

VÂNIA MANFREDINI DE ALCÂNTARA

DETERMINAÇÃO DOS FENÓTIPOS CHE1 UF E CHE1 AK EM AMOSTRAS DE
BRANCOS E NEGRÓIDES DE CURITIBA.

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Genética da Universidade Federal do
Paraná, para obtenção do título de Mestre
em Ciências Biológicas, na área de Genética

Orientadora: Profa. Dra. Eleidi Alice Chautard Freire Maia

Curitiba
1989

Aos meus pais, marido e filhos.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Eleidi Alice Chautard Freire Maia pela sugestão do tema desta tese, bem como pelo apoio, carinho transmitido e eficiente orientação, durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Curso de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná.

Aos professores e amigos do Departamento de Genética pelos ensinamentos recebidos durante o curso de pós-graduação.

Ao Prof. Lodércio Culpi por ceder as amostras de plasma que foram utilizadas neste trabalho.

Aos professores Sérgio Luiz Primo Parmo e Muriel Mourão Vieira, pela ajuda e conhecimentos transmitidos.

À Profa. Maria Luiza Petzl Erler pela leitura do manuscrito e sugestões.

Aos amigos Sérgio Eduardo Fontoura da Silva e Geraldo Picheth, pelas grandes ajudas prestadas no decorrer deste trabalho.

À Elizabeth Setim, (Betinha), pela edição do texto realizada no computador XPC.

A Fernando Sedor pela ajuda na revisão do texto.

Ao Departamento de Bioquímica, por permitir a utilização do espectrofotômetro Varian Techtron.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

Ao Dr. Kaoru Ishitani, dos Laboratórios Ayerst Ltda de São Paulo, por ter gentilmente enviado o cloridrato de propranolol que permitiu a realização deste trabalho.

À Hoffmann-La Roche e Co., Basileia, Suíça, pela doação do inibidor Ro2-0683.

Às Profas. Vera Maria Vidal Gomes, Cloris Vidal Gomes Gouveia e Mariléia Scartezzini, pela amizade e pelo incentivo para que eu realizasse o curso de mestrado.

À Irene Sedoski, pela simpatia e atenção que sempre me dispensou.

Ao Centro de Computação da Universidade Federal do Paraná pela atenção prestada na fase de análise dos dados.

Aos meus pais (Abelardo e Cirema), meu marido (Gusmão) e meus filhos (Vanessa, Sérgio e Viviane), pelo apoio e compreensão.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	x
PREFÁCIO.....	1
INTRODUÇÃO.....	3
1.1 - CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DA COLINESTERASE DO SORO.....	4
1.1.1 - Aspectos gerais.....	4
1.1.2 - Estrutura molecular.....	5
1.2 - FISILOGIA DA COLINESTERASE DO SORO.....	8
1.3 - LOCOS DA COLINESTERASE DO SORO E SEUS ALELOS.....	9
1.3.1 - Alelos do loco <i>CHE1</i>	10
1.3.1.1 - Identificação.....	11
1.3.1.2 - Alelo atípico.....	12
1.3.1.3 - Alelo resistente ao fluoreto - <i>CHE1*F</i>	14
1.3.1.4 - Alelos silenciosos: <i>CHE1*S</i> , <i>CHE1*R</i> e <i>CHE1*T</i>	16
1.3.1.5 - Alelo <i>CHE1*J</i>	17
1.3.1.6 - Alelo <i>CHE1*K</i>	18
1.3.1.7 - Alelo resistente à succinilcolina - <i>CHE1*SU</i>	19
1.3.1.8 - Alelo Newfoundland - <i>CHE1*NFLD</i>	20
1.3.1.9 - Alelo <i>CHE1*H</i>	20
1.3.2 - Alelos do loco <i>CHE2</i>	21

1.3.3	- Alelo Cynthiana (CY).....	22
1.4	- FREQUÊNCIAS DE ALGUNS ALELOS DO LOCO <i>CHE1</i> DA COLINESTERASE DO SORO.....	23
1.4.1	- Alelo <i>CHE1*A</i>	26
1.4.2	- Alelo <i>CHE1*F</i>	26
1.4.3	- Alelos silenciosos.....	27
1.4.4	- Alelo <i>CHE1*K</i>	27
1.5	- FREQUÊNCIAS DO ALELO <i>CHE2*Ce+</i>	28
1.6	- MÉTODOS UTILIZADOS NA IDENTIFICAÇÃO DO FENÓTIPO <i>CHE1</i> UF.....	28
II	- MATERIAL E MÉTODOS.....	31
2.1	- CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS UTILIZADAS...	31
2.1.1	- Amostra utilizada para padronização da técnica.....	31
2.1.2	- Amostra populacional.....	32
2.1.3	- Amostra de indivíduos <i>CHE1</i> UA.....	32
2.1.4	- Amostra para confirmação de resultados.	35
2.2	- MÉTODOS LABORATORIAIS.....	37
2.2.1	- Método de Kalow e Genest (1957) modifi- cado, a 37°C.....	37
2.2.2	- Método proposto pelo presente trabalho.	41
2.2.3	- Método de Kalow e Genest (1957) modifi- cado, a 25°C.....	45
2.3	- ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
III	- RESULTADOS.....	48
3.1	- PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA.....	48
3.2	- AMOSTRA POPULACIONAL.....	50
3.3	- AMOSTRA DE INDIVÍDUOS DE FENÓTIPO <i>CHE1</i> UA	54
3.4	- CONFIRMAÇÃO DOS RESULTADOS.....	54
IV	- DISCUSSÃO.....	57
4.1	- ANÁLISE SOBRE A PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA..	57

4.1.1	- Método de Kalow e Genest (1957) modificado, a 37°C.....	57
4.1.2	- Método proposto pelo presente trabalho.	60
4.2	- ANÁLISE DA AMOSTRA POPULACIONAL.....	64
4.3	- ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS SEXO, IDADE, COR E ATIVIDADE DA COLINESTERASE DO SORO.....	68
4.4	- ANÁLISE DOS FENÓTIPOS CHE1 UA, COM A FINALIDADE DE EVIDENCIAR FENÓTIPOS CHE1 AK.	69
4.5	- ANÁLISE DA CONFIRMAÇÃO DOS RESULTADOS....	73
V	- RESUMO E CONCLUSÕES.....	84
VI	- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87

LISTA DE TABELAS

	Página
1 - Distribuição das freqüências fenotípicas e genotípicas do sistema da colinesterase do soro em diferentes populações.....	24
2 - Métodos utilizados com base para criação do método proposto neste trabalho, bem como suas principais características.....	29
3 - Distribuição etária, sexual e étnica da amostra utilizada na padronização da técnica.....	33
4 - Distribuição etária, sexual e étnica da amostra populacional.....	34
5 - Distribuição etária, sexual e étnica da amostra de indivíduos CHE1 UA.....	36
6 - Porcentagens média de inibição (\pm D.P.) e respectivas amplitudes de variação (A.V.), referentes à amostra utilizada para padronização da técnica, classificada por fenótipo e tipo de inibidor - Método de Kalow e Genest (1957) modificado, a 37°C..	49
7 - Porcentagens médias de inibição (\pm D.P.) e respectivas amplitudes de variação (A.V.) referentes à amostra de padronização da técnica, classificada por fenótipo e tipo de inibidor - Método proposto pelo presente trabalho.....	51
8 - Porcentagens médias de inibição com respectivos desvios padrões e amplitudes de variação, obtidos para os fenótipos da amostra da população de Curitiba....	52
9 - Freqüências dos fenótipos CHE1 UF e do alelo CHE1*F, de acordo com o grupo racial.....	53
10 - Porcentagens médias de inibição (\pm D.P.) e respectivas amplitudes de variação (A.V.), classificadas por fenótipo e tipo de inibidor.....	55

11 - Comparação das amplitudes de variação dos números de inibição, obtidos pelo presente trabalho e por Zsigmond e cols. (1980), com a utilização do método de Kalow e Genest (1957), modificado e aplicado a 37°C, com aqueles obtidos por outros investigadores que utilizaram este mesmo método, aplicado a 25°C..	58
12 - Comparação das amplitudes de variação dos números de inibição, obtidos pelo presente trabalho, com a utilização do método de Kalow e Genest (1957), modificado e aplicado a 25°C, com aqueles obtidos por outros investigadores, na mesma temperatura.....	74
13 - Amplitudes de variação dos números de inibição de alguns fenótipos do loco <i>CHE1</i> do trabalho de Evans e Wardell (1984) e números de inibição obtidos no presente trabalho.....	75

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 - Gráfico feito a partir dos valores médios (± 2 D.P.) de RN (ordenada) e PN (abscissa), obtidos da tipagem de plasmas de 15 indivíduos CHE1 U, 14 CHE1 UA e 2 CHE1 UF pelo método de Kalow e Genest (1957) modificado, a 37°C.....	62
2 - Gráfico feito a partir dos valores médios (± 2 D.P.) de RN (ordenada) e PN (abscissa), obtidos da tipagem de plasmas de 15 indivíduos CHE1 U, 14 CHE1 UA e 2 CHE1 UF pelo método proposto pelo presente trabalho..	63
3 - Gráfico feito a partir dos valores médios (± 2 D.P.) de DN (ordenada) e PN (abscissa), obtidos por Whittaker e cols. (1981), na análise de 236 indivíduos CHE1 U, 223 CHE1 UA e 59 CHE1 UF.....	64
4 - Distribuição dos fenótipos CHE1 U, CHE1 UF, CHE1 UA e CHE1 AK de acordo com os valores de RN (ordenada) e PN (abscissa), na amostra da população de Curitiba...	67
5 - Distribuição dos fenótipos CHE1 UA e CHE1 AK de acordo com os valores de RN (ordenada) e PN (abscissa), obtidos pelo método proposto no presente trabalho....	70
6 - Distribuição dos fenótipos CHE1 UA e CHE1 AK, de acordo com os valores de FN (ordenada) e DN (abscissa), obtidos pelo método de Kalow e Genest (1957) modificado, a 25°C.....	77
7 - Distribuição dos fenótipos CHE1 UA e CHE1 AK, de acordo com os valores de PN (ordenada) e DN (abscissa), obtidos pelo método de Kalow e Genest (1957) modificado, a 25°C.....	79
8 - Distribuição dos fenótipos CHE1 UA e CHE1 AK, de acordo com os valores de FN (ordenada) e RN (abscissa), obtidos pelo método de Kalow e Genest (1957) modificado, a 25°C.....	80
9 - Distribuição dos fenótipos CHE1 UA E CHE1 AK, de acordo com os valores de PN (ordenada) e FN (abscissa), obtidos pelo método de Kalow e Genest (1957) modificado, a 25°C.....	81

10 - Distribuição dos fenótipos CHE1 UA e CHE1 AK, de acordo com os valores de PN (ordenada) e RN (abscissa), obtidos pelo método de Kalow e Genest (1957) modificado, a 25°C.....	82
11 - Distribuição dos fenótipos CHE1 UA e CHE1 AK, de acordo com os valores de DN (ordenada) e RN (abscissa), obtidos pelo método de Kalow e Genest (1957) modificado, a 25° C.....	83

PREFÁCIO

O principal objetivo deste trabalho foi estimar a frequência do alelo *CHE1*F* da colinesterase do soro, numa amostra da população de Curitiba, uma vez que existe somente um estudo que determina a frequência deste alelo em dados brasileiros (Simpson e Kalow, 1965).

Existe grande interesse nesta estimativa, uma vez que este alelo aparece com frequência mais alta em amostras de pacientes apnéicos do que na população em geral (Thompson e Whittaker, 1966; Whittaker e Vickers, 1970; Das, 1975). Além disto, vários trabalhos relatam que o alelo *CHE1*F* confere uma maior susceptibilidade à hipertemia maligna, síndrome causada por excesso de cálcio no sarcoplasma (Whittaker e cols., 1977; Ellis e cols., 1978; Whittaker e Britten 1981b). Também foram publicados trabalhos que mostram uma maior incidência do alelo *CHE1*F* em pacientes com doenças mentais (Whittaker e Berry, 1977) e entre aqueles submetidos à terapia com lítio (Whittaker e Spencer, 1977), quando comparados com os respectivos controles.

Visando a estimativa da frequência do alelo *CHE1*F*, modificamos métodos já descritos, criando, desta maneira, um novo método, que nos permitiu a identificação do fenótipo *CHE1 UF*.

Após o início deste trabalho surgiu, ainda, o interesse em estimar, nesta mesma população, a frequência do fenótipo *CHE1 AK*

entre os indivíduos que são identificados como CHE1 UA pelas técnicas clássicas. Evans e Wardell (1984) e Whittaker e Britten (1985) encontraram freqüências de CHE1 AK entre os considerados como CHE1 UA, de 11,5% e 13,0%, respectivamente, em populações britânicas. A freqüência do alelo *CHE1*K* ainda não tinha sido estimada em amostras brasileiras. Admitimos que os indivíduos CHE1 AK apresentem maior susceptibilidade ao suxametônio que os CHE1 UA, uma vez que o alelo *CHE1*K* condiciona uma redução de 33,0% no número de moléculas, que são semelhantes às usuais (Rubinstein e cols., 1978).

I - INTRODUÇÃO

Colinesterase do soro, ou do plasma, é sinônimo de pseudo-colinesterase, colinesterase não específica, butirilcolinesterase ou colinesterase tipo S (do soro), nomes estes usados para diferenciá-la da acetilcolinesterase ou colinesterase verdadeira, encontrada nos eritrócitos. De acordo com a Comissão de Enzimas, seu nome sistemático é acilcolina - acilhidrolase e possui o número código EC 3.1.1.8.

Os principais locais de distribuição desta enzima são a mucosa intestinal, fígado, plasma e substância branca do sistema nervoso central (Evans e cols., 1986).

Sua síntese é feita pelas células do fígado (Wescoe e cols., 1947) e o decréscimo de seus níveis no plasma, do mesmo modo que o decréscimo da albumina, tem sido usado para o diagnóstico de doenças crônicas deste órgão.

A colinesterase do soro exibe polimorfismo genético e os primeiros a descrevê-lo foram Bourne e cols. (1952) e Evans e cols. (1952).

As variações herdáveis desta enzima foram verificadas, inicialmente, devido ao uso da droga suxametônio (succinildicolina) como relaxante muscular em eletrochoques, endoscopias e cirurgias. O suxametônio age sobre os músculos voluntários e assim produz o relaxamento. Seu efeito é normalmente moderado e se desfaz após alguns minutos, pela ação

da colinesterase do soro, retornando ao normal o tono muscular, incluindo aquele da respiração. Contudo, certos indivíduos permanecem relaxados e sem respiração espontânea, por períodos prolongados (até algumas horas). Isto foi demonstrado por Bourne e cols. (1952) e Evans e cols. (1952) como devido à deficiência da atividade normal da colinesterase do soro e Forbat e cols. (1953) relataram ser esta condição familiar.

Kalow e Genest (1957) mostraram que a apnéia prolongada, seguida ao uso do suxametônio, poderia ser devida a uma colinesterase anormal do soro e herdada, a qual seria mais resistente à inibição por dibucaína que a enzima normal.

Mais tarde, novas isozimas da colinesterase do soro foram encontradas e serão mencionadas posteriormente.

1.1 - CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DA COLINESTERASE DO SORO

1.1.1 - Aspectos gerais

O termo colinesterase foi dado por Stedman e cols. (1932, apud Evans, 1986) às enzimas que hidrolisam ésteres de colina. O sangue humano contém dois tipos de colinesterase: acetilcolinesterase dos eritrócitos e colinesterase do soro.

Em 1940, um trabalho com material humano estabeleceu que estas enzimas eram diferentes, possuindo propriedades bioquímicas características (Alles e Hawes, 1940). Enquanto a dos eritrócitos era específica para a acetilcolina e era inibida com altas concentrações de substrato, a do plasma hidrolisava outros ésteres alifáticos de colina mais rapidamente do que a acetilcolina e não era afetada pelo aumento da concentração deste

substrato. A colinesterase do soro hidrolisa também ésteres que não contém colina tais como o ácido acetilsalicílico (Harris, 1975)

1.1.2 - Estrutura molecular

A colinesterase do soro foi caracterizada por Surgenor e Ellis (1954, *apud* Giblett, 1969) como uma alfa-2-globulina e Svensmark (1961, *apud* Giblett, 1969) mostrou que ela é uma glicoproteína contendo vários resíduos de ácido siálico.

Harris e cols. (1962), utilizando eletroforese bidimensional, encontraram quatro componentes com diferentes atividades colinesterásicas, que foram denominados C₁, C₂, C₃ e C₄, em ordem decrescente de mobilidade. Eles observaram ainda que, no soro de alguns indivíduos, aparecia um componente extra, o qual foi denominado C₅. Este apresentava uma mobilidade menor que C₄, tanto na eletroforese feita em papel de filtro como em gel de amido. Posteriormente, com o estudo de famílias, verificou-se que o componente C₅ era determinado geneticamente (Harris e cols., 1963a).

Harris e Robson (1963) chamaram C₄ de componente principal e C₁, C₂ e C₃ de componentes menores. Os autores fracionaram estes quatro componentes em coluna de Sephadex G-200, e pelo fato de observarem uma ordem de eluição inversa à obtida na eletroforese, concluíram que estes componentes diferiam quanto ao peso molecular.

La Motta e cols. (1965) demonstraram a interconvertibilidade dos componentes C₁ a C₄ da colinesterase do soro e sugeriram que estas múltiplas formas são polímeros de tamanhos va-

riáveis, formados por agregados de uma sub-unidade comum. Concluíram, ainda, que estas formas poderiam ser classificadas como isozimas com base em suas especificidades de substratos, suas susceptibilidades aos inibidores e, mais especificamente, suas propriedades de interconvertibilidade. Por despolarização, C_4 poderia se transformar em C_3 , C_2 e C_1 , assim como estes, isoladamente e em condições favoráveis de polimerização, poderiam se transformar em C_4 .

As estimativas de peso molecular para C_1 e C_4 estão em torno de 85.000 e 350.000 respectivamente (Das e Liddell, 1970; Boutin e Brodeur, 1971; Muensch e cols., 1976; Lockridge e cols., 1979; Lockridge e La Du, 1982).

La Motta e cols. (1970) relataram que os pesos moleculares das isozimas C_1 , C_2 , C_3 , C_4 e C_5 eram, respectivamente, 82.000, 110.000, 170.000, 200.000 e 260.000. Estes dados apoiaram a hipótese de que as formas múltiplas da colinesterase do soro eram agregados moleculares.

Posteriormente, Masson (1979) demonstrou com centrifugação em gradiente de sacarose e eletroforese de gel de poliacrilamida que C_1 é a forma monomérica da enzima com peso molecular de 84.800 ± 5.800 , e que C_1 , C_3 e C_4 correspondem ao monômero, dímero e tetrâmero da enzima, sendo parcialmente interconvertíveis. O componente C_2 é composto de C_1 associado a uma sub-unidade menor inativa, a qual é responsável pela suas propriedades elétricas específicas (mobilidade e ponto isoelétrico). Este fragmento inativo corresponde a uma glicoproteína de peso molecular de cerca de 20.000.

A estrutura tetramérica da colinesterase do soro também já havia sido sugerida por Scott e Powers (1972) e por Muensch e cols. (1976). Lockridge e cols. (1979) elaboraram um modelo es-

quemático para a colinesterase do soro. O tetrâmero se arranja como dois dímeros, cada um ligado por pontes de dissulfeto, sendo que os dímeros unem-se por ligações não covalentes. Após a redução e alquilação das ligações dissulfeto intercadeias, estes autores mostraram que a enzima continha um tetrâmero ativo, não sendo necessárias estas ligações para sua atividade. São importantes, entretanto, para sua estabilidade, como foi mostrado pela medida da taxa de inativação pelo calor. A 55°C, a enzima nativa apresentou uma meia vida de 54 minutos e a enzima com as pontes de dissulfeto reduzidas, de apenas 16 minutos.

Muensch e cols. (1976) demonstraram que a atividade de C_1 é semelhante a de C_4 . Lockridge e La Du (1978) relataram a presença de 4 centros ativos no tetrâmero C_4 , enquanto Muensch e cols. (1976) e Goedde e Agarwal (1978) encontraram 2 por tetrâmero. Possíveis explicações para esta discordância são:

1. 24% da molécula são representados por carboidratos e ácido siálico que podem desempenhar papel importante no bloqueio do centro ativo;

2. moléculas inativas que não são separáveis dos polímeros ativos podem interferir no experimento;

3. cada sub-unidade pode ter um centro ativo, mas a associação para construir o tetrâmero pode ocasionar um bloqueio parcial desses centros;

O centro ativo da colinesterase do soro, como da acetilcolinesterase, possui 2 sítios; um carregado negativamente (sítio aniônico), com função de orientar o substrato carregado positivamente, e o outro, o esterásico, que hidrolisa o substrato, ligando-se covalentemente ao grupo carbonila do mesmo, onde ocorrerá a clivagem (Wilson, 1954).

O sítio ativo determinado por La Du e Lockridge (1986) apresentou 29 aminoácidos na seguinte seqüência: Ser - Val - Thr - Leu - Phe - Gly - Glu - Ser* - Ala - Gly^{1*} - Ala - Ala - Ser - Val - Ser - Leu - His - Leu - Leu - Ser^{2*} - Pro - Gly - Ser - His - Ser - Leu - Phe - Thr - Arg^{3*}, muito semelhante ao da acetilcolinesterase, sugerindo uma origem comum entre elas.

O resíduo de serina crítico do sítio ativo foi indicado por um asterisco.

O seqüenciamento completo feito por Lockridge e cols. (1987) mostrou que a enzima contém 574 aminoácidos por sub-unidade e 9 cadeias de carboidratos ligadas a 9 resíduos de asparagina. Esses autores localizaram as pontes dissulfeto dentro desta seqüências de aminoácidos. A colinesterase do soro humano possui 8 cistinas em cada subunidade de 574 aminoácidos. Seis dessas formam 3 pontes dissulfeto internas; uma quarta ponte dissulfeto envolve a Cys571, a qual parece se ligar covalentemente a Cys571 de uma sub-unidade idêntica. A serina essencial para o sítio ativo estaria na posição 198.

1.2 - FISILOGIA DA COLINESTERASE DO SORO

A função da colinesterase do soro é ainda desconhecida, porém várias hipóteses têm sido levantadas:

a) hidrólise de ésteres de acilcolina e talvez mais especificamente da butirilcolina, os quais possuem ação nicotínica indesejável para o organismo e que são produtos do catabolismo de ácidos graxos livres e lipogênese no fígado (Clitherow e cols., 1963);

b) transmissão da condução nervosa lenta (Bergmann e Wurzel, 1954);

c) regulação, juntamente com colina acetilase, na homeostasia da colina no plasma (Funnell e Oliver., 1965);

d) hidrólise da substância P (Lockridge, 1982), neuromodulador relacionado com a transmissão da dor, que também afeta a contração dos músculos lisos, e redução da pressão sanguínea (Nicoll e cols., 1980);

e) manutenção do revestimento de mielina. A colinesterase do soro está presente nas células de Schwann de diversos nervos e se intercala com a bainha de mielina (Earl e Thompson, 1952, apud Kutty, 1980);

f) metabolismo de lipídios. A colinesterase do soro circula em estado inativo no organismo, quando associada à beta-lipoproteína, com a qual forma complexos relativamente instáveis; seus níveis encontram-se aumentados em obesidade e hiperlipoproteinemias (Lawrence e Melnick, 1961; Cucuianu e cols., 1968 e 1975).

1.3 - LOCOS DA COLINESTERASE DO SORO E SEUS ALELOS

A atividade da colinesterase do soro depende tanto de fatores genéticos como ambientais. Dois locos autossômicos, *CHE1* e *CHE2* não ligados, determinam os fenótipos desta enzima (Harris e cols., 1963a,b). Foram propostos diferentes sistemas de nomenclatura para estes locos. Motulsky (1964) os chamou de E_1 e E_2 ; Goedde e Baitsch (1964), de Ch_1 e Ch_2 e, em 1979, no 5º Congresso Internacional de Mapeamento do Genoma Humano, foram estabelecidas as denominações *CHE1* e *CHE2* (Shows e cols., 1979).

No loco *CHE1* já foram encontrados vários alelos que determinam diferenças qualitativas e quantitativas da colinesterase do soro. Entre os alelos mais estudados, temos: *CHE1*U*, *CHE1*A*, *CHE1*F*, *CHE1*S*, *CHE1*K* e *CHE1*J*. Indicações de outros alelos também foram propostas: *CHE1*SU* (Goedde e Agarwal, 1978); *CHE1*NFLO* (Simpson e Elliott, 1981) e *CHE1*H* (Whittaker, 1987).

O loco *CHE2* possui os alelos *CHE2*C_B⁺* e *CHE2*C_B⁻* que determinam, respectivamente, a presença e a ausência da banda *C_B*. O soro dos indivíduos *CHE2 C_B⁺*, isto é, daqueles com a isozima extra, possui, em média, um nível de atividade 25% maior do que aqueles que não a contém (indivíduos *CHE2 C_B⁻*). A variação da atividade, entretanto, é grande em ambos os fenótipos e as duas distribuições se sobrepõem em uma grande extensão.

Van Ros e Druet (1966) descreveram eletroforeses feitas com soros de negros africanos, sendo que em dois deles apareceu um componente que foi denominado *C_A*, o qual se diferenciava de *C_B* devido a sua migração mais lenta. Em dois outros negros africanos, estes mesmos autores relataram os componentes *C_Aa* e *C_Ab* com mobilidade, respectivamente, mais rápida e mais lenta que *C_A*. Neste mesmo ano, numa amostra de nordestinos brasileiros, Ashton e Simpson (1966) encontraram um soro com duas isozimas extras: uma considerada como *C_A* e outra que migrou entre a origem e *C_A*.

1.3.1 - Alelos do loco *CHE1*

1.3.1.1. Identificação

Os principais alelos do loco *CHE1* têm sido identificados graças aos diferentes comportamentos, das enzimas por eles determinadas, frente a uma variedade de inibidores.

O primeiro inibidor utilizado foi a dibucaína, com o uso da qual Kalow e Staron (1957) conseguiram uma distribuição trimodal na população estudada, constituída de homozigotos para os alelos *CHE1*U* (usual) e *CHE1*A* (atípico) e, ainda, de heterozigotos para ambos os alelos.

Outros inibidores foram testados por Kalow e Davies (1958) e também mostraram sua eficiência na separação fenotípica, dando resultados comparáveis aos da dibucaína. Foram eles:

1. Brometo de tetrametilamônio;
2. Cloreto de colina;
3. Brometo de decametônio;
4. Cloreto de succinilcolina;
5. Hidrocloreto de meperidina;
6. Hidrocloreto de clorpromazina;
7. Hidrocloreto de procaína;
8. Hidrocloreto de tetracaína;
9. Hidrocloreto de dibucaína;
10. Win 5303 - hidrocloreto de 2-n-pentoxi, 4-amino-dietil-aminoetilbenzoato;
11. Win 4510 - hidrocloreto de 2-n-hexoxi, 4-amino-dietil-aminoetiltiobenzoato;
12. Brometo de neostigmina;
13. Salicilato de fisostigmina;
14. Ro2-0683 - dimetilcarbamato do brometo de 2-hidroxi-5-fenilbenziltrimetilamônio;

15. Tetraetilpirofosfonato;

16. Diisopropilfluorofosfonato;

Os compostos de número 3 e 4 são relaxantes do músculo esquelético; o de número 5 é um analgésico sintético; o de número 6 é tranqüilizante; nos números de 7 a 11 são indicados anestésicos locais; nos números 12 a 16 estão relacionados inibidores da colinesterase bastante conhecidos.

Uma grande variedade de outros inibidores também tem sido usada: NaCl e NaF (Harris e Whittaker, 1963), n-butilalcool (Whittaker, 1968a), formaldeído (Whittaker, 1969), tiroxina (Whittaker, 1970; *apud* Whittaker, 1980), uréia (Hanel e Viby-Mogensen, 1971 e 1977), succinildicolina (King e Griffin, 1973), NaBr (Dickson, 1978), brometo de pancurônio e análogos (Whittaker e Britten, 1980 e 1981a), e propranolol (Whittaker e cols., 1981).

Estes inibidores têm sido usados com diversos substratos, contendo ou não o grupamento colina, como benzoilcolina, alfa-naftilacetato e inúmeros ésteres de tiocolina, como propionil e butiriltiocolina.

1.3.1.2 - Alelo atípico

Evans e cols. (1952) relataram relaxamento prolongado em dois pacientes que haviam recebido succinilcolina, antes da terapia de eletrochoque.

Mais tarde, Kalow e Gunn (1957) verificaram que a colinesterase destes indivíduos não tinha capacidade de hidrolizar a succinilcolina em concentrações farmacológicas e que mostrava

uma resistência anormal ao inibidor dibucaína (Nupercaína) que é um anestésico local.

Neste mesmo ano, Kalow e Genest (1957) introduziram o termo "número de dibucaína" (DN), definido como a porcentagem de inibição da colinesterase do soro frente a este inibidor. A fórmula que expressa o número de dibucaína é a seguinte:

$$DN = \left[1 - \frac{AP}{AA} \right] \times 100,$$

onde AP representa o decréscimo de absorvância na presença do inibidor e AA, na ausência deste. A enzima atípica é identificada, portanto, verificando-se a atividade enzimática, em relação à benzoilcolina, na presença e ausência do inibidor dibucaína.

No mesmo ano, Kalow e Staron (1957) verificaram que a biossíntese da colinesterase era controlada pelos alelos *CHE1*U* e *CHE1*A*. Indivíduos com DN próximo de 80 são homozigotos para *CHE1*U*, enquanto aqueles com DN em torno de 20 são homozigotos para *CHE1*A*. Foram encontrados, também, indivíduos com DN de aproximadamente 60, os quais são heterozigotos, portanto, possuidores das duas enzimas (usual e atípica). Este último fenótipo foi denominado de intermediário.

Kalow e Davies (1958) estudaram o soro de indivíduos com fenótipos intermediários, utilizando Ro2-0683, o qual inibe a enzima usual com maior intensidade do que a dibucaína. Os resultados indicaram que as duas enzimas se encontram em proporções

equimoleculares. Foi sugerido, por estes autores bem como por Muensch e cols. (1978), que deveria haver alterações no sítio aniônico da enzima atípica.

Lockridge e La Du (1986), estudando as seqüências de aminoácidos dos sítios ativos das enzimas usual e atípica, não encontraram substituições de aminoácidos no sítio ativo e sim uma diferença no número de aminoácidos nestes sítios. Na usual foram encontrados 29 e na atípica 22 aminoácidos, estes iguais aos 22 primeiros da enzima usual. McGuire e cols. (1989), entretanto, em estudos com DNA, mostraram que a diferença entre o alelo atípico e o usual é devida a uma mutação de ponto no nucleotídeo 209. Há mudança da trinca 70 de GAT para GGT, de modo que a enzima atípica apresenta o aminoácido glicina no lugar de asparagina.

1.3.1.3 - Alelo resistente ao fluoreto - *CHE1*F*

Harris e Whittaker (1961) tentaram identificar os fenótipos *CHE1 U*, *CHE1 UA* e *CHE1 A*, utilizando o fluoreto de sódio como inibidor. Mostraram que o número de fluoreto (FN) poderia ser utilizado da mesma maneira que o número de dibucaína (DN), apenas substituindo o inibidor dibucaína pelo fluoreto de sódio, no método de Kalow e Genest (1957). Contudo, examinando um grande número de indivíduos, encontraram alguns, anteriormente classificados como usuais e outros, classificados como intermediários (*CHE1 UA*), que mostraram um DN pouco menor e um FN bastante menor do que o esperado para estes fenótipos. Esses autores propuseram, então, a existência de uma nova variante estrutural para a colinesterase do soro. Posteriormente, Harris

e Whittaker (1962), pesquisando várias famílias, tiveram a confirmação de que o gene responsável por esta alteração era um terceiro alelo do loco *CHE1*, que foi denominado *CHE1*F* e cuja presença resulta numa variante enzimática conhecida como "resistente ao fluoreto". Evidências confirmando estes achados foram dadas por outros trabalhos, feitos por Liddell e cols. (1963), Goedde e cols. (1964), Thompson e Whittaker (1966), Simpson (1967) e Whittaker (1964, 1969).

Liddell e cols. (1963) encontraram uma família com dois indivíduos possivelmente homozigotos para o alelo resistente ao fluoreto. Esses casos apresentaram DN e FN próximos aos dos fenótipos *CHE1 AF*, porém com uma inibição pelo Ro2-0683 bem maior. Isso permitiu a distinção entre estes dois fenótipos.

A determinação do fenótipo *CHE1 UF* se torna bastante difícil, uma vez que a inibição pelo fluoreto de sódio é muito sensível a pequenas variações de temperatura (Lee e Robinson, 1967; King e Dixon, 1970; King e Morgan, 1970).

Whittaker e cols. (1981) apresentaram uma nova técnica que utiliza o propranolol como inibidor, conseguindo uma melhor separação entre os fenótipos *CHE1 UF* e usual. O propranolol é um bloqueador beta-adrenérgico indicado, entre outros casos, na terapia de infarto do miocárdio, angina de peito, arritmias cardíacas e hipertensão arterial. Foi observado por Periss e Whittaker (dados não publicados; *apud* Whittaker e cols., 1981) que indivíduos medicados com propranolol mostravam-se mais sensíveis ao suxametônio, o que parecia estar correlacionado com diminuição na atividade da colinesterase do soro. Além disto, o nível normal desta enzima era restabelecido após o término da terapia. Após esta evidência, resolveram verificar se o propranolol poderia diferenciar as variantes da enzima, determinadas

pelo loco *CHE1*. O resultado foi positivo e possibilitou, inclusive, uma boa identificação dos fenótipos *CHE1 UF* e *CHE1 AF*.

1.3.1.4 - Alelos silenciosos: *CHE1*S*, *CHE1*R* e *CHE1*T*

Pesquisas para verificar o padrão de herança do alelo *CHE1*A* apresentaram, em várias famílias, resultados inesperados (Kalow e Staron, 1957; Harris e cols., 1960; Liddell e cols., 1962; Simpson e Kalow, 1964). Nestas famílias, indivíduos considerados homozigotos atípicos pelo DN mostraram-se heterozigotos nos estudos familiares.

Para explicar estes achados, Kalow e Staron (1957) sugeriram a presença de um alelo determinante de ausência de atividade enzimática. A comprovação desta hipótese se deu com a descoberta do primeiro homozigoto para este alelo, no qual não se detectou atividade da colinesterase do soro. Tal achado foi relatado por Hart e Mitchell (1962) e Liddell e cols. (1962), em uma mulher grega que apresentou apnéia induzida pelo suxametônio, na ausência de qualquer doença que pudesse levar a uma diminuição de atividade da colinesterase do soro.

Goedde e cols. (1964) também relataram o caso de dois irmãos onde os alelos *CHE1*A* e *CHE1*S* foram encontrados em heterozigose.

Mais tarde, foram descritos tanto novos casos, sem qualquer atividade desta enzima, como também com atividade baixíssima, em torno de 2,0 a 3,0% do normal.

Hodgkin e cols. (1965), ao examinarem soros de indivíduos sem atividade enzimática, mostraram a ausência de bandas em eletroforese em gel de amido e falta de reação imunológica

frente a anticorpos contra a colinesterase humana. Resultados semelhantes foram encontrados por Kattamis e cols. (1967).

Goedde e cols. (1965) verificaram, entretanto, em soros de indivíduos com atividade muito baixa, padrões de inibição e mobilidade eletroforética comparáveis aos da enzima normal. Goedde e Altland (1968) e Rubinstein e cols. (1970) encontraram resultados semelhantes que sugeriram a heterogeneidade dos alelos silenciosos. Indivíduos homozigotos para um dos alelos (*CHE1*S*) não apresentavam atividade colinesterásica, enquanto os homozigotos para o outro alelo (*CHE1*T*) poderiam apresentar uma atividade baixa.

Scott e Wright (1976) descreveram um terceiro tipo de alelo silencioso, em esquimós, denominado *CHE1*R*. Soros de homozigotos apresentaram, em eletroforese, uma banda C_4 mais rápida que a usual.

A natureza das mutações responsáveis pelos alelos silenciosos ainda não está bem esclarecida.

1.3.1.5 - Alelo *CHE1*J*

Garry e cols. (1976), estudando uma família na qual segregavam os alelos *CHE1*A* e *CHE1*F*, observaram resultados imprevistos na atividade da enzima e no DN, que os levaram a postular a existência de um novo alelo: *CHE1*J*. Os dados obtidos foram consistentes com a explicação de que este alelo cause uma redução de 66,0%, na quantidade da enzima, estruturalmente considerada igual à usual. Estes autores não conseguiram, entretanto, determinar se esta redução era devida a uma diminuição na síntese ou a um aumento na degradação da enzima.

Rubinstein e cols. (1976), através de ensaios de imunodifusão e de imunoeletroforese, com soros de fenótipos considerados como CHE1 AJ, CHE1 UJ e CHE1 FJ, mostraram uma redução no número de moléculas de colinesterase ativas. Estes achados, portanto, confirmaram a hipótese anterior de que o alelo *CHE1*J* condiciona uma enzima semelhante à usual, presente com menor número de moléculas.

Evans e cols. (1980) e Evans e Wardell (1984) também relataram estudos sobre este alelo, confirmando sua existência.

O alelo *CHE1*J* só conseguiu ser identificado quando acompanhado do alelo *CHE1*A*, pois os valores de inibição dos indivíduos CHE1 UJ são semelhantes ao dos homozigotos usuais.

1.3.1.6 - Alelo *CHE1*K*

Este alelo foi encontrado em duas famílias com sensibilidade ao suxametônio, onde segregava o alelo *CHE1*A* (Rubinstein e cols., 1978). Resultados inesperados, apresentando uma inibição pela dibucaína abaixo da encontrada em heterozigotos CHE1 UA, levaram ao reconhecimento deste novo alelo. Dados enzimáticos e imunológicos confirmaram a hipótese de que o alelo *CHE1*K* causa uma redução de 33,0% no número de moléculas da enzima, que apresenta estrutura semelhante a do tipo usual. Neste caso, também não foi determinado se a redução é causada por deficiência da síntese ou aumento da degradação da colinesterase do soro.

Evans e cols. (1980) relataram uma família na qual segregavam os alelos *CHE1*A*, *CHE1*J* e *CHE1*K*, e mostraram que indiví-

duos de fenótipos CHE1 AJ, CHE1 AK e CHE1 JK podem ser considerados vulneráveis à apnéia prolongada com o uso de suxametônio.

Evans e Wardell (1984) estimaram, entre indivíduos anteriormente considerados como CHE1 UA uma freqüência de 11,5% de CHE1 AK. Estes autores interpretaram este valor como a própria freqüência do alelo *CHE1*K*. Estes dados indicaram que aproximadamente 1,0% da população britânica seria homozigota para o alelo *CHE1*K*.

Whittaker e Britten (1985) examinando fenótipos considerados como CHE1 UA, encontraram uma freqüência de 13,0% de CHE1 AK, obtendo, portanto, resultados concordantes com os anteriores.

O alelo *CHE1*K*, como o *CHE1*J*, só havia sido identificado em heterozigose com *CHE1*A*. Recentemente, um trabalho de Whittaker e cols. (1987) demonstrou o fenótipo CHE1 KF em três indivíduos de uma família onde segregavam os alelos *CHE1*K*, *CHE1*F* e *CHE1*A*. Os três eram sensíveis ao suxametônio. Estes casos foram reconhecidos com o uso dos inibidores dibucaína, fluoreto de sódio e Ro2-0683.

1.3.1.7 - Alelo resistente à succinilcolina - CHE1*SU

Agarwal e cols. (1976) reexaminaram os soros de 21 indivíduos que, apesar de considerados de fenótipo usual, frente aos inibidores dibucaína e fluoreto de sódio, haviam apresentado apnéia prolongada com a administração de suxametônio. Estes autores substituíram o substrato benzoilcolina pela succinilcolina, utilizando a dibucaína como inibidor. Desta maneira, foi sugerido que 15 destes indivíduos apresentavam uma nova variante

da enzima, sensível somente à succinilcolina. Da mesma maneira, Goedde e Agarwal (1978), utilizando este novo método, reexaminaram 51 indivíduos, dos quais 35 foram reclassificados como portadores da nova variante que não degrada este relaxante muscular. Estes autores confirmaram, também, a presença desta variante em estudos de segregação em famílias.

1.3.1.8 - Alelo Newfoundland - *CHE1*NFLD*

Simpson e Elliott (1981) encontraram, numa família de Newfoundland, um novo e raro alelo do loco *CHE1*, o qual foi denominado *CHE1*NFLD*. Este estava presente em indivíduos heterozigotos, *CHE1*A/CHE1*NFLD* e *CHE1*U/CHE1*NFLD*, que foram reconhecidos porque apresentaram uma alta inibição pela dibucaina (DN), principalmente quando succinilditiocolina foi utilizada como substrato. Uma alta porcentagem de inibição também foi observada frente ao substrato benzoicolina.

1.3.1.9 - Alelo *CHE1*H*

Whittaker e Britten (1987), ao analisarem dois indivíduos sensíveis ao suxametônio, considerados como homozigotos *CHE1 A* pelos valores de DN e FN, verificaram número de Ro2-0683 (RN) inesperado (acima dos valores normais). Sugeriram que estes casos fossem heterozigotos para novo alelo (*CHE1*H*), sendo de genótipo *CHE1*A/CHE1*H*. Estudos de segregação em famílias apoiaram esta hipótese.

1.3.2 - Alelos do loco *CHE2*

Embora com o uso de eletroforese bidimensional em papel de filtro e gel de amido, Harris e cols. (1962) tenham mostrado, pela primeira vez, a variante C_{\ominus} da colinesterase do soro, os resultados mais satisfatórios só foram encontrados quando Harris e cols. (1963a) utilizaram eletroforese unidimensional em gel de amido e bidimensional em papel de filtro e gel de amido. Estes autores, ao analisarem a segregação em famílias, demonstraram a determinação genética desta variante como autossômica dominante. Dados concordantes foram encontrados por vários autores, entre os quais: Simpson (1972), Singh e cols. (1974), Tortolero e Medina (1977). Outros estudos familiares, entretanto, mostraram indivíduos $CHE2 C_{\ominus}+$ filhos de cônjuges considerados como $CHE2 C_{\ominus}-$ (Harris e cols., 1963b; Ashton e Simpson, 1966; Robson e Harris, 1966; Altland e cols., 1969; Simpson, 1972; Singh e cols., 1974).

Entre as possíveis explicações para estes achados, são citadas: a) não concordância entre paternidade biológica e legal; b) penetrância incompleta do alelo $CHE2 C_{\ominus}+$; c) fenótipo $CHE2 C_{\ominus}+$ dependente de herança mais complexa. Van Ros e Vervoort (1973) adaptaram o método de Robinson e cols. (1957) para determinar os fenótipos do loco *CHE2*. Examinaram soros de 683 indivíduos, para comparar a eficiência deste método com o de Ashton e Simpson (1966). Detectaram 45 indivíduos de fenótipo $CHE2 C_{\ominus}+$, com este último método e 52 com o de Robinson e cols. (1957), o que representa uma diferença de 15,0% de eficiência. Portanto, problemas técnicos podem também explicar os distúrbios de segregação verificados.

Harris e cols. (1963b) examinaram o efeito dos alelos *CHE1*A* e *CHE1*U* sobre as características de inibição do componente C_B . Estes autores verificaram, em indivíduos $CHE2 C_B+$, que não só a banda C_A , como também a C_B , foram mais inibidas em soros de usuais do que em soros de intermediários. Portanto, o alelo *CHE1*A* causa o mesmo efeito na característica de inibição dos componentes C_B e C_A , concluindo-se que o componente C_B é condicionado, não só pelo loco *CHE2*, como também pelo *CHE1*.

Scott e Powers (1974) purificaram parcialmente a enzima dos soros usuais de indivíduos $CHE2 C_B+$ e $CHE2 C_B-$ e determinaram vários parâmetros cinéticos, mostrando que as duas enzimas diferem pouco. Estes mesmos autores realizaram hibridação entre as frações C_A e C_B , obtendo cinco bandas. A fração C_B , quando comparada às frações híbridas, comportou-se como os híbridos $(C_A)_3C_B$ e $(C_A)_2(C_B)_2$. O comportamento eletroforético de C_B sugeriu uma diferença da carga e não do tamanho da enzima.

Tortolero e Medina (1978) propuseram que o produto do alelo *CHE2*C_B+* atua sobre os componente C_A . Esta modificação alteraria propriedades eletroforéticas da isoforma sem alterar o peso molecular. Muensch e cols. (1978) não encontraram diferenças nos peptídeos que contém o centro ativo das enzimas C_A e C_B quando examinados por eletroforese.

1.3.3 - Alelo Cynthiana (CY)

Neitlich (1966) relatou o caso de quatro consangüíneos com uma variante da colinesterase, a qual apresentou uma atividade cerca de duas a três vezes maior que a usual, bem como uma banda

extra, de migração mais lenta, na eletroforese em gel de amido. Os números de dibucaína e de fluoreto destas pessoas foram normais. Estudos feitos pelo mesmo autor sugeriram uma herança autossômica dominante para esta característica, além de indicar que estas pessoas eram heterozigotas para este fenótipo. Não foi, entretanto, descartada a hipótese de herança dominante ligada ao sexo.

Yoshida e Motulsky (1969), após reestudarem esta variante, denominaram-na *Cynthiana* e verificaram que sua atividade específica é igual à da enzima usual, sendo que a sua maior atividade no soro é devida ao maior número de moléculas presentes. Seu padrão de polimerização também se mostrou alterado, formando polímeros com mais sub-unidades do que o normal, havendo o aparecimento de uma banda extra entre C_4 e C_6 , na eletroforese, o que pode indicar alterações na estrutura protéica.

Num outro estudo, Klein e cols. (1967; *apud* Brown e cols. 1981) apresentaram uma variante que pode ser idêntica à variante *Cynthiana*.

Ainda não se sabe em qual dos locos, condicionadores da colinesterase do soro, se situa o alelo *Cynthiana*.

1.4 - FREQUÊNCIAS DE ALGUNS ALELOS DO LOCO *CHE1* DA COLINESTERASE DO SORO.

Vários estudos foram feitos para verificar as frequências destes alelos em diferentes populações. Para uma revisão sobre o assunto, consultar Mourant e cols. (1976) e Guerreiro (1983). Nesta tese, o objetivo foi registrar apenas as frequências populacionais do alelo *CHE1*F*. A Tabela 1 mostra estas frequências

Tabela 1 - Distribuição das frequências fenotípicas loco *CHE1*, em diferentes populações.

Local	N	Fenótipos do loco <i>CHE1</i>				
		A	UA	UF	AF	US
EUROPA						
Alemanha Ocidental	280		7	4		
Bulgária	108		2	1		
Dinamarca	1278	1	32	3		
França (Pirineus)	2453	3	104	2		18
França (Lyon-Beynort)	1594		52	25	8	
Grécia	429	5	38	5	9	
Grécia	218		10	6	1	
Inglaterra	780		23	3	2	
ÁSIA						
Índia (Bengal, Bihar)	139			1		
Índia (Panjabi)	202		12	51	1	
Turquia	725	1	43	3	3	
ÁFRICA						
Gâmbia	103		1	1		
Malawi	191			14		
Mocambique	326			41		
Mocambique	153		4	1		

as e gênicas do sistema da colinesterase do soro,

Frequências gênicas			Referências
<i>CHE1*A</i>	<i>CHE1*F</i>	<i>CHE1*S</i>	
0,0125	0,0071		Steegmüller, 1975
0,0093	0,0046		Steegmüller, 1975
0,0133	0,0012		Hanel e cols., 1978
0,0224	0,0004	0,0037	Vergnes e cols., 1980
0,0188	0,0104		Masson e cols., 1979
0,0501	0,0163		Das e cols., 1975
0,0252	0,0160		Neumann e Walter, 1968
0,0160	0,0032		Whittaker, 1968c
0,0000	0,0036		Steegmüller, 1975
0,0322	0,1287		Singh e cols., 1971
0,0331	0,0041		Sayek e cols., 1967
0,0049	0,0049		Whittaker, 1968b
0,0000	0,0366		Whittaker e Lowe, 1976
0,0000	0,0610		Whittaker e Reys, 1975
0,0131	0,0033		Whittaker e Reys, 1975

cont.

Continuação

Tabela 1 - Distribuição das frequências fenotípicas e gênicas do sistema da colinesterase do soro, loco *CHE1*, em diferentes populações.

Local	N	Fenótipos do loco <i>CHE1</i>					Frequência gênica			Referência
		A	UA	UF	AF	US	<i>CHE1*A</i>	<i>CHE1*F</i>	<i>CHE1*S</i>	
Moçambique	162			10			0,0000	0,0309		Whittaker e Lowe, 1976
Rodésia	1227			85			0,0000	0,0346		Whittaker e Lowe, 1976
Zâmbia	34			3			0,0000	0,0441		Whittaker e Lowe, 1976
AMÉRICA DO NORTE										
U.S.A. (Branços)	836			11				0,0066		Garry e cols., 1972
U.S.A. (Negros)	168							0,0000		Garry e cols., 1972
AMÉRICA DO SUL										
Brasil (Nordestinos)	2138	1	60	20	1		0,0147	0,0049		Simpson e Kalow, 1965
<i>INDÍGENAS</i>										
OCEANIA										
Austrália	1224		57	13			0,0233	0,0053		Propert e Brackenridge, 1976
AMÉRICA DO SUL										
Brasil (Xavantes)	285						0,0000	0,0000		Tashian e cols., 1967
Venezuela (Motilon)	70						0,0000	0,0000		Arends e cols., 1967
Venezuela (Warrau)	131						0,0000	0,0000		Arends e cols., 1967
Venezuela (Aymara)	90						0,0000	0,0000		Arends e cols., 1967

Tabela 4 - Distribuição etária, sexual e étnica da amostra populacional.

Grupo étnico	Faixa etária									
	Sexo	10-19	20-29	30-39	40-49	50-59	> 60	SR	Total	
B	M	64	72	24	10	10	3	2	185	
	F	27	16	13	5	5	0	0	66	
MC	M	60	67	20	10	2	0	2	161	
	F	35	35	9	5	1	0	3	88	
MM	M	44	67	32	16	6	2	7	174	
	F	22	16	15	5	1	0	1	60	
ME	M	38	64	37	17	9	6	5	176	
	F	16	29	10	3	1	0	8	67	
N	M	16	21	13	9	4	2	0	65	
	F	5	10	6	2	4	0	0	27	
Totais	M	Nº	222	291	126	62	31	13	16	761
		%	67,9	73,3	70,4	75,6	72,1	100,0	57,1	71,2
	F	Nº	105	106	53	20	12	0	12	308
		%	32,1	26,7	29,6	24,4	27,9	0,0	42,9	28,8
Total geral		Nº	327	397	179	82	43	13	28	1069
		%	30,6	37,2	16,7	7,7	4,0	1,2	2,6	

B = branco, MC = mulato claro, MM = mulato médio, ME = mulato escuro, N = negro, M = masculino, F = feminino, SR = sem registro.

que haviam sido considerados como CHE1 U por estes mesmos autores. Destes indivíduos, 16 (33,3%) eram do sexo feminino e 32 (66,7%) do masculino. Quanto à raça, 30 (62,5%) eram brancos, 11 (22,9%) mulatos claros, 4 (8,3%) mulatos médios, 2 (4,2%) mulatos escuros e 1 (2,1%) negro (Tabela 5).

2.1.4 - Amostra para confirmação de resultados

Nesta última etapa, foram examinados plasmas de 31 indivíduos sendo 10 CHE1 U, 10 CHE1 UA, 10 CHE1 UF e 1 CHE1 AK separados da amostra utilizada na segunda etapa deste trabalho, e mais 28 indivíduos retirados dos 48 CHE1 UA citados na terceira etapa. Estas amostras foram retipadas tendo em vista que, no início do presente trabalho, não se possuía espectrofotômetro com leitura na faixa de ultravioleta com manutenção da temperatura em 25°C para permitir a utilização do método de Kalow e Genest (1957), método mais utilizado para a determinação dos fenótipos da colinesterase do soro. Assim, foi utilizado o método proposto pelo presente trabalho, o qual não possuía valores de referência para comprovação dos resultados. Ao se concluir a terceira etapa do trabalho, foi instalado, em nosso laboratório, um espectrofotômetro que permitiu a utilização do método de Kalow e Genest (1957), e assim resolveu-se avaliar os resultados obtidos pelo método proposto no presente trabalho.

Tabela 5 - Distribuição etária, sexual e étnica da amostra de indivíduos CHE1 UA.

Grupo étnico	Faixa etária						Total	
	Sexo	10-19	20-29	30-39	40-49	> 50		
B	M	4	9	3	1	1	18	
	F	2	7	1	0	2	12	
MC	M	4	3	1	0	0	8	
	F	3	0	0	0	0	3	
MM	M	2	0	0	1	0	3	
	F	0	0	1	0	0	1	
ME	M	0	2	0	0	0	2	
	F	0	0	0	0	0	0	
N	M	1	0	0	0	0	1	
	F	0	0	0	0	0	0	
Totais	M	Nº	11	14	4	2	1	32
		%	34,4	43,8	12,5	6,2	3,1	
	F	Nº	5	7	2	0	2	16
		%	31,2	43,8	12,5	0,0	12,5	
Total geral	Nº	16	21	6	2	3	48	
	%	33,3	43,8	12,5	4,2	6,2		

B = branco, MC = mulato claro, MM = mulato médio, ME = mulato escuro, N = negro, M = masculino, F = feminino

2.2 - MÉTODOS LABORATORIAIS

O plasma utilizado neste trabalho tinha sido obtido centrifugando-se o sangue total heparinizado, no mesmo dia da coleta, a 1000 rpm por aproximadamente 5 minutos. Após a separação, o plasma tinha sido retirado e colocado em pequenos tubos de 1,8 ml e estocado em congelador a -20°C . Utilizou-se material que esteve estocado por aproximadamente 9 anos.

2.2.1 - Método de Kalow e Genest (1957) modificado, a 37°C .

O método de Kalow e Genest (1957) utiliza como substrato a benzoilcolina e como inibidor a dibucaína. A temperatura de reação é de 25°C . Posteriormente, este método foi modificado por outros autores que acrescentaram a ele outros inibidores, como fluoreto de sódio (Harris e Whittaker, 1961) e Ro2-0683 (Liddell e cols., 1963). Mais tarde, Zsigmond e cols. (1980) propuseram outra modificação que consiste no aumento da concentração do fluoreto de sódio com concomitante aumento de temperatura para 37°C , utilizando ainda o Ro2-0683 e a dibucaína a esta temperatura. Whittaker e cols. (1981) também modificaram o método original, utilizando o inibidor propranolol a 25°C . No presente trabalho, o propranolol foi utilizado juntamente com estes outros inibidores, a 37°C , visando à caracterização dos indivíduos CHE1 UF. Este último método, portanto, será citado como de Kalow e Genest (1957) modificado, a 37°C .

Este método foi utilizado na primeira etapa do trabalho e consiste na medida do decréscimo da absorbância em 240 nm, a 37°C , que é proporcional à hidrólise do substrato

(benzoilcolina), cuja concentração final utilizada é de $5 \times 10^{-5} M$, de acordo com Kalow e Genest (1957).

Os inibidores utilizados e suas respectivas concentrações finais foram: dibucaína $10^{-5} M$ (do método original), fluoreto de sódio $2,5 \times 10^{-4} M$ (Zsigmond e cols., 1980), Ro2-0683 $2,5 \times 10^{-7} M$ (intermediária às utilizadas por Whittaker e Britten, 1987 e Liddell e cols., 1963) e o propranolol $8,45 \times 10^{-4} M$ (Whittaker e cols., 1981).

O plasma foi diluído de 1/100 em tampão fosfato M/15, pH 7,4 e o procedimento adotado para leitura foi o de Kalow e Lindsay (1955) onde a mudança de absorbância foi verificada durante um período de 4 minutos, sendo a primeira leitura iniciada 40 segundos após o início da reação, seguida de outras a cada 20 segundos.

As soluções foram preparadas seguindo-se a discriminação abaixo:

a) tampão fosfato M/15, pH 7,4

Na_2HPO_4 anidro		75,840 g
KH_2PO_4 anidro		18,156 g
Água destilada	qsp	10,0 l

O pH foi conferido em potenciômetro e quando houve necessidade de ajustamento, este foi feito com os sais acima.

b) substrato $2 \times 10^{-2} M$ (estoque)

cloridrato de benzoilcolina	487,0 mg
tampão fosfato	100,0 ml

Para uso foi feita uma diluição de 1/100

c) inibidores

dibucaína $4 \times 10^{-2}M$ (estoque)

cloridrato de dibucaína	152,0 mg
tampão fosfato	100,0 ml

Para uso foi feita diluição de 1/100

fluoreto de sódio $10^{-2}M$ (estoque)

fluoreto de sódio	42,0 mg
tampão fosfato	100,0 ml

Para uso foi feita diluição de 1/100

Obs.: A solução estoque de fluoreto de sódio foi preparada em quantidade suficiente para uma semana, pois ela se mostrou instável após este período.

Ro2-0683 $10^{-2}M$ (estoque)

Ro2-0683	39,3 mg
tampão fosfato	100,0 ml

Para uso foi feita diluição de 1/1000

propranolol $3,38 \times 10^{-2}M$ (estoque)

cloridrato de propranolol	100,0 mg
tampão fosfato	100,0 ml

Para uso foi feita diluição de 1/100

O procedimento inicial foi pré-incubar o substrato e os inibidores em banho-maria (37°C), por pelo menos 5 minutos. Posteriormente, foram numerados 6 tubos (1 a 6) aos quais foram adicionadas as devidas soluções (tampão: T, substrato: S, dibu-

caína: D, Ro2-0683: R, fluoreto de sódio: F, propranolol: P),
como especificado abaixo:

Soluções (ml)

<u>Tubos</u>	<u>I</u>	<u>S</u>	<u>D</u>	<u>R</u>	<u>F</u>	<u>P</u>
1	1,0	-	-	-	-	-
2	0,5	0,5	-	-	-	-
3	-	0,5	0,5	-	-	-
4	-	0,5	-	0,5	-	-
5	-	0,5	-	-	0,5	-
6	-	0,5	-	-	-	0,5

Adicionou-se ao tubo 1 (branco), 1 ml de plasma diluído para zerar o aparelho. Em seguida foi adicionado 1 ml de plasma diluído ao tubo 2 e acionado o cronômetro. A solução foi então levada ao espectrofotômetro Varian Techtron, modelo 635, o qual possuía temperatura controlada a 37°C. Foi então iniciada a leitura, como já explicada anteriormente, e o mesmo procedimento foi feito com os tubos 3, 4, 5 e 6. Os valores de absorvância encontrados para cada tubo foram registrados e verificou-se, posteriormente, o decréscimo médio a cada 20 segundos e calculou-se a porcentagem de inibição (DN, RN, FN e PN) para cada inibidor.

A caracterização dos fenótipos é feita calculando-se a porcentagem de inibição, para o que se utiliza o decréscimo de absorvância da reação, na presença e na ausência do inibidor:

$$\% \text{ de inibição} = 100 \times \left[1 - \frac{\text{decréscimo de absorbância na presença do inibidor}}{\text{decréscimo de absorbância na ausência do inibidor}} \right]$$

2.2.2 - Método proposto pelo presente trabalho

Este método também foi utilizado na primeira etapa do trabalho e, como se mostrou eficiente, foi utilizado na segunda etapa, onde se detectaram os indivíduos CHE1 UF da amostra de Curitiba.

Foi feita uma adaptação de dois métodos. Um deles é o de Morrow e Motulsky (1968). Este utiliza alfa-naftilacetato como substrato e Ro2-0683 como inibidor. A temperatura de incubação é de 37°C e a leitura em espectrofotômetro é feita a 555 nm.

O outro método é o de Whittaker e cols. (1981) que utiliza benzoilcolina como substrato e propranolol como inibidor. A temperatura utilizada é de 26°C e a leitura, em espectrofotômetro, é feita num comprimento de onda de 240 nm.

No presente trabalho, o método base foi o de Morrow e Motulsky (1968), acrescentando-se a ele o inibidor propranolol, usado no método de Whittaker e cols. (1981).

A caracterização dos fenótipos é feita calculando-se a porcentagem de inibição da reação enzimática na presença do inibidor, quando comparada com a reação na sua ausência.

O plasma foi diluído de 1/100 em tampão fosfato 0,2 M, pH 7,1. O corante utilizado foi o sal de Fast Red TR e para interromper a reação foi empregado lauril sulfato de sódio (Duponal).

As soluções foram preparadas seguindo-se a indicação abaixo:

a) tampão fosfato, pH 7,1

Na_2HPO_4 0,2 M	670,0 ml
NaH_2PO_4 0,2 M	330,0 ml

O pH foi conferido com potenciômetro e, quando houve necessidade de ajustamento, este foi feito com acréscimo de uma das soluções acima, conforme o caso.

b) substrato (estoque)

alfa-naftilacetato	56,0 mg
acetona	5,0 ml
água destilada	5,0 ml

O alfa-naftilacetato foi dissolvido inicialmente na acetona e, em seguida, foi acrescentada a água. (Esta solução pode ser guardada em refrigerador por um mês). Para uso foi feita a seguinte diluição: 1 ml do estoque, 20 ml de tampão, completando-se até 100 ml com água destilada.

Obs.: O substrato foi levado ao banho-maria (37°C), por meia hora, antes de ser utilizado.

c) inibidores

Ro2-0683 10^{-9} M (estoque)

Ro2-0683	39,3 mg
tampão fosfato	100,0 ml

Para uso foi feita diluição de 1/1000

Propranolol $8,45 \times 10^{-4}M$ (estoque)

cloridrato de propranolol	25,0 mg
tampão fosfato	100,0 ml

Para uso foi feita diluição de 1/10

d) corante

sal de Fast Red TR	50,0 mg
Duponal (3% em água destilada)	10,0 ml
água destilada	15,0 ml

Este foi sempre preparado cerca de 15 minutos antes do uso.

Os tubos foram marcados da seguinte maneira:

B1 - branco contendo Ro2-0683

B2 - branco contendo propranolol

Obs. Basta um tubo branco para cada bateria de exames.

A - sem inibidor (atividade)

- - R - com Ro2-0683

P - com propranolol

Posteriormente, foram adicionados aos tubos as devidas soluções, como especificado abaixo:

Tubos (ml)

<u>Soluções</u>	<u>A</u>	<u>R</u>	<u>P</u>	<u>B1</u>	<u>B2</u>
plasma (dil.)	0,2	0,2	0,2	-	-
tampão	0,2	-	-	0,2	0,2
Ro2-0683	-	0,2	-	0,2	-
propranolol	-	-	0,2	-	0,2

Os tubos foram levados ao banho-maria a 37°C e foi acrescentado, a cada um deles, 1,4 ml de substrato (já a 37°C). Estes permaneceram a esta temperatura por 60 minutos. Em seguida, retiraram-se os tubos do banho-maria e acrescentaram-se 0,2 ml de corante e 2,0 de água destilada, a cada tubo.

Após 15 minutos, foram feitas as leituras, em espectrofotômetro (Micronal, B 295) em 555 nm, calibrando-se o aparelho com água destilada. Os tubos brancos foram lidos e como apresentaram o mesmo valor de absorbância, este valor foi descontado dos tubos A, R e P, que foram lidos posteriormente. A porcentagem da inibição da atividade enzimática foi calculada da seguinte forma:

$$\% \text{ de inibição} = \frac{AA - AI}{AA} \times 100, \text{ onde:}$$

AA

AA - absorbância na ausência do inibidor

AI - absorbância na presença do inibidor

Obs.: Após a adição do corante, e antes da água, alguns tubos A apresentaram coloração alaranjada, significando que os plasmas utilizados estavam com atividade muito alta. A estes tubos e seus respectivos tubos R e P, foram acrescentados, antes da leitura, 0,2 ml de corante e 3,8 ml de água destilada. O mesmo procedimento foi seguido com um dos tubos brancos cujo valor de leitura deve ser descontados do valor dos outros tubos diluídos.

2.2.3 - Método de Kalow e Genest (1957) modificado, a 25°C

Este método, também referido como modificado em vista da introdução de novos inibidores ao método original, foi utilizado na quarta etapa do trabalho, quando já se possuíam condições adequadas para sua utilização. Foi usado para confirmação dos resultados obtidos na segunda e na terceira etapas do trabalho.

O princípio do método, a maneira de caracterizar os fenótipos, a faixa de leitura utilizada, bem como o preparo das soluções de substrato, tampão, dibucaína e propranolol, foram os mesmos já descritos em 2.2.2.1. O fluoreto de sódio foi preparado para uma concentração final de $5 \times 10^{-5}M$ (Harris e Whittaker, 1963) e o Ro2-0683 para $10^{-6}M$ (Whittaker e Britten, 1987).

O plasma foi diluído de 1/100 em tampão fosfato M/15, pH 7,4 e o procedimento adotado para leitura foi o de Harris e Whittaker (1963), onde a mudança de absorção foi verificada durante um período de 3 minutos, sendo este iniciado 1 minuto após a adição da mistura de reação sobre a enzima. Ao se utilizar o Ro2-0683, a leitura foi iniciada após 2 minutos de incubação

inicial, pois foi verificado, por experimentos anteriores, que a linearidade da reação era alcançada após este período.

Os inibidores fluoreto de sódio e Ro2-0683 foram preparados da seguinte forma:

a) fluoreto de sódio $10^{-2}M$ (estoque)

fluoreto de sódio 42,0 mg

tampão fosfato 100,0 ml

Para uso foi feita diluição de 1/50

b) Ro2-0683 $10^{-2}M$ (estoque)

Ro2-0683 39,3 mg

tampão fosfato 100,0 ml

Para uso foi feita diluição de 1/250

O procedimento inicial foi colocar o substrato e os inibidores em banho-maria (25°C). Posteriormente, foram numerados 5 tubos (1 a 5) aos quais foi adicionado 1 ml de soro diluído.

1 - tubo sem inibidor

2 - tubo com dibucaína

3 - tubo com fluoreto de sódio

4 - tubo com Ro2-0683

5 - tubo com propranolol

Ao tubo 1 juntou-se 0,5 ml de tampão e 0,5 ml de substrato foi verificado o decréscimo da absorbância na ausência do

inibidor. Ao tubo 2 acrescentou-se 0,5 ml de dibucaína e 0,5 ml de substrato e foi verificado o decréscimo da absorbância na presença deste inibidor. O mesmo procedimento foi usado para os outros inibidores.

As leituras foram feitas em espectrofotômetro Micronal B 382, o qual possuía banho-maria controlando sua temperatura a 25°C.

2.3 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

As frequências fenotípicas e gênicas do sistema da colinesterase do soro foram estimadas pelo método de contagem fenotípica e gênicas, respectivamente.

As porcentagens de inibição, bem como suas médias, desvios padrões e amplitudes de variação, e também os coeficientes de correlação, foram calculados através de programas (Statistical Package for Social Sciences - SPSS e MINITAB) no computador DEC-10 do Centro de Computação Eletrônica da Universidade Federal do Paraná.

As comparações entre duas médias foram realizadas pelo teste "t" de Student.

III - RESULTADOS

3.1 - PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA

Nesta etapa, foram utilizados dois métodos com o intuito de identificar os indivíduos CHE1 UF. As características de inibição dos três fenótipos, evidenciados por estes métodos, se encontram nas Tabelas 6 e 7. As médias e os desvios padrões estimados, respectivamente, com o uso de dibucaína, fluoreto de sódio, propranolol e Ro2-0683, são dados junto com a amplitude de variação encontrada para cada fenótipo.

A análise dos dados da Tabela 6, quanto aos quatro inibidores, mostra que nenhum deles pode ser usado separadamente para discriminar o fenótipo CHE1 UF. Entretanto, quando utilizados simultaneamente os inibidores propranolol e o Ro2-0683, há possibilidade de se fazer esta distinção. O que se observa na Tabela 6, é que a amplitude de variação dos indivíduos CHE1 UF, quanto ao DN, se sobrepõe à dos indivíduos CHE1 U e à dos CHE1 UA. A amplitude de variação quanto ao FN dos indivíduos CHE1 UF se sobrepõe apenas à dos CHE1 UA, porém a destes indivíduos se sobrepõe à dos CHE1 U. Quando se consideram os valores de PN, a amplitude de variação dos CHE1 UF se sobrepõe apenas à dos CHE1 UA e, no caso dos valores de RN, esta amplitude fica mais próxima à dos CHE1 U. Com o uso dos inibidores propranolol e Ro2-0683, as amplitudes de variação dos indivíduos CHE1 U e CHE1 UA

Tabela 6 - Porcentagens médias de i
referentes à amostra ut
e tipo de inibidor *.

Fenótipo	N	DN	
		$\bar{x} \pm D.P.$	A.V.
CHE1 U	15	76,5±2,8	71,4-81,8
CHE1 UA	14	64,5±4,4	59,6-71,1
CHE1 UF	2	70,8±0,2	70,7-71,0

* Método com base em Kalow e Genest

nibição (\pm D.P.) e respectivas amplitudes de variação (A.V.), utilizada para padronização da técnica, classificada por fenótipo

FN		PN		RN	
$\bar{x} \pm D.P.$	A.V.	$\bar{x} \pm D.P.$	A.V.	$\bar{x} \pm D.P.$	A.V.
87,2 \pm 2,4	83,9-91,4	75,1 \pm 3,2	71,3-81,7	97,1 \pm 1,1	94,7-98,8
81,6 \pm 2,8	77,9-85,9	60,2 \pm 2,9	53,3-65,3	79,0 \pm 3,3	71,9-83,7
78,0 \pm 0,9	77,4-78,6	63,4 \pm 0,8	62,8-64,0	91,3 \pm 0,9	90,6-91,9

: (1957) modificado, a 37°C.

além de não se sobrepor, ficam bastante separadas. Assim ficou claro que quando num determinado exame se obtivesse um PN característico de indivíduo CHE1 UA e um RN mais próximo ao dos indivíduos CHE1 U, estaríamos frente a um indivíduo CHE1 UF.

Apesar destes dados obtidos pelo método de Kalow e Genest (1957) modificado, a 37°C, mostrarem-se favoráveis a esta identificação, não houve possibilidade de se continuar utilizando este método, uma vez que o único aparelho disponível (Variant Techtron 635) para uso, na faixa de leitura em ultravioleta, com banho-maria acoplado, apresentou uma série de problemas que impediu a continuidade do seu uso. Por este motivo, foi criado o método descrito no item 2.2.2., que não necessita de espectrofotômetro com leitura na faixa de luz ultravioleta e nem banho-maria acoplado. Este método também se mostrou eficaz na separação do fenótipo CHE1 UF, o qual se identifica, neste caso, porque apresentam PN com valor intermediário entre os dos indivíduos CHE1 UA e CHE1 U e RN igual aos dos indivíduos CHE1 U (Tabela 7).

3.2 - AMOSTRA POPULACIONAL

As médias (\pm D.P.) e as amplitudes de variação, das porcentagens de inibição dos fenótipos encontrados, estão na Tabela 8.

As freqüências do fenótipo CHE1 UF e do alelo CHE1*F, classificadas por grupo racial são mostradas na Tabela 9. As freqüências deste alelo foram de 0,60% \pm 0,34% em brancos e 0,49% \pm 0,17% em negróides. Como não houve diferença entre estes dois grupos ($t=0,30$, $P > 70\%$), podemos estimar a freqüência

Tabela 7 - Porcentagens médias de inibição (\pm D.P.) e respectivas amplitudes de variação (A.V.), referentes à amostra de padronização da técnica, classificada por fenótipo e tipo de inibidor *.

Fenótipo	N	PN		RN	
		$\bar{x} \pm$ D.P.	A.V.	$\bar{x} \pm$ D.P.	A.V.
CHE1 U	15	73,6 \pm 1,9	70,0 - 76,9	94,8 \pm 1,2	90,1 - 96,7
CHE1 UA	14	48,7 \pm 2,6	45,6 - 51,3	68,4 \pm 2,3	64,0 - 70,6
CHE1 UF	2	60,4 \pm 1,3	59,4 - 61,4	92,4 \pm 0,8	91,8 - 93,0

* Método proposto pelo presente trabalho.

Tabela 8 - Porcentagens médias de inibição com respectivos desvios padrões e amplitudes de variação, obtidas para os fenótipos da amostra da população de Curitiba *.

Fenótipos	N	PN		RN	
		$\bar{x} \pm D.P.$	A.V.	$\bar{x} \pm D.P.$	A.V.
CHE1 U	1035	72,9 \pm 1,6	69,8-77,9	93,4 \pm 1,2	88,4-96,8
CHE1 UA	22	48,3 \pm 2,9	43,2-53,2	68,3 \pm 2,9	62,4-71,4
CHE1 UF	11	62,8 \pm 3,8	56,4-68,1	91,7 \pm 1,1	89,4-93,2
CHE1 AK	1	39,7 -	-	58,8 -	-

* Método proposto pelo presente trabalho.

Tabela 9 - Freqüências do fenótipo CHE1 UF (

Grupo racial	N
Branços	251
Mulatos claros	249
Mulatos médios	234
Mulatos escuros	243
Negros	92
Negróides	818
Total	1069

* Método proposto pelo presente trabalho.

e do alelo *CHE1*F*, de acordo com o grupo racial *.

CHE1 UF (%)	<i>CHE1*F</i> (% ± D.P.)
1,20	0,60 ± 0,34
0,80	0,40 ± 0,28
0,85	0,43 ± 0,30
1,65	0,82 ± 0,41
0,00	0,00
0,98	0,49 ± 0,17
1,03	0,51 ± 0,15

total para essa amostra de Curitiba como sendo cerca de $0,51\% \pm 0,15\%$.

Foi feita uma análise de correlação entre a atividade da colinesterase do soro e as variáveis: sexo, idade e cor. Destas variáveis, somente se mostraram correlacionadas com atividade, as seguintes: sexo ($P < 0,001$) e cor ($P < 0,01$). A atividade é maior no sexo masculino, e também aumenta à medida que aumenta o componente caucasóide.

3.3 - AMOSTRA DE INDIVÍDUOS DE FENÓTIPO CHE1 UA

Esta amostra, constituída de 48 indivíduos, apresentou uma absorvância média de $0,389 \pm 0,089$. Quanto às porcentagens de inibição, a média foi de 70,0% quando se usou o Ro2-0683 (62,0% a 75,0%) e de 50,0% quando o propranolol foi utilizado (43,0% a 54,0%).

3.4 - CONFIRMAÇÃO DOS RESULTADOS

Nesta etapa, que utilizou o método de Kalow e Genest (1957) modificado, a 25°C, foram analisados inicialmente 31 indivíduos retirados da população de Curitiba, sendo 10 CHE1 U, 10 CHE1 UA, 10 CHE1 UF e 1 CHE1 AK. As médias das porcentagens de inibição quanto aos inibidores dibucaína, fluoreto de sódio, propranolol e Ro2-0683, bem como os desvios padrões e amplitudes de variação dos fenótipos se encontram na Tabela 10. Posteriormente, analisaram-se mais 28 indivíduos, pelo mesmo método, retirados daqueles 48 CHE1 UA, que foram, anteriormente,

Tabela 10 - Porcentagens médias de inibição (\pm D.P.) e respectivas amplitudes de variação (A.V.), classificadas por fenótipos e tipo de inibidor *.

Fenótipos	N	DN		FN		PN		RN	
		$\bar{x} \pm$ D.P.	A.V.	$\bar{x} \pm$ D.P.	A.V.	$\bar{x} \pm$ D.P.	A.V.	$\bar{x} \pm$ D.P.	A.V.
CHE1 U	10	79,2 \pm 2,6	76,3-84,2	61,0 \pm 4,0	57,2-69,5	80,0 \pm 2,5	76,8-84,2	95,9 \pm 2,0	92,6-98,5
CHE1 UA	10	59,5 \pm 3,3	52,8-65,0	48,3 \pm 5,1	42,2-55,5	60,4 \pm 5,0	50,0-66,7	73,4 \pm 3,6	68,9-79,5
CHE1 UF	10	71,0 \pm 3,4	66,1-76,1	49,3 \pm 7,5	41,6-60,8	68,5 \pm 2,0	65,6-71,7	92,1 \pm 3,1	88,9-98,2
CHE1 AK	1	46,4	-	48,5	-	48,5	-	54,5	-

* Método com base em Kalow e Genest (1957) modificado, a 25°C.

examinados para verificação dos fenótipos CHE1 AK. As amplitudes de variação dos números de inibição obtidas para estes 28 indivíduos foram as seguintes: DN = 52,4-69,3; FN = 40,4-58,1; RN = 67,3-82,7 e PN = 50,0-66,7.

IV - DISCUSSÃO

4.1 - ANÁLISE SOBRE A PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA

4.1.1 - Método de Kalow e Genest (1957) modificado, a 37°C.

Este resultado é de interesse, pois no presente trabalho foi a primeira vez que o propranolol foi introduzido no método de Kalow e Genest (1957) a 37°C, mostrando-se um inibidor eficiente nesta temperatura.

As porcentagens de inibição obtidas no presente trabalho, por este método (Tabela 11), foram comparadas com as porcentagens de inibição obtidas pelo mesmo método aplicado a 25°C por Whittaker e cols. (1981), Evans e Wardell (1984) e Whittaker (1984). Esta tabela mostra amplitudes de variação dos DN, FN, RN e PN para alguns fenótipos da colinesterase do soro. Analisando-se os valores de DN e RN encontrados para o fenótipo CHE1 U pelos diferentes investigadores, observa-se que as amplitudes de variação obtidas no presente trabalho, o qual utilizou temperatura de 37°C, são comparáveis com as obtidas pelos outros autores, que utilizaram 25°C. O mesmo ocorreu em relação aos fenótipos CHE1 UA e CHE1 UF. Assim corroboram-se resultados encontrados por outros autores (Lee e Robinson, 1967; King e

Tabela 11 - Comparação das amplitudes de variação dos números de inibição, obtidos pelo presente trabalho e por Zsigmond e cols. (1980), com a utilização do método de Kalow e Genest (1957), modificado e aplicado a 37°C, com aqueles obtidos por outros investigadores que utilizaram este mesmo método, aplicado a 25°C.

Fenótipos	N	DN	FN	RN	PN	Investigadores
CHE1 U	-	-	70,6-83,4*	-	-	Zsigmond e cols. (1980)
	236	-	-	-	79,0-85,4*	Whittaker e cols. (1981)
	476	80,0-83,5	57,0-63,5	93,5-97,5	-	Evans e Wardell (1984)
	100	78,0-83,0	56,0-69,0	-	-	Whittaker (1984)
	15	74,3-81,8	83,9-91,4	94,7-98,8	71,3-81,7 68,8-81,4*	Presente trabalho Presente trabalho
CHE1 UA	-	-	56,3-77,7*	-	-	Zsigmond e cols. (1980)
	223	-	-	-	55,9-70,1*	Whittaker e cols. (1981)
	169	58,0-68,0	45,5-53,0	66,5-80,0	-	Evans e Wardell (1984)
	77	48,0-69,0	44,0-54,0	-	-	Whittaker (1984)
	14	59,6-71,1	77,9-85,9	71,9-83,7	53,3-65,3 54,4-65,9*	Presente trabalho Presente trabalho
CHE1 UF	59	-	-	-	68,3-78,3*	Whittaker e cols. (1981)
	15	72,0-81,0	41,5-56,5	91,0-100,0	-	Evans e Wardell (1984)
	86	70,0-83,0	46,0-54,0	-	-	Whittaker (1984)
	02	70,7-71,0	77,4-78,6	90,6-91,9	62,8-64,0 61,7-65,1*	Presente trabalho Presente trabalho

* Amplitudes de variação calculadas com base na média \pm 2 D.P.

Dixon, 1970; Zsigmond e cols., 1980), os quais indicam que a inibição por Ro2-0683 é pouco influenciada pela temperatura.

Comparando-se, ainda, os PN obtidos no presente trabalho com os obtidos por Whittaker e cols. (1981), nota-se o mesmo comportamento, indicando que a inibição pelo propranolol também não deve sofrer grande influência da temperatura.

Observando-se, porém, os FN contidos nesta tabela, verifica-se que há uma diferença grande entre as porcentagens de inibição obtidas no presente trabalho, com aquelas obtidas pelos outros três investigadores. Isto realmente era esperado uma vez que em nosso trabalho utilizamos uma concentração de $2,5 \times 10^{-4} M$ de fluoreto de sódio com temperatura de reação de $37^{\circ}C$ (Zsigmond e cols., 1980), enquanto os outros investigadores utilizaram $5,0 \times 10^{-5} M$ deste inibidor, com temperatura de reação de $25^{\circ}C$ (Harris e Whittaker, 1961). O que se observou, entretanto, foi que os valores obtidos no presente trabalho para o FN (Tabela II), foram maiores que os encontrados por Zsigmond e cols. (1980). Como pode-se observar nesta tabela, nossos menores valores de FN são semelhantes aos valores mais altos encontrados por Zsigmond e cols. (1980). Uma possível justificativa para este resultado é a sensibilidade da inibição pelo fluoreto de sódio a mudanças de temperatura. A possibilidade de ter havido uma diferença de temperatura entre o banho termoeletrificante (local onde foi medida a temperatura de $37^{\circ}C$) e a cubeta onde estava ocorrendo a reação, pode ser sugerida para explicar esta diferença com relação a Zsigmond e cols. (1980), que adota $37^{\circ}C$. Estes autores mostraram que uma mudança de temperatura de $37^{\circ}C$ para $31^{\circ}C$ eleva as porcentagens de inibição. Portanto, se na cubeta onde estava ocorrendo a reação a temperatura fosse menor

que 37°C, obteríamos realmente valores maiores aos encontrados por aqueles pesquisadores.

Os valores de nossas determinações, assim como os obtidos por Zsigmond e cols. (1980), não foram muito eficientes na identificação dos indivíduos CHE1 UF, uma vez que os menores valores obtidos para os CHE1 U imbricam com os maiores obtidos para os CHE1 UA. Assim, em análises posteriores, optamos por não mais utilizar o inibidor fluoreto de sódio.

4.1.2 - Método proposto pelo presente trabalho.

Comparando-se as amplitudes de variação dos indivíduos CHE1 U e CHE1 UA, obtidas para o RN, no método proposto pelo presente trabalho, (Tabela 8) com aquelas obtidas por Morrow e Motulsky (1968), de 82,0 a 96,0 e de 43,0 a 67,0, respectivamente, observa-se que os valores obtidos no método proposto pelo presente trabalho, para os indivíduos CHE1 U, aproximam-se daqueles obtidos por Morrow e Motulsky (1968), porém os valores obtidos por estes autores para os indivíduos CHE1 UA estão bem abaixo aos encontrados no presente trabalho, o que leva a pensar que a enzima codificada pelo alelo *CHE1*A* seja mais sensível às mudanças que foram realizadas no presente trabalho em relação ao método original. Morrow e Motulsky (1968) colocam o substrato em temperatura ambiente e depois levam os tubos ao banho-maria. No presente trabalho, o substrato já estava no banho-maria, portanto, a 37°C, antes de ser acrescentado ao tubo para iniciar a reação. Este procedimento parece dar mais precisão ao método, fornecendo menores amplitudes de variação.

A partir das porcentagens de inibição (RN e PN) encontradas pelo método de Kalow e Genest (1957) modificado, a 37°C e pelo método desenvolvido no presente trabalho, foram calculadas amplitudes de variação ($\bar{x} \pm 2$ D.P.) utilizadas em dois gráficos (Figuras 1 e 2, respectivamente), os quais mostram boa discriminação dos fenótipos CHE1 U, CHE1 UA e CHE1 UF. Também a partir das porcentagens de inibição (DN e PN) relatadas no trabalho de Whittaker e cols. (1981), foram calculadas amplitudes de variação ($\bar{x} \pm 2$ D.P.), usadas no gráfico da Figura 3, utilizado para comparação com nossos resultados. O que se observa pela comparação dos três gráficos é que todos estes métodos servem para discriminar o fenótipo CHE1 UF.

4.2 - ANÁLISE DA AMOSTRA POPULACIONAL

As freqüências do alelo *CHE1*F* foram de 0,60% \pm 0,34% em brancos e 0,49% \pm 0,17 em negróides, não diferindo entre estes grupos raciais ($t = 0,30$; $P > 70\%$). Este alelo, portanto, não se comporta como o *CHE1*A* que mostrou uma freqüência menor (0,84% \pm 0,20%) em negróides, quando comparado aos caucasóides (1,5% \pm 0,27%) na população de Curitiba (Chautard-Freire-Maia e cols., 1984b).

A freqüência total do alelo *CHE1*F* encontrada nesta amostra foi de 0,51 \pm 0,15%. Esta freqüência não difere da apresentada por Simpson e Kalow (1965), de 0,49% \pm 0,11% ($t = 0,11$; $P > 90\%$), que estudaram uma população trihíbrida (branca, negra e índia) do nordeste do Brasil. Nesta população trihíbrida composta de 2138 indivíduos, as estimativas dos componentes raciais indicaram 58,6% de genes de origem caucasóides, 30,1% de genes de

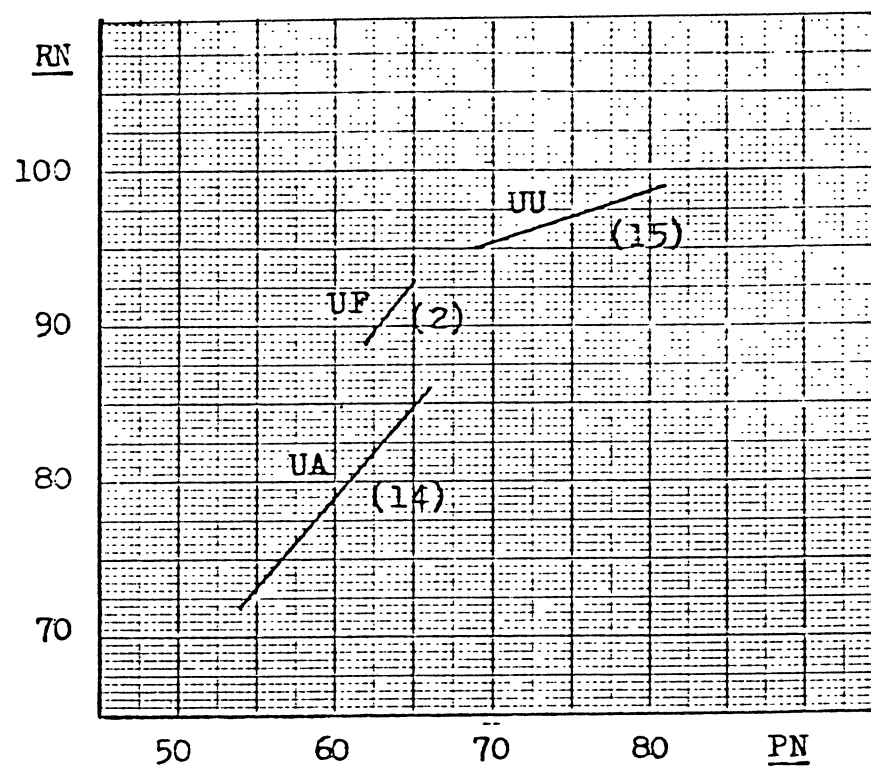


Figura 1 - Gráfico feito a partir dos valores médios (± 2 D.P.) de RN (ordenada) e PN (abscissa), obtidos da tipagem de plasma de 15 indivíduos CHE1 U, 14 CHE1 UA e 2 CHE1 UF, pelo método de Kalow e Genest (1957) modificado, a 37°C.

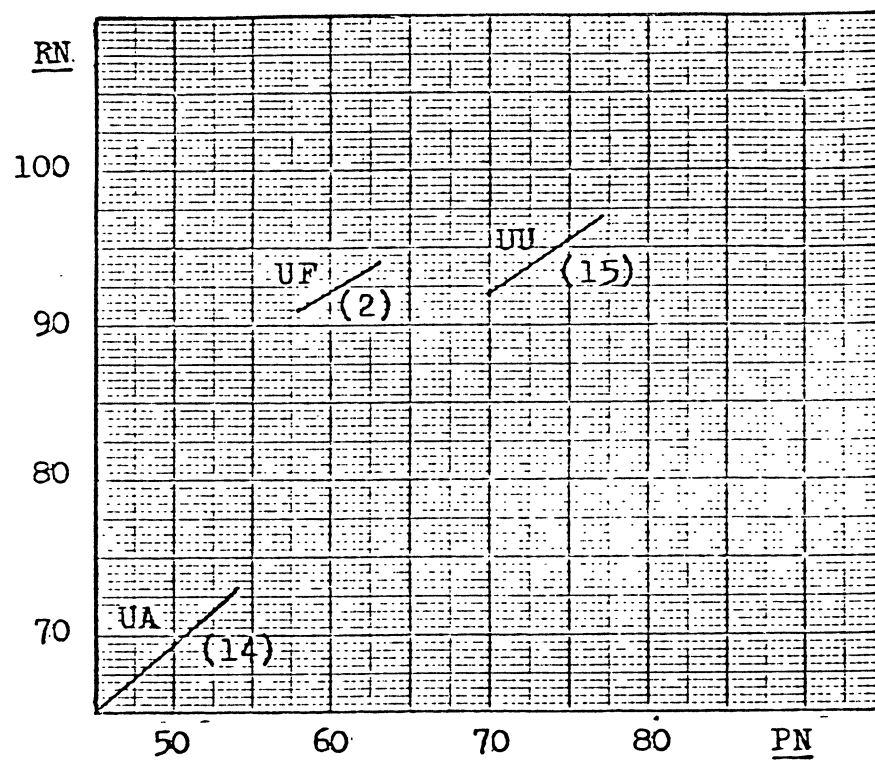


Figura 2 - Gráfico feito a partir dos valores médios (± 2 D.P.) de RN (ordenada) e PN (abscissa), obtidos da tipagem de plasmas de 15 indivíduos CHE1 U, 14 CHE1 UA e 2 CHE1 UF, pelo método proposto pelo presente trabalho.

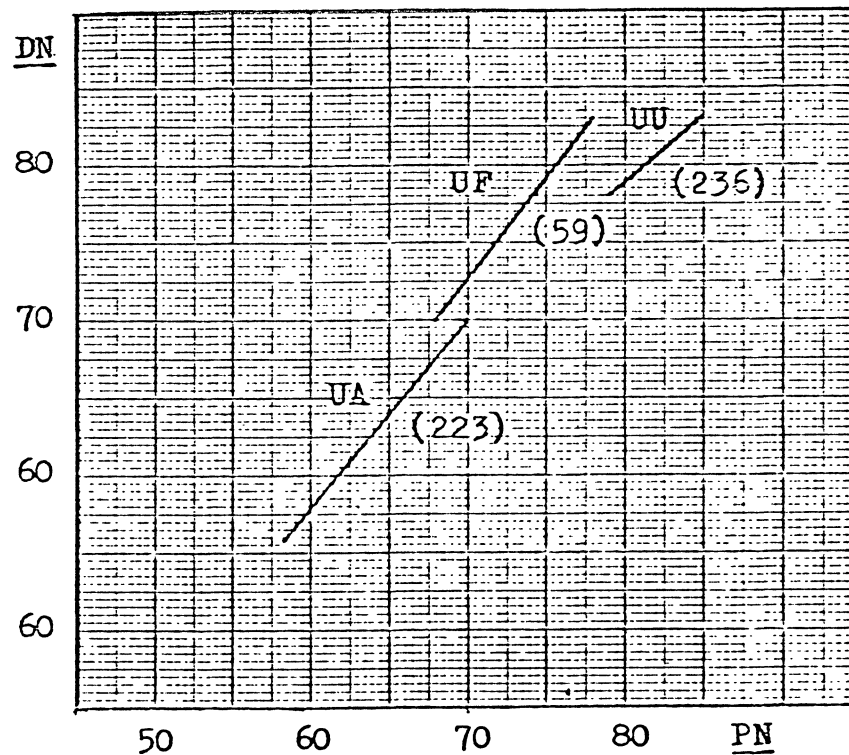


Figura 3 - Gráfico feito a partir dos valores médios (± 2 D.P.) de DN (ordenada) e PN (abscissa), obtidos por Whittaker e cols., (1981), na análise de 236 indivíduos CHE1 U, 223 CHE1 UA e 59 CHE1 UF.

origem negra e 11,3% de genes de origem indígena (Krieger e cols., 1965). Tashian e cols. (1967), analisando índios Xavantes do Mato Grosso, não encontraram o alelo *CHE1*F*. Arends e cols. (1967) examinaram três populações indígenas da América do Sul (Venezuela e Bolívia) onde também não encontraram este alelo, levando-os a sugerir sua possível ausência nos índios da América do Sul. Supondo-se, portanto, que o alelo *CHE1*F* estivesse ausente no contingente indígena que participou da formação da amostra trihíbrida estudada por Simpson e Kalow (1965), a frequência encontrada por estes autores para a população nordestina poderia ser uma subestimativa para caucasóides e negróides. Se nesta população a contribuição de genes de origem indígena foi de 11,3%, pode-se concluir que a frequência do alelo *CHE1*F*, entre caucasóides e negróides, estaria em torno de $0,55\% \pm 0,12\%$. Esta frequência também não difere da encontrada no presente trabalho ($0,51\% \pm 0,15\%$; $t = 0,20$; $P > 80,0\%$). Como, entretanto, a fração indígena é pequena (11,3%), deve-se considerar que apenas com base nestas comparações não se pode excluir a possibilidade da existência do alelo *CHE1*F* em indígenas que contribuíram para a formação do nordestino brasileiro. Seria interessante, em novos trabalhos, verificar se o alelo *CHE1*F* ocorre em nossos indígenas, uma vez que existe apenas o trabalho de Tashian e cols. (1967) a este respeito.

A frequência encontrada no presente trabalho também é bastante próxima à encontrada por vários autores (Tabela 1) $0,41\%$ (Turquia-Sayek e cols., 1976), $0,49\%$ (Gâmbia-Whittaker, 1968b), $0,66\%$ (U.S.A.-Garry e cols., 1972), $0,46\%$ (Bulgária-Steegmüller, 1975), $0,53\%$ (Austrália-Propert e Brackenridge, 1976).

Com os valores de RN e PN obtidos no presente trabalho, para a amostra populacional, foi feito o gráfico da Figura 4,

onde se encontra a distribuição dos fenótipos CHE1 U, CHE1 UA, CHE1 UF e CHE1 AK (amplitudes de variação, ver Tabela 8). Como já era esperado, os indivíduos CHE1 UF ficaram separados dos CHE1 U e mais ainda dos CHE1 UA. Nota-se, ainda, neste gráfico, que os indivíduos CHE1 UF foram separados dos CHE1 U graças ao propranolol (PN), pois as porcentagens de inibição obtidas com este inibidor é que se mostraram mais baixas para os primeiros. Assim fica demonstrada a eficiência deste inibidor na separação dos indivíduos CHE1 UF.

O método proposto pelo presente trabalho mostrou-se, portanto, eficiente na separação dos indivíduos CHE1 UF. Desta maneira, o seu uso facilita a identificação destes indivíduos, uma vez que é um método simples de ser usado e que permite a determinação de vários fenótipos num mesmo dia. Além disto, não há necessidade de aparelhagem especial, ou seja, não é preciso espectrofotômetro com faixa de leitura em ultravioleta e nem banho-maria acoplado. Elimina-se desta maneira, também, o inconveniente do método de Kalow e Genest (1957) que necessita incubação prévia do inibidor Ro2-0683, o que torna a aplicação do método desses autores mais demorado para verificação de grande número de amostras.

Entre os indivíduos analisados na população de Curitiba, um apresentou comportamento diferente dos demais, mostrando RN de 58,8 e PN de 39,7; valores estes abaixo dos mínimos encontrados para os fenótipos CHE1 UA (62,4 e 43,2; respectivamente).

A princípio ficou a dúvida se este indivíduo seria CHE1 AF ou CHE1 AK uma vez que não dispúnhamos de soros padrão para com-

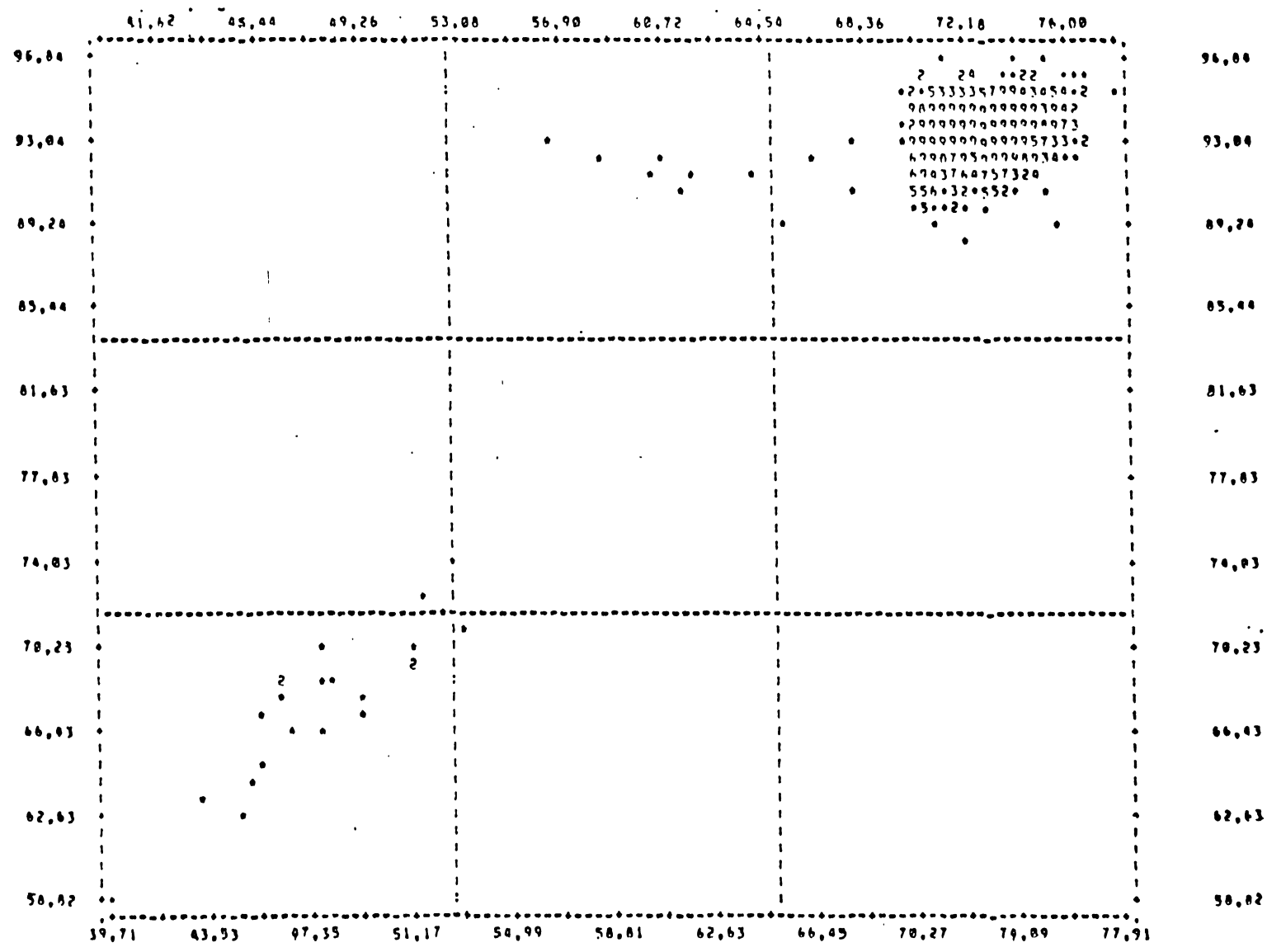


Figura 4 - Distribuição dos fenótipos CHE1 U, CHE1 UF, CHE1 UA e CHE1 AK, de acordo com os valores de RN (ordenada) e PN (abscissa), na amostra da população de Curitiba.

paração. Na amostra estudada por Fontoura (1989, comunicação pessoal), que trabalhou com indivíduos intoxicados por organofosforados, uma moça apresentou valores de RN e PN muito próximos aos deste indivíduo (56,2 e 37,5, respectivamente). Examinando-se soros de seus pais, pode-se observar que nenhum deles era CHE1 UF, reforçando a hipótese de que estes fenótipos seriam CHE1 AK. Esta afirmação foi comprovada após a análise de confirmação dos resultados, com a utilização do método de Kalow e Genest (1957) modificado, 25°C, do qual se possuía valores de referência.

4.3 - ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS SEXO, IDADE, COR E ATIVIDADE DA COLINESTERASE DO SORO

Na análise de correlação feita entre atividade da colinesterase do soro e as variáveis sexo, idade e cor, a atividade se mostrou correlacionada com sexo e cor. Em média, os homens apresentaram maior atividade, bem como os indivíduos com menor componente negróide. Simpson e Kalow (1963), Propert e Brackenridge (1976), Stueber-Odebrecht e cols. (1985) também encontraram maior atividade desta enzima no sexo masculino. Entretanto outros autores, como Callaway e cols. (1951), Vorhaus e Kark (1953), Wetstone e cols. (1965), Simpson (1966), Guerreiro e Chautard-Freire-Maia (1984), Primo-Parmo e cols. (1986), não notaram nenhuma influência do sexo sobre a atividade da enzima.

Van Ros e Vervoort (1973) e Stueber-Odebrecht e cols. (1985) encontraram, também, maior atividade da colinesterase do soro em negros do que em caucasóides, enquanto Guerreiro e

Chautard-Freire-Maia (1984) não observaram este resultado em dados do norte do Brasil.

4.4 - ANÁLISE DOS FENÓTIPOS CHE1 UA, COM A FINALIDADE DE EVIDENCIAR FENÓTIPOS CHE1 AK.

Como já citado anteriormente, Evans e Wardell (1984) encontraram $11,5\% \pm 2,3\%$ de indivíduos CHE1 AK entre os CHE1 UA e Whittaker e Britten (1985) encontraram uma freqüência de $13,3\% \pm 2,5\%$, obtendo, portanto, resultados próximos aos anteriores.

Com o intuito de se verificar a freqüência de CHE1 AK entre os indivíduos CHE1 UA, foram analisados 48 destes indivíduos e a partir das porcentagens de inibição obtidas (RN e PN) foi feito o gráfico da Figura 5. Neste gráfico foram colocados, também, os valores de RN e PN do indivíduo que se destacou quando do exame da amostra populacional, por apresentar valores mais baixos que os dos indivíduos CHE1 UA. Sua posição está incluída num círculo, para destaque.

A princípio, observando-se o gráfico, pensou-se que os cinco resultados apontados pudessem ser de indivíduos CHE1 AK. Baseamo-nos, inicialmente, em afirmações de Evans e Wardell (1984) e Whittaker e Britten (1985), que dizem serem os valores para este fenótipo, muito próximos aos do fenótipo CHE1 UA. Pensou-se, ainda, que o resultado que se destaca dos demais e que está incluído num círculo fosse de indivíduo CHE1 AF. Posteriormente, com os resultados obtidos na etapa de confirmação de resultados ficou claro que o único indivíduo CHE1 AK era aquele bem separado dos demais. Os outros cinco eram CHE1 UA possuidores de valores mais baixos de RN e PN. Assim, o método pro-

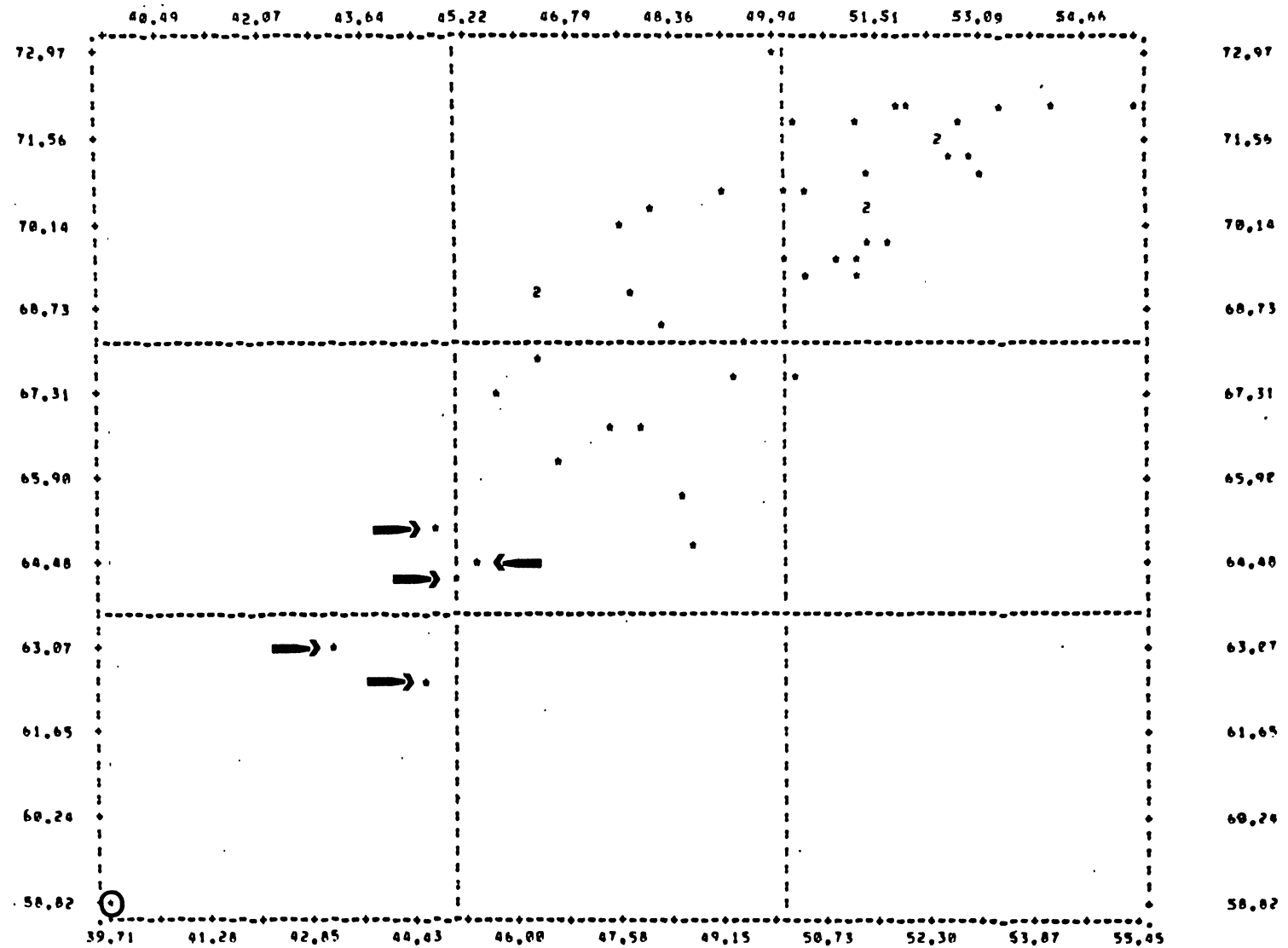


Figura 5 - Distribuição dos fenótipos CHE1 UA e CHE1 AK de acordo com os valores de RN (ordenada) e PN (abscissa), obtidos pelo método proposto no presente trabalho.

posto no presente trabalho deve ser eficaz, também, na identificação do fenótipo CHE1 AK. Os indivíduos CHE1 AK se separam melhor dos CHE1 UA quando se utiliza Ro2-0683 como inibidor (Whittaker e Britten, 1985). Assim, este indivíduo que se destacou dos demais, ao ser analisado anteriormente por Chautard-Freire-Maia e cols. (1984b), que utilizaram o método de Morrow e Motulsky (1968), foi classificado, erroneamente, como CHE1 AF, uma vez que não se tinha conhecimento do alelo *CHE1*K* até aquele momento. Outros autores que não utilizassem Ro2-0683 como inibidor, poderiam atribuir a este indivíduo o fenótipo CHE1 UA, devido à pequena separação dos fenótipos CHE1 UA e CHE1 AK com outros inibidores. Assim, incluindo este indivíduo nos 48 CHE1 UA analisados, teríamos 1 CHE1 AK em 49 supostos CHE1 UA, o que nos forneceria uma frequência de $2,04\% \pm 2,02\%$ de indivíduos CHE1 AK entre os supostos CHE1 UA. Esta frequência é significativamente diferente da encontrada por Evans e Wardell (1984), de $11,5\% \pm 2,3\%$ ($t = 2,01$; $P < 5,0\%$) e também da encontrada por Whittaker e Britten (1985), de $13,3\% \pm 2,5\%$ ($t = 2,25$; $P < 5,0\%$).

Existem três possíveis explicações para esta diferença: a primeira é que, em nossa população, a frequência do alelo *CHE1*K* realmente seja mais baixa do que na população residente na Inglaterra, analisada pelos dois autores citados acima. Isto, porém, parece pouco provável, uma vez que nossa população caucasóide não mostrou diferenças, quanto as frequências dos alelos *CHE1*A* e *CHE1*F*, quando comparadas com outras populações européias. A outra possibilidade é que haja inadequação do método proposto no presente trabalho para a separação dos indivíduos CHE1 AK. Esta hipótese parece pouco provável, uma vez que o método separou muito bem um dos indivíduos dessa população

de Curitiba e também outros dois indivíduos de uma amostra de intoxicados, analisada por Fontoura (1989, comunicação pessoal). Como se poderá verificar na análise de confirmação dos resultados, somente 1 dos 49 indivíduos, antes tipados como CHE1 UA, pode ser considerado CHE1 AK. A terceira possibilidade, que parece a mais provável, é que nas amostras analisadas por Evans e Wardell (1984) e por Whittaker e cols. (1985) tenha havido uma superestimativa na freqüência dos indivíduos CHE1 AK, uma vez que a amostra de CHE1 UA estudada por estes pesquisadores foi averiguada a partir de indivíduos, susceptíveis à apnéia prolongada, devida ao uso do suxametônio. Se ambos tivessem o mesmo risco de desenvolverem apnéia prolongada, após o uso do suxametônio, a proporção de fenótipos CHE1 AK, dentro do grupo daqueles considerados como CHE1 UA, deveria corresponder à freqüência do alelo *CHE1*K* da população. Entretanto, como o alelo *CHE1*K* condiciona cerca de 33,0% a menos de moléculas da colinesterase do soro do que o alelo *CHE1*U*, é de se esperar que o indivíduo de fenótipo CHE1 AK apresente risco mais elevado do que o de fenótipo CHE1 UA. Em vista disto, a estimativa da freqüência do alelo *CHE1*K*, a partir da proporção do fenótipo CHE1 AK detectado entre apnéicos ou seus consangüíneos considerados como de fenótipo CHE1 UA, irá se constituir numa superestimativa da freqüência com a qual este alelo ocorre na população.

4.5 - ANÁLISE DA CONFIRMAÇÃO DOS RESULTADOS

Inicialmente, foram analisados 31 indivíduos retirados da amostra populacional, sendo 10 CHE1 U, 10 CHE1 UA, 10 CHE1 UF, e

1 CHE1 AK. O objetivo desta análise foi realmente comprovar se os indivíduos tipados como CHE1 UF e CHE1 AK haviam sido tipados corretamente, uma vez que o método utilizado foi criado no presente trabalho, não havendo dados de referência para comprovação. As amplitudes de variação, para os fenótipos CHE1 U, CHE1 UA e CHE1 UF, obtidas quanto a DN, FN, RN e PN, utilizando-se o método com base em Kalow e Genest (1957) modificado, a 25°C, se encontram na Tabela 12, juntamente com os valores obtidos por Whittaker e cols. (1981), Evans e Wardell (1984) e Whittaker (1984). Observando-se esta tabela, nota-se que os valores obtidos no presente trabalho aproximam-se aos dos outros investigadores, comprovando, portanto, os resultados obtidos quanto aos fenótipos. O indivíduo que apresentou RN de 58,8 e PN de 39,7, e foi fenotipado como CHE1 AK, apresentou os seguintes resultados, quando foi utilizado o método base de Kalow e Genest (1957) modificado, a 25°C: DN = 46,4; FN = 48,5; RN = 54,5 e PN = 48,5. Comparando-se os resultados de DN, FN e RN, com aqueles obtidos por Evans e Wardell (1984), Tabela 13, pode-se concluir que o mesmo deve ser realmente CHE1 AK, principalmente pelos valores de RN e FN. O DN obtido no presente trabalho (46,4) é um pouco mais baixo que os obtidos por Evans e Wardell (1984) para os CHE1 AK, porém, para os fenótipos CHE1 U, CHE1 UA e CHE1 UF, os valores obtidos no presente trabalho sempre se iniciaram um pouco abaixo. É possível que isto seja devido às diferentes condições de trabalho, de um laboratório para outro. O valor de PN obtido no presente trabalho (48,5) não pode ser comprovado, uma vez que ainda não houve nenhum trabalho a este respeito, ou seja, os indivíduos CHE1 AK não foram verificados com a utilização deste inibidor.

Tabela 12 - Comparação das amplitudes de variação dos números de inibição, obtidos pelo presente trabalho, com a utilização do método de Kalow e Genest (1957), modificado e aplicado a 25°C, com aqueles obtidos por outros investigadores, na mesma temperatura.

Fenótipos	N	DN	FN	RN	PN	Investigadores
CHE1 U	236	-	-	-	79,0-85,4*	Whittaker e cols. (1981)
	476	80,0-83,5	57,0-63,5	93,5-97,5	-	Evans e Wardell (1984)
	100	78,0-83,0	56,0-69,0	-	-	Whittaker (1984)
	10	76,3-84,2	57,2-69,5	92,6-98,5	76,8-84,2	Presente trabalho
					75,0-85,0*	Presente trabalho
CHE1 UA	223	-	-	-	55,9-70,1*	Whittaker e cols. (1981)
	169	58,0-68,0	45,5-53,0	66,5-80,0	-	Evans e Wardell (1984)
	77	48,0-69,0	44,0-54,0	-	-	Whittaker (1984)
	10	52,8-65,0	42,2-55,5	68,9-79,5	50,0-66,7	Presente trabalho
					50,4-70,4*	Presente trabalho
CHE1 UF	59	-	-	-	68,3-78,3*	Whittaker e cols. (1981)
	15	72,0-81,0	41,5-56,5	91,0-100,0	-	Evans e Wardell (1984)
	86	70,0-83,0	46,0-54,0	-	-	Whittaker (1984)
	10	66,1-76,1	41,6-60,8	88,9-98,2	65,6-71,7	Presente trabalho
					64,5-72,5*	Presente trabalho

* Amplitudes de variação calculadas com base na média \pm 2 D.P.

Tabela 13 - Amplitude de variação dos números de inibição de alguns fenótipos do loco *CHEI* do trabalho de Evans e Wardell (1984) e números de inibição obtidos no presente trabalho.

Referências	Fenótipos do loco <i>CHEI</i>	N	DN	FN	RN
Evans e Wardell (1984)*					
	AF	7	43,0-52,0	27,0-36,5	58,0-69,0
	AK	22	47,5-58,0	33,0-48,0	49,0-66,5
	AJ	3	40,0-46,5	35,5-39,0	40,0-48,5
Presente trabalho *	AK	1	46,4	48,5	54,5

* Método de Kalow e Genest (1957) modificado, a 25°C.

Posteriormente, foram analisados os 28 indivíduos, retirados daqueles 48 CHE1 UA, que foram anteriormente examinados para verificação dos CHE1 AK. Estes indivíduos foram escolhidos, porque apresentaram valores de RN e PN menores que os outros 20 e, portanto, tinham maior probabilidade de serem CHE1 AK. Como já citado anteriormente, as amplitudes de variação dos números de inibição obtidas para estes indivíduos, com a utilização do método base de Kalow e Genest (1957) modificado, a 25°C, foram as seguintes: DN = 52,4-69,3; FN = 40,4-58,1; RN = 67,3-82,7 e PN = 50,0-66,7. Comparando-se estes resultados com aqueles dos CHE1 UA incluídos na Tabela 12, verifica-se que todos devem ser CHE1 UA. Ainda com o intuito de verificar se entre estes indivíduos não se destacariam alguns CHE1 AK, foram feitos seis gráficos, nos quais se colocaram dois a dois os diferentes números de inibição: DN, FN, RN e PN. Estes se encontram nas Figuras 6,7,8,9,10 e 11. Observando-se estes gráficos, não se nota distinção aparente entre os 28 indivíduos CHE1 UA incluídos no gráfico, reforçando a hipótese da ausência de fenótipos CHE1 AK entre eles. Apenas o indivíduo ressaltado por um círculo, o qual consideramos CHE1 AK, pode ser considerado como diferente dos 28 demais.

No gráfico da Figura 6 se encontra a distribuição de FN e DN. Os inibidores dibucaína e fluoreto de sódio têm sido, por muito tempo, os utilizados pela maioria dos pesquisadores de variantes da colinesterase do soro. Como podemos observar neste gráfico, o indivíduo que consideramos CHE1 AK não se destacou muito dos demais e por isto, seria antigamente tipado como CHE1 UA. Rubinstein e cols. (1978) foram os primeiros a observarem, utilizando estes inibidores, que certos indivíduos, por apresentarem DN pouco mais baixos que os CHE1 UA, se separavam dis-

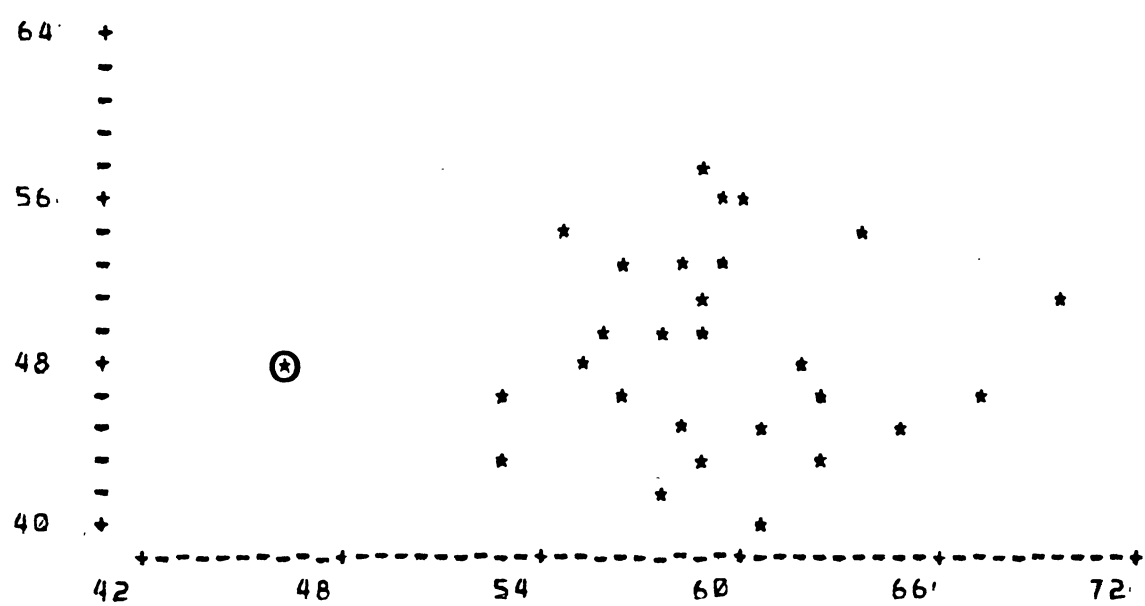


Figura 6 - Distribuição dos fenótipos CHE1 UA e CHE1 AK, de acordo com os valores de FN (ordenada) e DN (abscissa), obtidos pelo método de Kalow e Genest (1957) modificado, a 25°C.

cretamente destes. Na Figura 7 observa-se a distribuição de PN e DN, onde o fenótipo CHE1 AK se apresenta levemente separado dos demais sendo esta separação devida ao uso da dibucaína. A Figura 8 mostra a distribuição do FN e RN, onde pode-se observar o fenótipo CHE1 AK separado dos demais graças ao uso do Ro2-0683. A Figura 9, que apresenta a distribuição de PN e FN, mostra que o fluoreto de sódio e o propranolol não formam uma boa combinação de inibidores para discriminar os indivíduos CHE1 AK. A Figura 10, onde se encontra a distribuição de PN e RN, mostra uma boa separação do indivíduo CHE1 AK, também, graças ao uso do Ro2-0683. Assim, parece que podemos concluir que a melhor combinação de inibidores para se distinguir os fenótipos CHE1 AK, utilizando-se o método de Kalow e Genest (1957) modificado, a 25°C, é a dibucaína e o Ro2-0683. Isto pode ser verificado na Figura 11, onde aparece a distribuição de DN e RN, com perfeita separação do indivíduo CHE1 AK.

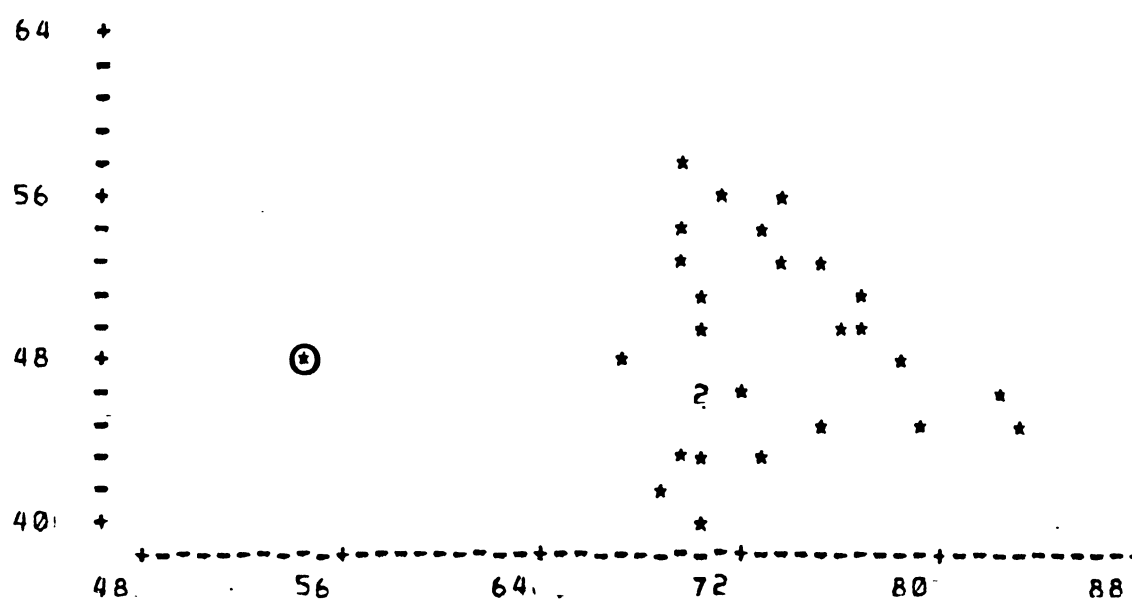


Figura 8 - Distribuição dos fenótipos CHE1 UA e CHE1 AK, de acordo com os valores de FN (ordenada) e RN (abscissa), obtidos pelo método de Kalow e Genest (1957) modificado, a 25°C.

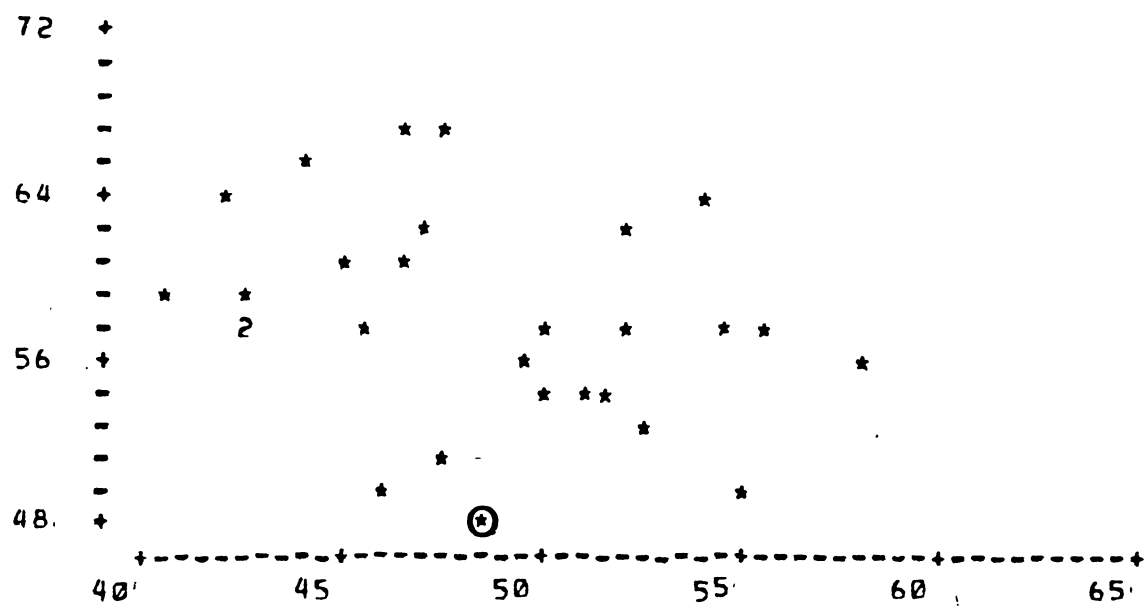


Figura 9 - Distribuição dos fenótipos CHE1 UA e CHE1 AK, de acordo com os valores de PN (ordenada) e FN (abscissa), obtidos pelo método de Kalow e Genest (1957) modificado, a 25°C.

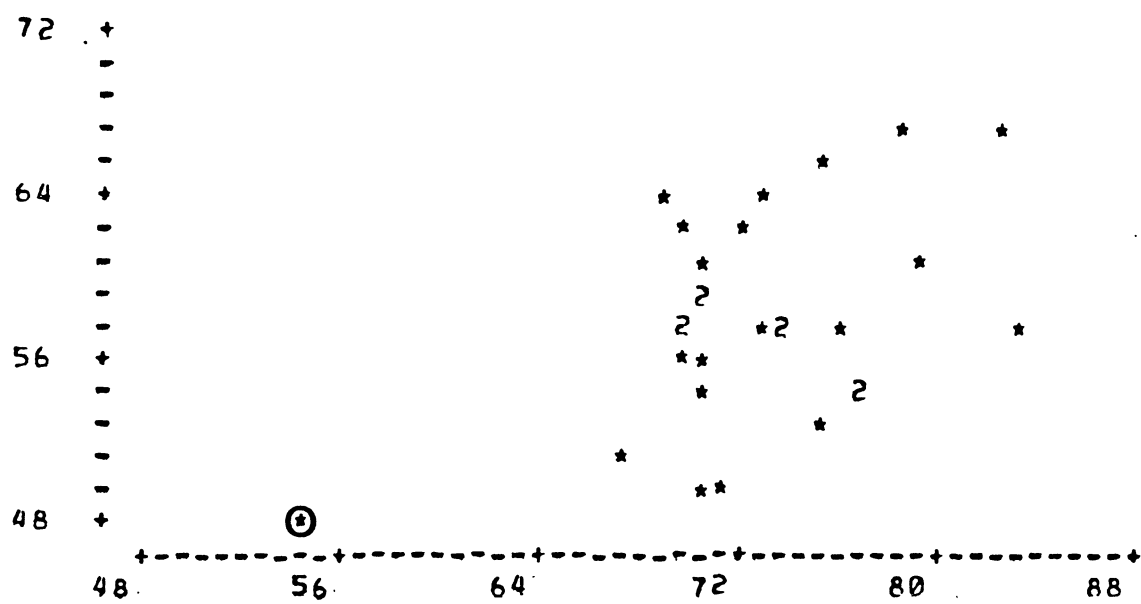


Figura 10 - Distribuição dos fenótipos CHE1 UA e CHE1 AK, de acordo com os valores de PN (ordenada) e RN (abscissa), obtidos pelo método de Kalow e Genest (1957) modificado, a 25°C.

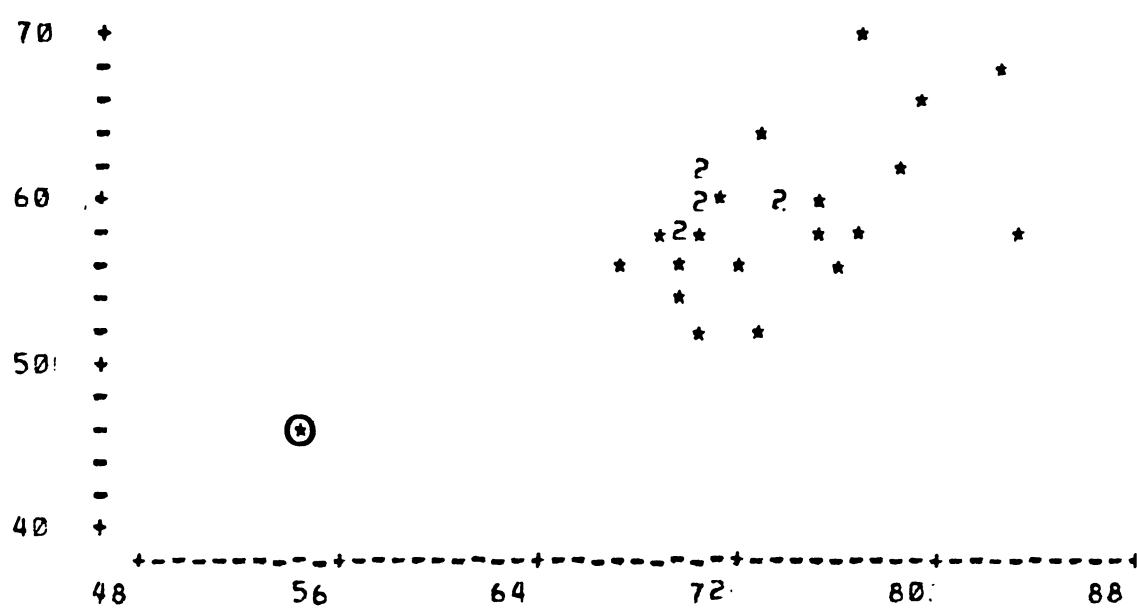


Figura 11 - Distribuição dos fenótipos CHE1 UA e CHE1 AK, de acordo com os valores de DN (ordenada) e RN (abscissa), obtidos pelo método de Kalow e Genest (1957) modificado, a 25°C.

V - RESUMO E CONCLUSÕES

O objetivo inicial deste trabalho foi estimar a freqüência do alelo *CHE1*F* da colinesterase do soro, numa amostra da população de Curitiba. Posteriormente, houve interesse em estimar a freqüência do fenótipo CHE1 AK entre os indivíduos considerados como de fenótipo CHE1 UA, uma vez que os primeiros, dependendo do método utilizado, podem ser confundidos com os últimos.

Para se alcançar esses objetivos, foi criado um método que introduziu o inibidor propranolol, utilizado inicialmente por Whittaker e cols. (1981), ao método de Morrow e Motulsky (1968), que utilizava apenas o inibidor Ro2-0683, o qual isoladamente não conseguia detectar os indivíduos portadores do alelo *CHE1*F*.

Foram utilizadas quatro amostras. A primeira delas constava de 31 indivíduos de fenótipos CHE1 U, CHE1 UA e CHE1 UF. Estes foram utilizados para se verificar a eficiência do método proposto pelo presente trabalho. A segunda amostra, constituída de 1069 indivíduos da população de Curitiba (250 brancos, 249 mulatos claros, 234 mulatos médios, 243 mulatos escuros e 92 negros), foi utilizada com o objetivo de se verificar a freqüência do alelo *CHE1*F*. A terceira amostra foi usada com o intuito de se identificar indivíduos de fenótipos CHE1 AK entre os de fenótipo CHE1 UA e, finalmente, a quarta amostra foi utilizada para confirmação dos resultados obtidos com o método proposto

pelo presente trabalho. Para esta confirmação, foi empregado o método de Kalow e Genest (1957) modificado, a 25°C, para obtenção de valores de referência. A utilização deste método só foi possível no final do trabalho, quando o aparelho necessário para seu uso foi instalado em nosso laboratório.

Os resultados e as conclusões obtidos ao se analisarem essas amostras foram os seguintes:

1) O método proposto pelo presente trabalho permite a identificação do fenótipo CHE1 UF.

2) As freqüências do alelo *CHE1*F* encontradas na amostra da população de Curitiba foram 0,60% ± 0,34% em brancos e 0,49% ± 0,17% em negróides. Como estas freqüências não diferiram significativamente entre estes grupos raciais ($t = 0,30$; $P > 70,0\%$), a freqüência total foi estimada como 0,51% ± 0,15%.

3) Foram estimadas as correlações entre a atividade da colinesterase do soro e as variáveis sexo, idade e cor. Destas variáveis, somente se mostraram correlacionadas com atividade, o sexo ($P < 0,001$) e a raça ($P < 0,01$). Em média, os homens apresentaram maior atividade, bem como os indivíduos com menor componente negróide.

4) A freqüência de indivíduos de fenótipos CHE1 AK entre os de fenótipos considerados como CHE1 UA foi de 2,04% ± 2,02%. Esta freqüência difere da encontrada por Evans e Wardell (1984) de 11,5% ± 2,31% ($t = 2,01$; $P < 5,0\%$) e também da relatada por Whittaker e Britten (1985) de 13,3% ± 2,52% ($t = 2,25$; $P < 5,0\%$). A justificativa que parece mais provável para estas diferenças é que as amostras analisadas por aqueles autores eram constituídas por indivíduos averiguados a partir de pessoas sensíveis ao suxametônio. Se os riscos de apnéia prolongada, após uso de suxametônio, fossem os mesmos para os indivíduos de

fenótipo CHE1 UA e CHE1 AK, era de se esperar que a proporção de fenótipo CHE1 AK, dentro do grupo daqueles considerados como CHE1 UA, correspondesse à frequência do alelo *CHE1*K* da população. Entretanto, como o alelo *CHE1*K* condiciona cerca de 33,0% a menos de moléculas da colinesterase do soro do que o alelo *CHE1*U*, espera-se que o indivíduo de fenótipo CHE1 AK apresente risco mais elevado do que o de fenótipo CHE1 UA. Em vista disto, a estimativa da frequência do alelo *CHE1*K*, a partir da proporção do fenótipo CHE1 AK detectado entre apnéicos ou seus consangüíneos, considerados como de fenótipo CHE1 UA, irá se constituir numa superestimativa da frequência com a qual este alelo ocorre na população.

5) Os exames feitos pelo método com base em Kalow e Genest (1957) confirmaram os resultados obtidos com o método proposto no presente trabalho, quanto à identificação dos fenótipos do loco *CHE1*, que encontramos na amostra de Curitiba.

6) A utilização conjunta dos inibidores Ro2-0683 e propranolol, no método proposto pelo presente trabalho foi de grande importância, sendo que o primeiro se mostrou mais eficiente na identificação do fenótipo CHE1 AK e o último na identificação do fenótipo CHE1 UF.

7) Pela primeira vez, o inibidor propranolol foi introduzido no método de Kalow e Genest (1957), modificado, na temperatura de 37°C. Mostrou-se também eficiente na discriminação do fenótipo CHE1 UF, nesta temperatura.

VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, D.P.; SRIVASTAVA, L.M.; GOEDDE, H.W. A note on suxamethonium sensitivity and serum cholinesterase variants. *Hum. Genet.*, 32:85-88, 1976.
- ALLES, G.A.; HAWES, R.C. Cholinesterases in the blood of man. *J. Biol. Chem.*, 133:375-390, 1940.
- ALTLAND, K.; BUCHER, R.; KIM, T.W.; BUSH, H.; BROCKELMAN, C.; GOEDDE, H.W. Population genetic studies on pseudocholinesterase polymorphism in Germany, Czechoslovakia, Finland and among Laps. *Humangenetik*, 8:158-161, 1969.
- ARENDS, T.; DAVIES, D.A.; LEHMANN, H. Absence of variants of usual serum pseudocholinesterase (acylcholine acylhydrolase) in South American Indians. *Acta. Genet.*, 17:13-16, 1967.
- ASHTON, G.C.; SIMPSON, N.E. C₀ types of serum cholinesterase in a Brazilian population. *Am. J. Hum. Genet.*, 18:438-447, 1966.
- BERGMANN, F.; WURZEL, M. The structure of the active surface of serum cholinesterase. *Biochim. Biophys. Acta.*, 13:251-259, 1954.
- BOURNE, J.G.; COLLIER, H.O.J.; SOMERS, G.F. Succinylcholine (succinoylcholine). Muscle relaxant of short action. *Lancet*, 1:1225-1229, 1952.
- BOUTIN, D.; BRODEUR, J. Human serum pseudocholinesterases: molecular weight estimation of a subunit structure. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 49:777-779, 1971.
- BROWN, S.S.; KALOW, W.; PILZ, W.; WHITTAKER, M.; WIRONICK, C.L. The plasma cholinesterases: a new perspective. *Adv. Clin. Chem.*, 22:1-123, 1981.
- CALLAWAY, S.; DAVIES, D.R.; RUTLAND, J.P. Blood cholinesterase levels and range of personal variation in a healthy adult population. *Br. Med. J.*, 2:812-816, 1951.
- CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.; LOURENÇO, M.A.C.; JUGEND, R.M. Phenotype frequencies of the *CHES* locus of serum cholinesterase in a sample collected in Curitiba. *Rev. Brasil. Genet.*, 7(4):709-715, 1984a.
- CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.; PRIMO-PARMO, S.L.; LOURENÇO, M.A.C.; CULPI, L. Frequencies of atypical serum cholinesterase among

- Caucasians and Negroes from Southern Brazil. *Hum. Hered.*, 34:388-392, 1984b.
- CLITHEROW, J.W.; MITCHARD, M.; HARPER, N.J. The possible biological function of pseudocholinesterase. *Nature*, 199:1000-1001, 1963.
- CULPI, L. *Migração, grupos sanguíneos ABO e Rh e tipos de hemoglobina na população de Curitiba*. Porto Alegre, 1981. 108p. Tese, Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- CUCUIANU, M., POPESCU, T.A.; HARAGUS, S. Pseudocholinesterase in obese and hyperlipemic subjects. *Clin. Chim. Acta.*, 22:151-155, 1968.
- CUCUIANU, M.; POPESCU, T.A.; OPINCARU, A.; HARAGUS, S. Serum cholinesterase and ceruloplasmin in various types of hyperlipoproteinemia. *Clin. Chim. Acta.*, 59:19-27, 1975.
- DAS, P.K. Suxamethonium sensitivity and segregation of human serum cholinesterase variants at locus (Ch1) among twelve British families. *Hum. Hered.*, 25:461-471, 1975.
- DAS, P.K.; KATTAMIS, C.; HAIDAS, S.; LIDDELL, J. Validity of a screening test for typing serum cholinesterase variants among Greek populations. *Hum. Hered.*, 25:429-441, 1975.
- DAS, P.K.; LIDDELL, J. Purification and properties of human serum cholinesterase. *Biochem. J.*, 116:875-881, 1970.
- DICKSON, A. The effect of some hypnotic and analgesic drugs on cholinesterase activity. *Med. Lab. Sci.*, 35:47-53, 1978.
- EARL, C.J.; THOMPSON, R.H.S. The inhibitory action of tri-orthocresylphosphate on cholinesterase. *Brit. J. Pharmacol.*, 2:685-692, 1952, *apud* KUTTY, 1980.
- ELLIS, F.R.; CAIN, C.A.; HARRIMAN, D.G.F.; TOOTHILL, C. Plasma cholinesterase and malignant hyperpyrexia. *Br. J. Anaesth.*, 50:86, 1978.
- EVANS, R.T. Cholinesterase phenotyping: clinical aspects and laboratory applications. *CRC Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, 23(1):35-64, 1986.
- EVANS, F.T.; GRAY, P.W.S.; LEHMANN, H.; SILK, E. Sensitivity to succinylcholine in relation to serum cholinesterase. *Lancet*, *i*: 1229-1230, 1952.
- EVANS, R.T.; IQBAL, J.; DIETZ, A.A.; LUBRAND, T.; RUBINSTEIN, H.M. A family segregating for E₁^J and E₁^K at cholinesterase locus 1. *J. Med. Genet.*, 17:464-467, 1980.
- EVANS, R.T.; WARDELL, J. On the identification and frequency of the J and K cholinesterase phenotypes in a Caucasian population. *J. Med. Genet.*, 21:99-102, 1984.
- FORBAT, A.; LEHMANN, H.; SILK, E. Prolonged apnoea following injection of succinylcholine. *Lancet*, *ii*:1067, 1953.

- FUNNELL, H.S.; OLIVER, W.T. Proposed physiological function for plasma cholinesterase. *Nature*, 208:689-690, 1965.
- GARRY, P.J.; DIETZ, A.A.; LUBRANO, T.; FORD, P.C.; JAMES, K.; RUBINSTEIN, H.M. New allele at cholinesterase locus 1. *J. Med. Genet.*, 13:38-42, 1976.
- GARRY, P.J.; OWEN, G.M.; LUBIN, A.H. Identification of serum cholinesterase fluoride variants by differential inhibition in tris and phosphate buffers. *Clin. Chem.*, 18:105-109, 1972.
- GIBLETT, E.R. *Genetic markers in human blood*. Oxford, Blackwell Scientific Publication, 1969.
- GOEDDE, H.W.; AGARWAL, D.P. Pseudocholinesterase variation. *Hum. Genet.*, (Supl.)1:54-55, 1978.
- GOEDDE, H.W.; ALTLAND, K. Evidence for different "silent genes" in the human serum pseudocholinesterase polymorphism. *Ann. NY Acad. Sci.*, 151:540-544, 1968.
- GOEDDE, H.W.; BAITSCH, H. Nomenclature of pseudocholinesterase polymorphism. *Br. Med. Bull.*, 11:310, 1964.
- GOEDDE, H.W.; FUSS, W.; GEHRING, D.; BAITSCH, H. Studies on formal genetics of the pseudocholinesterase polymorphism; an atypical segregation in a family. *Biochem. Pharmacol.*, 13:603-608, 1964.
- GOEDDE, H.W.; GEHRING, D.; HOFMANN, R.A. On the problem of a "silent gene" in pseudocholinesterase polymorphism. *Biochim. Biophys. Acta.*, 107:391-393, 1965.
- GUERREIRO, J.F. *Sistemas da colinesterase do soro, ABO e Rh na população de Belém - Frequências gênicas e estimativas de mistura racial*. Curitiba, 1983. 104p. Tese, Mestrado, Universidade Federal do Paraná.
- GUERREIRO, J.F.; BATISTA DOS SANTOS, S.E.; BLACK, F.L. Frequencies of the atypical and C₀ variants of serum cholinesterase in Wayana-Apalai Indians. *Rev. Brasil. Genet.*, 8(1):129-132, 1985.
- GUERREIRO, J.F.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Studies on serum cholinesterase (CHE1 locus) in a sample from Northern Brazil. *Rev. Brasil. Genet.*, 7:717-725, 1984.
- GUERREIRO, J.F.; SANTOS, S.E.B.; LOURENÇO, M.A.C.; PRIMO-PARMO, S.L.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Serum cholinesterase polymorphism (CHE1 and CHE2 loci) in Indians from the Amazon region of Brazil: Urubu-Kaapor and Assurini tribes. *Rev. Brasil. Genet.*, 10(4): 781-785, 1987.
- GUTSCHE, B.B.; SCOTT, E.M.; WRIGHT, R.C. Hereditary deficiency of pseudocholinesterase in Eskimos. *Nature*, 215:322-333, 1967.
- HANEL, H.K.; VIBY-MOGENSEN, J. Urea inhibition of human pseudocholinesterase. A new method of detecting atypical

- pseudocholinesterase in homozigotes. *Brit. J. Anaesth.*, 43:51-60, 1971.
- The inhibition of human serum cholinesterase by urea. Mechanism of action and application in the typing of abnormal genes. *Brit. J. Anaesth.*, 49:1251-1257, 1977.
- HANEL, H.K.; VIBY-MOGENSEN, J.; SCHAFFALITZKY DE MUCKADELL, O.B. Serum cholinesterase variants in the Danish population. *Acta. Anaesth. Scand.*, 22:305-307, 1978.
- HARRIS, H. *The principles of human biochemical genetics*. 2.ed. Amsterdam, North-Holland and American Elsevier, 1975.
- HARRIS, H.; HOPKINSON, D.A.; ROBSON, E.B. Two dimensional electrophoresis of pseudocholinesterase components in human serum. *Nature*, 196:1296-1298, 1962.
- Evidence for non-allelism between genes affecting human serum cholinesterase. *Nature*, 200:1185-1187, 1963a.
- HARRIS, H.; ROBSON, E.B.; GLEN-BOTT, A.M.; THORNTON, J.A. Genetical studies on a new variant of serum pseudocholinesterase detected by electrophoresis. *Ann. Hum. Genet.*, 26:359-382, 1963b.
- HARRIS, H.; ROBSON, E.B. Fractionation of human serum cholinesterase components by gel filtration. *Biochim. Biophys. Acta.*, 73:649-652, 1963.
- HARRIS, H.; WHITTAKER, M. Differential inhibition of human serum cholinesterase with fluoride. Recognition of two new phenotypes. *Nature*, 191:496-498, 1961.
- The serum cholinesterase variants. A study of twenty-two families selected via the "intermediate" phenotype. *Ann. Hum. Genet.*, 26:59-72, 1962.
- Differential inhibition of "usual" and "atypical" serum cholinesterase by NaCl and NaF. *Ann. Hum. Genet.*, 27:53-58, 1963.
- HARRIS, H.; WHITTAKER, M.; LEHMANN, H.; SILK, E. The pseudocholinesterase variants. Esterase levels and dibucaine numbers in families selected through suxamethonium sensitive individuals. *Acta. Genet. Stat. Med.*, 10:1-16, 1960.
- HART, S.M.; MITCHELL, J.V. Suxamethonium in the absence of pseudocholinesterase. A case report. *Br. J. Anaesth.*, 34:207-209, 1962.
- HEILBRONN, E. Action of fluoride on cholinesterase: 1. on the mechanism of inhibition. *Acta Chem. Scand.*, 19:1333-1346, 1965; apud PROPERT e BRACKENRIDGE, 1976.
- HODGKIN, W.E.; GIBLETT, E.R.; LEVINE, H.; BAUR, W.; MOTULSKY, A.G. Complete pseudocholinesterase deficiency: genetic and immunologic characterization. *J. Clin. Invest.*, 44(3):486-492, 1965.

- KALOW, W.; DAVIES, R.O. The activity of various esterase inhibitors towards atypical human serum cholinesterase. *Biochem. Pharmacol.*, 1:183-192, 1958.
- KALOW, W.; GENEST, K. A method for detection of atypical forms of human serum cholinesterase. Determination of dibucaine numbers. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 35:339-346, 1957.
- KALOW, W.; GUNN, G.R. The relation between dose of succinylcholine and duration of apnoea in man. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 120:203, 1957.
- KALOW, W.; LINDSAY, H.A. A comparison of optical and manometric methods for the assay of human serum cholinesterase. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 33:568-574, 1955.
- KALOW, W.; STARON, N. On distribution and inheritance of atypical forms of human serum cholinesterase as indicated by dibucaine numbers. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 35:1305-1320, 1957.
- KATTAMIS, C.H.; DAVIES, D.; LEHMANN, H. The silent serum cholinesterase gene. *Acta Genet.*, 17:299-303, 1967.
- KING, J.; DIXON, R.I. A source of error in the determination of inhibitor constants of serum cholinesterase. *Brit. J. Anaesth.*, 42:698-701, 1970.
- KING, J.; GRIFFIN, D. Differentiation of serum cholinesterase variants by succinylcholine inhibition. *Brit. J. Anaesth.*, 45:450-454, 1973.
- KING, J.; MORGAN, H.G. The temperature activity relationships of serum cholinesterases. *J. Clin. Pathol.*, 23:730-732, 1970.
- KLEIN, H.; GARTNER, K.; GUNTHER, R. Die variante C₀ der cholinesterasen des serum. Experimentelle untersuchungen über mikromethoden der gelelektrophorese. *Dtsch. Z. Ges. Gerichtl. Med.*, 61:137-147, 1967, apud BROWN e cols., 1981.
- KRIEGER, H.; MORTON, N.E.; MI, M.P.; AZEVEDO, E.; FREIRE-MAIA, A.; YASUDA, N. Racial admixture in Northeastern Brazil. *Ann. Hum. Genet.*, 29:113-125, 1965.
- KUTTY, K.M. Review: Biological function of cholinesterase. *Clin. Biochem.*, 13(6):239-243, 1980.
- LA DU, B.N.; LOCKRIDGE, O. Molecular biology of human serum cholinesterase. *Fed. Proc.*, 45(13):2965-2969, 1986.
- LA MOTTA, R.V.; McCOMB, R.B.; WETSTONE, H.J. Isozymes of serum cholinesterase: a new polymerization sequence. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 43:313-318, 1965.
- LA MOTTA, R.V.; WORDONICK, C.L.; REINFRANK, R.F. Multiple forms of serum cholinesterase: molecular weights of the isoenzymes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 136:448-451, 1970.
- LAWRENCE, S.H.; MELNICK, P.J. Enzymatic activity related to human serum beta-lipoprotein: histochemical, immuno-

- electrophoretic and quantitative studies. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 107:998-1001, 1961.
- LEE, G.; ROBINSON, J.C. Agar diffusion test for serum cholinesterase typing and influence of temperature on dibucaine and fluoride numbers. *J. Med. Genet.*, 4:19-25, 1967.
- LIDDELL, J.; LEHMANN, H.; SILK, E. A 'silent' pseudo-cholinesterase gene. *Nature*, 199:561-562, 1962.
- LIDDELL, J.; LEHMANN, H.; DAVIES, D. Harris and Whittaker's pseudo-cholinesterase variant with increased resistance to fluoride. *Acta. Genet.*, 13:95-108, 1963.
- LOCKRIDGE, D. Substance P hydrolysis by human serum cholinesterase. *J. Neurochem.*, 39:106-110, 1982.
- LOCKRIDGE, D.; BARTELS, C.F.; VAUGHAN, T.A.; WONG, C.K.; NORTON, S.E.; JOHNSON, L.L. Complete amino acid sequence of human serum cholinesterase. *J. Biol. Chem.*, 262(2): 549-557, 1987.
- LOCKRIDGE, D.; ECKERSON, H.W.; LA DU, B.N. Interchain disulfide bonds and subunits organization in human serum cholinesterase. *J. Biol. Chem.*, 245:8324-8330, 1979.
- LOCKRIDGE, D.; LA DU, B.N. Comparison of atypical and usual human serum cholinesterase. *J. Biol. Chem.*, 253(1/2): 361-366, 1978.
- Loss of the interchain disulfide peptide and dissociation of the tetramer following limited proteolysis of native human serum cholinesterase. *J. Biol. Chem.*, 257(20):12012-12018, 1982.
- Amino acid sequence of the active site of human serum cholinesterase from usual, atypical and atypical-silent genotypes. *Biochem. Genet.*, 24:485-498, 1986.
- MCGUIRE, M.C.; NOGUEIRA, C.P.; BARTELS, C.F.; LIGHTSTONE, H.; HAJRA, A.; VAN DER SPEK, A.F.L.; LOCKRIDGE, D.; LA DU, B.N. Identification of the structural mutation responsible for the dibucaine-resistant (atypical) variant form of human serum cholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 86:953-957, 1989.
- MASSON, P. Formes moléculaires multiples de la butyrylcholinesterase du plasma humain. *Biochim. Biophys. Acta.*, 578:493-504, 1979.
- MASSON, P.; GUMANI, F.; PASSE, M. Fréquence des variants du locus E₁ de la butyrylcholinesterase plasmatique dans une population française. *C.R. Acad. Sc. Paris.*, 289:537-539, 1979.
- MORROW, A.C.; MOTULSKY, A.G. Rapid screening method for the common atypical pseudo-cholinesterase variant. *J. Lab. & Clin. Med.*, 71:350-356, 1968.
- MOTULSKY, A.G. Pharmacogenetics. In: *Progress in Medical Genetics*. Nova York, Grune & Stratton, 1964. v.3, p.49.

- MOURANT, A.E.; KOPÉC, A.C.; DOMANIEWSKA-SOBCZAK, K. *The distribution of human blood groups and other polymorphisms*. 2.ed. London, Oxford University Press, 1976. p.705-708.
- MUENSCH, H., GOEDDE, H.W.; YOSHIDA, A. Human-serum cholinesterase subunits and number of active sites of the major component. *Eur. J. Biochem.*, 70:217-223, 1976.
- MUESNCH, H.; YOSHIDA, A.; ALTLAND, K; JENSEN, W.; GOEDDE, H.W. Structural difference at the active site of dibucaine variant of human plasma cholinesterase. *Am. J. Hum. Genet.*, 30:302-307, 1978.
- NEITLICH, W. Increased plasma cholinesterase activity and succinylcholine resistance: a genetic variant. *J. Clin. Invest.*, 45:380-387, 1966.
- NEUMANN, S.; WALTER, H. Frequencies of pseudocholinesterase variants in Icelanders, Greeks and Pakistanis. *Nature*, 219:950-951, 1968.
- NICOLL, R.A.; SCHENKER, C.; LEEMAN, S.E. Substance P as a transmitter candidate. *Ann. Rev. Neurosci.*, 3:227-268, 1980.
- PRIMO-PARMO, S.L., CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.; LOURENÇO, M.A.C.; SALZANO, F.M.; MELO E FREITAS, M.J. Studies on serum cholinesterase (*CHE1* and *CHE2*) in Brazilian Indians and admixed populations. *Rev. Brasil. Genet.*, 9(3):467-478, 1986.
- PROPERT, D.N.; BRACKENRIDGE, C.J. The relation of sex, age, smoking status, birth rank and parental ages to pseudocholinesterase activity and phenotypes in a sample of Australian Caucasian adults. *Hum. Genet.*, 32:181-188, 1976.
- RAD, P.R.; GOPALAM, K.B. High incidence of the silent allele at cholinesterase locus 1 in Vysyas of Andhra Pradesh (S. India). *Hum. Genet.*, 52:139-141, 1979.
- ROBINSON, A.R.; ROBSON, M.; HARRISON, A.P.; ZUELZER, W.W. A new technique for differentiation of hemoglobin. *J. Lab. Clin. Med.*, 50(5):745-752, 1957.
- ROBSON, E.B.; HARRIS, H. Further data on the incidence and genetics of the serum cholinesterase phenotype C_{6+} . *Ann. Hum. Genet.*, 29:403-408, 1966.
- RUBINSTEIN, H.M.; DIETZ, A.A.; HODGES, L.K.; LUBRAND, T.; CZEBOTAR, V. Silent cholinesterase gene: variations in the properties of serum enzyme in apparent homozygotes. *J. Clin. Invest.*, 49:479-486, 1970.
- RUBINSTEIN, H.M.; DIETZ, A.A.; LUBRAND, T. E_1^K , another quantitative variant at cholinesterase locus 1. *J. Med. Genet.*, 15:27-29, 1978.
- RUBINSTEIN, H.M.; DIETZ, A.A.; LUBRAND, T. GARRY, P.J. E_1^J , a quantitative variant at cholinesterase locus 1: immunological evidence. *J. Med. Genet.*, 13:43-45, 1976.

- SAYEK, I.; KARASHASANOGLU, A.M.; OZAND, P. *Turk. J. Pediat.*, 9:8-12, 1967, *apud* MOURANT *et cols.*, 1976.
- SCOTT, E.M.; POWERS, R.F. Human serum cholinesterase, a tetramer. *Nature*, 236:83-84, 1972.
- _____. Properties of the C₆ variant form of human serum cholinesterase. *Am. J. Hum. Genet.*, 26:189-194, 1974.
- SCOTT, E.M.; WEAVER, D.D.; WRIGHT, R.C. Discrimination of phenotypes in human serum cholinesterase deficiency. *Am. J. Hum. Genet.*, 22:363-369, 1970.
- SCOTT, E.M.; WRIGHT, R.C. A third type of human serum cholinesterase deficiency in Eskimos. *Am. J. Hum. Genet.*, 28:253-254, 1976.
- SHOWS, T.B.; ALPER, C.A.; BOOTSMAN, D.; DORF, M.; DOUGLAS, T.; HUISMAN, T.; KIT, S.; KLINGER, H.P.; KOZAK, C.; LALLEY, P.A.; LINDSLEY, D.; McALPINE, P.J.; McDOUGALL, J.K.; MEERA KHAN, P.; MEISLER, M.; MORTON, N.E.; OPITZ, J.M.; PARTRIDGE, C.W.; PAYNE, R.; RODERICK, T.H.; RUBINSTEIN, P.; RUDDLE, F.H.; SHAW, M.; SPRANGER, J.W.; WEISS, K. International system for human gene nomenclature. *Cytogenet. Cell. Genet.*, 25:96-116, 1979.
- SIMPSON, N.E. Factors influencing cholinesterase activity in a Brazilian population. *Am. J. Hum. Genet.*, 18:243-251, 1966.
- _____. A second heterozygote for "silent" and "fluoride resistant" genes for serum cholinesterase. *J. Med. Genet.*, 4:264-267, 1967.
- _____. Polyacrylamide electrophoresis used for the detection of C₆+ cholinesterase in Canadian Caucasians, Indians and Eskimos. *Am. J. Hum. Genet.*, 24:317-320, 1972.
- SIMPSON, N.E.; ELLIOTT, C.R. Cholinesterase Newfoundland: a new succinylcholine-sensitive variant of cholinesterase at locus 1. *Am. J. Hum. Genet.*, 33:366-374, 1981.
- SIMPSON, N.E.; KALOW, W. Serum cholinesterase levels in families and twins. *Am. J. Hum. Genet.*, 15:280-287, 1963.
- _____. The "silent" gene for serum cholinesterase. *Am. J. Hum. Genet.*, 16:180-188, 1964.
- _____. Comparisons of two methods for typing of serum cholinesterase and prevalence of its variants in a Brazilian population. *Am. J. Hum. Genet.*, 17:156-162, 1965.
- SINGH, S.; AMMA, M.K.P.; SARLEN, K.N.; GOEDDE, H.W. A study of the pseudocholinesterase polymorphism among a Panjabi population. *Hum. Hered.*, 21:388-393, 1971.
- SINGH, S.; SATERNUS, K.; MÜNSCH, H.; ALTLAND, K.; GOEDDE, H.W.; ERIKSSON, A.W. Pseudocholinesterase polymorphism among Alanders (Finno-Swedes), Maris (Cheremisses, USSR) and Greenland Eskimos, and the segregation of some E₁ and E₂ locus types in Finnish Lapp families. *Hum. Hered.*, 24:352-362, 1974.

- STEDMAN, E.; STEDMAN, E.; EASSON, L.H. Cholinesterase: An enzyme present in the blood serum of the horse. *Biochem. J.*, 26:2056-2066, 1932, *apud* EVANS, 1986.
- STEEGMÖLLER, H. On the geographical distribution of pseudochoolinesterase variants. *Humangenetik*, 26:167-185, 1975.
- STUEBER-ODEBRECHT, N.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.; PRIMO-PARMO, S.L. Estudos com sistema da colinesterase do soro em amostras de Blumenau, S.C. *Ciênc. Cult. Suppl.*, 35:693, 1985.
- SURGENOR, D.M.; ELLIS, D. Preparation and properties of serum and plasma proteins. Plasma cholinesterase. *J. Am. Chem. Soc.*, 76:6049, 1954, *apud* GIBLETT, 1969.
- SVENSMARK, O. Human serum cholinesterase as a sialo-protein. *Acta. Physiol. Scand.*, 52:267, 1961, *apud* GIBLETT, 1969.
- SZEINBERG, A.; PIPANO, S.; ASSA, M.; MEDALIE, J.H.; NEUFELD, H.N. High frequency of atypical pseudochoolinesterase gene among Iraqi and Iranian Jews. *Clin. Genet.*, 3:123-127, 1972.
- TASHIAN, R.E.; BREWER, G.J.; LEHMANN, H.; DAVIES, D.A.; RUCKNAGEL, D.L. Further studies on the Xavante Indians. V. Genetic variability in some serum and erythrocyte enzymes, hemoglobin, and urinary excretion of B-amino-isobutyric acid. *Am. J. Hum. Genet.*, 19:524-531, 1967.
- THOMPSON, J.C.; WHITTAKER, M. A study of the pseudochoolinesterase in 78 cases of apnoea following suxamethonium. *Acta. Genet.*, 16:209-222, 1966.
- TORTOLERO, M.; MEDINA, J.R. El componente C₆ de la pseudochoolinesterasa humana. *Sangre*, 22:606-611, 1977.
- Las isozimas C₄ e C₆ de la pseudocolinesterasa humana. *Sangre*, 23(2):157-162, 1978.
- VAN ROS, G.; DRUET, R. Uncommon electrophoretic patterns of serum cholinesterase (pseudochoolinesterase). *Nature*, 212:543-544, 1966.
- VAN ROS, G.; VERVOORT, T. Frequencies of the "atypical" and C₆ variants of serum cholinesterase in Zairians and Belgians. Detection of the C₆ variant by agar gel electrophoresis with an acid buffer. *Ann. Soc. Belge. Med. Trop.*, 53:633-644, 1973.
- VERGNES, H.; SEVIN, J.; CONSTANS, J. Le polymorphisme de la cholinesterase plasmatique dans les populations pyrénéennes. *Nouv. Rev. Fr. Hématol.*, 22:105-114, 1980.
- VORHAUS, L.J.; KARK, R.M. Serum cholinesterase in health and disease. *Am. J. Med.*, 14:707-719, 1953.
- WESCOE, W.C.; HUNT, C.H.; RIKER, W.F.; LITT, I.C. Regeneration rates of serum cholinesterase in normal individuals and in

- patients with liver damage. *Am. J. Physiol.*, 149:549-551, 1947
- WETSTONE, H.J., HONEYMAN, M.S.; McCOMB, R.B. Genetic control of the quantitative activity of a serum enzyme in man. *JAMA*, 192:165-167, 1965.
- WHITTAKER, M. The pseudocholinesterase variants: esterase levels and increased resistance to fluoride. *Acta. Genet.*, 14:281-285, 1964.
- . Differential inhibition of human serum cholinesterase with n-butyl alcohol: recognition of new phenotypes. *Acta. Genet. Stat. Med.*, 18:335-340, 1968a.
- . Frequency of atypical cholinesterase in groups of individuals of different ethnographic origin. *Acta. Genet.*, 18:567-572, 1968b.
- . The frequency of the fluoride resistant gene in a population of British students. *Acta. Genet.*, 18:563-566, 1968c.
- . The serum cholinesterase variants. Differentiation by means of formaldehyde. *Clin. Chim. Acta.*, 26:141-145, 1969.
- . The effect in vitro of thyroxine, glucagon, thyrotrophin and antithyroid drugs on "usual" and "atypical" human plasma cholinesterase. *J. Endocrinol.*, 47:177-182, 1970, *apud* WHITTAKER, 1980.
- . Plasma cholinesterase variants and the anaesthetist. *Anaesthesia*, 35:174-197, 1980.
- . Cholinesterases. In: *Methods of enzymatic analysis*. 3.ed., Weinheim, Verlag Chemie. 1984. v.4, p.52-74.
- . E₁^H, a new allele at cholinesterase locus 1. *Hum. Hered.*, 37: 54-58, 1987.
- WHITTAKER, M.; BERRY, M. The pseudocholinesterase variants. *Hum. Hered.*, 22:243-248, 1972.
- . The plasma cholinesterase variants in mentally ill patients. *Brit. J. Psych.*, 130:397-404, 1977.
- WHITTAKER, M.; BRITTEN, J.J. Inhibition of the plasma cholinesterase variants by pancuronium bromide and some of its analogues. *Clin. Chim. Acta.*, 108:89-94, 1980.
- . Differential inhibition of plasma cholinesterase variants using the dibutyrate analogue of pancuronium bromide. *Hum. Hered.*, 31:242-247, 1981a.
- . Malignant hyperthermia and the fluoride-resistant gene. *Br. J. Anaesth.*, 53:241-244, 1981b.
- . Plasma cholinesterase variants. Family studies of the E₁^K gene. *Hum Hered.*, 35:364-368, 1985.

- . E_1^H a new allele at cholinesterase locus 1. *Hum. Hered.*, 37:54-58, 1987.
- WHITTAKER, M.; BRITTEN, J.J.; WICKS, R.J. Inhibition of the plasma cholinesterase variants by propranolol. *Br. J. Anaesth.*, 53:511-516, 1981.
- WHITTAKER, M.; LOWE, R.F. The cholinesterase variants found in some African tribes living in Rhodesia. *Hum. Hered.*, 26:380-383, 1976.
- WHITTAKER, M.; REYS, L. Plasma cholinesterase studies on South-Eastern Bantu of Mozambique. *Hum. Hered.*, 25:296-301, 1975.
- WHITTAKER, M.; SPENCER, R. Plasma cholinesterase variants in patients having lithium therapy. *Clin. Chim. Acta.*, 75:421-425, 1977.
- WHITTAKER, M.; SPENCER, R.; SEARLE, J. Plasma cholinesterase and malignant hyperthermia. *Br. J. Anaesth.*, 49:393, 1977.
- WHITTAKER, M.; TAYLOR, F.; BATTERSBY, E.F. Recognition of the $E_1^K E_1^F$ cholinesterase genotype in a family segregating three rare genes, E_1^K , E_1^F and E_1^A . *Hum. Hered.*, 37:82-85, 1987.
- WHITTAKER, M.; VICKERS, M.D. Initial experiences with the Cholinesterase Research Unit. *Brit. J. Anaesth.*, 42:1016-1020, 1970.
- WILSON, I.B. The active surface of the serum esterase. *J. Biol. Chem.*, 208:123-132, 1954.
- YOSHIDA, A.; MOTULSKY, A.G. A pseudocholinesterase variant (E Cynthiana) associated with elevated plasma enzyme activity. *Amer. J. Hum. Genet.*, 21:486-498, 1969.
- ZSIGMOND, E.K.; FLYNN, K.B.; KOTHARY, S.P. Improved method for the identification of the fluoride-resistant plasma cholinesterase genotypes. *Biochem. Genet.*, 18(9/10):861-867, 1980.