

LUPE FURTADO

ESTUDOS COM A BUTIRILCOLINESTERASE HUMANA

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: Profª Dra. Eleidi Alice Chautard Freire Maia.

CURITIBA  
1997

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, imensamente, à professora Eleidi por ter me acolhido e nutrido com grande sabedoria e paciência.

Ao CNPq pela bolsa de Iniciação Científica e pelo auxílio à pesquisa. À FUNPAR por auxílios dados ao Laboratório de Polimorfismo e Ligação do Departamento de Genética da UFPR.

Aos professores Vânia M. Alcântara e Geraldo Picheth por cederem os antisoros para apolipoproteínas A1 e B.

Ao doutorando Ricardo L.R. de Souza pela orientação no desenvolvimento de técnicas e por todas as sugestões.

À Lilian pela inesgotável tranquilidade ao ensinar pequenos detalhes inúmeras vezes.

À Isolde pelo carinho e cuidado pelo Laboratório e por todos nós.

À amiga Duda pela competência e sensatez. Pela amizade e afeto.

Ao meu irmão Gunther e meu primo Vladi pelas tantas horas através dos meandros dos Sistemas Operacionais.

À Ny por ser, também, mãe do meu filho.

Ao mundo pela minha mãe.

## SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 - Aspectos Gerais	1
1.2 - Estrutura bioquímica da BChE	3
1.3 - Variabilidade Genética	3
1.3.1 - Loco BCHE	4
1.3.2 - Loco CHE2	4
1.3.2.1 - Banda Eletroforética C <sub>4</sub>	5
1.3.2.2 - Banda Eletroforética C <sub>2</sub>	6
1.3.2.3 - Banda Eletroforética C <sub>5</sub>	7
1.3.2.4 - Banda C <sub>4/5</sub>	9
1.4 - Lipídios e lipoproteínas	12
1.5 - Hiperlipidemias	13
1.6 - BChE e lipoproteínas alfa (HDL) e beta (LDL)	14
1.7 - BChE e metabolismo de lipídios e lipoproteínas	16
2 - OBJETIVOS	21
3 - JUSTIFICATIVAS DOS OBJETIVOS	22
3.1 - Justificativa do objetivo 1	22
3.2 - Justificativa do objetivo 2	23
4 - MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 - Amostra	26
4.2 - Materiais	26
4.3 - Metodologia	27

4.3.1 - Eletroforese em gel de ágar 1,4%, pH 5,37	27
4.3.2 - Eletroforese em gel de ágar 1,4%, pH 5,37 com adição de soluções salinas (3M e 0,9%)	28
4.3.3 - Eletroforese em gel de ágar 1,4%, pH 6,50	28
4.3.4 - Eletroforese em gel de ágar 1,4%, pH 6,50 com adição de soluções salinas (3M e 0,9%)	30
4.3.5 - Eletroforese em duas fases em gel de ágar 1,4%, pH 5,37 com adição de soluções salinas (3M e 0,9%)	30
4.3.6 - Eletroforese em duas fases em gel de ágar 1,4%, pH 6,50 com adição de soluções salinas (3M e 0,9%)	32
4.3.7 - Teste com antisoro para apolipoproteínas A1 e B	32
4.3.8 - Eletroforese em gel de ágar 1,4%, pH 5,37 com amostras tratadas com antisoro para apolipoproteína A1	33
4.3.9 - Eletroforese em gel de ágar 1,4%, pH 5,37 com amostras BCHE U e BCHE A do teste com antisoro para apolipoproteína B seguida por incubação com Ro2-0683	34
4.3.10 - Técnica para fenotipagem utilizando-se $\alpha$ - naftilacetato como substrato com amostras submetidas ao antisoro para apolipoproteína B	34
5 - RESULTADOS	37
5.1 - Verificação da hipótese da banda C <sub>4/5</sub> ser um complexo não-covalente entre BChE e outra substância	37
5.2 - Verificação da relação entre BChE e apolipoproteína B	41
5.3 - Verificação da relação entre BChE e apolipoproteína A1	49

5.4 - Comportamento eletroforético da BChE de plasma diluído 1:200 em salina fisiológica.....	49
6 - DISCUSSÃO.....	53
6.1 - Experimentos com soluções salinas.....	53
6.2 - Experimentos com antisoro para apolipoproteína B.....	54
6.3 - Experimentos com antisoro para apolipoproteína A1.....	56
6.4 - Comportamento eletroforético da BChE em plasmas diluídos 1:200 em solução salina fisiológica.....	58
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

## RESUMO

Este trabalho consiste em estudos com a butirilcolinesterase humana (BChE; EC 3.1.1.8), presente no plasma, através de experimentos eletroforéticos e imunológicos. As bandas C<sub>5</sub> e C<sub>4/5</sub>, parcialmente isoladas a partir do plasma após três horas de corrida eletroforética, foram submetidas a soluções salinas. A solução salina 3M mostrou-se capaz de desfazer, parcialmente, as bandas C<sub>5</sub> e C<sub>4/5</sub>. Este resultado vem a confirmar a sugestão feita por Souza (1995) de que a banda C<sub>4/5</sub> seja um complexo, mantido por forças iônicas, entre BChE e outra substância. O antisoro para apolipoproteína B pareceu provocar liberação de BChE, provavelmente presente na LDL. Foi encontrada atividade de BChE de coelho no antisoro para apolipoproteína B, porém menor do que no sobrenadante de plasma humano tratado com este antisoro. O antisoro para apolipoproteína A1 não provocou aumento na atividade da BChE e não foi encontrada BChE de coelho neste antisoro. Não foi possível, com base nas informações fornecidas pelos fabricantes, inferir o motivo da presença ou ausência de BChE nos antisoros de coelho para apolipoproteínas B e A1, respectivamente. O comportamento eletroforético da BChE, em plasma diluído 1:200 em solução salina fisiológica, apresentou-se variável: ausência de banda; banda anódica ou banda catódica.

## 1 - INTRODUÇÃO

### 1.1 - Aspectos Gerais

O soro de animais contém ésteres de diferentes tipos que são hidrolisados preferencialmente por enzimas chamadas de esterases. Estas esterases são enzimas séricas, classificadas em três tipos principais de acordo com seu substrato preferencial. As esterases aromáticas hidrolisam ésteres aromáticos, as aliesterases hidrolisam, preferencialmente, ésteres alifáticos e as colinesterases hidrolisam, com maior eficiência, ésteres de colina. As colinesterases são também diferenciadas por serem inibidas pela fisostigmina na concentração de  $10^{-5}M$  (Augustinsson, 1963).

No sangue humano existem dois tipos de colinesterases: a acetilcolinesterase (AChE) e a butirilcolinesterase (BChE). A acetilcolinesterase (EC 3.1.1.7) é encontrada nos eritrócitos, tendo como substrato preferencial a acetilcolina. A butirilcolinesterase hidrolisa vários ésteres de colina, sendo mais eficiente na hidrólise da butirilcolina. É também chamada colinesterase do soro, pseudocolinesterase, colinesterase não específica e colinesterase do tipo S. Segundo a Comissão de Enzimas da União Internacional de Bioquímica, a butirilcolinesterase é denominada acilcolina-acilhidrolase (EC 3.1.1.8).

As colinesterases também podem ser diferenciadas através das respostas frente a diferentes inibidores. Em doses terapêuticas de bambuterol (bisdimetilcarbamato de terbutalina) somente a BChE é inibida e em altas concentrações de acetilcolina somente a AChE é inibida.

A síntese da BChE ocorre no fígado. Esta enzima é também encontrada no plasma, músculo liso, pâncreas, adipócitos, pele, massa

branca do cérebro e coração (Wescoe e cols., 1947).

A função da BChE no organismo e o seu substrato natural permanecem desconhecidos. Existem hipóteses que relacionam a BChE à condução nervosa lenta, à regulação de níveis de colina e acetilcolina no plasma, à proteção da acetilcolinesterase, ao controle de permeabilidade e transporte de sódio e outros íons pela membrana e ao metabolismo de lipídios (revisão em Kutty, 1980; Whittaker, 1980; Whittaker, 1986).

Existem diversas formas moleculares da BChE presentes em um mesmo organismo. A BChE humana apresenta quatro formas moleculares principais identificadas através de eletroforese denominadas  $C_1$ ,  $C_2$ ,  $C_3$ ,  $C_4$  (Harris e cols., 1962). A forma  $C_1$  é um monômero,  $C_2$  é um monômero ligado à albumina através de ponte dissulfeto,  $C_3$  é um dímero e a forma  $C_4$ , que é responsável por 95% da atividade sérica da BChE, é um tetrâmero formado por subunidades idênticas, cada uma contendo um sítio ativo (Lockridge e cols., 1979; 1987; Masson, 1979).

Outra nomenclatura, baseada na estrutura molecular da BChE, foi sugerida em contraponto à nomenclatura baseada na mobilidade eletroforética (Masson, 1989). Esta nomenclatura propõe as designações  $G_1$ ,  $G_2$ ,  $G_3$  e  $G_4$ , de acordo com o número de subunidades moleculares. A forma  $C_1$  corresponde à forma globular monomérica, sendo denominada de  $G_1$ , a forma  $C_2$ , que é um monômero ligado à albumina, é referido como  $G_1$ -ALB, o dímero  $C_3$  é denominado  $G_2$  e o tetrâmero  $C_4$  corresponde à  $G_4$ . A designação  $G_3$  corresponde ao trímero de mobilidade intermediária entre  $C_3$  e  $C_4$  que se forma progressivamente a partir de  $C_4$  submetido à tripsina, plasmina e certas proteases.



## **1.2 - Estrutura bioquímica da BChE**

A estrutura primária da BChE humana, encontrada no plasma, é formada por uma cadeia de 574 aminoácidos ligada a nove cadeias de oligossacarídeos (Lockridge e cols., 1987). O peso molecular, calculado com base na sequência de aminoácidos e oligossacarídeos, é de 83.534 daltons.

As dificuldades na obtenção de cristais de uma glicoproteína com altos teores de açúcares, impossibilitaram, até agora, a determinação da estrutura terciária da BChE humana.

A grande homologia entre BChE e AChE possibilitou a Millard e Broomfield (1992) a proposição de um modelo para a BChE humana derivado por análise computacional. Neste modelo, as nove cadeias de oligossacarídeos estão distribuídas longe da entrada do sítio ativo, não indicando interações entre estas cadeias e as moléculas do substrato.

Várias formas moleculares da BChE são encontradas no plasma. Dentre as formas principais, a forma C<sub>4</sub> é um tetrâmero formado por um dímero de dímeros, onde cada dímero é constituído por dois monômeros unidos por uma ligação dissulfeto entre os resíduos Cys571. A ligação entre os dímeros que se unem para formar o tetrâmero C<sub>4</sub> se processa através de interações não covalentes (Lockridge e cols., 1987).

## **1.3 - Variabilidade Genética**

As evidências da provável existência de um único gene que codifica a BChE, bem como a estrutura deste gene foram mostradas por Arpagaus e cols. (1990). O gene da BChE tem cerca de 73 quilobases e possui quatro exons formados por 2.416 pares de bases. A BChE é uma enzima polimórfica, sendo a maioria das variantes genéticas codificadas pelo loco da BChE.

### 1.3.1 - Loco BCHE

Durante a década de 50, o início do uso da succinilcolina como relaxante muscular pré-operatório causou, em alguns pacientes, paralisia muscular e apnéia respiratória prolongada. Esta resposta incomum observada em alguns pacientes submetidos à succinilcolina em doses fisiológicas, possibilitou a descoberta da variabilidade genética da BChE. A menor eficiência na hidrólise da succinilcolina não é devida a uma concentração insuficiente da enzima usual mas à presença de uma enzima não-usual determinada pelo loco BCHE.

Os diversos alelos do loco BCHE, já identificados, são: BCHE\*U; BCHE\*K; BCHE\*A; BCHE\*F1; BCHE\*F2; BCHE\*J; BCHE\*H; BCHE\*NFDL e vários alelos silenciosos. Os alelos do loco BCHE podem ser identificados por inibição enzimática (Kalow e Staron, 1957). O uso dos inibidores DL-propranolol e Ro2-0683 [dimetilcarbamato de brometo de (2-hidroxi-5-fenil-benzil) trimetil amônio] e de acetato de  $\alpha$ -naftila como substrato (Alcântara e cols., 1991; Picheth e cols., 1994) fornece uma boa separação dos diversos fenótipos. Dibucaína e fluoreto de sódio também podem ser utilizados como inibidores buscando-se evidenciar variantes fenotípicas do loco BCHE.

A análise direta de DNA para identificação das mutações responsáveis pela codificação de algumas das variantes genéticas da BChE vem sendo utilizada mais recentemente.

As enzimas não usuais apresentam, geralmente, menor média de atividade quando comparadas à enzima usual.

### 1.3.2 - Loco CHE2

Em eletroforese bidimensional em papel e gel de amido, além das bandas C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub>, Harris e cols. (1962) e Harris e cols. (1963b)

encontraram uma banda que foi denominada C<sub>5</sub>. Esta banda encontrava-se presente em apenas 4,6% da amostra e não apresentava alelismo em relação às variantes do loco BCHE. O loco responsável pela banda C<sub>5</sub> foi chamado CHE2 e apresenta os alelos CHE2\*C5+ e CHE2\*C5- responsáveis, respectivamente, pela presença e pela ausência da banda C<sub>5</sub>. Sugimori (1986) demonstrou que os indivíduos CHE2 C5+ são menos sensíveis à succinilcolina que os indivíduos CHE2 C5-. Harris (1980) relata que indivíduos com fenótipo CHE2 C5+ apresentam atividade média da BChE cerca de 30% superior à de indivíduos CHE2 C5-.

Foi proposto um padrão de herança autossômico dominante para a presença da banda C<sub>5</sub> (Harris e cols., 1962). Existem, porém, registros de famílias onde são observados filhos CHE2 C5+ provenientes de casais CHE2 C5-.

É possível uma melhor separação entre a banda C<sub>5</sub> e o conjunto de bandas C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> através da técnica de eletroforese em gel de ágar ácido originalmente desenvolvida por Robinson e cols. (1957) para variantes de hemoglobina e aplicada por Van Ros e Vervoort (1973) para a BChE. A banda C<sub>5</sub> migra para o polo positivo e a banda formada por C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub> migra para o polo negativo devido à eletroendosse causada pelo ágar.

#### **1.3.2.1 - Banda Eletroforética C<sub>4</sub>**

Existe evidência estrutural e cinética de que a banda C<sub>4</sub> não é homogênea, embora C<sub>4</sub> migre como uma única espécie em géis não desnaturantes. A banda C<sub>4</sub> é formada por quatro subunidades unidas por fortes ligações não covalentes, sendo o conjunto estabilizado pelas pontes dissulfeto inter-dímeros (Lockridge e cols., 1979). Foi observado (La Mota e cols., 1968; Masson, 1979; 1991) que pode ocorrer dissociação espontânea de parte de C<sub>4</sub> em C<sub>1</sub> e C<sub>3</sub>. Plasma ou C<sub>4</sub> purificado por pressão hidrostática (3,5 Kbar) quando submetidos a

tratamento físico drástico ou ultrasons, demonstram perdas progressivas da atividade da BChE com a geração de monômeros e dímeros. Não ocorre dissociação completa de  $C_4$  sem a adição de agente desnaturante, o que pode sugerir que uma parte do  $C_4$  encontrado apresenta-se fragilizada. Lockridge e La Du (1982) e Lockridge e cols. (1987) verificaram que o tratamento de  $C_4$  com tripsina cliva o peptídeo C-terminal onde se encontra a ponte dissulfeto intercadeias, diminuindo a estabilidade do tetrâmero e levando-o à dissociação em monômeros, dímeros e trímeros ativos ( $G_1$ ,  $G_2$ , e  $G_3$ ). As propriedades moleculares de mobilidade destas formas correspondem, respectivamente, às formas de ocorrência natural  $C_1$  e  $C_3$  e ao trímero gerado sob a ação de proteínas de coagulação sobre  $C_4$ . Em gel de SDS (dodecil sulfato de sódio) em condições não redutoras, utilizando-se preparações altamente purificadas de  $C_4$ , observa-se uma banda de monômero que evidencia a presença de  $C_4$  desprovida de ponte dissulfeto.

Cada tetrâmero, que corresponde à forma  $C_4$ , contém quatro sítios ativos. Números mais baixos de sítios ativos têm sido descritos, o que pode ser explicado pela presença no plasma de uma grande quantidade de BChE inativa ou pela inativação da enzima durante a purificação (Masson e Goasdoué, 1986; *apud* Masson, 1991).

#### **1.3.2.2 - Banda Eletroforética $C_2$**

Através da análise de Ferguson, baseada nos padrões de amostras em gel de eletroforese, foi possível estimar a massa molecular de  $C_2$  em 150 KDa e verificar que a razão carga/massa foi diferente daquela encontrada nas formas  $C_1$ ,  $C_3$  e  $C_4$  (Masson, 1979).

O ponto isoelétrico (Masson, 1979) e a mobilidade em tampões alcalinos (Harris e cols., 1962 e Masson e Anguille, 1980; *apud*

Masson, 1991) de C<sub>2</sub> verificam-se ligeiramente maiores em relação a estes mesmos parâmetros observados nos seus isômeros de tamanho.

A liberação de C<sub>1</sub> ativo, a partir da redução de C<sub>2</sub> em condições suaves, permitiu a conclusão de que C<sub>2</sub> é um dímero formado pela associação entre C<sub>1</sub> e uma proteína com 65 KDa através de uma ponte dissulfeto exposta por solvente. A subunidade menor é responsável pelas propriedades elétricas específicas. Em eletroforese posterior à imunoabsorção para albumina, a banda C<sub>2</sub> não aparece, demonstrando portanto, que a imunoabsorção para albumina consegue remover C<sub>2</sub>. A banda C<sub>2</sub> (C<sub>1</sub>-ALB) é, portanto, um conjugado covalente entre o monômero C<sub>1</sub> e a albumina (Masson, 1989).

#### 1.3.2.3 - Banda Eletroforética C<sub>5</sub>

BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS/UFPA

A estrutura da banda eletroforética C<sub>5</sub> permanece desconhecida.

Harris e cols. (1963a) estudaram a segregação em duas famílias com alelos BCHE\*U e BCHE\*A e verificaram sua independência em relação à banda C<sub>5</sub>. A banda C<sub>5</sub> é determinada, em parte pelo loco BCHE, em parte pelo loco CHE2. A participação do loco BCHE na determinação da banda C<sub>5</sub> é verificada pelo uso do inibidor Ro2-0683 que inibe as bandas C<sub>4</sub> e C<sub>5</sub>, totalmente em soros BCHE U e parcialmente em soros BCHE A.

Uma associação entre a BChE e uma proteína codificada pelo loco CHE2 foi proposta por Scott e Powers (1974) como a provável formação da banda C<sub>5</sub>. Tortolero e Medina (1978) propõem que a banda C<sub>4</sub>, através de modificações que não alteram o seu peso molecular, dá origem à banda C<sub>5</sub>. Ohkawa e cols. (1988) sugerem que C<sub>5</sub> seja um conjugado entre C<sub>4</sub> e lipídio.

Masson (1991), baseado em seu trabalho anterior (1989) onde demonstrou que a isoenzima C<sub>2</sub> é formada pela associação entre BChE e

albumina, considera que é possível supor uma origem semelhante para a formação de C<sub>5</sub> e sugere que C<sub>5</sub> seja uma banda híbrida, formada pela banda C<sub>4</sub> associada a outra proteína (X). Vários experimentos foram realizados na tentativa de estabelecer a estrutura de C<sub>5</sub>. Eletroforese em gel de poliacrilamida e comparação com um padrão de peso molecular mostrou que o peso molecular de C<sub>5</sub> é de 400KDa. Este valor de 400KDa é 60KDa maior que o peso molecular de C<sub>4</sub>, podendo esta diferença ser atribuída à proteína X que se liga à C<sub>4</sub> para a formação de C<sub>5</sub>. O logaritmo da mobilidade de C<sub>4</sub> e C<sub>5</sub> versus a concentração do gel fornece a razão carga/massa. Uma comparação entre a razão carga/massa de C<sub>5</sub> e a razão carga/massa de C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> e C<sub>4</sub> demonstrou que o valor verificado em C<sub>5</sub> era diferente dos demais. O tratamento com tripsina, bem como altas concentrações de sal (NaCl 1,5-4,0M) causam a dissociação de C<sub>5</sub> originando C<sub>4</sub>. A banda C<sub>5</sub> não se dissocia sob a ação de agentes redutores ou pressão de 3,5 Kbar. O ponto isoelétrico de C<sub>4</sub> é de 3,50 e o ponto isoelétrico de C<sub>5</sub> foi estimado em 3,95. Todos estes resultados indicam que C<sub>5</sub> é formado pela associação entre C<sub>4</sub>, através de ligações não covalentes e com predomínio de interações iônicas, e uma proteína. Neste mesmo trabalho, Masson (1991) procurou identificar a proteína X. Os resultados obtidos não permitiram a identificação desta proteína mas descartaram várias hipóteses. A análise de géis corados de eletrofereses de plasmas CHE2 C5+ incubados por 30 minutos em soluções tamponadas de bambuterol (10<sup>-8</sup>-10<sup>-4</sup>M) mostrou curvas de inibição paralelas para C<sub>4</sub> e C<sub>5</sub>. Estas curvas de inibição paralelas observadas para C<sub>4</sub> e C<sub>5</sub>, frente a um inibidor específico da BChE (bambuterol), demonstram que a banda C<sub>5</sub> não é um híbrido de AChE/BChE. Experimentos por imunoadsorção e imunodeteção descartaram a possibilidade de C<sub>5</sub> ser um agregado de C<sub>2</sub>. A possibilidade de que C<sub>5</sub> poderia ser uma imunoglobulina foi considerada desde que Gallango (1969) detectou C<sub>5</sub> em sangue de pacientes com mieloma, porém

anticorpos contra cadeias k e l de imunoglobulina não detectaram tal fragmento. A banda C<sub>5</sub> não se apresentou sensível à colagenase, descartando a possibilidade da substância X ser identificada como colágeno. O mapeamento do gene da fibronectina como pertencente ao cromossomo 2 (Koch e cols., 1982; apud Masson, 1991), próximo à região designada para CHE2 (Eiberg e cols., 1989), levantou a possibilidade de C<sub>5</sub> ser formado pela associação de C<sub>4</sub> com fragmento de fibronectina. Esta hipótese foi rejeitada pois C<sub>5</sub> não foi reconhecido por anticorpos policlonais para fibronectina humana.

#### 1.3.2.4 - Banda C<sub>4/5</sub>

A banda C<sub>4/5</sub> foi encontrada pela primeira vez por Souza (1995) quando tentava padronizar a técnica de eletroforese em gel de ágar ácido de Robinson e cols. (1957) com modificações de Van Ros e Vervoort (1973) e Fadel-Picheth (1991) para posterior quantificação da banda C<sub>5</sub>. Eletroforeses em gel de ágar ácido com pH diminuído mostraram bandas na posição da banda C<sub>5</sub> em amostras anteriormente tipadas como CHE2 C<sub>5</sub>-. Primeiramente esta nova banda foi chamada de C<sub>5</sub>- pois foi, de início, observada em indivíduos com fenótipo CHE2 C<sub>5</sub>-. A nomenclatura foi modificada para C<sub>4/5</sub> pois a nova banda aparece na posição de C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> em gel de ágar de pH 6,7 e na posição da banda C<sub>5</sub> em gel de ágar de pH 5,3.

A paraoxonase é uma enzima sérica que, assim como a BChE, é capaz de hidrolisar o acetato de  $\alpha$ -naftila. Considerando-se o substrato comum (acetato de  $\alpha$ -naftila) à paraoxonase e à BChE foi levantada a possibilidade de C<sub>4/5</sub> ter atividade de paraoxonase. A banda C<sub>4/5</sub> não foi inibida pelo EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) que é inibidor da paraoxonase, descartando-se assim a possibilidade de C<sub>4/5</sub> ser paraoxonase (Souza, 1995).

A amostra de um indivíduo com fenótipo não-usual (BCHE A) para o loco BCHE foi submetida à eletroforese em gel de ágar de pH 5,3 e incubada com o inibidor da BChE Ro2-0683 por uma hora antes da coloração da eletroforese. A banda  $C_{4/5}$ , assim como a banda  $C_4$ , foi parcialmente inibida. Amostras de indivíduos com fenótipo usual (BCHE U) para o loco BCHE foram submetidas ao mesmo tratamento que a amostra BCHE A e as bandas  $C_{\#}$  e  $C_{4/5}$  foram totalmente inibidas (Souza, 1995).

Experimentos de isolamento de  $C_{4/5}$  e posterior eletroforese dos isolados forneceram informação a cerca da mobilidade eletroforética desta banda. A banda  $C_{4/5}$  teve o mesmo comportamento já observado pela banda  $C_5$ , isto é, a formação de duas bandas (Souza, 1995). Baseado nestes resultados, Souza (1995) sugeriu que, como ocorre na banda  $C_5$ , a banda  $C_{4/5}$  poderia ser formada pela associação da BChE a uma outra substância. A metodologia utilizada por Souza (1995) em seus experimentos não seria capaz de romper ligações covalentes, excluindo desta forma, a possibilidade de  $C_{4/5}$  ser  $C_2$  pois a ligação com a albumina é covalente. A banda  $C_{4/5}$  não pode ser considerada como  $C_1$  ou  $C_3$  pois estas bandas não estão associadas a nenhuma substância não podendo, desta forma, produzir duas bandas como ocorreu com  $C_{4/5}$  após os experimentos de isolamento.

Souza (1995) não obteve resultados conclusivos ao testar a hipótese de que as substâncias que se ligam à BChE para formar as bandas  $C_{4/5}$  e  $C_5$  sejam condicionadas pelo loco CHE2. A banda  $C_{4/5}$  foi observada, sem variação na mobilidade eletroforética, em uma amostra de 311 indivíduos de Curitiba e 67 índios Guarani todos com fenótipo CHE2  $C_5^-$ . Uma amostra de 71 índios Guarani, todos com fenótipo CHE2  $C_5^+$ , apresentou a banda  $C_{4/5}$ , o que pode indicar que se a banda  $C_{4/5}$  não for condicionada pelo loco CHE2 poderá ser considerada como monomórfica.



Os resultados obtidos por Masson (1991) ao tratar com tripsina  $C_5$  purificada do plasma mostraram que a banda  $C_5$  foi convertida em  $C_4$ . Visando caracterizar, sob diversas condições, o comportamento das bandas  $C_{4/5}$  e  $C_5$ , Diniz (1996) verificou o efeito da tripsina sobre a banda  $C_5$  não purificada, utilizando plasma total. A tripsina na concentração de 1000 mg/ $\mu$ l levou a um completo desaparecimento da banda  $C_5$ . A possível banda  $C_4$ , recém formada pela ação da tripsina sobre  $C_5$ , não pôde ser isolada do grupo de bandas  $C_1$  a  $C_4$  que já se encontravam no plasma, pois neste experimento a banda  $C_5$  não foi anteriormente purificada. Baseando-se nos resultados de Masson (1991) com a banda  $C_5$  purificada, Diniz (1996) sugere que  $C_5$  tenha se transformado em  $C_4$ . A banda  $C_{4/5}$  foi submetida a tratamentos com tripsina sob as mesmas condições dos tratamentos para a banda  $C_5$ . A tripsina não causa nenhuma alteração à banda  $C_{4/5}$ , resultado este que descarta as possibilidades desta banda ser o complexo  $C_2$  ou associação entre BChE e  $\alpha$ -2-macroglobulina, pois estes complexos são desfeitos pela tripsina.

Segundo Masson (1991), o complexo  $C_5$  submetido a altas concentrações salinas (1,5 a 4 M) dissocia-se em  $C_4$  e substância "X". Diniz (1996) submeteu plasmas a altas concentrações de solução salina, visando verificar o comportamento da banda  $C_{4/5}$  e utilizando a banda  $C_5$  como controle. Os resultados obtidos por Diniz (1996) foram diferentes daqueles descritos por Masson (1991), pois a banda  $C_5$  não se dissociou quando submetida à solução salina. Em seus experimentos Diniz (1996) utilizou plasma como fonte de  $C_5$  e de  $C_{4/5}$ . Masson (1991) não descreve os procedimentos utilizados nos seus tratamentos com salina, sendo possível supor que o autor tenha utilizado  $C_5$  após isolamento a partir de soro ou plasma. Diniz (1996) sugere que substâncias presentes no plasma protejam  $C_5$  da ação do sal impedindo sua dissociação. O cloreto de sódio não agiu sobre a banda

C<sub>4/5</sub> porém, como não foi observada a dissociação de C<sub>5</sub>, Diniz (1996) sugere que o comportamento da banda C<sub>4/5</sub> frente a altas concentrações salinas deve ser verificado a partir do tratamento do isolado de C<sub>4/5</sub>.

#### **1.4 - Lipídios e lipoproteínas**

Os lipídios são substâncias que, devido a sua natureza hidrofóbica, não podem ser transportados livremente no plasma, devendo ser transportados no interior de estruturas hidrofílicas. As lipoproteínas são partículas formadas por apoproteínas de caráter hidrofílico e por lipídios transportados no interior do complexo lipoproteico. Os lipídios constituintes das lipoproteínas são o colesterol e seus ésteres, fosfolipídios e triglicerídeos.

As lipoproteínas são classificadas de acordo com sua densidade, composição lipídica e composição proteica. Quanto à densidade são classificadas como: quilomicrons, lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), lipoproteínas de densidade baixa (LDL), lipoproteínas de densidade alta (HDL) e lipoproteínas de densidade muito alta (VHDL). Com o aumento da fração proteica, aumenta a densidade da lipoproteína, diminuindo proporcionalmente o conteúdo lipídico. De acordo com a composição lipídica, os quilomicrons e as VLDL contêm principalmente triglicerídeos, as LDL transportam predominantemente colesterol esterificado, as HDL transportam fosfolipídios e as VHDL são complexos de ácidos graxos livres e albumina ou fosfolipídios e albumina. Em relação à parte proteica, as lipoproteínas são classificadas em seis famílias de apoproteínas (A-F) que são também separadas em subgrupos. Algumas apolipoproteínas são encontradas preferencialmente em determinado tipo de lipoproteína. Nas HDL são encontradas, preferencialmente, apolipoproteínas A1 e A2, nas LDL apolipoproteína B100 e nas VLDL apolipoproteína C.

Os quilomicrons, sintetizados e secretados pela mucosa intestinal, transportam, principalmente, triglicerídeos exógenos. As VLDL, que transportam preferencialmente triglicerídeos endógenos, são secretadas, em forma nascente, pelo fígado. As LDL são possivelmente formadas a partir das VLDL circulantes e da degradação de quilomicrons. Transportam, essencialmente, colesterol exógeno e endógeno para os tecidos extra-hepáticos. As HDL são secretadas pelo fígado e provavelmente pelo intestino delgado e por outros órgãos. Transportam o colesterol dos tecidos periféricos para o fígado onde é degradado produzindo ácidos biliares.

### **1.5 - Hiperlipidemias**

As hiperlipidemias são distúrbios metabólicos caracterizados por um nível elevado de uma ou mais lipoproteínas. Estes distúrbios foram classificados por Fredrickson e cols. (1967), sendo a classificação posteriormente modificada por Beaumont e cols. (1970). Esta classificação sugere seis tipos de hiperlipidemias: tipo I, caracterizada por um aumento no nível de quilomicrons (hiperlipemia exógena); tipo II-a, com aumento no nível de LDL (hipercolesterolemia); tipo II-b, detectada pelo aumento de LDL e VLDL (hiperlipemia combinada); tipo III, caracterizada por um aumento de VLDL remanescente rica em colesterol e triglicerídeos (hiperlipemia remanescente); tipo IV, onde se observa aumento de VLDL (hiperlipemia endógena) e tipo V, onde é característico aumento nos níveis de quilomicrons e VLDL (hiperlipidemia).

As hiperlipidemias podem ser de origem primária ou secundária. Aquelas de origem secundária advêm de distúrbios sistêmicos como diabetes, obesidade, hipotireoidismo, alcoolismo, etc.

## 1.6 - BChE e lipoproteínas alfa (HDL) e beta (LDL)

Diversos estudos, com diferentes metodologias, mostram que existe relação entre BChE e lipoproteínas alfa e beta. Apesar de não ter sido propriamente esclarecida a forma de associação, os resultados desses estudos apontam para uma ligação física entre BChE e LDL e entre BChE e HDL.

Lawrence e Melnick (1961) encontraram traços de atividade da BChE na lipoproteína beta, atividade esta que se tornou maior após o tratamento do soro com ultrassom. Estes resultados levaram os autores a sugerirem que a LDL formaria um complexo com a BChE, formado por ligação física e facilmente desfeito por oscilação sônica. Dubbs (1966) expôs amostras de soros, por diferentes períodos de tempo, à radiação sônica. Os resultados deste experimento, obtidos através de eletroforeses em gel de amido, mostraram que ocorria aumento de atividade da BChE após tratamento com ultrassom. Verificou também que exposições prolongadas por duas horas destruíam a atividade da enzima.

De acordo com Kutty e Acharya (1972), inibidores da BChE, como a fisostigmina, desestabilizam a lipoproteína LDL. Em um trabalho posterior, Kutty e cols. (1973) verificaram a atividade da BChE em coelhos tratados com endotoxina de E.coli, que provoca hiperlipoproteinemia. Observaram aumento na atividade da BChE e na concentração de VLDL após 24 horas de tratamento. Entre 48 e 72 horas, verificaram redução de VLDL e da BChE e simultâneo aumento de LDL e HDL. Estes resultados levaram os autores a proporem que a LDL seria formada pela ligação da pré-LDL com a BChE. Ainda neste trabalho, Kutty e cols. (1973) verificaram que LDL humana, tratada com fosfolipase D, libera BChE, apresentando mobilidade eletroforética alterada.

Analisando a atividade da BChE em um paciente acidentalmente intoxicado pelo organofosforado parathion, Kutty e cols. (1975) observaram que, tanto a atividade da enzima quanto a concentração de LDL, encontravam-se diminuídas. Cobaias, tratadas com o organofosforado iodeto de fosfolina, apresentaram o mesmo comportamento no que se refere à atividade enzimática e ao conteúdo de LDL. Fundamentando-se nestes resultados, os autores sugeriram que a queda no nível de LDL pudesse ser causada pela diminuição da BChE. É possível, porém, sugerir que a hepatotoxicidade destes organofosforados pudesse causar alterações no metabolismo lipídico, sem relação direta com a queda na atividade da BChE.

Kutty e cols. (1977) verificaram a atividade da BChE em precipitados de LDL e observaram que a atividade da enzima no precipitado era quase que diretamente proporcional à concentração desta lipoproteína observada no soro. Demonstraram ainda, através de incorporação de H<sup>3</sup>-lisina, que camundongos, tratados com o inibidor da BChE neostigmina, apresentavam diminuição da síntese de lipoproteína beta e aumento da síntese de lipoproteína alfa. Sugeriram, concordando com sua hipótese sugerida em trabalho anterior (Kutty e cols., 1973), que a VLDL formaria HDL e pré-LDL que se ligaria à BChE formando LDL.

Ryhänen e cols. (1982) observaram que dentre as frações de lipoproteínas, a fração de VHDL era a que mostrava maior atividade da BChE. Buscando verificar uma possível relação entre a concentração de colesterol e triglicerídeos e a atividade da BChE, mediram os níveis destes lipídios nas diferentes frações lipoproteicas. Observaram que a fração com maior nível de colesterol era a LDL e a fração com maior concentração de triglicerídeos era a VLDL. Após lavagem das frações, mostraram-se aumentadas, na fração de LDL, a concentração de colesterol e a atividade da BChE. Nas frações de HDL e VHDL

observaram, após a lavagem, aumento de colesterol e diminuição na atividade da BChE. Em gel de poliacrilamida foram detectadas oito bandas com atividade de BChE no soro total e nas frações de HDL e VHDL. Na fração de LDL foram observadas duas bandas com atividade da BChE e após a lavagem foram observadas três bandas. Os autores sugeriram que a lavagem remove inibidores da BChE presentes na fração LDL. Estes resultados vieram a fortalecer a hipótese, já anteriormente sugerida (Puhakainen e cols., 1980; Kutty e cols., 1981), de que na LDL o aumento de colesterol acarreta um aumento da atividade da BChE, enquanto que na HDL o colesterol inibe a atividade enzimática.

Em estudos com pacientes hipertensos, Magarian e Dietz (1987) verificaram correlação positiva entre atividade da BChE e as concentrações de colesterol (LDL-C, HDL-C, VLDL-C, total) e de triglicerídeos. Observaram correlação negativa entre a atividade da BChE e as razões colesterol da HDL/colesterol total e colesterol da HDL/colesterol da LDL. Observaram que seus resultados estavam em concordância com resultados anteriores que indicavam relação entre BChE e metabolismo lipoproteico. Magarian e Dietz (1987) sugeriram que talvez não houvesse relação de causa e efeito mas apenas ligação física da BChE com LDL e HDL.

### **1.7 - BChE e metabolismo de lipídios e lipoproteínas**

Apesar do papel da butirilcolinesterase ainda não ter sido esclarecido, muitos estudos sugerem que a BChE está relacionada ao metabolismo de lipídios e às lipoproteínas. Hutchinson e cols. (1951) observaram que homens subnutridos que se recuperavam e tornavam-se gordos mostravam atividade elevada da BChE. Berry e cols. (1954), baseando-se nos resultados de Hutchinson e cols. (1951), estudaram a relação entre gordura superficial e atividade da BChE em 345 homens

ingleses considerados em equilíbrio metabólico. Foi verificada correlação positiva entre a atividade da BChE e a gordura superficial, correlação esta que não era afetada pelo consumo de calorias e apenas levemente influenciada pelo peso. Trabalhos anteriores (Antopol e cols., 1937; Faber, 1943; Cristol e cols., 1946) mostravam que ocorria um aumento na atividade da BChE em pacientes com diabetes que é um distúrbio que aumenta a demanda de gordura. Estes resultados levaram Berry e cols. (1954) a sugerirem uma relação entre BChE e metabolismo de gorduras. Clitherow e cols. (1963) propuseram que o papel da BChE no metabolismo de lipídios seria hidrolisar ésteres de colina, preferencialmente butirilcolina, que são subprodutos do catabolismo de ácidos graxos livres e da lipogênese no fígado. Desta forma, tanto um aumento na disponibilidade e/ou fluxo de ácidos graxos livres para o fígado quanto um aumento da lipogênese a partir de carboidratos, poderiam levar a dois efeitos: hiperlipemia e atividade elevada da BChE. Os resultados de Cucuianu e cols. (1968) vieram a concordar com a hipótese sugerida por Clitherow e cols. (1963). O trabalho de Cucuianu e cols. (1968) consistia em examinar quatro grupos de indivíduos com relação aos níveis de colesterol e triglicerídeos (lipídios séricos) e de atividade da BChE. Estes quatro grupos consistiam de um grupo controle normolipêmico com peso normal, um grupo de obesos normolipêmicos, um grupo controle hiperlipêmico com peso normal e um grupo de obesos hiperlipêmicos. Os resultados obtidos neste trabalho mostraram elevação significativa da atividade da BChE nos grupos não-controle, mostrando também que para um mesmo nível de lipídios séricos ocorria um aumento na atividade da BChE em indivíduos obesos.

Cucuianu e cols. (1978) analisaram indivíduos hiperlipoproteinêmicos dos tipos II-a, misto, IV e V, bem como

indivíduos normais e obesos, em relação aos níveis de colesterol, triglicerídeos, LCAT e BChE. Os resultados mostraram que as enzimas LCAT e BChE têm as atividades correlacionadas entre si, com a concentração de colesterol e com o logarítimo da concentração de triglicerídeos. As atividades das duas enzimas mostraram-se significativamente mais altas nos indivíduos obesos e hiperlipêmicos, à exceção do tipo II-a. Considerando que o aumento das duas enzimas era devido à aceleração da cinética no transporte de lipoproteínas, os autores sugeriram que no tipo II-a, onde não fora observado aumento da atividade das enzimas, o defeito seria causado por retardo no catabolismo da LDL.

Chu e cols. (1978) estudaram indivíduos hiperlipêmicos dos tipos II-a, II-B e IV quanto aos níveis de BChE no soro e em precipitados de LDL. Observaram atividade da BChE aumentada no precipitado de LDL dos três tipos de hiperlipêmicos, enquanto que no soro a atividade aparecia aumentada apenas nos tipos II-b e IV, o que veio a concordar com os resultados de Cucuianu e cols. (1978). Nesse mesmo trabalho Chu e cols. (1978) verificaram aumento da atividade da BChE concomitante com aumento de LDL, colesterol e triglicerídeos, no soro bem como no precipitado de LDL. Estes resultados levaram os autores a sugerirem que uma parte da colinesterase encontra-se livre no soro e outra parte ligada à LDL.

Estudando dois grupos de camundongos diabéticos e obesos, assim como os respectivos grupos de controles normais, Kutty e cols. (1981) verificaram atividade da BChE significativamente elevada no fígado e no soro dos camundongos diabéticos e geneticamente obesos. Os camundongos normais tratados com tioglucose também mostraram atividade da BChE significativamente maior. Após jejum de 24 horas a atividade da BChE, no fígado de camundongos diabéticos, reduziu-se a cerca de 40%. Nos camundongos obesos, o excesso de calorías leva à



indução da atividade da BChE no fígado e à sua supressão no tecido adiposo, sugerindo que um dos intermediários do metabolismo de lipídios e carboidratos funcione como indutor ou repressor da BChE.

Ryhänen e cols. (1984) estudaram, em coelhos, os efeitos de organofosforados sob a atividade das enzimas BChE,  $\gamma$ -GT e LCAT. Verificaram que após o uso do organofosforado dichlorvos não alterava a atividade da LCAT e diminuía a atividade da BChE e da  $\gamma$ -GT. O uso deste organofosforado não influenciou na concentração de VLDL, aumentou a concentração de HDL, triglicerídeos e ácidos graxos esterificados e baixou a concentração de LDL e de colesterol. Nousiainen e Ryhänen (1984), estudando o efeito do organofosforado dissulfiram em ratos, observaram que após a administração do organofosforado ocorreu diminuição da atividade da BChE e simultâneo aumento dos níveis séricos de colesterol. Estes resultados não estão de acordo com a hipótese de Kutty e cols. (1973,1977) onde foi sugerido que ocorre uma ligação entre pré-LDL e BChE, produzindo LDL. Nousiainen e Ryhänen (1984) sugeriram que os organofosforados, além de inibirem a BChE, induziriam mais receptores de LDL. Como hipótese alternativa, sugeriram que os organofosforados inibiriam a enzima HMG-CoA-redutase, reguladora da biossíntese do colesterol. O comportamento oposto da BChE e da HDL, posterior à administração do organofosforado, poderia ser atribuído à inibição de LCAT, que usa HDL como substrato.

Após o tratamento de ratos com aloxana, utilizado para provocar diabete, Deshmukh (1986) verificou um aumento significativo da BChE e do colesterol na fração LDL+VLDL.

Estudos em nosso laboratório mostraram associação positiva entre atividade da BChE e peso (Stueber-Odebrecht e cols., 1985). Em trabalho posterior foi encontrada média de peso inferior (cerca de

seis quilos a menos) em indivíduos CHE2 C5+ de banda C<sub>5</sub> forte, quando comparados a seus controles CHE2 C5- (Chautard-Freire-Maia e cols., 1991). No mesmo estudo, Chautard-Freire-Maia e cols. (1991) encontraram correlação positiva entre peso e atividade da BChE no grupo de fenótipo CHE2 C5+ de banda fraca e ausência de correlação no grupo de fenótipo CHE2 C5+ de banda forte. No grupo de fenótipo CHE2 C5+ de banda fraca não se verificou diferença na média de peso com relação ao grupo controle de fenótipo CHE2 C5-. Cinco anos mais tarde, Alcântara e cols.(1996) encontraram peso médio inferior (cerca de 5 Kg) no grupo de fenótipo CHE2 C5- de banda C<sub>4/5</sub> fraca, quando comparado com o controle CHE2 C5- de banda C<sub>4/5</sub> forte.

## 2 - OBJETIVOS

1 - Tentar confirmar a hipótese (Souza, 1995) da banda C<sub>4/5</sub> ser um complexo formado pela associação entre BChE e outra substância, com predomínio de ligações iônicas.

2 - Verificar a mobilidade eletroforética e a atividade da BChE após tratamento do plasma com antisoros (anti-apo A1 e anti-apo B).

### 3 - JUSTIFICATIVAS DOS OBJETIVOS

#### 3.1 - Justificativa do objetivo 1

Souza (1995) realizou experimentos com a banda  $C_{4/5}$  isolada após eletroforese em gel de ágar de pH 5,3 e novamente submetida à eletroforese em gel de ágar de mesmo pH. Os resultados da segunda eletroforese mostraram que a banda  $C_{4/5}$  formou uma banda na posição de  $C_1$  a  $C_4$  e outra na posição de  $C_5$ . Baseando-se nestes resultados, Souza (1995) sugere que a banda  $C_{4/5}$  seja um complexo formado pela associação da BChE com outra substância, provavelmente por ligações iônicas pois ligações covalentes não se romperiam com o procedimento utilizado no experimento.

Masson (1991), ao realizar tratamentos com soluções salinas concentradas, observou que o complexo  $C_5$  sofria dissociação formando  $C_4$  e substância "X". Esta dissociação observada em  $C_5$  indica que o complexo não é formado através de ligações covalentes. Diniz (1996), buscando caracterizar o comportamento da banda  $C_{4/5}$  frente a soluções salinas em altas concentrações, utilizou amostras de plasma de indivíduos com fenótipos CHE2  $C_5^-$  e CHE2  $C_5^+$ . Os resultados destes experimentos mostraram que não ocorreu dissociação das bandas  $C_5$  e  $C_{4/5}$ . A banda  $C_5$  foi utilizada como controle para  $C_{4/5}$  e sua não dissociação sugere divergência quanto aos procedimentos adotados nos experimentos realizados por Diniz (1996) e por Masson (1991). Não existe descrição dos procedimentos utilizados por Masson (1991) em seus experimentos e Diniz (1996) supõe que  $C_5$  tenha sido isolada a partir do soro ou plasma. Diniz (1996) sugere que o uso de  $C_5$  do plasma ao invés de  $C_5$  isolada (Masson, 1991) impediu a dissociação da banda  $C_5$  pois esta encontrava-se protegida da ação do sal. Assumindo que apenas o isolado da banda  $C_5$ , quando submetido a soluções salinas em altas concentrações, dissocia-se em  $C_4$  e substância "X", é

possível supor que o mesmo ocorra para a banda C<sub>4/5</sub>. O **objetivo 1** deste projeto é verificar o comportamento da banda C<sub>4/5</sub>, parcialmente isolada a partir do plasma submetido a eletroforese, frente a soluções salinas em altas concentrações.

### 3.2 - Justificativa do objetivo 2

Os diversos estudos, já realizados a respeito da relação entre BChE e LDL, fornecem uma boa base para o desenvolvimento de experimentos e análises correlatos.

BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS / UFPA

A existência de uma ligação física entre BChE e LDL, com a formação de um complexo relativamente instável, foi sugerida por Lawrence e Melnick (1961). Esta sugestão foi reforçada por experimentos que mostraram que soro humano, submetido à ultrassom, revelava aumento na atividade da BChE (Dubbs, 1966). Kutty e Acharya (1972) demonstraram que a fisostigmina (inibidor da BChE) é capaz de desestabilizar a LDL. Tratamento, *in vitro*, da LDL com fosfolipase D gerava liberação de BChE e simultânea alteração na mobilidade eletroforética da lipoproteína. Estes resultados tornaram possível a sugestão de que a ligação da BChE com a LDL ocorra na fosforilcolina da leticina. É importante lembrar a relação estrutural bastante próxima entre fosforilcolina e acetilcolina que é um substrato da BChE. No mesmo trabalho, os autores (Kutty e Acharya, 1972) constataram que coelhos tratados com endotoxina de E.coli, para induzir hiperlipidemia, mostraram aumento na atividade da BChE e na concentração de VLDL após 24 horas de tratamento. No período entre 48 e 72 horas de tratamento, observaram redução de VLDL e da atividade da BChE e concomitante aumento de LDL e HDL. Estes resultados possibilitaram a sugestão de que a partir da VLDL se formaria um precursor da LDL que, quando combinado à BChE, constituiria a LDL. Trabalho posterior (Kutty e cols., 1977) forneceu sustento a esta

sugestão, quando foi demonstrado, através de incorporação de H<sup>3</sup>-lisina, que camundongos tratados com neostigmina (inibidor da BChE) mostravam diminuição da síntese de LDL e aumento da síntese de HDL.

A relação da BChE com a HDL foi ilustrada no trabalho de Ryhänen e cols. (1982) ao verificarem a atividade da BChE e a concentração de colesterol e triglicerídeos em frações de lipoproteínas. Observaram que a atividade da BChE era maior na fração de VHDL e relativamente alta na HDL. Após lavagem das frações, observaram que a concentração de colesterol mostrava-se aumentada nas frações LDL, HDL e VHDL enquanto que a atividade da BChE aparecia aumentada na LDL e diminuída na HDL e VHDL. Os resultados forneceram suporte a uma hipótese já sugerida (Puhakainen e cols., 1980; Kutty e cols., 1981) de que o HDL-colesterol inibe a atividade da BChE enquanto que o LDL-colesterol estimula a atividade enzimática. É importante notar que na literatura moderna não se utiliza a denominação VHDL. Atualmente é utilizada a subdivisão da HDL em duas principais subclasses: HDL2 e HDL3.

Correlação positiva entre atividade da BChE e as concentrações de colesterol (VLDL-C, LDL-C, total) e de triglicerídeos foi encontrada em pacientes hipertensos (Magarian e Dietz, 1987). As razões HDL-C/C-total e HDL-C/LDL-C mostraram correlação negativa com a atividade da BChE. Magarian e Dietz (1987) propuseram que poderia haver apenas ligação física da BChE com LDL e HDL, não havendo relação de causa e efeito.

De modo geral, os trabalhos que relacionam a BChE com a LDL e com a HDL, indicam a existência de ligação física. A literatura mostra que na HDL são encontradas, preferencialmente as apolipoproteínas A1 e A2 e que na LDL é encontrada principalmente apolipoproteína B100. Desta forma, o **objetivo 2** deste trabalho

consiste em verificar a mobilidade eletroforética e a atividade da BChE em plasma submetido a antisoro para apolipoproteínas A1 e B.

## 4 - MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 - Amostra

Foram utilizadas amostras de plasmas estocadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  no Laboratório de Polimorfismos e Ligação do Departamento de Genética da UFPR. As amostras utilizadas (CHE2 C5+ e CHE2 C5-) foram anteriormente fenotipadas pela técnica de eletroforese em gel de ágar ácido (Robinson e cols., 1957; com modificações de Van Ros e Vervoort, 1973; Fadel-Picheth, 1991 e Souza, 1995). Foram também utilizadas amostras de plasmas, utilizadas na mesma semana da coleta. Estas amostras de plasma eram provenientes de indivíduos anteriormente fenotipados, através da mesma técnica eletroforética acima citada, para o loco *CHE2*. Foram utilizados nos experimentos deste trabalho amostras de plasmas individuais CHE2 C5+ e CHE2 C5-, bem como "pool" de plasmas CHE2 C5+ e "pool" de plasmas CHE2 C5-.

### 4.2 - Materiais

- a) Bacto-ágar;
- b) Tampão citrato de sódio 500 mM, pH 6,2 (solução estoque);
- c) Tampão citrato de sódio 50 mM, pH 6,7;

O pH é ajustado com ácido cítrico 1,56 M;

- d) Tampão citrato de sódio 50 mM, pH 5,3;

O pH é ajustado com ácido cítrico 1,56 M;

- e) Tampão fosfato de sódio, pH 7,1:

Solução A: Fosfato de sódio dibásico anidro 200 mM;

Solução B: Fosfato de sódio monobásico anidro 230 mM;

- f) 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  $\alpha$ -naftilacetato 30 mM (2,5% v/v);



- g) Solução salina concentrada (3 M) e solução salina fisiológica;
- h) Antisoro para apolipoproteína B (Roche e Behring).
- i) Antisoro para apolipoproteína A1 (Roche).
- j) Inibidor da butirilcolinesterase Ro2-0683.

#### **4.3 - Metodologia**

##### **4.3.1 - Eletroforese em gel de ágar 1,4 %, pH 5,37**

Esta técnica foi desenvolvida por Robinson e cols. (1957) e posteriormente modificada por Van Ros e Vervoort (1973), Fadel Picheth (1991) e Souza (1995).

O gel de ágar é preparado com uma solução de bacto ágar (Difco) a 1,4% p/v em tampão citrato de sódio, pH 5,37. Esta solução é aquecida por cerca de sete minutos ou até que o ágar seja totalmente dissolvido, sendo importante não deixar a solução ferver. Após o aquecimento a solução é vertida sobre uma placa de vidro de 230 x 160 mm. O gel deve resfriar completamente e então ser colocado na geladeira e mantido em repouso por pelo menos 12 horas a fim de diminuir o efeito da eletroendosse. Após este período de repouso as amostras de plasma são aplicadas no gel através da extremidade de uma lâmina (5 x 5 x 0,1 mm) onde são colocados dois a dois e meio microlitros ( $\mu$ l) de plasma CHE2 C5-, diluído 1:1 em salina fisiológica. A placa contendo as amostras de plasma é então submetida à eletroforese com tampão citrato pH 6,7 nas cubas. A corrida eletroforética é realizada a 4°C com aplicação de cerca de 35 mA e de 75 V. Após a corrida eletroforética despeja-se sobre a placa o cromógeno-substrato que deve ser preparado imediatamente antes do uso. A placa com o cromógeno-substrato deve ser incubada por uma hora a 37°C. Após a revelação das bandas lava-se a placa com água para retirar o excesso de corante. O gel é então colocado entre uma folha

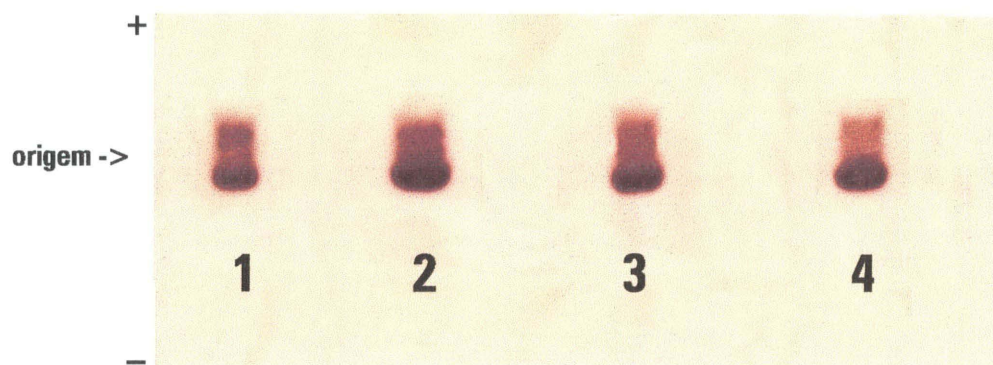
de papel cartão e uma folha de papel filtro para secagem. O gel coberto pelo papel cartão e pelo papel filtro é colocado entre duas placas de vidro e levado à estufa a 37°C até completa secagem. A folha de papel filtro deve ser trocada após 10 minutos para retirar o excesso de umidade. O resultado desta metodologia está demonstrado na Figura 1.

#### **4.3.2 - Eletroforese em gel de ágar 1,4%, pH 5,37 com adição de soluções salinas (3M e 0,9%)**

A técnica seguida é a mesma descrita no item anterior, porém a eletroforese é interrompida, após três horas de corrida, para a aplicação das soluções salinas. As soluções de salina concentrada (3 M) e fisiológica (controle; 0,9%) são aplicadas em três posições a partir da origem na direção do polo positivo e em três posições a partir da origem na direção do polo negativo. A administração das soluções salinas deve coincidir com as posições, referentes a cada amostra aplicada, do complexo de bandas C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> (que migra para o polo negativo) e da banda C<sub>4/5</sub> (que migra para o polo positivo), após as três horas de corrida. Outras amostras-controle não são submetidas à aplicação de soluções salinas. Após a adição das soluções salinas a corrida eletroforética tem prosseguimento por mais três horas. A revelação das bandas e a secagem da placa prosseguem como descrito no item anterior.

#### **4.3.3 - Eletroforese em gel de ágar 1,4%, pH 6,50**

A técnica para eletroforese em gel de ágar 1,4%, pH 6,50 é a mesma descrita no item 4.3.1, apenas alterando o pH do tampão citrato utilizado na preparação do gel de ágar de 5,37 para 6,50. As amostras de plasma utilizadas nas eletroforeses em gel de ágar 1,4% pH 6,50 eram provenientes de indivíduos previamente fenotipados para o loco



**FIGURA 1.** Eletroforese em gel de ágar, 1,4%, pH 5,37. Amostras de plasmas CHE2 C5- diluídos 1:1 em solução salina fisiológica.

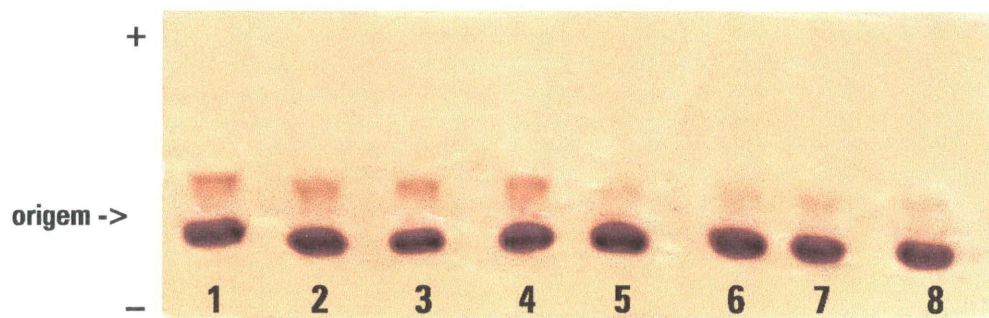
CHE2 como de fenótipo CHE2 C5+. Na Figura 2 é mostrado o resultado da aplicação desta técnica.

#### **4.3.4 - Eletroforese em gel de ágar 1,4%, pH 6,50 com adição de soluções salinas (3M e 0,9%)**

A técnica para eletroforese em gel de ágar 1,4%, pH 6,50 é a mesma descrita no item 4.3.1, apenas alterando o pH do tampão citrato utilizado na preparação do gel de ágar de 5,37 para 6,50. Em seguida, procede-se como no item 4.3.2.

#### **4.3.5 - Eletroforese em duas fases em gel de ágar 1,4%, pH 5,37 com adição de soluções salinas (3M e 0,9%)**

A primeira fase desta técnica consiste em uma eletroforese em gel de ágar 1,4%, pH 5,37, como descrito no item 4.3.1. Após as três horas de corrida eletroforética, o gel de ágar é cortado na região da origem, separando-se a região das bandas C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> (sentido do polo negativo) da região das bandas C<sub>4/5</sub> e C<sub>5</sub> (sentido do polo positivo). A parte do gel de ágar correspondente à região do polo negativo da eletroforese, onde deveria estar o conjunto de bandas C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, foi removido e revelado separadamente. A metade da placa, de onde o gel havia sido removido, foi preenchida com novo gel de ágar 1,4%, pH 5,37. Após o total resfriamento do novo gel de ágar, foram aplicados dois e meio microlitros de salina 3M em três posições acima da origem, isto é, na região correspondente à banda C<sub>4/5</sub>. Desta forma, foram aplicados sete e meio microlitros de salina 3M para cada dois e meio microlitros de plasma. Para cada amostra de plasma submetida à solução salina 3M, havia um controle com a mesma quantidade de solução salina fisiológica, bem como um controle apenas de plasma diluído 1:1 em salina fisiológica. A segunda fase deste experimento consiste em nova corrida eletroforética sob as mesmas condições da



**FIGURA 2. Eletroforese em gel de ágar 1,4%, pH 6,50.** Amostras de plasmas CHE2 C5+ diluídos 1:1 em solução salina fisiológica. Amostras 1 a 4 com banda C5 forte e amostras 5 a 8 com banda C5 fraca.

primeira fase, contendo porém novo gel preenchendo a metade da placa correspondente à região do polo negativo e também a solução salina 3M aplicada da forma descrita acima, assim como os respectivos controles com solução salina fisiológica e plasma diluído.

#### **4.3.6 - Eletroforese em duas fases em gel de ágar 1,4%, pH 6,50 com adição de soluções salinas (3M e 0,9%)**

O procedimento para esta técnica é o mesmo descrito no item 4.3.5 para a eletroforese em duas fases em gel de ágar 1,4%, pH 5,37 com adição de soluções salinas (concentrada e fisiológica), alterando-se apenas o pH do tampão citrato utilizado na preparação do gel de ágar de 5,37 para 6,50. Na região do polo positivo aparece, em pH 6,50, a banda C<sub>5</sub> pois neste tipo de eletroforese foram utilizadas amostras previamente fenotipadas como CHE2 C5+.

#### **4.3.7 - Teste com antisoro para apolipoproteínas A1 e B**

Esta metodologia foi originalmente elaborada para determinação quantitativa de proteínas séricas humanas através de turbidimetria, utilizando Turbitimer (equipamento comercializado pela Behring). O antisoro é preparado através da imunização de coelhos com proteínas do soro humano. As proteínas, existentes em uma amostra de soro humano, formam complexos imunológicos com os anticorpos específicos do antisoro. A turbidez gerada pela reação é medida fotometricamente.

Com o propósito de verificar uma possível relação entre BChE e apolipoproteínas A1 e B, através de experimentos eletroforéticos, a metodologia imunoquímica original foi parcialmente modificada. O protocolo, adotado neste estudo, para o teste com antisoro para apolipoproteínas A1 e B está ilustrado na tabela I.

**Tabela I - Protocolo para teste com antisoro para apolipoproteínas A1 e B**

<b>Tubos</b>	<b>Especificação</b>
Estoque 1	10 µl de pool de plasmas CHE2 C5- em 200 µl de solução salina fisiológica
Estoque 2	10 µl de pool de plasmas CHE2 C5+ em 200 µl de solução salina fisiológica
Teste 1	50 µl do estoque 1 e 500 µl de antisoro de apolipoproteína B
Teste 2	50 µl do estoque 2 e 500 µl de antisoro de apolipoproteína B
Teste 3	50 µl do estoque 1 e 500 µl de antisoro de apolipoproteína A1
Teste 4	50 µl do estoque 2 e 500 µl de antisoro de apolipoproteína A1
Controle 1	50 µl do estoque 1 e 500 µl de solução salina fisiológica
Controle 2	50 µl do estoque 2 e 500 µl de solução salina fisiológica
Controle 3	50 µl de solução salina fisiológica e 500 µl de antisoro de apolipoproteína B
Controle 4	50 µl de solução salina fisiológica e 500 µl de antisoro de apolipoproteína A1

Centrifugar a 2.500 rpm por 30 minutos, em seguida ou até quatro dias em geladeira.

Retirar os sobrenadantes dos tubos-teste e reservá-los separadamente. Lavar os precipitados com solução salina fisiológica por três vezes, desprezando o sobrenadante após centrifugação. No caso dos tubos-controle, reservar a parte superior da solução e lavar o restante com solução salina fisiológica como descrito para os precipitados dos tubos-teste.

Aplicar, em gel de ágar 1,4%, 2,5 µl de cada sobrenadante reservado e de cada precipitado dos tubos-teste. Seguir o mesmo procedimento quanto às soluções-controle. Utilizar gel de ágar com pH 5,37 e 6,50 para plasmas CHE2 C5- e CHE2 C5+, respectivamente.

#### **4.3.8 - Eletroforese em gel de ágar 1,4%, pH 5,37 com amostras tratadas com antisoro para apolipoproteína A1**

Foram colocados 10 microlitros de soro CHE2 C5- e 100 microlitros de antisoro para apolipoproteína A1 em uma placa escavada. Antes da aplicação, com uma ponteira de plástico, o soro e o antisoro foram bem misturados. Foram aplicados 2,5 microlitros desta mistura em um gel de ágar 1,4%, pH 5,37, preparado como

descrito no item 4.3.1. Como controles, foram utilizados plasmas CHE2 C5- diluído 1:1 e 1:10 em salina fisiológica. A corrida e a revelação seguiram como descrito no item 4.3.1.

#### **4.3.9 - Eletroforese em gel de ágar 1,4%, pH 5,37 com amostras BCHE U e BCHE A do teste com antisoro para apolipoproteína B seguida por incubação com Ro2-0683**

Este experimento procedeu como descrito no item 4.3.7 , porém ao final da corrida, a placa foi cortada pela metade no sentido longitudinal. As duas metades da placa foram incubadas a 37°C, uma em contato com 20 ml de tampão fosfato pH 7,1 e a outra em contato com Ro2-0683 [dimetilcarbamato de brometo de (2-hidroxi-5-fenil-benzil)-trimetil amônio] na concentração final de  $2,5 \times 10^{-4}$  M (5ml de Ro2-0683 + 15ml de tampão fosfato pH 7,1). Após a incubação, as duas metades da placa original foram reveladas como descrito no item 4.3.1. Este experimento foi realizado duas vezes, variando-se apenas o tempo de incubação: 20 e 30 minutos.

#### **4.3.10 - Técnica para fenotipagem utilizando-se $\alpha$ -naftilacetato como substrato com amostras submetidas ao antisoro para apolipoproteína B**

A técnica de Picheth e cols.(1994) utiliza como substrato  $\alpha$ -naftilacetato e, como inibidores da butirilcolinesterase, DL-propranolol e Ro2-0683, que permitem a identificação dos fenótipos BCHE U; BCHE UF; BCHE UA; BCHE AK; BCHE AF e BCHE A. O reagente de cor utilizado é o sal de Fast Red TR (Sigma F-1500), diluído em água destilada e adicionado de lauril sulfato de sódio a 3% (Duponal; Sigma L-5750). O tampão utilizado é o tampão fosfato, 0,2M, pH 7,1. A leitura das reações é feita em espectrofotômetro em absorvância de 540nm.



A utilização desta técnica ocorreu em virtude da necessidade de se testar o possível aumento na atividade da butirilcolinesterase em amostras de plasma submetidas ao teste com antisoro para apolipoproteína B. Desta forma, como o objetivo não era o de fenotipar as amostras para o loco BCHE, foi utilizado somente o inibidor Ro2-0683 para confirmar se a atividade observada era da BChE.

O tampão fosfato, 0,2M, pH 7,1, é preparado misturando-se 670 ml de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,2M) com 330 ml de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,2M).

A solução estoque de Ro2-0683, 10<sup>-3</sup>M é preparada dissolvendo-se 39,3 mg de Ro2-0683 em 100ml de tampão fosfato (estável por muitos meses a 4°C e por muitos anos a -20°C). A solução de uso é diluída em tampão fosfato.

A solução estoque do substrato, 0,03M é preparada dissolvendo-se 56mg de alfa-naftilacetato em 10ml de acetona 50% aquosa (estável por um mês a 4°C). Imediatamente antes de usar, diluir 1ml da solução estoque em 20ml de tampão fosfato, completando o volume para 100ml com água destilada para que a concentração final seja de 3 x 10<sup>-4</sup>M.

O reagente de cor é preparado dissolvendo-se 40mg de sal de Fast Red TR em 6ml de água destilada e adicionando-se 4ml de Duponal.

Foram utilizados os sobrenadantes das amostras submetidas ao teste com antisoro para apolipoproteína B (ítem 4.3.7). A concentração final do plasma, tanto nos tubos-controle quanto nos tubos contendo o antisoro, foi de 1:200.

Foram utilizados dois tipos de brancos, um deles contendo tampão fosfato e o outro contendo antisoro para apolipoproteína B. Desta forma ficaram estabelecidos controles de degradação do substrato (α-naftilacetato) tanto frente ao tampão fosfato quanto frente ao

antisoro para apolipoproteína B.

**Tabela II- Protocolo para o Método de Fenotipagem**

Reagentes	Tubos*					
	I	II	III	IV	V	VI
Tampão fosfato	0,2	-	0,2	-	0,7	-
Ro2-0683	-	0,2	-	0,2	-	-
antisoro de apolipoproteína B	-	-	-	-	-	0,7
$\alpha$ -naftilacetato	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Incubar por cinco minutos a 37°C						
sobrenadante com anti-apo B	-	-	0,5	0,5	-	-
sobrenadante controle	0,5	0,5	-	-	-	-
Incubar por 25 min a 37°C						
Reagente de cor (Fast Red)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

Misturar evitando que espume

Após 10 min ler em absorbância 540nm

\* Tubos I, II, III, IV, V, VI, correspondem, respectivamente, a: Controle do sobrenadante contendo plasma na diluição de 1/200 em salina fisiológica; controle com Ro2-0683; sobrenadante contendo plasma na diluição de 1/200 em antisoro para apolipoproteína B; sobrenadante com antisoro para apolipoproteína B com Ro2-0683; branco contendo tampão fosfato e branco contendo antisoro para apolipoproteína B.

## 5 - RESULTADOS

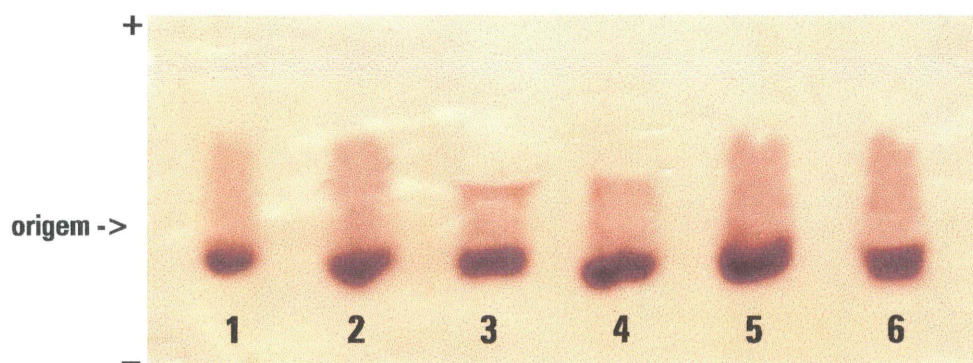
### 5.1 - Verificação da hipótese da banda C<sub>4/5</sub> ser um complexo não-covalente entre BChE e outra substância

Foram realizadas seis eletroforeses (pH 5,37) com adição de soluções salina 3M e fisiológica como descrito no item 4.3.2. A banda C<sub>4/5</sub> teve sua corrida modificada pela ação da solução salina concentrada (Figura 3; 3 e 4). Neste tipo de experimento, com apenas uma fase de corrida eletroforética, não foi possível observar se parte da banda C<sub>4/5</sub> foi desfeita e migrou para o polo negativo pois na região deste polo eram observadas as bandas C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> que originalmente migram nesta direção.

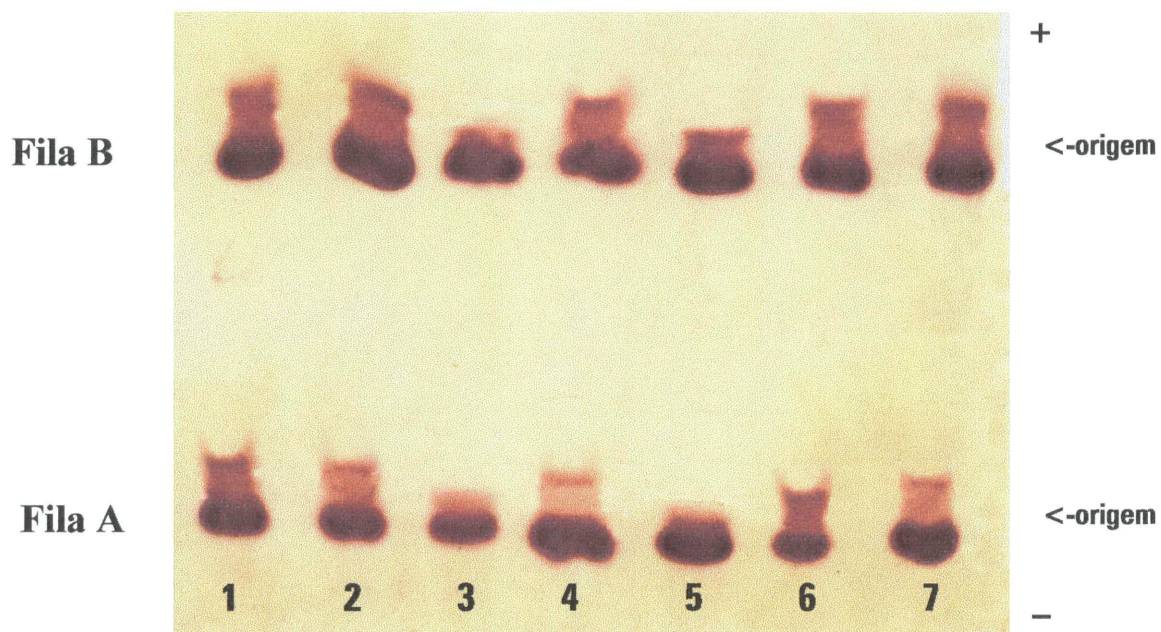
Quatro eletroforeses em gel de ágar (pH 6,50) com adição de solução salina 3M, como descrito no item 4.3.4, mostraram que o comportamento da banda C<sub>5</sub> era o mesmo descrito acima para a banda C<sub>4/5</sub> (Figura 4; 3A, 5A, 3B e 5B).

BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS / UFPR

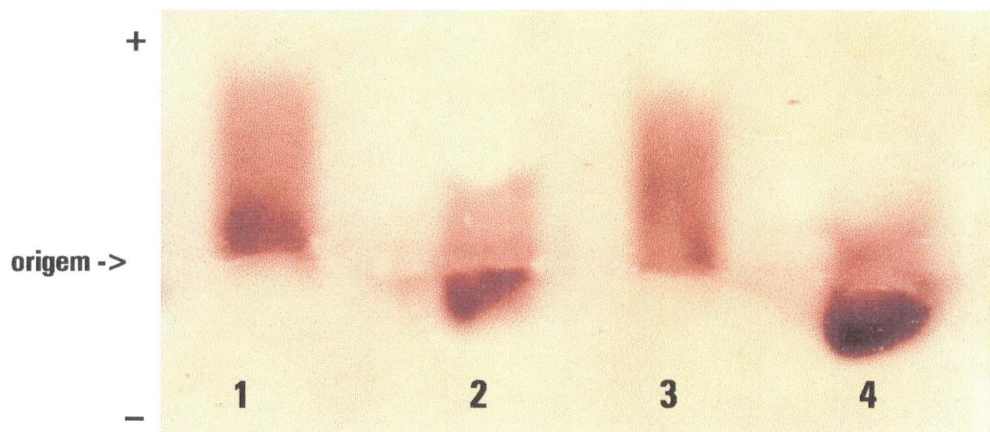
Foram realizadas cinco eletroforeses em duas fases em gel de ágar 1,4%, pH 5,37, com adição de soluções salinas 3M e fisiológica, como descrito no item 4.3.5. Foi verificado que a banda C<sub>4/5</sub>, pela ação da solução salina 3M, mostra mobilidade eletroforética semelhante a C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> ou C<sub>4</sub>, como mostra a Figura 5 (amostras 2 e 4). Neste tipo de experimento, foi retirada a metade do gel que corresponde à região do polo negativo e portanto do conjunto de bandas C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, sendo colocado novo gel de ágar (pH 5,37) na metade retirada. A adição da solução salina 3M foi efetuada após a retirada da parte do gel contendo as bandas C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, garantindo que qualquer atividade da BChE observada no sentido do polo negativo era devida à banda C<sub>4/5</sub>. A parte referente à C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> não foi mostrada na figura 5 por ter sido danificada no processo de secagem.



**FIGURA 3. Eletroforese em gel de ágar 1,4%, pH 5,37 com adição de soluções salinas 3M e fisiológica.** Amostras de plasmas CHE2 C5- diluídos 1:1 em solução salina fisiológica. Após 3 horas de corrida eletroforética houve adição de solução salina fisiológica (amostras 1 e 2) e de solução salina 3M (amostras 3 e 4). Não foi adicionada solução salina nas amostras 5 e 6.



**FIGURA 4. Eletroforese em gel de ágar, 1,4%, pH 6,50 com adição de soluções salinas 3M e fisiológica.** Amostras de plasmas CHE2 C5+ diluídos 1:1 em solução salina fisiológica. Após 3 horas de corrida eletroforética houve adição de solução salina fisiológica (amostras 2A, 2B, 6A e 6B) e de solução salina 3M (amostras 3A, 3B, 5A e 5B). Não foi adicionada solução salina nas amostras 1A, 1B, 4A, 4B, 7A e 7B.



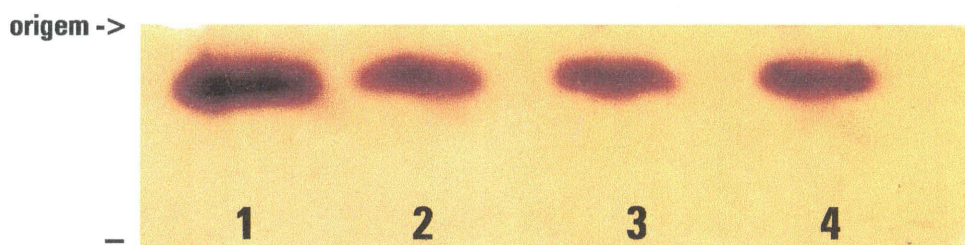
**FIGURA 5. Eletroforese em duas fases em gel de ágar, 1,4%, pH 5,37 com adição de soluções salinas 3M e fisiológica.** Amostras de plasmas CHE2 C5- diluídos 1:1 em solução salina fisiológica. Após 3 horas de corrida eletroforética houve adição de solução salina fisiológica (amostra 1) e de solução salina 3M (amostras 2 e 4). Não foi adicionada solução salina na amostra 3.

Quatro eletroforeses em duas fases em gel de ágar 1,4%, pH 6,50 com adição de soluções salinas 3M e fisiológica (como descrito no item 4.3.6), mostraram que a banda C<sub>5</sub> tem o mesmo comportamento descrito acima para a banda C<sub>4/5</sub> em experimento correspondente com gel de ágar pH 5,37 (Figura 6b; 3 e 4).

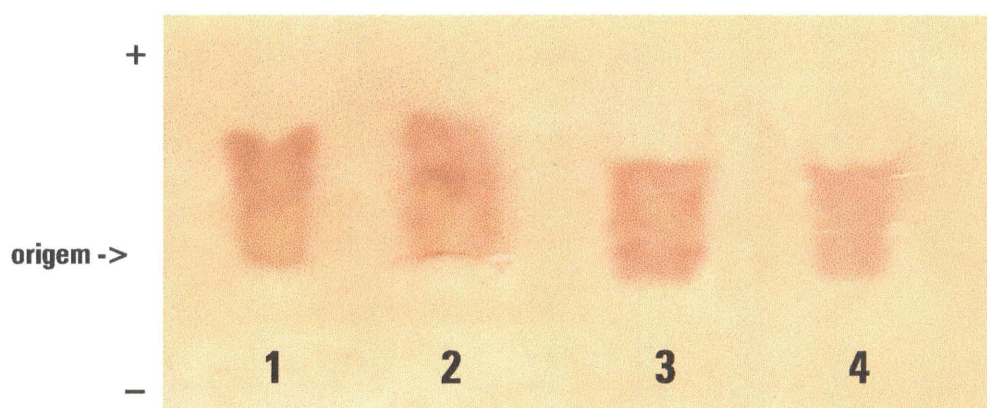
## **5.2 - Verificação da relação entre BChE e apolipoproteína B**

Foram efetuados todos os passos do teste com antisoro para apolipoproteína B, descritos no item 4.3.7, e foi observada a formação de um precipitado nos tubos contendo antisoro para apolipoproteína B, tanto nas amostras CHE2 C5+ quanto nas amostras CHE2 C5-. Com base nesse resultado, partimos para verificação de uma relação entre apolipoproteína B e BChE. Foram realizadas catorze eletroforeses (dez de pH 5,37 e quatro de pH 6,50) que mostraram atividade visível da BChE no sobrenadante e no precipitado das amostras que haviam sido submetidas ao antisoro para apolipoproteína B. (Figura 7; 1A, 2A, 2B e 3B e Figura 8 1A, 2A, 2B e 3B). Nas amostras dos controles 1 e 2 (ver item 4.3.7), contendo plasma diluído (1:200) em salina fisiológica, ou não foi observada atividade da BChE ou esta era muito fraca (ver item 5.4). Foram realizadas duas eletroforeses (pH 5,37), cada uma contendo duas amostras dos controle 3. As amostras do controle 3, contendo antisoro para apolipoproteína B, mostraram banda da BChE (Figura 9; 3B e 5B). Bandas da BChE com intensidade maior que 3B e 5B foram observadas nas amostras de sobrenadante dos tubos contendo antisoro para apolipoproteína B (Figura 9; 2A e 5A).

Para verificar se a atividade observada era devida realmente à BChE, amostras BCHE A, bem como amostras usuais, foram submetidas ao teste com antisoro para apolipoproteína B e posterior eletroforese. Ao final das três horas de corrida eletroforética, a placa de gel de

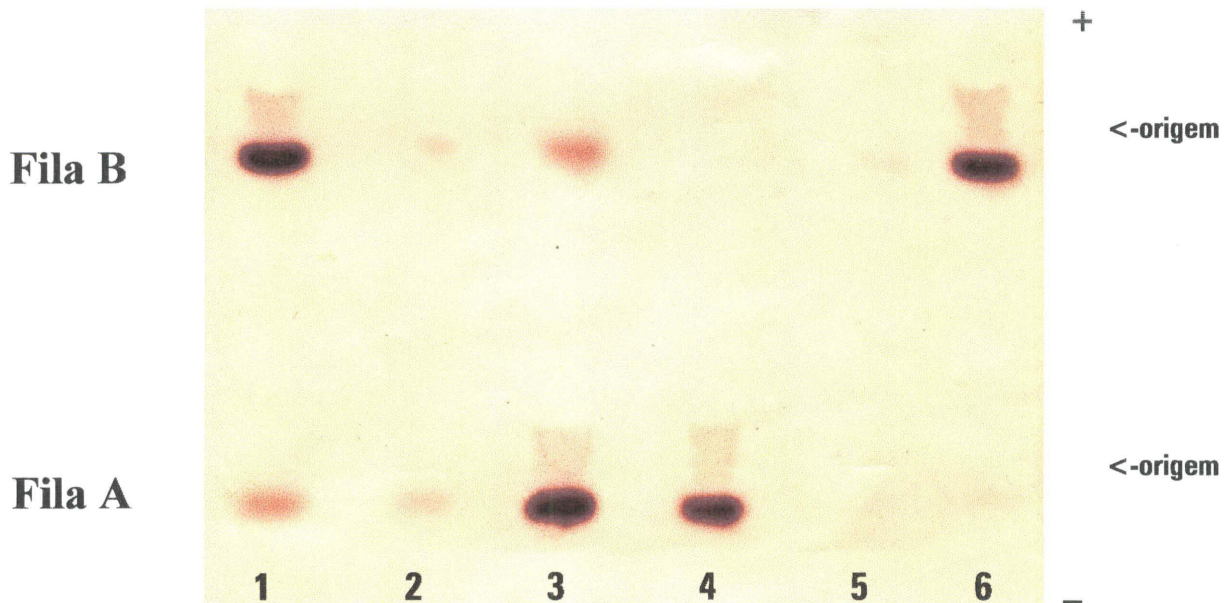


**FIGURA 6a. Eletroforese em gel de ágar, 1,4%, pH 6,50.** Amostras de plasmas CHE2 C5+ diluídos 1:1 em solução salina fisiológica. Região do polo negativo contendo as bandas C1- C4 que migraram durante a primeira fase da corrida eletroforética.

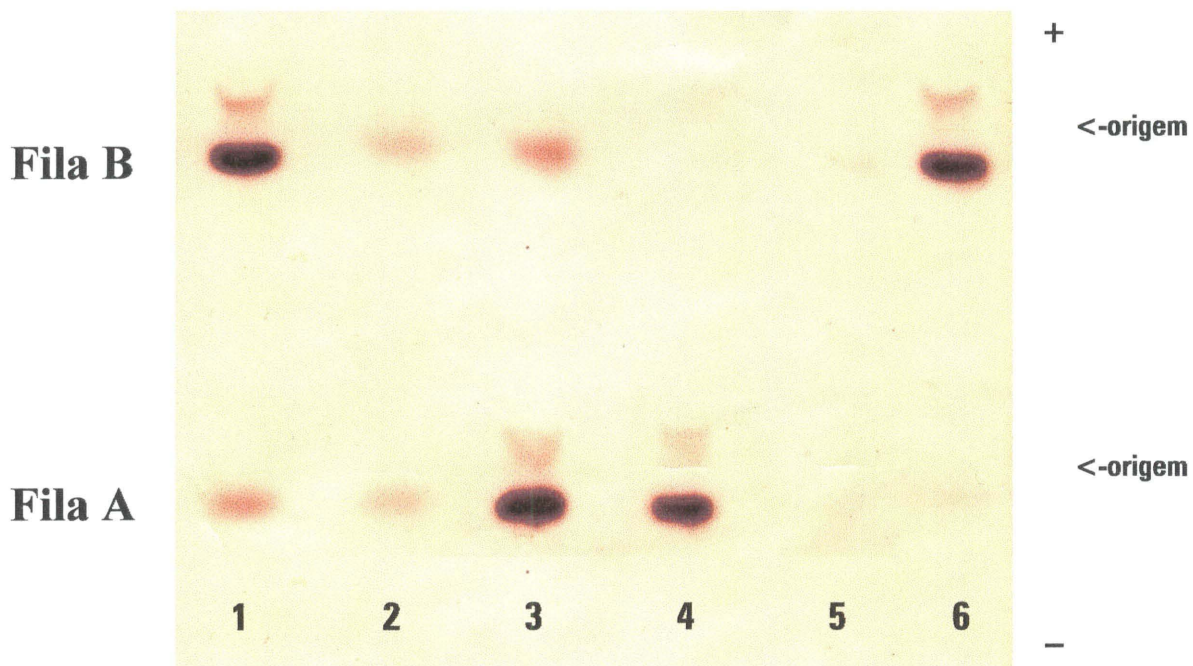


**FIGURA 6b. Eletroforese em duas fases em gel de ágar 1,4%, pH 6,50 com adição de soluções salinas 3M e fisiológica.** Amostras de plasmas CHE2 C5+ diluídos 1:1 em solução salina fisiológica. Após 3 horas de corrida eletroforética houve adição de solução salina fisiológica (amostra 1) e de solução salina 3M (amostras 3 e 4). Não foi adicionada solução salina na amostra 2.

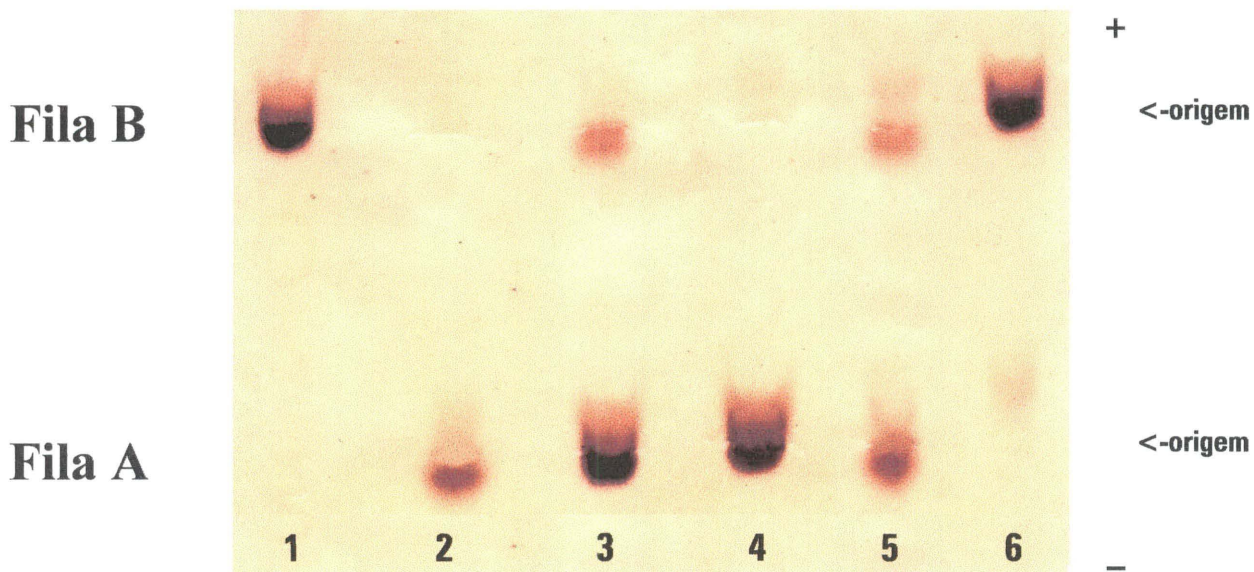




**FIGURA 7. Eletroforese em gel de ágar, 1,4%, pH 5,37 com amostras CHE2 C5- do teste com antisoro para apolipoproteína B. 2A e 2B são amostras de precipitados de plasmas 1:200 em antisoro para apolipoproteína B. 1A e 3B são amostras de sobrenadantes de plasmas 1:200 em antisoro para apolipoproteína B. 3A, 4A, 1B e 6B são amostras de plasmas diluídos 1:1 em solução salina fisiológica. 5A e 4B são amostras - controle de precipitados. 6A e 5B são amostras de plasmas 1:200 em solução salina fisiológica.**



**FIGURA 8. Eletroforese em gel de ágar, 1,4%, pH 6,50 com amostras CHE2 C5+ do teste com antisoro para apolipoproteína B. 2A e 2B são amostras de precipitados de plasmas 1:200 em antisoro para apolipoproteína B. 1A e 3B são amostras de sobrenadantes de plasmas 1:200 em antisoro para apolipoproteína B. 3A, 4A, 1B e 6B são amostras de plasmas diluídos 1:1 em solução salina fisiológica. 5A e 4B são amostras - controle de precipitados. 6A e 5B são amostras de plasmas 1:200 em solução salina fisiológica.**



**FIGURA 9. Eletroforese em gel de ágar, 1,4%, pH 5,37 com amostras de plasmas CHE2 C5- do teste com antisoro para apolipoproteína B e com amostras de antisoro para apolipoproteínas B e A1. 2A e 5A são amostras de sobrenadante de plasmas 1:200 em antisoro para apolipoproteína B. 3B e 5B são amostras de antisoro para apolipoproteína B na concentração de 91% em solução salina fisiológica. 3A, 4A, 1B e 6B são amostras de plasmas diluídos 1:1 em solução salina fisiológica. 1A e 2B são amostras de antisoro para apolipoproteína A1 na concentração de 91% em solução salina fisiológica. 6A e 4B são amostras de plasmas 1:200 em solução salina fisiológica.**

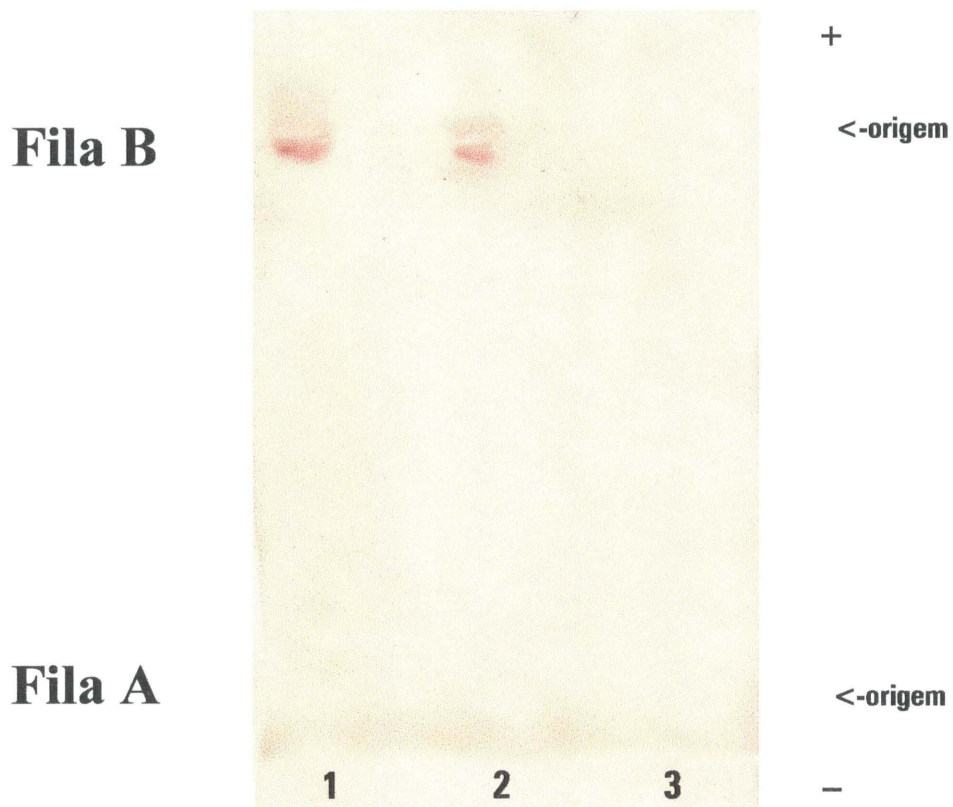
ágar contendo amostras BCHE A e BCHE U foi cortada longitudinalmente, sendo que uma das metades foi incubada com tampão fosfato pH 7,1 e a outra foi incubada com o inibidor da BChE Ro2-0683 (ítem 4.3.9). Na metade incubada com Ro2-0683 somente foi visível atividade da BChE nas amostras BCHE A (Figura 10; 1B e 2B). Na metade incubada com tampão fosfato foi observada atividade nas amostras BCHE A e nas amostras BCHE U diluídas 1/2 em salina fisiológica, bem como nos respectivos sobrenadantes (Figura 11; 2A, 3A, 2B e 3B). Foi observada uma banda fraca da BChE na amostra de precipitado de plasma BCHE U (Figura 11; 1A). Este experimento foi repetido, fornecendo os mesmos resultados.

Para quantificar variação na atividade da BChE em amostras submetidas ao teste com antisoro para apolipoproteína B, foi utilizado o método para fenotipagem que utiliza  $\alpha$ -naftilacetato como substrato (Picheth, 1994). Os valores obtidos encontram-se na tabela III.

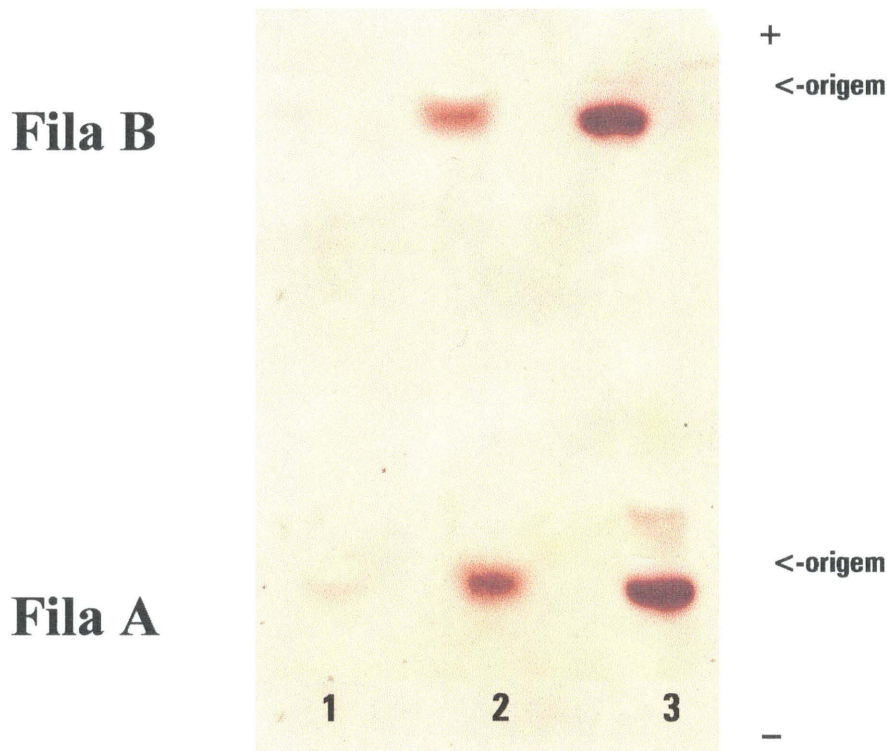
**Tabela III- Valores de absorbância e percentagem de inibição de amostras submetidas ao teste com antisoro para apolipoproteína B<sup>a</sup>**

Amostra <sup>b</sup>	frente à água destilada	frente aos respectivos brancos	com Ro2-0683	RON <sup>c</sup>
sobrenadante de plasma com antisoro para apolipoproteína B	-	0,262	0,072	72,52
sobrenadante do plasma controle com solução salina fisiológica	-	0,086	0,012	86,05
branco-tampão fosfato e substrato	0,021	-	-	-
branco-antisoro para apolipoproteína B e substrato	0,243	-	0,115	52,67

<sup>a</sup>média de três valores de absorbância; <sup>b</sup>Antes da leitura dos sobrenadantes o aparelho foi zerado com os respectivos brancos; <sup>c</sup>Percentagem de inibição frente ao Ro2-0683.



**FIGURA 10. Eletroforese em gel de ágar, 1,4%, pH 6,50 com amostras BCHE U (CHE2 C5+) e BCHE A (CHE2 C5-) do teste com antisoro para apolipoproteína B com incubação em Ro2-0683. 3A e 3B são amostras de precipitados de plasmas BCHE U e BCHE A, respectivamente, 1:200 em antisoro para apolipoproteína B. 2A e 2B são amostras de sobrenadantes de plasmas BCHE U e BCHE A, respectivamente, 1:200 em antisoro para apolipoproteína B. 1A e 1B são amostras de plasma BCHE U e BCHE A, respectivamente, diluídos 1:1 em solução salina fisiológica.**



**FIGURA 11. Eletroforese em gel de ágar, 1,4%, pH 6,50 com amostras BCHE U (CHE2 C5+) e BCHE A (CHE2 C5-) do teste com antisoro para apolipoproteína B com incubação em tampão fosfato. 1A e 1B são amostras de precipitados de plasmas BCHE U e BCHE A, respectivamente, 1:200 em antisoro para apolipoproteína B. 2A e 2B são amostras de sobrenadantes de plasmas BCHE U e BCHE A, respectivamente, 1:200 em antisoro para apolipoproteína B. 3A e 3B são amostras de plasmas BCHE U e BCHE A, respectivamente, diluídos 1:1 em solução salina fisiológica.**

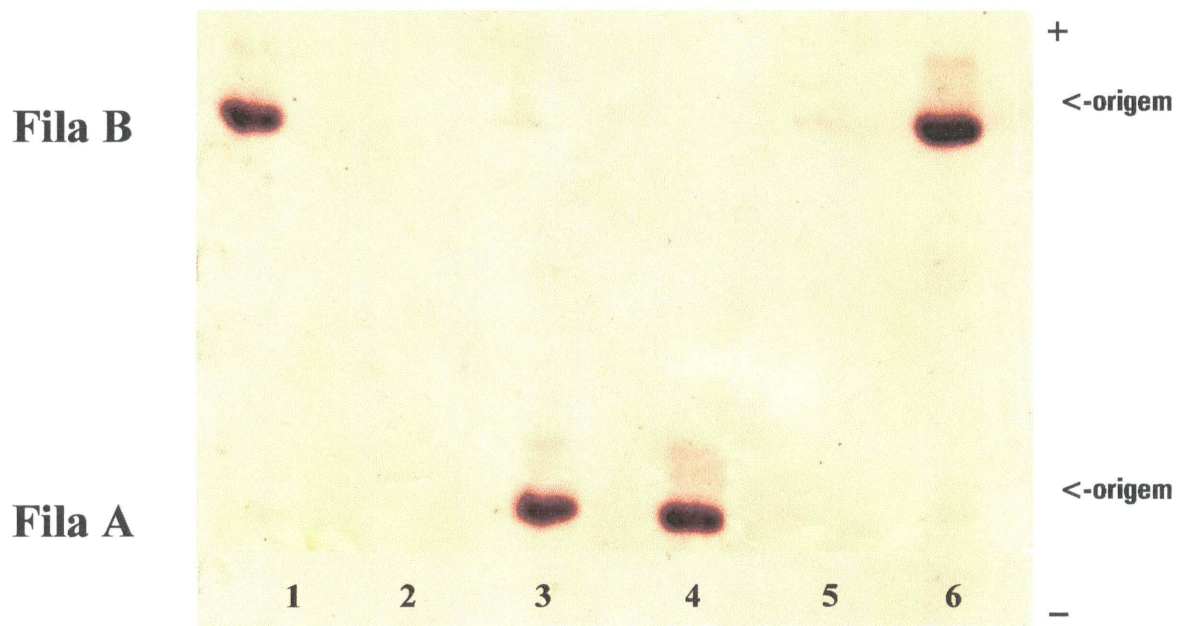
### **5.3 - Verificação da relação entre BChE e apolipoproteína A1**

Foram cumpridos todos os passos do teste com antisoro para apolipoproteína A1 como descrito (ítem 4.3.7) e foi observada a formação de um precipitado nos tubos contendo antisoro para apolipoproteína A1. Foram realizadas dez eletroforeses (seis com pH 5,37 e quatro com pH 6,50) com amostras do teste com antisoro para apolipoproteína A1. As amostras aplicadas não mostraram atividade visível da BChE nem no sobrenadante nem no precipitado (figura 12; 1A, 2A, 2B e 3B e figura 13; 1A, 2A, 2B e 3B). Nas amostras-controle, contendo plasma 1:200 em solução salina fisiológica, ou não foi observada nenhuma banda da BChE ou esta era muito fraca. As amostras do controle 3, contendo antisoro para apolipoproteína A1, não mostraram banda da BChE (Figura 9; 1A e 2B).

Amostras de plasma CHE2 C5- diluídas 1:10 em antisoro para apolipoproteína A1, mostraram, em eletroforese em gel de ágar 1,4% (ph 5,37), atividade da BChE visualmente um pouco maior quando comparadas com as amostras-controle. Buscando resultados positivos, como aqueles dados pela técnica 4.3.8, alteramos a concentração final do plasma do teste com antisoro para apolipoproteína A1 de 1/201 para 1/11. Os resultados obtidos mostraram atividade semelhante da BChE tanto nas amostras submetidas ao antisoro quanto nas amostras-controle.

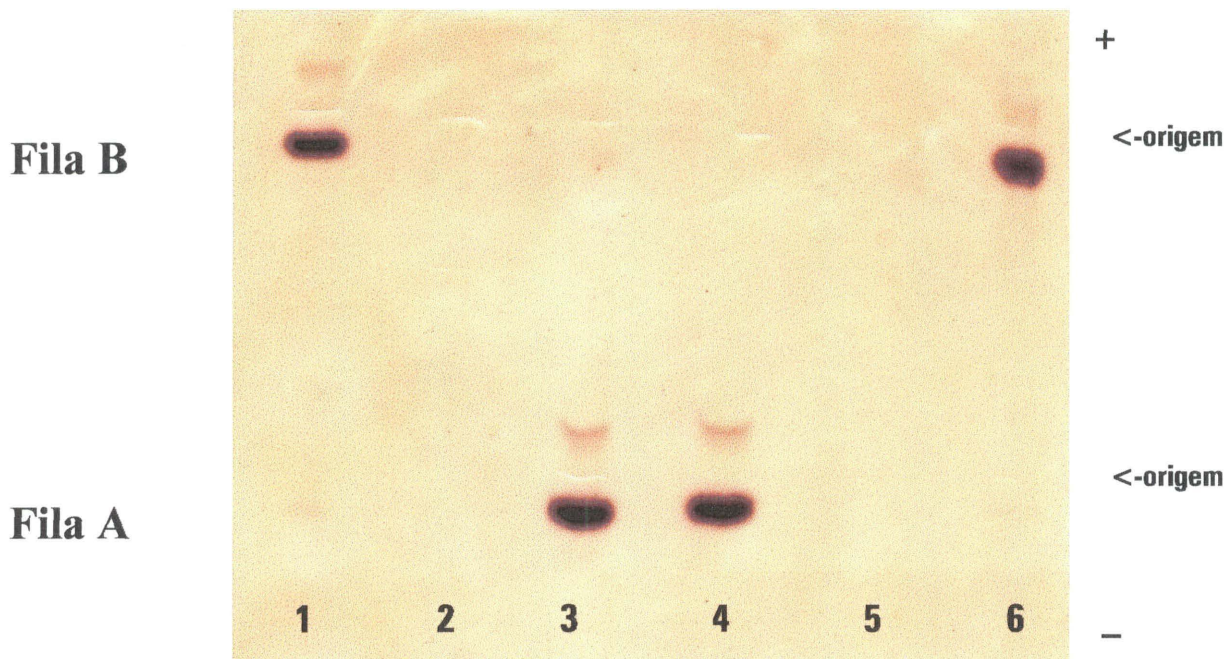
### **5.4 - Comportamento eletroforético da BChE de plasma diluído 1:200 em salina fisiológica**

O comportamento da BChE, em plasma 1:200 em solução salina fisiológica, utilizado como controle nos experimentos com antisoro, apresentou-se bastante variável. Estas variações, observadas através de eletroforeses em gel de ágar, referem-se a: nenhuma atividade



**FIGURA 12. Eletroforese em gel de ágar, 1,4%, pH 5,37 com amostras de plasmas CHE2 C5- do teste com antisoro para apolipoproteína A1. 2A e 2B são amostras de precipitados de plasmas 1:200 em antisoro para apolipoproteína A1. 1A e 3B são amostras de sobrenadantes de plasmas 1:200 em antisoro para apolipoproteína A1. 3A, 4A, 1B e 6B são amostras de plasmas diluídos 1:1 em solução salina fisiológica. 5A e 4B são amostras - controle de precipitados. 6A e 5B são amostras de plasmas 1:200 em solução salina fisiológica.**





**FIGURA 13. Eletroforese em gel de ágar, 1,4%, pH 6,50 com amostras CHE2 C5- do teste com antisoro para apolipoproteína A1. 2A e 3B são amostras de precipitados de plasmas 1:200 em antisoro para apolipoproteína A1. 1A e 2B são amostras de sobrenadantes de plasmas 1:200 em antisoro para apolipoproteína A1. 3A, 4A, 1B e 6B são amostras de plasmas diluídos 1:1 em solução salina fisiológica. 5A e 4B são amostras - controle de precipitados. 6A e 5B são amostras de plasmas 1:200 em solução salina fisiológica.**

visível da BChE; aparecimento de banda fraca na região do polo negativo ou aparecimento de banda fraca na região do polo positivo. Na tabela IV encontram-se sumarizados os resultados encontrados.

**Tabela IV - Comportamento da BChE em plasma 1:200 em solução salina fisiológica em eletroforeses em gel de ágar 1,4%, pH 5,37 e pH 6,50**

pH do gel	Comportamento de 37 amostras		
	sem banda	banda na região do polo negativo	banda na região do polo positivo
pH 5,37	12	06	05
pH 6,50	05	05	04
TOTAL	17	11	09

## 6 - DISCUSSÃO

### 6.1 - Experimentos com soluções salinas

Masson (1991) observou o comportamento da banda C<sub>5</sub> após tratamento com soluções salinas concentradas e verificou que esta banda sofria dissociação formando C<sub>4</sub> e substância "X". Tendo em vista os resultados de Diniz (1996), bem como sua sugestão de utilizar a banda C<sub>5</sub> isolada a partir do plasma (ver item 3.1), foram realizados neste trabalho tratamentos com solução salina concentrada em bandas C<sub>5</sub> e C<sub>4/5</sub> parcialmente isoladas através de eletroforeses.

Após submeter a banda C<sub>5</sub>, parcialmente isolada através de eletroforese, à solução salina 3M, verificou-se que esta banda apresentava corrida eletroforética menor quando comparada aos controles (Figura 4; 3A, 5A, 3B e 5B). Nas amostras submetidas à solução salina 3M, a banda C<sub>5</sub> parecia ter sido parcialmente desfeita, porém não era possível verificar se esta banda, ao se desfazer, formava C<sub>4</sub>. Na região correspondente à banda C<sub>4</sub>, que poderia estar sendo formada, era encontrado o conjunto de bandas C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> que originalmente migra nesta direção.

Os resultados da eletroforeses em duas fases mostraram que a banda C<sub>5</sub>, submetida à solução salina 3M, foi parcialmente desfeita formando C<sub>4</sub> (Figura 6b; 3 e 4). Neste tipo de experimento, onde o gel original ( que contém a banda C<sub>5</sub> e o conjunto de bandas C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>) é cortado, pode ser observado o isolamento da banda C<sub>5</sub> em relação ao conjunto de bandas C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>. Desta forma foi possível observar a formação de C<sub>4</sub> a partir de C<sub>5</sub> submetida à solução salina concentrada. Estes resultados vem a concordar com aqueles descritos por Masson (1991) e reforçam a sugestão de que a banda C<sub>5</sub> seja um complexo, formado por ligações predominantemente iônicas, entre C<sub>4</sub> e substância "X".

O comportamento da banda C<sub>4/5</sub>, submetida às mesmas condições descritas acima, foi o mesmo que o da banda C<sub>5</sub>. Nas eletroforeses com apenas uma fase pôde ser observado que a banda C<sub>4/5</sub> apresentava-se aparentemente bloqueada nas amostras submetidas à solução salina 3M. Da mesma forma, não foi possível verificar, em eletroforese de uma fase, se a banda C<sub>4/5</sub> estava formando uma banda na região do polo negativo. Eletroforeses de duas fases mostraram que a banda C<sub>4/5</sub>, quando submetida à solução salina 3M, formava uma banda na região do polo negativo (Figura 5; 2 e 4).

Estes resultados concordam com a sugestão de Souza (1995) de que a banda C<sub>4/5</sub> poderia ser um complexo, mantido por forças predominantemente iônicas, entre BChE e outra substância. Souza (1995) coloca que os tratamentos realizados em seus experimentos não seriam capazes de desfazer uma ligação covalente, excluindo a possibilidade de C<sub>4/5</sub> ser C<sub>2</sub>, pois a ligação com a albumina é covalente. Desta forma, o suposto homopolímero, formado a partir da banda C<sub>4/5</sub> submetida à solução salina 3M, pode ser o monômero C<sub>1</sub>, o dímero C<sub>3</sub> ou o tetrâmero C<sub>4</sub>.

Os resultados destes experimentos também mostram que a técnica utilizada é adequada para estudos eletroforéticos com as bandas C<sub>5</sub> e C<sub>4/5</sub>, pois estas encontram-se parcialmente isoladas, minimizando as chances de substâncias presentes no plasma exercerem qualquer influência protetora.

## **6.2 - Experimentos com antisoro para apolipoproteína B**

Em todas as eletroforeses (pH 5,37 e pH 6,50) foi observada atividade nos sobrenadantes e precipitados das amostras de plasmas CHE2 C5- e CHE2 C5+ submetidas a tratamento com antisoro para apolipoproteína B (Figura 7; 1A, 2A, 2B e 3B e Figura 8 1A, 2A, 2B e

3B). As amostras-controle 3 (ver ítem 4.3.8), contendo antisoro para apolipoproteína B na concentração de 91% em salina fisiológica, mostraram banda da BChE (Figura 9; 3B e 5B), porém com intensidade menor do que aquela observada nos sobrenadantes de plasma tratado com antisoro (Figura 9 2A e 5A). As amostras-controle 1 e 2 (ver ítem 4.3.8), contendo plasma diluído 1:200 em salina fisiológica apresentaram muito pouca ou nenhuma atividade da BChE. Desta forma é possível sugerir que a banda da BChE observada nas amostras de sobrenadante é devida, em parte pela ação do antisoro sobre o plasma, liberando BChE, e em parte à própria BChE presente no antisoro de coelho para apolipoproteína B. Esta sugestão encontrou sustento ao serem analisados os resultados que estão sumarizados na tabela III. Estes resultados mostram que os valores de absorbância nas amostras de sobrenadantes são maiores do que os valores observados nos tubos com antisoro e solução salina fisiológica, indicando que o tratamento do plasma com antisoro acarreta um aumento de BChE. É importante acentuar que os valores de absorbância para os tubos com antisoro para apolipoproteína B, na concentração de 91% em solução salina fisiológica, são maiores do que os valores de absorbância nos tubos contendo tampão fosfato, indicando presença da BChE no antisoro de coelho. Analisando os valores de inibição com Ro2-0683, pode ser observado que nos tubos contendo antisoro para apolipoproteína B a percentagem de inibição é menor do que aquela observada para as amostras de plasma 1:200 em salina fisiológica onde ocorre inibição por Ro2-0683 compatível com fenótipo BCHE U. As amostras de plasma submetidas à tratamento com antisoro para apolipoproteína B, mostram inibição com Ro2-0683 menor do que as amostras de plasma 1:200 em salina fisiológica e maior do que os tubos contendo antisoro para apolipoproteína B. A partir destes resultados pode-se sugerir que a percentagem de inibição por Ro2-0683, observada nos tubos contendo os sobrenadantes de plasma com antisoro, é intermediária entre as

percentagens observadas nos tubos contendo antisoro 91% em solução salina fisiológica e nos tubos com plasma 1:200 em solução salina fisiológica. Isto pode ser devido a uma inibição diferencial (menor) da BChE de coelho presente no antisoro.

As eletroforeses (pH 5,37) com incubação com Ro2-0683 (ver item 4.3.9) mostraram que a banda formada nos sobrenadantes e nos precipitados, das amostras submetidas ao teste com antisoro para apolipoproteína B, foi inibida pelo Ro2-0683. Sobrenadante e precipitado de amostra BCHE A mostraram inibição menor, indicando que a banda formada é BChE (Figura 10; 1B e 2B).

Os resultados encontrados neste trabalho vieram a concordar com a hipótese já anteriormente sugerida (Lawrence e Melnick, 1963; Dubbs, 1966; Kutty e Acharya, 1972; Kutty e cols., 1973, 1975, 1977) de que existe uma relação entre BChE e LDL, provavelmente uma ligação física. É importante acentuar que na LDL é encontrada principalmente apolipoproteína B. Desta forma o tratamento com antisoro para apolipoproteína B poderia liberar BChE presente na LDL.

### **6.3 - Experimentos com antisoro para apolipoproteína A1**

Amostras de plasmas CHE2 C5- e CHE2 C5+ submetidas ao teste com antisoro para apolipoproteína A1, quando submetidas a eletroforeses (pH 5,37 e pH 6,50), não mostraram banda da BChE nem no sobrenadante e nem no precipitado (figura 12; 1A, 2A, 2B e 3B e figura 13; 1A, 2A, 2B e 3B). As amostras do controle 3, contendo antisoro para apolipoproteína A1, não mostraram banda da BChE (Figura 9; 1A e 2B).

O experimento da placa escavada (ver item 4.3.8), com amostras de plasma diluídas 1:10 em antisoro para apolipoproteína A1, mostrou atividade da BChE visualmente maior nas amostras tratadas com antisoro quando comparadas com as amostras-controle tratadas com

solução salina fisiológica. Com base neste resultado, foi realizado novo teste com antisoro para apolipoproteína A1, alterando a concentração final do soro de 1/201 para 1/11. Os resultados mostraram-se pouco conclusivos pois foi observada banda da BChE, de mesma intensidade, tanto nas amostras submetidas ao antisoro quanto nas amostras-controle, contendo plasma 1:10 em solução salina fisiológica. As eletroforeses contendo amostras de antisoro para apolipoproteína A1, na concentração de 91% em solução salina fisiológica, não mostraram banda da BChE. Desde que não foi formada banda da BChE nem nas amostras tratadas com antisoro para apolipoproteína A1 e nem nas amostras-controle de antisoro, não foi realizado teste para verificar alteração da atividade da BChE sob o efeito do antisoro para apolipoproteína A1.

O trabalho de Ryhänen e cols. (1982) mostra grande atividade da BChE na fração de HDL, sendo portanto esperado que tratamento de plasmas com antisoro para apolipoproteína A1 (que é principalmente encontrada na HDL) levasse a um aumento na atividade da BChE. É possível sugerir que a diferença entre a concentração final de apolipoproteínas utilizada nos experimentos de Ryhänen e cols. (1982) e a concentração final de apolipoproteínas utilizada neste trabalho, impossibilite comparações ou inferências. Ryhänen e cols. (1982) obtiveram concentração final de apolipoproteínas de 3mg/ml e no presente estudo foi obtida concentração final de apolipoproteínas entre 0,0045 e 0,0065mg/ml.

Os experimentos mostraram existência da BChE em antisoro para apolipoproteína B e não detectaram atividade da BChE em antisoro para apolipoproteína A1. Os mesmos resultados foram obtidos com duas marcas diferentes de antisoro para apolipoproteína B (Roche e Behring). Foi mantida a metodologia descrita pelo fabricante no que se refere às proporções entre plasma e antisoro e à diluição final do

plasma. Tanto quanto a orientação do fabricante diz, é utilizado o mesmo processo para obtenção de antisoro para as apolipoproteínas A1 e B. Desde que não nos são conhecidos os padrões normais de atividade da BChE de coelhos, não foi possível saber se houve um aumento de BChE no processo de fabricação do antisoro para apolipoproteína B ou se ocorreu uma perda desta enzima durante a obtenção de antisoro para apolipoproteína A1. Sugerimos, desta forma, a realização de estudos da BChE em coelhos imunizados.

#### **6.4 - Comportamento eletroforético da BChE em plasmas diluídos 1:200 em solução salina fisiológica**

Ao abaixar o pH do gel de ágar Souza (1995) possibilitou a saída da banda C<sub>4/5</sub> em direção ao polo positivo, que em pH mais alto, migra para a posição das bandas C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> na região do polo negativo. Souza (1995) observou que, para melhor saída da banda C<sub>4/5</sub>, deveriam ser utilizadas amostras de plasmas diluídos 1:1 em solução salina fisiológica ou água destilada.

A BChE, em plasmas diluídos 1:200 em solução salina fisiológica, apresentou mobilidade eletroforética alterada. Como a diluição do plasma de 1:200 é bastante grande, é pouco provável que sejam encontradas as bandas C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> ou C<sub>4/5</sub>, desta forma a banda da BChE que é visualizada será referida como C<sub>4</sub>. Como visto na tabela IV, a diluição do plasma, em 1:200 em solução salina fisiológica, acarreta diversas alterações na mobilidade eletroforética da banda C<sub>4</sub>. Pode ocorrer formação de banda na região do polo positivo, na região do polo negativo ou não ocorrer formação de banda alguma. A banda C<sub>4</sub> não deveria migrar para o polo negativo, isto acontece em decorrência da eletroendosse. A existência de C<sub>4</sub> na região do polo positivo sugere diminuição da eletroendosse, permitindo a corrida da banda nesta direção. O número de amostras utilizadas neste experimento foi muito



pequeno para a verificação de correlações entre pH do gel e ausência ou presença de bandas (também em relação à mobilidade eletroforética). Com base nestes resultados, é possível sugerir a realização de um estudo, utilizando-se maior número de amostras e diferentes pH de gel de ágar, a cerca do comportamento da BChE em amostras de plasma em diversas diluições.

## 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alcântara, V.M.; Chautard-Freire-Maia, E.A.; Picheth, G. e Vieira, M.M. Method for serum cholinesterase phenotyping. Rev. Brasil. Genet., 14:841-846, 1991.
- Alcântara, V.M.; Rodrigues, L.C. e Chautard-Freire-Maia, E.A. Association between weight and intensity of the C<sub>4/5</sub> band of butyrylcholinesterase. Rev. Brasil. Genet., 19 (suppl):233, 1996.
- Antopol, W.; Tuchman, L. e Schifrin, A. Cholinesterase activity of human sera with special reference to hyperthyroidism. Proc. Soc. exp. Biol. and Med., 36:46-50, 1937.
- Arpagaus, M.; Kott, M.; Vatsis, K.P.; Bartels, C.F.; La Du, B.N. e Lockridge, O. Structure of the gene for human butyrylcholinesterase. Evidence for a single copy. Biochemistry., 29:124-131, 1990.
- Augustinsson, K.B. Cholinesterase and anticholinesterase agents. In: Handbook of experimental pharmacology. Koelle, G.B. (org). Springer-Verlag, Berlin e Nova York, pp.89-128, 1963.
- Berry, W.T.C.; Cowin, P.J. e Davis, D.R. A relationship between body fat and plasma pseudocholinesterase. Brit. J. Nutr., 8:79-82, 1954.
- Beaumont, J.L.; Carlson, L.A.; Cooper, G.R.; Fejfar, Z.; Fredrickson, D.S. e Strasser, T. Classification of hyperlipidaemias and hyperlipoproteinaemias. Bull. Wld. Hlth. Org., 43:891-915, 1970.
- Chautard-Freire-Maia, E.A.; Primo-Parmo, S.L.; Picheth, G.; Lourenço, M.A.C. e Vieira, M.M. The C<sub>5</sub> isozyme of serum cholinesterase and adult weight. Hum. Hered., 41:330-339, 1991.
- Chu, M. I.; Fontaine, P.; Kutty, K.M.; Murphy, D. e Redheendran, R. Cholinesterase in serum and low density lipoprotein of hyperlipidemic patients. Clin. Chim. Acta, 85:55-59, 1978.
- Clitherow, J.W.; Mitchard, M. e Harper, N.J. The possible biological function of pseudocholinesterase. Nature, 199:1000-1001, 1963.
- Cristol, P.; Passouant, P.; Benezch, C. e Dutarte, J. Valeur sémiologique de la cholinestérase sérique. Pr. méd., 40:557, 1946.
- Cucuianu, M.; Opincaru, A. e Tapalagă, D. Similar behavior of lecithin: cholesterol acyltransferase and pseudocholinesterase in liver disease and hyperlipoproteinemia. Clin. Chim. Acta, 85:73-79, 1978.
- Cucuianu, M.; Popescu, T.A. e Haragus, St. Pseudocholinesterase in obese and hyperlipemic subjects. Clin. Chim. Acta, 22:151-155, 1968.
- Deshmukh, M.B. Changes in serum cholinesterase activity and lipoprotein cholesterol levels in rats during diabetes. IRCS Med. Sci., 14:234, 1986.

- Diniz, A.C. Caracterização das bandas C<sub>4/5</sub> e C<sub>5</sub> da butirilcolinesterase humana frente a determinados tratamentos. Curitiba, 1996, 49 p. Trabalho de conclusão de curso para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná.
- Dubbs, C.A. Ultrasonic effects on isoenzymes. Clin Chem., 12: 181-186, 1966.
- Eiberg, H.; Nielsen, L.S.; Klausen, J.; Dahlén, M.; Kristensen, M.; Bisgaard, M.L.; Moller, N. e Mohr, J. Linkage between serum cholinesterase 2 (CHE2) and crystallin gene cluster (CRYG): assignment to chromosome 2. Clin. Genet., 35: 313-321, 1989.
- Faber, M. Serum cholinesterase in diseases. Acta. Med. Scand., 114:59-71, 1943.
- Fadel-Picheth, C. Variabilidade do loco BCHE da butirilcolinesterase e peso do adulto em amostra de Curitiba. Curitiba, 1991, 107p. Tese de Mestrado. Universidade Federal do Paraná
- Fredrickson, D.S.; Levy, R.I. e Lees, R.S. Fat transport in lipoproteins - an integral approach to mechanisms and disorders. N. Engl. J. Med., 276:34-44, 94-103, 148-156, 215-225, 273-281, 1967.
- Gallango, M.L. e Arends, T. Phenotypical variants of pseudocholinesterase in myeloma patients. Human. Genet., 7:104-108, 1969.
- Harris, H. The principles of human biochemical genetics. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 3<sup>a</sup> ed., pág 171, 1980.
- Harris, H.; Hopkinson, D.A e Robson, E.B. Two-dimensional electrophoresis of pseudocholinesterase components in human serum. Nature, 196:1296-1298, 1962.
- Harris, H.; Robson, E.B.; Glen-Bott, A.M. e Thornton, J.A. Evidence for non-allelism between genes affecting human serum cholinesterase. Nature, 200:1185-1187, 1963a.
- Harris, H.; Robson, E.B.; Hopkinson, D.A. e Whittaker, M. Genetical studies on a new variant of serum pseudocholinesterase detected by electrophoresis. Ann. Hum. Genet., 26:359-382, 1963b.
- Hutchinson, A. O.; McCance, R.A. e Widdowson, E.M. Serum cholinesterases. In: Studies of undernutrition, Wuppertal, 1946-1949. Spec. Rep. Ser. med. Res. Coun. (Lond.), 275:216-225, 1951.
- Kalow, W. e Staron, N. On distribution and inheritance of atypical forms of human cholinesterase as indicated by dibucaine numbers. Canad. J. Biochem. Physiol., 35:1305-1320, 1957.
- Kutty, K.M. Review: Biological function of cholinesterase. Clin. Biochem., 13:239-243, 1980.
- Kutty, K.M. e Acharya, C.D. Serum cholinesterase and lipoproteins: a possible relationship. Scand. J. Clin. Lab. Invest., (supl. 126), 29, Resumo 3.28, 1972.

- Kutty, K.M.; Huang, S.N. e Kean, K.T. Pseudocholinesterase in obesity: hypercaloric diet induced changes in experimental obese mice. Experientia, 37:1141-1142, 1981.
- Kutty, K.M.; Jacob, J. C.; Hutton, C.J.; Davis, P.J. e Peterson, S.C. Serum beta-lipoproteins: studies in a patient and in guinea pigs after the ingestion of organophosphorus compounds. Clin. Biochem., 8:379-383, 1975.
- Kutty, K.M.; Redheendran, R. e Murphy, D. Serum cholinesterase: function in lipoprotein metabolism. Experientia, 33:420-421, 1977.
- Kutty, K.M.; Rowden, G. e Cox, A. R. Interrelationship between serum b-lipoprotein and cholinesterase. Canad. J. Biochem., 51:883-887, 1973.
- La Motta, R.V.; McComb, R.B.; Noll, C.R.Jr.; Wetstone, H.J. e Reinfrank, R.F. Multiple forms of serum cholinesterase. Arch. Biochem. Biophys., 124:299-308, 1968.
- Lawrence, S.H. e Melnick, P.J. Enzymatic activity related to human serum beta-lipoprotein: histochemical, imuno-electrophoretic and quantitative studies. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 107:998-1001, 1961.
- Lockridge, O.; Bartels, C.F.; Vaughan, T.A.; Wong, C.K.; Norton, S.E. e Johnson, L.L. Complete aminoacid sequence of human serum cholinesterase. J. Biol. Chem., 262:549-557, 1987.
- Lockridge, O.; Eckerson, H.W. e La Du, B.N. Interchain disulfide bonds and subunit organization in human serum cholinesterase. J. Biol. Chem., 254:8324-8330, 1979.
- Lockridge, O. e La Du, B.N. Loss of the interchain disulfide peptide and dissociation of the tetramer following proteolysis of native human serum cholinesterase. J. Biol. Chem., 257:12012-12018, 1982.
- Magarian, E.O. e Dietz, A.J. Correlation of cholinesterase with serum lipids and lipoproteins. J. Clin. Pharmacol., 27:819-820, 1987.
- Masson, P. Formes moléculaires multiples de la butyrylcholinesterase du plasma humain. Biochim. Biophys. Acta., 578:493-504, 1979.
- Masson, P. A naturally occurring molecular form of human plasma cholinesterase is an albumin conjugate. Biochim. Biophys. Acta., 988:258-266, 1989.
- Masson, P. 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, 1991.
- Millard, C.B. e Broomfield, C.A. A computer model of glycosylated human butyrylcholinesterase. Biochem. Biophys. Res. Commun., 189:1280-1286, 1992.
- Nousiainen, U. e Ryhänen, R. Serum lipids and hepatic microsomal enzymes with special reference to serum cholinesterase in Wistar rats. Gen. Pharmac., 15:123-127, 1984.

- Ohkawa, J.; Furuya, I.; Tabata, S.; Saeki, S.; Oimomi, T. e Baba, S. Chemical characterization of C<sub>5</sub> cholinesterase isoenzyme. Enzyme (suppl.1), 40:37-38, 1988.
- Picheth, G.; Fadel-Picheth, C.; Primo-Parmo, S.L.; Chautard-Freire-Maia, E.A. e Vieira, M.M. An improved method for butyrylcholinesterase phenotyping. Biochem. Genet., 32:83-89, 1994.
- Puhaikainen, E.; Rykänen, R. e Penttilä, I. Serum pseudocholinesterase and HDL-cholesterol. J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 18:684, 1980.
- Robinson, A.R.; Robson, M.; Harrison, A.P. e Zuelzer, W.W. A new technique for differentiation of hemoglobin. J. Lab. Clin. Med., 50:745-752, 1957.
- Ryhänen, R.J.J.; Herranen, J.; Korhonen, K.; Penttila, I.; Polvilampi, M. e Puhakainen, E. Relationship between serum lipids, lipoproteins and pseudocholinesterase during organophosphate poisoning in rabbits. Int. J. Biochem., 16:687-690, 1984.
- Ryhänen, R.J.J.; Jauhianen, M.S.; Laitinen, M.V. e Puhakainen, E.V. The relationships between human serum pseudocholinesterase, lipoproteins and apolipoproteins (APOHDL). Biochem. Med., 28:241-245, 1982.
- Scott, E.M. e Powers, R.F. Properties of the C<sub>5</sub> variant form of human serum cholinesterase. Am. J. Hum. Genet., 26:189-194, 1974.
- Souza, R.L.R. Estudos sobre nova banda da butirilcolinesterase humana (C<sub>4/5</sub>) verificada em eletroforese. Curitiba, 1995. Tese de Mestrado. Universidade Federal do Paraná.
- Stueber-Odebrecht, N.; Chautard-Freire-Maia, E.A.; Primo-Parmo, S.L. e Carrenho, J.M.X. Studies on the CHE1 locus of serum cholinesterase and surnames in a sample from Southern Brazil. Rev. Brasil. Genet., 8: 535-543, 1985.
- Sugimori, T. Shortened action of succinylcholine in individuals with cholinesterase C<sub>5</sub> isoenzyme. Canad. Anaesth. Soc. J., 33:321-327, 1986.
- Tortolero, M. e Medina, J.R. Las isoenzimas C<sub>4</sub> y C<sub>5</sub> de la pseudocolinesterasa humana. Sangra, 23:157-162, 1978.
- Van Ros, G. e Vervoort, T. Frequencies of the "atypical" and C<sub>5</sub> variants of serum cholinesterase in Zairians and Belgians. Detection of the C<sub>5</sub> variant by agar gel electrophoresis with an acid buffer. Ann. Soc. belge Méd. trop., 53: 633-644, 1973.
- Wescoe, W.C.; Hunt, C.H.; Riker, W.F. e Litt, I.C. Regeneration rates of serum cholinesterase in normal individuals and in patients with liver damage. Am. J. Physiol., 149:549-551, 1947.
- Whittaker, M. Plasma cholinesterase variants and the anaesthetist. Anaesthesia., 35:174-197, 1980.
- Whittaker, M. Cholinesterase. Karger, Basel, New York., 11:1-126, 1986.