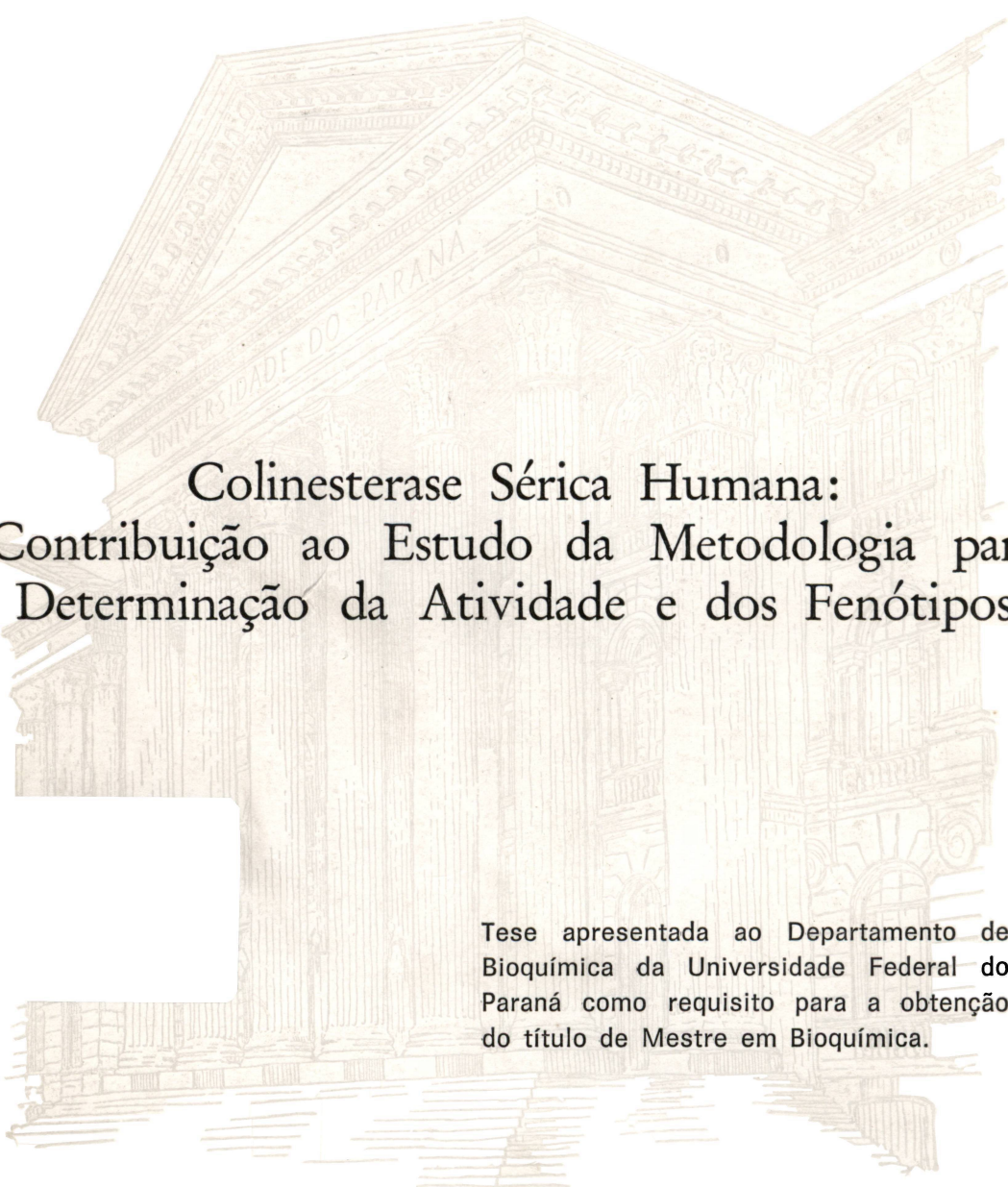


GERALDO PICHETH



Colinesterase Sérica Humana:
Contribuição ao Estudo da Metodologia para
Determinação da Atividade e dos Fenótipos

Tese apresentada ao Departamento de
Bioquímica da Universidade Federal do
Paraná como requisito para a obtenção
do título de Mestre em Bioquímica.

CURITIBA

1 9 8 9

Colinesterase Sérica Humana:
Contribuição ao Estudo da Metodologia para
Determinação da Atividade e dos Fenótipos

Tese apresentada ao Departamento de
Bioquímica da Universidade Federal do
Paraná como requisito para a obtenção
do título de Mestre em Bioquímica.

CURITIBA
1 9 8 9

ORIENTADORAS:

Dra. Muriel Mourão Vieira

Dra. Eleidi Alice Chautard Freire Maia

Para
Guilherme
Eduardo
Cynthia
Felipe e
Ainé

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos Drs. Yoshio Hashimoto e Luiz de Lacerda Filho por facilitarem minha jornada.

Agradeço aos meus sogros Ivan e Maria Fadel pelo apoio que me dispensaram durante este trabalho.

Agradeço às Dras. Muriel Mourço Vieira e Eleidi Alice Chautard Freire Maia pela orientação.

Agradeço ao Prof. Sérgio Luiz Primo Parmo por tudo que me ensinou e pela amizade.

Agradeço à Dra. Glacy Terezinha Zancan pelas críticas e sugestões.

Sou grato a todo grupo da genética, em especial à Prof^ª. Maria Angelina Canever de Lourenço pelo nosso convívio, e à Srta. Irene Sedoski pela ajuda que me dispensou.

Minha dívida é ilimitada para com a Dra. Márcia Quiroga, pelo seu estímulo e amizade.

Agradeço aos amigos do laboratório do IPE e da clínica Champagnat, em especial à Dra. Kazuko Koto e à Srta. Romilda Aparecida Silva, pelo estímulo constante.

Sou grato ao amigo Marcos Machado pela nossa convivência.

Agradeço ao amigo Fernando Antonio Sedor pela ajuda e pelas nossas conversas.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pelo apoio financeiro.

Ao Emiro e a Sílvia por serem os amigos que são.

SUMÁRIO

	LISTA DE TABELAS	vii
	LISTA DE FIGURAS	viii
	LISTA DE ABREVIATURAS	xi
	RESUMO	xii
1	INTRODUÇÃO	01
1.1	Histórico	02
1.2	Caracterização das colinesterases	02
1.3	A colinesterase sérica	04
1.4	Variabilidade genética	09
1.5	Função da ChE no plasma	14
1.6	Atividade da ChE	15
1.7	Coleta e estocagem da amostra	19
1.8	Métodos para determinação da ChE sérica ..	20
1.9	Inibidores da ChE para diferenciação de variantes genéticas	26
2.0	MATERIAIS E MÉTODOS	29
2.1	Amostras	29
2.2	Pool de soros	29
2.3	Reagentes	30
2.4	Espectrofotômetro	30
2.5	Atividade e Inibição enzimática	31
2.6	Procedimentos com alfa-naftilacetato	32
2.7	Procedimentos com benzoilcolina	36
2.8	Procedimentos com propioniltiocolina	36

2.9	Efeito de ciclos de congelamento/descongelamento sobre a ChE	39
2.10	Estabilidade e estocagem da ChE.....	39
2.11	Efeito do EDTA sobre a ChE	39
2.12	Efeito da heparina sobre a ChE	40
2.13	Efeito da bilirrubina sobre a ChE	40
2.14	Efeito da lipemia sobre a ChE	40
2.15	Efeito da hemólise sobre a ChE	41
2.16	Valores de Referência	42
2.17	Controle de qualidade	42
3.0	RESULTADO	43
3.1	Procedimentos com alfa-naftilacetato	43
3.2	Procedimentos com benzoilcolina	46
3.3	Procedimentos com propioniltioacolina	46
3.4	Efeito de ciclos de congelamento/descongelamento sobre a ChE	48
3.5	Efeito da Temperatura sobre a estocagem da ChE	48
3.6	Efeito do EDTA	49
3.7	Efeito da heparina	49
3.8	Efeito da bilirrubina	49
3.9	Efeito da lipemia	49
3.10	Efeito da hemólise	50
3.11	Valores de referência para atividade	50
3.12	Controle de qualidade	50
4	DISCUSSÃO	93
5	CONCLUSÕES	107
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108

LISTA DE TABELAS

1	Comparação entre as principais esterases ...	03
2	Principais fenótipos do loco <u>CHE1</u>	10
3	Inibição das colinesterases por organo- fosforados	19
4	Curva de calibração de alfa-naftol e Fast Red TR	51
5	Parâmetros cinéticos	52
6	Médias e amplitudes de variação das per- centagens de inibição conforme classificação por fenótipo	53
7	Valores médios de referência da atividade conforme avaliada com propioniltiocolina	54
8	Avaliação da reprodutibilidade de medidas de atividade e percentagens de inibição	55

LISTA DE FIGURAS

01	Modelo esquemático da colinesterase sérica ...	05
02	Espectro de absorção do produto colorido com Fast Red TR	56
03	Estabilidade da coloração e do cromógeno	57
04	Efeito do tempo e da concentração de enzima utilizando alfa-naftilacetato como substrato .	58
05	Gráfico duplo-recíproco com alfa-naftilacetato	59
06	Curva de inibição com DL-propranolol utilizando alfa-naftilacetato como substrato	60
07	Curva de inibição com R02-0683 utilizando alfa-naftilacetato como substrato	61
08	Curva de inibição com R02-0683 pré-incubado com R02-0683 por 2 horas utilizando alfa-naftilacetato como substrato	62
09	Curva de inibição com dibucaína utilizando alfa-naftilacetato como substrato	63
10	Efeito do tempo de incubação sobre a inibição com R02-0683 utilizando alfa-naftilacetato como substrato	64
11	Efeito do tempo de incubação sobre a inibição com DL-propranolol utilizando alfa-naftilacetato como substrato	65
12	Efeito da temperatura sobre a inibição com R02-0683 utilizando alfa-naftilacetato como substrato	66
13	Efeito da temperatura sobre a inibição com DL-propranolol utilizando alfa-naftilacetato como substrato	67
14	Distribuição das percentagens de inibição com DL-propranolol e R02-0683 utilizando alfa-naftilacetato como substrato	68
15	Distribuição das percentagens de inibição com DL-propranolol e dibucaína utilizando alfa-naftilacetato como substrato	69
16	Efeito sobre os perfis de inibição de amostras das variantes A e U misturadas em várias proporções	70

17	Distribuição das percentagens de inibição com DL-propranolol e RO2-0683 utilizando benzoilcolina como substrato	71
18	Distribuição das percentagens de inibição com DL-propranolol e dibucaína utilizando benzoilcolina como substrato	72
19	Distribuição das percentagens de inibição com dibucaína e fluoreto de sódio utilizando benzoilcolina como substrato	73
20	Estabilidade da propioniltiocolina em solução	74
21	Curva de concentração da enzima utilizando propioniltiocolina como substrato	75
22	Verificação da sensibilidade do método com propioniltiocolina como substrato	76
23	Efeito do tempo sobre a hidrólise da propioniltiocolina	77
24	Gráfico duplo-recíproco com propioniltiocolina	78
25	Efeito na variação das concentrações de DTNB e fosfato sobre a atividade utilizando propioniltiocolina como substrato	79
26	Curva de inibição com RO2-0683 utilizando propioniltiocolina como substrato	80
27	Curva de inibição com dibucaína utilizando propioniltiocolina como substrato	81
28	Curva de inibição com DL-propranolol utilizando propioniltiocolina	82
29	Curva de inibição com uréia utilizando propioniltiocolina como substrato	83
30	Efeito de ciclos de congelamento/descongelamento sobre a atividade e perfis de inibição da ChE	84
31	Efeito da temperatura sobre a estocagem da ChE	85
32	Efeito do EDTA sobre a atividade e perfis de inibição da ChE	86
33	Efeito da heparina sobre a atividade e perfis de inibição da ChE	87
34	Efeito da bilirrubina sobre a atividade e perfis de inibição da ChE	88

35	Efeito da lipemia sobre a atividade e perfis de inibição da ChE	89
36	Efeito da hemólise sobre a atividade e perfis de inibição da ChE	90
37	Gráfico de controle de qualidade para atividade e perfis de inibição	91
38	Gráfico de controle de qualidade para atividade baixa e elevada	92

LISTA DE ABREVIATURAS

AChE	acetilcolinesterase
ASTRA 1397	cloridrato de 10-(α -dietilaminopropionil)-fenotiazina
C5+	isoenzima C5 presente
C5-	isoenzima C5 ausente
ChE	colinesterase do soro
<u>CHE1</u>	loco 1 da colinesterase do soro
<u>CHE2</u>	loco 2 da colinesterase do soro
DATA	perclorato de (1-dimetilaminonaftaleno-5-sulfenamidoetil)-trimetilamônio
cDNA	DNA complementar
DFP	diisopropilfluorofosfato
DTNB	ácido 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzóico
EDTA	ácido etilenodiaminatetracético
HDL	lipoproteína de alta densidade
K_m	constante de Michaelis
KU/l	quilo-unidade por litro
LDL	lipoproteína de baixa densidade
N	número de amostras
VHDL	lipoproteína de muito alta densidade
V_{max}	velocidade máxima
xg	força centrífuga

RESUMO

Foram estudadas técnicas para medida da atividade e fenotipagem da enzima, considerando a adaptabilidade da metodologia a laboratórios clínicos e de pesquisa sem equipamentos sofisticados. Mostrou-se adequado para a medida da atividade um procedimento que utiliza propioniltiocolina como substrato, acoplado ao DTNB, sendo o ensaio realizado a 25°C. Para detecção das variantes genéticas, o uso de alfa-naftilacetato como substrato, foi otimizado associando os inibidores RO2-0683 e DL-propranolol, em uma metodologia simples e rápida. A análise conjunta dos perfis de inibição com RO2-0683 e DL-propranolol permitiu identificação bem discriminada dos fenótipos CHE1 U; CHE1 UF; CHE1 UA e CHE1 A. As determinações da atividade e fenotipagem não se mostraram sensíveis a presença de EDTA, heparina, bilirrubina, lipemia e hemólise moderada na amostra. A boa estabilidade da enzima quando estocada a -20°C permitiu utilizar um pool de soros como controle de qualidade para reprodutibilidade.

1 INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRICO

O reconhecimento de que o sangue contém uma substância capaz de desdobrar um éster de colina vem de 1914. Dale, observando que a ação da acetilcolina sobre o coração do sapo era muito rápida, postulou que uma enzima esterásica a decompunha rapidamente em colina e ácido acético (135).

Os trabalhos pioneiros de Loewi (123), no início dos anos 30, caracterizaram a substância liberada pela estimulação do nervo vago em sapos, como um derivado de colina. Em 1926 Loewi e Navratil observaram que a "vago-substância", anteriormente caracterizada, e a acetilcolina eram indistinguíveis e ambas passíveis de destruição por extratos de coração de sapo. O agente destrutivo era termolábil e possuía propriedades de enzima, sendo considerado uma esterase (123). Coube a Engelhart e Loewi, em 1930, demonstrarem conclusivamente que a acetilcolina era o éster procurado e que uma enzima, inibida pelo alcalóide eserina, realizava sua hidrólise (13).

Seguindo uma linha de pesquisas com esterases que atuam sobre ésteres de colina, Stedman et al. (123), em 1932, descreveram e purificaram pela primeira vez uma enzima do soro de cavalo que hidrolisava a acetilcolina, e chamaram-na de "colina-esterase", denominação que persiste até hoje.

A existência de duas formas de "colina-esterase" foi demonstrada por Halles e Hayes em 1940, quando observaram que a enzima presente nos eritrócitos era inibida em altas concentrações de substrato, enquanto que a existente no soro aumentava a atividade com o incremento de substrato (96).

Mendel e Rudney em 1942, estudando as especificidades das colinesterases, propuseram o nome de pseudo-colinesterase àquelas que desdobravam outros ésteres além dos colínicos, e reservaram o termo colinesterase à enzima específica. Nesse trabalho os autores chamam a enzima específica de colinesterase verdadeira, termo que se consagrou (96).

O estudo da colinesterase sérica individualiza-se daquele das demais esterases após a década de 50, época que marca a disponibilidade do relaxante muscular succinilcolina no mercado, e as primeiras observações que associam redução na atividade da enzima com a ação prolongada dessa droga (13, 35).

A inibição com dibucaina, utilizada em 1957 por Kalow e Genest (65) para identificar a variante atípica da colinesterase, abriu um novo campo de pesquisa, onde Das(25), Staron(123), Liddell(81), Harris(53) e Whittaker(140), também se destacam, descrevendo novas variantes.

Em 1986 Lockridge *et al.* (84) descreveram a sequência completa de aminoácidos da enzima sérica e três anos mais tarde, o grupo liderado por La Du caracteriza a variante atípica como uma mutação pontual no gene, utilizando técnicas de DNA recombinante (93).

1.2 CARACTERIZAÇÃO DAS COLINESTERASES

Hidrolases que atuam sobre ligações ésteres são chamadas esterases (59).

As três principais classes de esterases que catalisam a hidrólise de ésteres carboxílicos, encontradas no sangue e extrato de tecidos de animais, podem ser caracterizadas conforme suas preferências a substratos e susceptibilidade a inibidores, como mostra a tabela I (120, 148).

TABELA I. COMPARAÇÃO ENTRE AS PRINCIPAIS ESTERASES SEGUNDO WILKINSON (148)

	ALIESTERASES	ARILESTERASES	COLINESTERASES
ÉSTER HIDROLIZADO*	ACETATO OU BUTIRATO	ACETATO OU BUTIRATO	ACETATO OU BUTIRATO
ésteres fenílicos	+	+++	+
ésteres alifáticos	+++	-	++
ésteres de colina	-	-	+++
INIBIDORES**			
organofosforados	+++	-	+++
eserina ($10^{-5}M$)	-	-	+++
EDTA	-	+++	-

* + a +++: reatividade crescente.

** + a +++: inibição crescente.

- : sem reatividade.

Como regra, as esterases atuam sobre uma ampla gama de substratos, o que dificulta a classificação (131). A designação colinesterase, conforme Augustinsson (7), caracteriza as enzimas inibidas pelo alcalóide eserina (fisostigmina) na concentração de $10^{-5}M$.

O sangue humano contém dois tipos de colinesterases: acetilcolina acetilhidrolase EC 3.1.1.7 e acilcolina acilhidrolase EC 3.1.1.8. A acetilcolina acetilhidrolase é também conhecida como acetilcolinesterase, colinesterase verdadeira, colinesterase eritrocitária, colina esterase I e encontra-se ligada à membrana dos eritrócitos (59, 127). Formas semelhantes são encontradas na matéria cinzenta do sistema nervoso central, placa motora, terminações sinápticas de gânglios,

líquido amniótico, placenta e membranas de vários tecidos (13, 141). Apenas uma fração muito pequena encontra-se livre no plasma (17).

A ação da acetilcolinesterase no sangue não é conhecida, mas sua participação no processo de transmissão de impulsos neuromusculares e nas sinapses nervosas tem sido extensamente estudada (125).

Solúvel no plasma, a acilcolina acilhidrolase é usualmente denominada colinesterase do soro, colinesterase do plasma, pseudocolinesterase, colinesterase não específica, colinesterase tipo II, butirilcolinesterase, colinesterase tipo S ou simplesmente colinesterase (59, 127, 140). O fígado, mucosa intestinal, matéria branca do sistema nervoso central, músculo liso e adipócitos são outros sítios principais onde se encontram formas semelhantes dessa enzima (13, 72).

Apresentando meia vida entre 8 e 12 dias (47, 140), supõe-se que a colinesterase sérica seja de origem hepática (136), sendo a principal esterase circulante (9, 49).

No presente trabalho, usaremos a notação ChE para a enzima sérica não específica e AChE para a acetilcolinesterase, descrevendo o termo colinesterase, indistintamente, as duas enzimas.

1.3 A COLINESTERASE SÉRICA

A colinesterase sérica humana (ChE) é um tetrâmero de subunidades idênticas, na sua principal forma circulante (85, 90, 91, 112, 135).

Os monômeros apresentam três pontes de enxofre internas e uma cistina na posição 571 capaz de formar uma ponte com outro monômero idêntico (83). Após a redução e alquilação das pontes de enxofre intercadeias, a enzima continua um te-

trâmero e completamente ativa, concluindo-se que estas são dispensáveis para a manutenção da estrutura ou atividade, e que as subunidades se mantêm unidas por ligações não covalentes (85).

Uma proteólise suave com tripsina libera um pequeno peptídeo e dissocia o tetrâmero em monômeros, dímeros e trímeros, sem perda da atividade de cada fração (86). Este segmento menor que 5.000 daltons, situado próximo à superfície da molécula, contribui para a ligação hidrofóbica entre as subunidades e contém a ponte dissulfeto intercedente (85).

O tetrâmero apresenta segundo Lockridge *et al.* (17, 85) a forma globular G_4 , como dímero de dímeros $(()_2)_2$, e esta forma (fig. 1) representa 95% da atividade encontrada no plasma (6). Kasson (90), analisando parâmetros moleculares, propõe que os dois dímeros ocupem um espaço de posicionamento excêntrico, em zig-zag, formando entre eles um ângulo superior a 90° , o que confere à proteína uma forma elipsóide alongada.



FIGURA 01. Modelo esquemático da colinesterase sérica.

Representação plana (A) e espacial (B) da colinesterase sérica conforme Lockridge *et al.* (85) e Chatonnet e Lockridge (17), respectivamente.

Lockridge et al. (84) sequenciaram a enzima, evidenciando a presença de 574 aminoácidos. Com uma exceção, todos os demais 9 resíduos de asparagina na molécula mostraram-se glicosilados, não se examinando a possibilidade de O-ligações. Haupt et al. (55) mostraram que 23,9% do peso da enzima eram devido a carboidratos, na proporção de 9,3% de galactose + manose; 8,4% acetilhexosamina; 6% ácido acetil-neuramínico e 0,2% fucose, sendo o número de resíduos de açúcar por molécula, calculado como respectivamente, 50, 35, 18 e 1,2 (84).

Os dados de Lockridge et al. (84) e de Haupt et al. (55) sugerem que as cadeias glicosídicas são do tipo complexo, terminando em ácido siálico, cuja remoção por sialidases não afeta as propriedades cinéticas da enzima, apenas modificando grandemente sua mobilidade eletroforética (30).

O peso molecular, de 342.136 daltons foi calculado com base no sequenciamento de aminoácidos e no teor de carboidratos (84). Esse valor é aproximado, devido à inexatidão da estimativa do conteúdo de açúcar. Valores referentes ao monômero, de 90.000 (85) e 84.000 (90) obtidos através do uso de eletroforese em gel de acrilamida com SDS e 85.000, obtido por ultracentrifugação (100), apoiam esta afirmação.

Brimicombe et al. (12) produziram anticorpos monoclonais contra ChE e AChE humanas e não observaram reações cruzadas, o que sugere diferenças significativas na sequência de aminoácidos e na conformação das proteínas (83)

1.3.1 CENTRO ATIVO E MECANISMO DE AÇÃO

As estimativas de 4 sítios ativos por tetramero parecem estar bem consolidadas (83, 85, 86, 90), no entanto, 2 sítios por molécula já foram descritos (100).

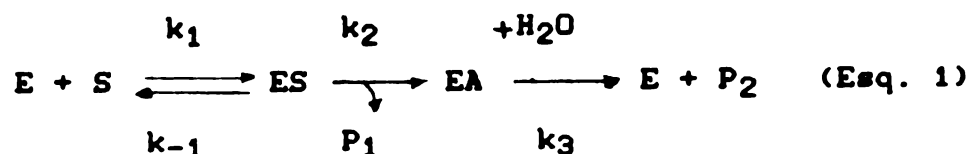
Classicamente, às colinesterases são atribuídas duas regiões importantes para a catálise. Um sítio de posicionamento - sítio aniônico - responsável pela fixação e especificidade do substrato, e outro reativo denominado sítio esterásico, local da clivagem do substrato (16, 80, 147). O primeiro seria constituído por um carbono eletrofilico de uma carbonila e atrairia grupos carregados positivamente do substrato, como o nitrogênio da colina, por forças do tipo Coulomb ou van der Waals (80, 108). A serina 198 é o componente mais reativo do sítio esterásico, sendo indispensável à catálise (84). Um grupo imidazol ressaltaria o caráter nucleofílico da hidroxila serínica próxima a ele, sendo fundamental para a reação (108). Este grupo, previsto por estudos de inibição com DFP, (26) ainda não foi localizado (84).

A inibição da acetilcolinesterase, pelo excesso de substrato (26, 109), contrasta com a ativação da ChE pelo incremento deste (15). A ChE não segue a cinética Michaeliana (15) e parece mostrar vários sítios de ligação (111). O'Brien (102), baseando-se na inibição de derivados do azopiridinium, propõe a existência de três sítios de ligação: aniônico, hidrofóbico e esterásico. Cauet *et al.* (15), trabalhando em estudos cinéticos com ChE de soro equino, apresentam dois mecanismos pelos quais seria explicado o fenómeno de ativação pelo excesso de substrato. O primeiro modelo pressupõe a ligação de uma molécula de substrato adicional sobre o intermediário acil-enzima, sendo considerado como pouco provável por esses autores. O segundo, apoiado em estudos de inibição com DATA, um inibidor potente que não se liga ao centro ativo da enzima, sugere a existência de um sítio de ligação adicional para uma molécula de substrato, distinto do centro ativo. A ligação desta molécula de substrato poderia induzir mudanças conformacionais na enzima, aumentando sua capacidade catalí-

tica.

Exceto a serina 198, outros resíduos importantes do sítio ativo ainda não foram mapeados (84). Apesar dos dados da literatura consolidarem a hipótese da existência do sítio esterásico, a ocorrência do sítio aniônico ainda permanece muito discutível (26).

Ferro e Masson (41) mostraram um mecanismo mínimo para a hidrólise de ésteres por colinesterases, simplificando o proposto por Mahler e Cordes (89), que pode ser escrito como:



onde E é a enzima livre, ES o complexo enzima-substrato, EA o intermediário acil-enzima, e P₁ e P₂ os produtos, respectivamente, álcool e ácido.

Este mecanismo de ação enzimática caracteriza a colinesterase como uma enzima da classe serina que forma composto covalente enzima-substrato do tipo acil-enzima (92, 124).

A existência de homologia entre os peptídeos que contêm a serina do sítio ativo das proteases do tipo tripsina e das colinesterases poderia indicar ancestrais comuns. No entanto, a diversidade na localização de outros resíduos indispensáveis à catálise sugere que as similaridades nos sítios catalíticos entre estes grupos de enzimas provêm de evolução convergente (124).

1.3.2 ISOENZIMAS

Harris *et al.* (52), analisando amostras de soros humanos por eletroforese bidimensional em ágar, evidenciaram quatro bandas com atividade colinesterásica, denominando-as de

C1 a C4, cabendo a C4 a menor migração e a maior atividade. No mesmo trabalho, foi relatada outra banda, denominada C5, que estava presente em apenas alguns indivíduos e pareceu depender de determinação genética. Jull (63) utilizando eletroforese em poliacrilamida, relatou a presença de 12 bandas no soro normal.

O desenvolvimento dos estudos eletroforéticos levou LaHotta et al. (77, 78) a propor que a ChE é uma mistura de múltiplas formas moleculares, as quais em virtude de suas especificidades pelo substrato, susceptibilidade a inibidores e interconvertibilidade, poderiam ser classificadas como isoenzimas. As diferenças seriam fundamentalmente de tamanho da molécula, onde agregados de subunidade polipeptídica comum comporiam as frações (79).

Scott e Powers (112) sugeriram que C4 fosse um tetrâmero e C1 o monômero, no que foram confirmados por Muensch et al. (100). Os dímeros e monômeros encontrados no plasma parecem ser produtos de degradação do tetrâmero, uma vez que a hidrólise parcial deste com tripsina, fornece fragmentos de migração idêntica à das isoenzimas do soro nativo (86). Uma fração de migração mais rápida que o dímero mostrou ser uma associação do monômero à albumina, através de ligação por pontes de enxofre (17).

1.4 VARIABILIDADE GENÉTICA

A ChE é determinada por dois locos autossômicos não ligados, CHE1 e CHE2, ambos polimórficos na maioria das populações estudadas (52).

Soreq et al. (121), utilizando como sonda cDNA humano, evidenciaram dois sítios de hibridização, um no cromossomo 3 e outro no cromossomo 16. O encontro do sítio no cromossomo

16 é indicativo de que o loco CHE2 também condicione uma subunidade estrutural da enzima.

1.4.1 VARIAÇÃO NO LOCO CHE1

A descoberta de variação da ChE ocorreu após 1951, quando os primeiros casos de susceptibilidade à succinilcolina foram observados. As variantes foram evidenciadas com a utilização de inibidores que as discriminam. A tabela II mostra a atividade e os perfis de inibição das principais variantes do loco 1.

TABELA II. PRINCIPAIS FENÓTIPOS DO LOCO CHE1

FENÓTIPO	ATIVIDADE PROPIONILTIOCOLINA KU/L	DN 10^{-5}	FN 5×10^{-5}	RON 10^{-8}	Frequência
UU	2,1-8,6	78-83	56-69	93-98	96%
UA	2,1-6,1	48-69	44-64	66-88	1:25
UF	3,0-6,4	78-83	41-56	91-100	1:200
US	1,2-5,3	77-84	27-39	94-99	1:190
AA	0,66-2,1	8-28	18-31	5-23	1:2.000
AF	0,38-3,4	43-59	41-56	58-69	1:2.000
AS	0,2-1,0	8-28	18-32	4-29	1:29.000
FF	1,3	64-69	38-42	-	1:154.000
FS	1,2-2,4	62-78	38-43	92-100	1:158.000
SS	-	-	-	-	1:100.000
AK	0,94-3,7	47-69	33-64	49-66,5	1:1.700
AJ	1,0-2,4	48-47	35-39	48-49	?
JK	2,2	82	63	97,5	?
LK	3,4-5,6	77-82	59-63	94-97	1:25
AM	0,27 [*]	27-29	26-28	28-35	?
UM	0,61 [*]	78-82	56-60	94-100	?
KH	0,57 [*]	78	56	100	?

Os valores foram compilados dos trabalhos de Evans (35, 37, 38), Whittaker (141, 142) e alchatare (3). As percentagens de inibição com dibucaina (DN) 10^{-5} ; fluroto de sódio (FN) 5×10^{-5} e BOZ-0683 (RON) 10^{-8} foram realizadas com benzilcolina. A atividade foi ensaiada conforme Evans e Erce (38), exceto para os fenótipos AM, UM e KH (K) que foram determinadas com benzilcolina (144).

1.4.1.1 Alelo CHE1*U

Esse alelo condiciona a enzima usual, que é a mais frequentemente encontrada em todas as populações já examinadas. Sua capacidade de ser inibida é maior do que a demonstrada pelas demais variantes com a quase totalidade dos inibidores.

1.4.1.2 Alelo CHE1*A

Kalow e Genest (65) identificaram esta enzima, pela sua resistência à inibição com o anestésico local dibucaína, denominando-a de atípica. Estes autores criaram o termo "número de dibucaína", expresso em percentagem que descreve o grau de inibição da enzima, em condições padronizadas, possibilitando a diferenciação dos fenótipos. Os heterozigotos, de fenótipo UA, são denominados de intermediários "I", face a seu comportamento à dibucaína. McGuire *et al.*, (93), estudando DNA de indivíduos atípicos, identificaram uma mutação pontual que muda a asparagina 70 para glicina. Os homozigotos AA são considerados sensíveis à succinilcolina, pela lentidão com que hidrolisam a droga, levando os portadores à apnéia prolongada.

1.4.1.3 Alelo CHE1*F

Harris e Whittaker (54), utilizando o fluoreto de sódio como inibidor, detectaram uma variante resistente ao fluoreto. A proteína codificada por este gene tem propriedades intermediárias entre as enzimas atípica e usual, na habilidade de hidrolisar succinilcolina.

1.4.1.4 Alelo CHE1*J

Garry *et al.*, (44) sugeriram que esse alelo condicionasse uma enzima semelhante à usual, mas com redução de 66%

da quantidade normal de moléculas. Esta variação só foi estudada em um número pequeno de famílias.

1.4.1.5 Alelo CHE1*K

Este alelo, demonstrado por Rubinstein *et al.* (110) condiciona, de modo semelhante ao alelo J, uma variação quantitativa, que mostra uma redução da ordem de 33% de moléculas da enzima circulante. As variantes J e K só podem ser identificadas quando em heterozigose com outra variante diversa da usual, uma vez que seu comportamento frente a inibidores é idêntico ao da enzima usual.

1.4.1.6 Alelo CHE1*H

Whittaker e Britten (144) relataram outra variante de caráter quantitativo. Este alelo, quando em heterozigose com o alelo A, mostrou diferenciação com o inibidor R02-0683. Os autores postulam que o alelo parece condicionar uma redução mais acentuada na atividade enzimática do que as condicionadas pelas variantes K e J.

1.4.1.7 Alelos CHE1*SU e CHE1*NFLD

Essas variantes foram descritas em número muito reduzido de indivíduos e nada mais foi publicado sobre elas. O alelo CHE1*SU, sensível à succinilcolina, foi caracterizado por Agarwal *et al.* (2), utilizando a própria succinilcolina como substrato e dibucaína como inibidor, em amostras de apnéticos considerados anteriormente de fenótipo usual.

Simpson e Elliot (118) caracterizaram o alelo CHE1*NFLD, com base em dados de uma família de Newfoundland, que apresentou uma enzima com reduzida afinidade frente à succinilcolina e alta capacidade de inibição pela dibucaína.

1.4.1.8 Alelos Silenciosos

O primeiro caso, onde não se pode detectar atividade da ChE no soro, foi relatado por Liddell et al. (82), que evidenciaram a existência do alelo silencioso CHE1*S. Goedde et al. (48) estudaram dois casos de deficiência da ChE, com cerca de 2 a 3% de atividade apenas, caracterizando o alelo CHE1*R. Trabalhando com amostras de esquimós, Scott e Wright (114) encontraram um novo alelo, designado CHE1*T, que condicionava de 2 a 10% de atividade do normal e uma banda de mobilidade mais lenta que a da enzima usual.

1.4.2 VARIAÇÃO DO LOCO CHE2

A detecção das variantes do loco CHE2 se dá pela eletroforese. Os fenótipos desse loco podem ou não apresentar uma banda extra em eletroforese, a isoenzima C5, sendo caracterizados, respectivamente, como C5+ ou C5-.

Considera-se o alelo CHE2*C5+ de caráter dominante sendo que sua frequência varia em diferentes populações, estando próxima de 5% na maioria das populações estudadas (18). Seus portadores apresentam, em média, 30% a mais de atividade (47).

Scott e Powers (113) isolaram as isoenzimas C4 e C5, identificando diferenças cinéticas entre elas e propuseram que C5 fosse um tetrâmero de $(C4)_3C5$ ou $(C4)_2(C5)_2$. Tortolero e Medina (130), com base nas similaridades de eluição em Sephadex e estudos de desnaturação, postularam que C5 derivaria de C4 através de modificações que não alterariam o peso molecular.

Em recente trabalho, Ohkawa et al. (104) sugeriram que a isoenzima seja um produto da fração C4 conjugada com lipídeo.

Chautard-Freire-Maia (18) mostrou correlação entre o peso individual e este loco, reforçando as hipóteses que admitem a influência da ChE no metabolismo lipídico.

1.4.3 VARIANTES COM LOCO INDETERMINADO

1.4.3.1 Alelo CY

Uma variante, com resultados normais quanto à inibição por dibucaína, mostrando atividade duas a três vezes superior à enzima usual, foi descrita por Neitlich (101). Posteriormente evidenciou-se que a atividade elevada era devido a maior número de moléculas circulantes. A essa variante deu-se o nome de Cynthiana (150).

1.4.3.2 Alelo Johannesburg

Krause et al. (70) descreveram uma variante com alta atividade, com perfis de inibição por dibucaína e fluoreto de sódio semelhantes aos da enzima usual e maior estabilidade térmica que esta. A amostra continha o mesmo número de moléculas de ChE que o soro normal, sugerindo a presença de uma enzima hiper-ativa que foi denominada de JOHANNESBURG.

1.5 FUNÇÃO DA ChE NO PLASMA

A função da ChE é desconhecida até o momento (13, 35, 140).

Kutty (72), em sua revisão sobre funções biológicas da ChE, relaciona algumas proposições que ainda não foram substantiadas com melhores evidências, como:

- a)- ChE relacionada com a estrutura da mielina,
- b)- ChE responsável pela homeostasia dos níveis de colina/acetilcolina plasmáticos,
- c)- ChE relacionada à assimilação dos alimentos.

A presença da ChE no fígado, onde ocorre o metabolismo de ácidos graxos, sugere uma função desta no metabolismo lipídico (72). Cucuianu et al. (22) relacionando a atividade da ChE com os níveis séricos de colesterol e triglicerídeos observaram aumento da atividade em indivíduos obesos e hiperlipêmicos.

Sugeriu-se, também, que a ChE pudesse ter a sua secreção induzida por um "turnover" acelerado de lipídios e lipoproteínas (23).

Kutty et al. (73, 78) sugerem que a ChE estaria intimamente associada com a estrutura das beta-lipoproteínas e que na transformação das lipoproteínas VLDL em LDL, um intermediário pré-LDL+ChE se formaria. Estes autores chegam a discutir o uso de drogas anti-colinesterásicas para o tratamento da hiper-beta lipoproteinemia e aterosclerose.

As propostas apresentadas, bem como outras descritas na literatura, parecem não se compatibilizar com a existência de indivíduos sem atividade detectável da ChE, os quais não apresentam qualquer alteração metabólica evidenciável (47).

1.6 ATIVIDADE DA ChE

1.6.1 ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS

Na gravidez, uma queda rápida na atividade, de 30% em média, ocorre no primeiro trimestre quando os valores se mantêm até o parto, com a volta à normalidade somente após 6 semanas deste (39). Ao nascimento e nas semanas que imediatamente o seguem, os níveis da enzima são baixos, até 50% dos níveis adultos. Com o crescimento, estes valores se elevam sobrepujando em 30 a 50% os níveis adultos até os 5 anos, quando se reduzem gradualmente para chegarem na puberdade aos valores adultos (128). Os homens apresentam, em média, níveis séricos mais elevados que as mulheres (13).

1.6.2 ALTERAÇÕES PATOLÓGICAS

A ChE é utilizada como prova de função hepática. Desde que a enzima sérica é sintetizada no fígado (136), patologias como a hepatite crônica, cirrose e doenças malignas que comprometem a síntese hepática são acompanhadas de redução marcante dessa atividade (16).

Calculando a razão entre a atividade da ChE e a concentração de HDL-colesterol, Jain et al. (60) desenvolveram um índice denominado fator de risco complementar, que segundo esses autores pode prever 45% dos casos de risco de doença coronária obstrutiva.

As revisões de Evans (35), Whittaker (140) e Friedman et al. (114) relataram várias condições patológicas que afetam a colinesterase sérica. Entre as que reduzem a atividade pode-se enfatizar: infarto do miocárdio, doenças do colágeno, má nutrição, anemias crônicas, hiperpirexia, tuberculose, infecções agudas, queimaduras, mixedema, uremia e câncer. Aumentam a atividade: a obesidade, hiperlipemia, psoríase, hipertensão essencial, tirototoxicose, nefrose, asma, estados de ansiedade, alcoolismo e esquizofrenia.

1.6.3 ALTERAÇÕES INDUZIDAS POR DROGAS

Várias drogas reduzem a atividade da ChE por influenciarem sua síntese ou inibirem diretamente a enzima no plasma. Entre elas estão: glucocorticóides, estrogênios sintéticos (contraceptivos), ecotiopato, ciclofosfanida, hexafluorenio, tetrahydro-aminacridina, neostigmina, piridostigmina, lítio, pancurônio, fenelzina, clorpromazina e inibidores da monoaminaoxidase (35, 115, 128, 140, 151).

1.6.4 ChE E SUCCINILCOLINA

A contração muscular é iniciada por impulso nervoso transmitido para a fibra muscular através da liberação de acetilcolina das terminações nervosas nas junções neuromusculares (35). A acetilcolina fixa-se em receptores específicos na membrana, induzindo mudanças na permeabilidade iônica e desencadeando o impulso. A AChE hidrolisa rapidamente o neurotransmissor, para que outro impulso possa ser deflagrado. Compostos como a succinilcolina ligam-se ao receptor da membrana causando a despolarização desta e consequente interrupção dos impulsos nervosos, até que a droga seja hidrolisada pela ChE, uma vez que a AChE atua de forma muito lenta sobre ela (125).

A administração intravenosa de 1 mg de succinilcolina, comercialmente denominada suxametônio, induz a paralisia muscular por 2 a 6 minutos (140). O pequeno tempo de atuação caracteriza este composto como relaxante muscular de curta duração, facilitando intubação endotraqueal e outros procedimentos amplamente difundidos na prática anestésica (94).

Em todas as circunstâncias nas quais a atividade da ChE sobre a succinilcolina estiver reduzida, a ação da droga se prolongará, podendo levar a uma paralisação dos músculos respiratórios, com apnéia de graves consequências se não prontamente assistida (94).

1.6.5 ChE e INIBIÇÃO TÓXICA

As colinesterases são inibidas por duas classes de substâncias largamente empregadas como defensivos agrícolas: carbonatos e organofosforados (80).

Os carbonatos a inibem pela formação de um intermediário carbamoil-enzima que é hidrolisado muito lentamente, em contraste com a acil-enzima correspondente (124). A fipostig-

mina (eserina) e a neostigmina (de uso terapêutico) são ésteres carbamólicos e atuam como inibidores através de formação desse intermediário. A retirada do inibidor processa a completa recuperação da enzima (80). Devido a esta reversibilidade, ensaios da ChE na intoxicação por carbamatos são úteis somente se os resultados falsos negativos puderem ser eliminados. Este fato é atribuído à diluição da enzima, necessária em quase todos os métodos, que dilui além da enzima o inibidor, produzindo "in vitro" efeitos não detectáveis de intoxicação, visíveis "in vivo" (149).

A serina do sítio esterásico é o alvo de ligação específica dos organofosforados (80, 108). A formação de um complexo fosforil-enzima muito estável é de ampla utilização como marcador de sítio ativo de serina-protease por estes compostos (124). Em uma primeira etapa, compostos como o diisopropilfluorofosfato reagem com serina, formando diisopropil-enzima, a qual lenta e espontaneamente converte-se em monoisopropil-enzima, processo denominado "envelhecimento" (61). Reagentes nucleófilos, como ácidos hidroxâmicos e oximas, são capazes de reativar "in vivo" e "in vitro" a enzima fosforilada na forma de diisopropil-enzima, não mais atuando na forma "envelhecida" que se torna permanentemente marcada e inibida (80, 108).

A relação entre o grau de intoxicação no homem por organofosforados e o comportamento da atividade da ChE e AChE no sangue estão descritos na tabela III (108).

TABELA III. INIBIÇÃO DAS COLINESTERASES POR ORGANOFOSFORADOS

INTOXICAÇÃO	REDUÇÃO NA ATIVIDADE	
	ChE	ACtE
leve ou recente	+++	0 ou +
em doses repetidas	0 ou +	+++
grave e recente	+++	+++

0: sem alteração
 +: pouco reduzida
 +++: muito reduzida

1.6.6 DIFICULDADE NA CARACTERIZAÇÃO DE ALTERAÇÕES NA ATIVIDADE

A distribuição da atividade da ChE na população normal é bastante ampla. Este fato dificulta a caracterização de alterações significativas, que não sejam exacerbadas, com uma dosagem isolada (20). Portanto para avaliação da atividade da ChE ao longo do processo clínico, é necessário que se façam várias determinações. Este monitoramento é eficaz porque as variações, dentro de um mesmo indivíduo adulto, têm-se mostrado pequenas, com 8,5% em média de flutuação ao longo dos anos (116, 138).

Chu (20) propõe níveis de significância para detecção da queda na atividade enzimática, com relação à imprecisão da metodologia de dosagem e ressalta a importância da boa acurácia desta.

1.7 COLETA E ESTOCAGEM DA AMOSTRA

O material de escolha para a determinação da ChE deve ser soro isento de hemólise (128). Quando necessário, heparina é o anticoagulante de escolha (145). Poucos estudos contemplam as interferências de outros anticoagulantes utilizados na rotina, quer na determinação da atividade, quer na fe-

notipagem de variantes.

Está bem substanciada a estabilidade da enzima, quando estocada a -20°C por períodos de até 14 meses (132). Soros mantidos a 4°C ou a temperatura ambiente, por semanas, mesmo com contaminação bacteriana grosseira, produzem resultados consistentes com aqueles obtidos de amostras recentes (29, 58). Em anticoagulantes citrato-ácido-dextrose (ACD) e citrato-fosfato-dextrose (CPD), de uso em bancos de sangue, a enzima manteve 87% da atividade após 21 dias sob refrigeração (34). Turner *et al.* (132) demonstraram que após 6 ciclos de congelamento/descongelamento a atividade permanecia inalterada, contrariando as observações de Johnston e Huff (62) que relataram a perda de 30% na atividade com um único descongelamento. Para estudos de fenotipagem, a estabilidade relatada para a ChE é muito grande, sendo de vários anos, com a enzima mantida a -20°C (13).

Deve-se ressaltar que os estudos, sobre a estabilidade da enzima, foram realizados em condições próximas à ideal, levando-se em conta esterilidade na coleta e manipulação, rigoroso controle da temperatura ao longo do tempo, bem como transporte da amostra em clima temperado, fatores que nos sempre estão presentes em nossa rotina e em países tropicais.

1.6 MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DA ChE SÉRICA

A literatura dispõe de um grande número de metodologias para medir atividade da ChE ou para identificar variantes associando inibidores a estes métodos. No entanto, o número de técnicas aplicáveis à rotina é muito menor, restringindo-se ainda mais, quando condições como reprodutibilidade e praticabilidade são impostas.

As primeiras técnicas descritas tinham como fundamento a quantificação de ácido liberado na reação enzimática, atra-

vés de indicadores de pH, titulação com NaOH, liberação de CO₂ e variação de pH. Entre estes, destacou-se o método potenciométrico de Michel (97), no qual o pH é medido antes e após a ação enzimática sobre acetilcolina, o que permite avaliar a unidade $\Delta\text{pH}/\text{hora}$, ainda citada nos manuais (108).

Maiores detalhes sobre os métodos acima citados, bem como testes rápidos para uso no campo, podem ser obtidos na revisão de Witter (149).

Entre os métodos com pouca citação na literatura, por serem excessivamente sofisticados para propósitos de rotina, podemos citar: substratos marcados radioativamente (56, 119), cromatografia gasosa na detecção de produtos da reação (106), calorimetria (103), imobilização do substrato (50, 56) e quimioluminescência (71).

Os substratos, com aceitação mais difundida, são aqueles que possibilitam análises espectrofotométricas, tanto na faixa de luz ultravioleta, como visível, notadamente benzoilcolina, alfa-naftilacetato e numerosos ésteres tiocolínicos.

1.6.1 ALFA-NAFTILACETATO

Este substrato, que é desdobrado por várias esterases, foi estudado por Sanford e Harris (9). Embora um método cinético baseado na absorção do alfa-naftol liberado durante a reação em 321 nm tenha sido descrito (152), a visualização pela reação do alfa-naftol com sais de diazônio é mais empregada. A identificação de variantes da ChE com o uso de inibidores, utilizando-se alfa-naftilacetato associado ao cromogênio "Fast Red" tem sido descrita (53, 88, 95, 126).

As principais inconveniências no uso deste substrato são:

- a)- baixa solubilidade em água, requerendo dissolução em acetona ou álcool (152);

b)- inespecificidade para ChE (49);

c)- hidrólise em velocidades muito similares tanto para a enzima usual como para a atípica (9).

Os três fatores expostos acima tornam a medida da atividade sem reprodutibilidade e especificidade, de modo que este substrato só é útil quando associado ao uso de inibidores (35), possibilitando, então, investigações de variabilidade genética.

Morrow e Motulsky (99) aproveitaram algumas desvantagens do alfa-naftilacetato, como a utilização de concentrações não saturantes imposta pela baixa solubilidade e semelhança entre os K_m das enzimas usual e atípica para desenvolver um método rápido de rastreamento dessas variantes. Utilizando RO2-0683 como inibidor, conseguiram discriminar pelo perfil de inibição de forma clara os fenótipos U, UA e A. Alcântara et al. (3) acrescentaram propranolol a esta metodologia (147), e a relação dos perfis de inibição com RO2-0683 e propranolol permitiu evidenciar também o fenótipo UF.

1.8.2 BENZOILCOLINA

Kalow e Lindsay (66) foram os primeiros a utilizar benzoilcolina como substrato para medir a atividade da ChE. O método tornou-se popular, por fornecer simultaneamente a atividade e boa resposta nos estudos de inibição com dibucaína (65) e fluoreto de sódio (54). Quase todas as variantes genéticas, reveladas através de inibidores, foram descobertas por este procedimento, que se manteve ao longo dos anos, sem alterações do original.

A reação, neste caso específica para ChE, é visualizada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm, onde a benzoilcolina absorve e os produtos colina e ácido benzóico não (66). As principais críticas a essa metodologia são:

- a)- as proteínas séricas e alguns inibidores como a dibucaína absorvem luz no comprimento de onda da reação, produzindo absorbâncias iniciais elevadas. As medidas de pequenas diferenças nestas condições são menos precisas e mais susceptíveis de erro na medição espectrofotométrica (141). Este efeito se potencializa quando para amostras de baixa atividade, se impõe diluições menores que as preconizadas, elevando a concentração proteica no meio de reação (66);
- b)- o equipamento necessita ser sofisticado e de alta qualidade para fornecer um comprimento de onda acurado. Analisando-se o espectro de absorção do plasma diluído, verificou-se que um erro de 2 nm (de 240 para 238 nm) reduz a energia disponível no detector em 50% (1);
- c)- outros aspectos, como problemas associados à inibição pelo fluoreto de sódio, necessidade de medição cinética e velocidade lenta de hidrólise foram revistos por Silk et al. (117).

1.8.3 ÉSTERES TIICOLÍNICOS

A preferência pelos ésteres tiicolínicos, como substratos para a reação da ChE, se deve à rápida velocidade de hidrólise, associada à liberação de tiocolina, com um grupo tiol ativo que pode desenvolver uma reação colorimétrica secundária muito sensível (33, 35).

A tiocolina pode reagir com 2,2'- ou 4,4'-ditiopiridina formando 2- ou 4-tiopiridina que absorvem em 343 e 324 nm, respectivamente (133). Embora a desvantagem de medição na luz ultravioleta, o método tem a vantagem de não sofrer interferência da cromogenicidade da hemoglobina e permite determinar

ChE e AChE em sangue total, empregando inibidores diferenciais como o "ASTRA 1397" que inibe seletivamente a ChE (8).

O acoplamento do tiol, liberado ao ácido 5,5'-ditio-bis-(-2-nitrobenzóico) também conhecido como reagente de Ellman (32) ou DTNB, forma o ácido 5-tio-2-nitrobenzóico de intensa coloração amarela cuja absorbância é medida em 410 nm.

Ellman (33) descreveu um procedimento utilizando acetiltiocolina acoplada ao DTNB, método que foi modificado por Garry e Routh (46), que interrompiam a reação com sulfato de quinidina. Com o mesmo princípio, Das e Liddell (25) utilizaram a butiriltiocolina, substrato específico para ChE, de boa estabilidade em solução, estudando ainda vários inibidores para fenotipagem.

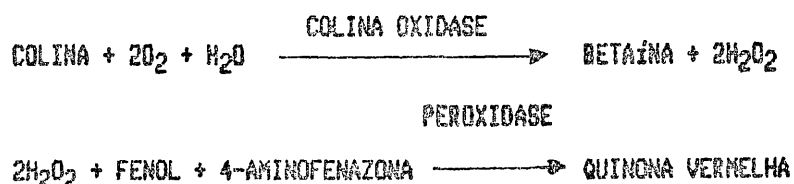
Em 1972 Dietz *et al.* (28), baseados em metodologias anteriores (25, 33, 46), utilizaram propioniltiocolina como substrato e dibucaina e fluoreto de sódio como inibidores, e propuseram um método para medida da atividade e diferenciação fenotípica. Após um ano, esse método tinha sido suficientemente estabelecido para ser aceito como Método Selecionado pelo corpo editorial do Journal of the American Association of Clinical Chemists (29).

A propioniltiocolina não é específica para a ChE, sendo também desdobrada pela AChE, embora em menor velocidade (4). O método sofreu críticas quanto ao seu grau de reprodutibilidade (107), má separação dos fenótipos (14) e pelo fato da inibição com fluoreto não diferenciar a variante atípica da usual (95). Embora os autores tenham refutado as críticas (14, 95), Evans e Wroe (38) consideraram o método muito sensível e propuseram a redução da temperatura para 25°C e a utilização de metade do volume de amostra proposto originalmente.

Avaliando apenas a atividade, Evans e Wroe (38) demonstraram que a propioniltiocolina identificava 90% dos indivíduos que sofreram apnéia prolongada, sem falsos resultados positivos. Os resultados com o uso de butiril e acetiltiocolina eram um pouco inferiores e a benzoilcolina discriminava apenas 50% desses indivíduos. O valor da atividade limítrofe de discriminação foi caracterizado como a média do fenótipo usual menos 2,5 desvios padrões.

1.8.4 MONITORAMENTO ACOPLADO A ENZIMAS

Okabe et al. (105) descreveram um procedimento com benzoilcolina, através do qual a colina liberada é observada pela sua oxidação com colina oxidase acoplada ao sistema peroxidase/4-aminofenazona/fenol, conforme a equação:



A introdução de inibidores à metodologia semelhante foi descrita por Abernethy et al. (1), enquanto Artiss et al. (5) aumentaram a sensibilidade do procedimento, acrescentando 2-hidroxi-3,5-diclorobenzenosulfonato sódico no lugar do fenol.

Tomita et al. (129) utilizaram o acetato liberado como indicador da reação, processando-o, através de uma sequência de reações enzimáticas que culminam com a oxidação do NADH.

1.8.5 SUCCINILCOLINA COMO SUBSTRATO

A constatação que indivíduos de fenótipo usual experimentaram apnéia prolongada seguida ao uso de succinilcolina, sugere a presença de variantes da ChE não detectadas pelos inibidores convencionais.

Wakid et al. (134), utilizando succinilcolina como substrato, identificaram a colina liberada, pela oxidação com colina oxidase como descrita anteriormente. Succinilditiocolina foi sintetizada e pode vir a ser um passo promissor nesta investigação, pela facilidade da reação poder ser acoplada ao DTNB (137).

Faye e Evans (40) não encontraram, em estudos comparativos, vantagens no uso de succinilcolina, quando comparado ao de propioniltiocolina, na identificação dos fenótipos de risco.

1.9 INIBIDORES DA ChE PARA DIFERENCIAÇÃO DE VARIANTES GENÉTICAS

Um grande número de compostos que produzem inibição diferencial entre os fenótipos tem sido descritos (140), sendo os seguintes os mais citados na literatura: dibucaína (65), fluoreto de sódio (54) e R02-0683 (81)

1.9.1 DIBUCAÍNA

A dibucaína foi o primeiro

inibidor diferencial descrito e até hoje mantém-se como dos mais usados. Sua eficiência bem estabelecida e estabilidade em solução contribuem para isso. No entanto, os perfis de inibição não diferenciam os fenótipos UA e FF e indivíduos heterozigotos, nos quais a enzima atípica aparece com as variantes J e K, são confundidos com outros fenótipos (35).

1.9.2 FLUORETO DE SÓDIO

A inibição da ChE pelo fluoreto de sódio é do tipo incompetitiva (21) e Garry *et al.* (45) mostram diferentes perfis de inibição quando TRIS e fosfato são usados como tampões. A inibição diferencial pelo fluoreto de sódio é muito sensível à temperatura, necessitando rígido controle desta (68, 69, 153). É reconhecidamente difícil trabalhar com este inibidor, que no entanto é muito útil na identificação de fenótipos, notadamente os que apresentam a variante F.

1.9.3 R02-0683

Este carbamato, cujo perfil de inibição se assemelha à dibucaína, tem se mostrado muito útil, em particular na identificação das variantes J, K e H (144). A inibição não é imediata, como a da dibucaína, mas lenta e progressiva, sendo as melhores separações fenotípicas obtidas na concentração de $10^{-8}M$ e com 2 horas de pré-incubação (64). A solução aquosa é estável a 4°C.

1.9.4 PROPRANOLOL

Em nosso laboratório, tem-se obtido boa identificação do alelo F, pela discriminação com propranolol. Este conhecido beta-bloqueador, comercializado com o nome de Inderal, é um inibidor instantâneo, competitivo e reversível (147). A ChE tem grande especificidade pelo isômero D, no entanto é mais prático usar o racemato que não somente é mais barato e mais facilmente disponível que o isômero D, como também mostra diferenciação das variantes comparável à obtida por este (146)

1.9.5 OUTROS INIBIDORES

Também merecem destaque inibidores como a uréia (51), mais reativo com a variante atípica do que com a usual e o brometo de pncurônio e seus análogos (139, 142), os quais são considerados promissores, por Whittaker. A diferenciação das variantes genéticas requer laboratórios com metodologias bem estabelecidas. Um programa de proficiência entre laboratórios americanos e ingleses mostrou as dificuldades na classificação fenotípica e a necessidade de laboratórios de referência com intercâmbios para melhorar a acurácia das determinações (36).

A falta de consenso na literatura, até o momento, sobre os méritos de substratos e inibidores, resulta na escolha de um ou outro de forma quase arbitrária.

1.10 OBJETIVOS DO TRABALHO

O objetivo do presente trabalho é estabelecer um procedimento para a determinação da atividade e fenotipagem da colinestérase sérica, de forma acurada, reprodutível e adaptável a laboratórios não sofisticados. Para isso, propomos:

- 1)- Estudar as metodologias adaptáveis às condições de laboratórios clínicos.
- 2)- Adaptar as metodologias, se possível, às condições desejadas, levando em conta acurácia e reprodutibilidade.
- 3)- Avaliar a estabilidade da enzima.
- 4)- Verificar a interferência de anticoagulantes de uso comum e fatores como lipemia, bilirrubinemia e hemólise na metodologia escolhida.
- 5)- Estabelecer valores de referência para a metodologia escolhida.
- 6)- Propor e desenvolver um programa de controle de qualidade para as medidas de atividade e fenotipagem.

2 MATERIAIS E METODOS

2.1 AMOSTRAS

2.1.1 AMOSTRAS PARA ENSAIOS DE FENOTIPAGEM

As amostras utilizadas foram soros e plasmas heparinizados obtidos do Laboratório de Polimorfismo e Ligação do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná, mantidos em freezer a -20°C . A caracterização dos fenótipos CHE1 U, CHE1 UA, CHE1 UF e CHE1 A, foi realizada pela inibição com dibucaina (65), fluoreto de sódio (54), R02-0683 (81) e propranolol (146). A variante atípica foi cedida pelo Prof. João F. Guerreiro da Universidade Federal do Pará.

2.1.2 AMOSTRAS PARA VALORES DE REFERENCIA DA ATIVIDADE.

As amostras utilizadas para obtenção de valores de referência da medida da atividade (soros e plasmas) foram obtidas do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (HEHE-PAR), durante o ano de 1988 e mantidas estocadas a -20°C . Para maiores informações consultar Chautard-Freire-Neis (18).

2.2 POOL DE SOROS

Uma mistura de aproximadamente 100 soros excedentes da rotina clínica, isentos de icterícia, hemólise e lipemia foi utilizada como fonte de enzima. Os soros foram coletados durante vários dias e mantidos a -20°C . Após descongelamento, foram misturados por 1 hora em agitador magnético a baixa velocidade e filtrados em papel de filtro retentor. Sob cons-

tante homogeneização, alíquotas do filtrado de aproximadamente 1 ml foram envasadas e mantidas a -20°C . Esta amostra foi designada pool e demonstrou comportamento de fenótipo CHE1 U, frente a todos os sistemas testados e uma atividade situada na média da encontrada na população. Cada alíquota do pool foi descongelada uma única vez para uso após o preparo.

2.3 REAGENTES QUÍMICOS

Duonal (lauril sulfato de sódio), Fast Red TR (cloreto de 5-cloro-2-toluenodiazônio), alfa-naftilacetato, ácido 5,5'-ditiocobis-2-nitrobenzóico (DTNB), iodeto de butiriltiocolina, iodeto de propioniltiocolina, cloreto de benzoilcolina, sulfato de quinidina, alfa-naftol, dibucaina e fluoreto de sódio foram obtidos da Sigma Chemical Company. R02-0683 (dimetilcarbamato do brometo de (2-hidroxi-5-fenil-benzil) trimetil anônio) foi doado pelos Laboratórios Roche. Cloridrato de Propranolol foi doado pelos Laboratórios Ayerst e não tendo demonstrado atividade ótica frente ao polarímetro (Shimdt-Haensch) foi considerado mistura racêmica (DL).

Os demais reagentes químicos utilizados foram pró-análise e considerados puros.

2.4 ESPECTROFOTOMETRO

Todas as determinações foram realizadas em espectrofotômetro Micronal (modelo E-382) com lâmpada U.V. e cubeta de fluxo, termostaticada, com 10 mm de espessura. A termostatização foi realizada por banho circulante Liquitherm Ft (Cliticam, Mannheim GMBH) ou Heto Lab Equipment (Denmark).

2.5 ATIVIDADE E INIBIÇÃO ENZIMÁTICA

2.5.1 MEDIDA DA ATIVIDADE

A atividade colinesterásica medida com todos os substratos e métodos empregados foi definida em Unidades Internacionais por litro (U/l), sendo 1 U/l equivalente à hidrólise de 1µmol de substrato por minuto por litro de soro nas condições de ensaio. Neste trabalho a atividade foi expressa pelo múltiplo quilo-unidades por litro (KU/l).

Para o cálculo (11) foram utilizados os coeficientes de extinção $E_{410}=1,36 \text{ l.mM}^{-1}.\text{mm}^{-1}$ para o DTNB (29) e $E_{240}=0,66 \text{ l.mM}^{-1}.\text{mm}^{-1}$ para benzoilcolina (141). O alfa-naftol liberado foi determinado através de curva de calibração.

2.5.2 PERCENTAGEM DE INIBIÇÃO (DN, PN, e RON)

A percentagem de inibição, também designada número de dibucaína (DN), número de propranolol (PN) e número de R02-0683 (RON), conforme o inibidor empregado, foi definida (65 e 99) como:

$$\% \text{ de INIBIÇÃO} = 100 - \frac{A \text{ com inibidor} \times 100}{A \text{ sem inibidor}}$$

sendo "A" equivalente à atividade ou absorbância medidas na reação enzimática.

2.6 PROCEDIMENTOS COM ALFA-NAFTILACETATO

2.6.1 MÉTODO DE MORROW E KOTULSKY

O método de Morrow e Kotulsky (99) foi utilizado com as seguintes alterações nos volumes de ensaio: inibidores 0,2 ml; substrato 2,0 ml; amostra 0,5 ml e cromógeno 0,2 ml, mantendo-se as concentrações finais dos reagentes idênticas às descritas originalmente.

2.6.2 ESPECTRO DE ABSORÇÃO DO CROMÓGENO

O pool, alfa-naftol $3,47 \times 10^{-5} M$ e o tubo controle foram ensaiados nas condições propostas em 2.6.1. Leituras da absorbância entre 400 e 700 nm foram feitas contra água, após 15 minutos de repouso.

2.6.3 CURVA DE CALIBRAÇÃO DE ALFA-NAFTOL E FAST RED TR

Concentrações de alfa-naftol de $0,7 \times 10^{-5}$ a $2,1 \times 10^{-4} M$ foram ensaiadas nas condições propostas no item 2.6.1 sendo que a cada concentração foi adicionado Fast Red TR dissolvido em duponal $4,16 \times 10^{-2} M$ em concentrações variando de $5,6 \times 10^{-5}$ a $4,4 \times 10^{-4} M$. As absorbâncias em 540 nm, considerando-se cada concentração do corante, foram medidas contra água e, posteriormente, descontadas de um controle isento de alfa-naftol.

2.6.4 ESTABILIDADE DA COLORAÇÃO E DO CROMÓGENO

O pool foi ensaiado conforme item 2.6.1. Imediatamente após a adição do cromógeno (Tempo 0) todos os tubos da reação foram lidos, sendo as leituras repetidas em vários tempos até 18 horas. Em um segundo experimento, a tubos con-

tendo alfa-naftol $3,47 \times 10^{-5} M$ em tampão fosfato $0,081 M$ pH 7,1, foi adicionado Fast Red TR, preparado conforme item 2.6.1 em tempos de 0 a 18 horas após o preparo do cromógeno, sendo o tempo 0 definido como aquele imediatamente após a dissolução do corante.

2.6.5 EFEITO DO TEMPO E DA CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA.

Diluições do pool, representando volumes de 2, 5 e 10 μl de soro na reação, foram ensaiadas conforme item 2.6.1, variando-se o tempo de reação entre 3 e 90 minutos. A hidrólise espontânea do substrato foi descontada para todas as leituras, em cada tempo ensaiado.

2.6.6 CURVA DE CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO

Concentrações de alfa-naftilacetato de $4,66 \times 10^{-5}$ a $1,17 \times 10^{-3} M$ foram ensaiadas nas condições descritas no item 2.6.1. A variante atípica e o pool foram as fontes de enzima, com atividades expressas em $\mu moles$ de alfa-naftol liberado. $min^{-1}.ml^{-1}$ de soro. A V_{max} e o K_M foram determinados através das retas de regressão obtidas do gráfico duplo-recíproco (115) e confirmadas por programa computacional.

2.6.7 CURVA DE CONCENTRAÇÃO DE INIBIDORES

Concentrações de DL-propranolol ($10^{-6} M$ a $1,25 \times 10^{-4} M$), dibucaina (10^{-6} a $2,7 \times 10^{-3} M$), RO2-0683 ($3,70 \times 10^{-8}$ a $2,22 \times 10^{-6} M$) e RO2-0683 pré-incubado com soro por 2 horas à temperatura ambiente ($7,4 \times 10^{-9}$ a $1,85 \times 10^{-7} M$) foram ensaiadas conforme item 2.6.1. As determinações foram realizadas com 3

soros diferentes para cada um dos fenótipos U, UF, e UA e com um soro de fenótipo A examinado em duplicata.

2.6.8 EFEITO DO TEMPO SOBRE OS PERFIS DE INIBIÇÃO

Percentagens de inibição com R02-0683 e DL-propranolol de três soros diferentes para cada fenótipo U, UF, UA e de um soro referente a fenótipo A, foram determinadas conforme item 2.6.1, com tempo de incubação variando de 5 a 60 minutos.

2.6.9 EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE OS PERFIS DE INIBIÇÃO

Percentagens de inibição com R02-0683 e DL-propranolol de três soros diferentes para cada fenótipo U, UF, UA e de um soro referente a fenótipo A, foram determinadas conforme item 2.6.1, nas temperaturas de 21, 30 e 37°C.

2.6.10 MÉTODO DE MORROW E MOTULSKY MODIFICADO PARA FENOTIPAGEM

Em tubos marcados "atividade" e "controle" foram adicionados, respectivamente, 0,2 e 0,7 ml de tampão fosfato 0,2M, pH 7,1. Em tubo marcado "inibidor" foi adicionado 0,2 ml do inibidor dissolvido em tampão fosfato 0,2M, pH 7,1. Todos os tubos receberam 2,0 ml de alfa-naftilacetato $3 \times 10^{-4}M$, preparado conforme Morrow e Motulsky (99) e incubados a 37°C por 5 minutos. Aos tubos "atividade" e "inibidor" adicionou-se 0,5 ml de soro ou plasma diluídos (1/100) em tampão fosfato 0,2M pH 7,1, seguindo-se incubação a 37°C por 25 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 0,2 ml de Fast Red TR $15,5 \times 10^{-3}M$ dissolvido em duponal $4,16 \times 10^{-2}M$.

A absorvância foi determinada entre 10 e 60 minutos após a adição do cromógeno, sendo as leituras descontadas do tubo controle. Na reação, as concentrações dos inibidores foram R02-0683 $3,7 \times 10^{-7}M$, DL-propranolol $10^{-5}M$ e dibucaina $10^{-4}M$.

2.6.11 DISTRIBUIÇÃO DAS PERCENTAGENS DE INIBIÇÃO

A distribuição das percentagens de inibição de uma amostra contendo 41 indivíduos CHE1 U, 8 CHE1 UF, 25 CHE1 UA, e 1 CHE1 A, ensaiada conforme 2.6.10, foi observada, plotando-se as inibições obtidas com DL-propranolol versus R02-0683 e DL-propranolol versus dibucaina.

2.6.12 VERIFICAÇÃO DA INIBIÇÃO COM R02-0683 E DL-PROPRANOLOL EM MISTURAS DE SOROS U e A

Soros provenientes de homozigotos para as variantes atípica e usual, foram misturados de forma que a variante atípica representasse, respectivamente, 20%, 40%, 60% e 80% do volume total. As diluições das variantes, assim obtidas, bem como as amostras sem diluir foram ensaiadas conforme item 2.6.10. Os perfis de inibição com R02-0683 e DL-propranolol foram plotados contra a percentagem de amostra atípica existente na mistura.

2.7 PROCEDIMENTOS COM BENZOILCOLINA

2.7.1 MEDIDA DA ATIVIDADE E PERFS DE INIBIÇÃO COM BENZOILCOLINA

As determinações da atividade e inibições com dibucaina e fluoreto de sódio foram realizadas segundo Whittaker (141), as inibições com DL-propranolol segundo Whittaker e Britten (146) e com RO2-0683 segundo Whittaker e Britten (144). O espectrofotômetro foi previamente calibrado através de calibração isobástica com dicromato de potássio (57). Todas as determinações foram realizadas a 25°C.

2.7.2 DISTRIBUIÇÃO DAS INIBIÇÕES

As distribuições das percentagens de inibição foram plotadas considerando-se os valores de RON e PN; DN e PN e DN e FN, calculados conforme o item 2.7.1 .

2.8 PROCEDIMENTO COM PROPIONILTIOCOLINA

2.8.1 MÉTODO DE DIETZ ET AL.

O método foi utilizado como descrito por Dietz et al. (29) com redução proporcional de 50% em todos os volumes utilizados.

2.8.2 MÉTODO DE EVANS E URDE modificado

As determinações, com base no método de Evans e Uros (38), foram realizadas com as seguintes modificações: a 2,2 ml de tampão-DTNB foram adicionados 0,05 ml de solução aquosa de iodeto de propioniltiocolina 0,1 N, seguindo-se incubação por 5 minutos a 25°C. A reação foi iniciada com a adição de

0,25 ml de soro diluído em água(1/100) e o incremento na absorbância em 410 nm observado por, no mínimo, 3 minutos. A atividade foi calculada com o $\Delta A/\text{min}$ médio. Os inibidores quando utilizados foram adicionados em volume de 0,2 ml sendo o volume final corrigido pela adição de 2,0 ml de tampão-DTNB.

2.8.3 ESTABILIDADE DA PROPIONILTIOCOLINA

A hidrólise espontânea de soluções aquosas de iodeto de propioniltiocolina foi observada, adicionando-se 0,05 ml do substrato a 2,45 ml de tampão-DTNB, seguindo-se leitura em 410 nm contra um branco de tampão-DTNB. Foram ensaiadas soluções 0,02M, 0,1M e 0,1M com pH 4,0 ajustado com HCl 0,01M, mantidas a 4°C, e uma solução 0,1M mantida a -20°C, sofrendo descongelamento a cada determinação.

2.8.4 CURVA DE CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA

Diluições do pool proporcionando concentrações de 0,5 a 25 μl de soro na reação foram ensaiadas conforme item 2.8.2.

2.8.5 SENSIBILIDADE DE DETECÇÃO

Diluições do pool com soro inativado (2 horas a 60°C), produzindo concentrações de 1 a 100% da atividade original foram ensaiadas conforme item 2.8.2 .

2.8.6 EFEITO DO TEMPO SOBRE A HIDRÓLISE DO SUBSTRATO

O incremento da absorbância em 410 nm foi observado para o pool ensaiado conforme ítem 2.8.2, nas temperaturas de 25, 30 e 37°C.

2.8.7 CURVA DE CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO

Concentrações de propioniltiocolina de 10^{-4} a 10^{-2} M foram ensaiadas nas condições descritas no ítem 2.8.2. A variante atípica e o pool foram utilizados como fontes de enzima, sendo a velocidade expressa em $\mu\text{moles de grupos SH liberados} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$ de soro. O K_M e a V_{max} foram calculados para concentrações de substrato de 10^{-3} a 10^{-2} M através das retas de regressão obtidas do gráfico duplo-recíproco (115) e confirmadas por programa computacional.

2.8.8 VARIAÇÕES NAS CONCENTRAÇÕES DE DTNB E FOSFATO

O pool foi ensaiado conforme ítem 2.8.2 variando-se as concentrações de DTNB presentes no tampão de 0,5 a 20×10^{-4} M. O pool e a variante atípica foram ensaiados conforme ítem 2.8.2 em concentrações de fosfato variando de 1 a 20×10^{-2} M, obtidas através de misturas adequadas de Na_2HPO_4 e KH_2PO_4 , ajustadas para pH 7,6.

2.8.11 CURVA DE CONCENTRAÇÃO COM INBIDORES

Concentrações de RO2-0683 de $8,0 \times 10^{-7}$ a $1,6 \times 10^{-5}$ M; dibucaína de $2,16 \times 10^{-6}$ a $1,08 \times 10^{-4}$; DL-propranolol de $2,7 \times 10^{-6}$ a $2,7 \times 10^{-4}$ M e uréia de 0,8 a 4,0 M foram ensaiadas conforme o ítem 2.8.2. Como fonte de enzima foram utilizados o pool, a variante A e uma mistura de três soros de indivíduos de fenótipo UA.

2.9 EFEITO DE CICLOS DE CONGELAMENTO/DESCONGELAMENTO SOBRE A ChE

Alíquotas de pool foram submetidas a processos cíclicos de congelamento/descongelamento durante um período de 30 dias. Em cada ciclo as amostras foram mantidas à temperatura ambiente por 10 a 30 minutos antes do ensaio. As determinações da atividade e fenotipagem foram realizadas conforme item 2.8.2 e 2.6.10, respectivamente.

2.10 ESTABILIDADE E ESTOCAGEM DA ChE

Amostras do pool foram mantidas a -20, 4, 22 e 37°C e a atividade determinada conforme o item 2.8.2 durante 10 dias. Nas mesmas condições foram ensaiadas amostras do pool contendo 25 e 50% v/v de glicerol e mantidas a 37°C. A atividade da amostra no início do experimento foi considerada 100%.

2.11 EFEITO DE EDTA SOBRE A ChE

Concentrações de etilenodiaminatetraacetato, sal dissódico, variando de 0,5 a 10 mg foram adicionadas a 1 ml de sangue total de indivíduo ChE1 U, com a qual ficaram em contato por 4 horas. Os plasmas assim obtidos, bem como controles isentos de EDTA, foram ensaiados conforme itens 2.8.2 e 2.6.10 quanto à atividade e fenotipagem, respectivamente. Para atividade os controles isentos de EDTA foram considerados com atividade de 100%.

2.12 EFEITO DA HEPARINA SOBRE A CHE

Concentrações de heparina sódica (Liquemine, Roche) variando de 10 a 800 UI (1 UI = 0,001 mg) foram adicionadas a 1 ml de sangue total de um indivíduo CHE1 U, ficando em contato por 4 horas. O plasma obtido, bem como controles isentos de heparina foram ensaiados para atividade e fenotipagem conforme itens 2.8.2 e 2.6.10, respectivamente. Com relação à atividade, os controles isentos de heparina foram considerados 100%.

2.13 EFEITO DA BILIRRUBINA SOBRE A CHE

Foram solubilizadas 11 mg de bilirrubina (Inlab cd2530) em 1,0 ml de Na_2CO_3 0,1 M, acrescentando 8 ml de soro inativado (2 horas a 60°C) e 1,0 ml de HCl 0,1M. Este padrão contendo 110 mg/dl (1,88 $\mu\text{mol/l}$) foi diluído com pool de modo a produzir concentrações de 1,09 a 35,7 mg de bilirrubina/dl de soro. As amostras, bem como controles preparados nas mesmas condições mas isentos de bilirrubina, foram ensaiados para atividade e fenotipagem conforme os itens 2.8.2 e 2.6.10, respectivamente. Para atividade os controles isentos de bilirrubina foram considerados 100%.

2.14 EFEITO DA LIPEMIA SOBRE A CHE

Uma mistura de soros lipêmicos armazenada a -20°C foi inativada por 2 horas a 60°C . Esta amostra homogeneizada apresentou 1.742,0 mg/dl de triglicérides (75) e 385,0 mg/dl de colesterol (75). A amostra lipêmica foi misturada com o pool (90,0 mg/dl de triglicérides) de modo a produzir

concentrações de triglicérides de 90 a 1.577 mg/dl de soro. Estas amostras, bem como controles obtidos pela diluição do pool com soro não lipêmico inativado (2 horas a 60°C), foram ensaiados para atividade e fenotipagem conforme os itens 2.8.2 e 2.6.10, respectivamente. Para atividade os controles isentos de amostra lipêmica foram considerados 100%.

2.15 EFEITO DA HEMÓLISE SOBRE A CHE

A um volume de papa de hemácias obtidas de um sangue heparinado de indivíduo CHE1 U, após 5 lavagens em solução salina, foi adicionado 1 volume de água (hemolizado) ou 1 volume de solução salina. As amostras assim obtidas apresentaram concentração de hemoglobina de 16,0 g/dl (método de cianometahemoglobina em analisador Toa Medical Eletronics) e volume globular de 49% (microhematócrito). Volumes do hemolizado foram adicionados ao pool, produzindo concentrações de 0,08 a 1,45 g de hemoglobina/dl de soro e simulando a hemólise de 0,24 a 4,44% do volume globular. As amostras assim diluídas, bem como controles obtidos pela diluição do pool em solução salina foram centrifugados por 30 minutos a 800 x g e a atividade e a fenotipagem do sobrenadante foram determinadas conforme os itens 2.8.2 e 2.6.10, respectivamente. Para atividade os controles isentos de hemoglobina foram considerados 100%.

2.16 VALORES DE REFERENCIA

As amostras descritas no item 2.1.2 foram ensaiadas para atividade conforme o item 2.8.2 .

2.17 CONTROLE DE QUALIDADE

O pool foi utilizado como controle para níveis normais de enzima. Uma diluição 1/10 do pool com soro inativado (2 horas a 60°C) foi utilizada como controle para níveis baixos de atividade. O pool misturado a uma amostra de soro, concentrado por diálise contra goma arábica, foi utilizado como controle para níveis elevados de atividade. Todas as amostras foram mantidas em alíquotas a -20°C. Os limites de tolerabilidade foram fixados em dois desvios padrões acima e abaixo da média, obtida de 20 determinações de cada soro controle, em dias diferentes.

3 RESULTADOS

3.1 PROCEDIMENTOS COM ALFA-NAFTILACETATO

3.1.1 ESPECTRO DE ABSORÇÃO DO CROMÓGENO

O cromógeno na reação apresentou reação máxima em 540 nm (fig. 02). A curva espectral da reação foi semelhante à produzida isoladamente pelo alfa-naftol.

3.1.2 CURVA DE CALIBRAÇÃO DE ALFA-NAFTOL E FAST RED TR

Em relação ao cromógeno, a amostra mostrou reação linearidade até $2,8 \times 10^{-5} M$ de alfa-naftol (tab.IV). A linearidade não foi alterada pelo acréscimo de corante de $5,5 \times 10^{-4} M$ a $4,4 \times 10^{-3} M$. Concentrações de alfa-naftol superiores a $7 \times 10^{-5} M$ necessitaram concentrações de Fast Red TR iguais ou superiores a $11 \times 10^{-4} M$ para manutenção da coloração púrpura usual.

3.1.3 ESTABILIDADE DA COLORAÇÃO E DO CROMÓGENO

A figura 03 mostra que a atividade é máxima após 10 minutos da adição do cromógeno, decaindo de forma lenta após 1 hora. O cromógeno Fast Red TR perde 5% do poder cromogênico após 2 horas de preparo, 20% e 55% após 8 e 18 horas respectivamente.

3.1.4 EFEITO DO TEMPO E DA CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA

A cinética de tempo com alfa-naftilacetato é mostrada na figura 4. Observou-se ausência de linearidade da reação em relação ao tempo quando usam-se 10 ul de soro na reação. Curvas lineares são obtidas por 25 e 40 minutos para 5 e 2 ul, respectivamente. A hidrólise espontânea do substrato é linear com o tempo e negligível até 30 minutos de incubação.

3.1.5 CURVA DE CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO

As retas de regressão do gráfico duplo-recíproco (fig. 05) foram $y = 0,228x + 0,2778$ e $y = 0,1965x + 0,4344$ para os fenótipos U e A, respectivamente. A análise gráfica e computacional dos dados permitiram calcular os valores de K_M e V_{max} que se encontram na tabela V.

3.1.6 CURVAS DE CONCENTRAÇÃO COM INIBIDORES

As concentrações de DL-propranolol (fig. 06) e R02-0683 (fig. 07) que melhor se adequaram à separação dos fenótipos testados foram $10^{-5}M$ e $3,7 \times 10^{-7}M$, respectivamente. Quando R02-0683 foi pré incubado (fig. 08) com soro, antes da reação, não se obteve separação dos fenótipos U e UF. Dibucaina (fig. 09) a $10^{-5}M$ discriminou de forma mais eficiente os fenótipos, no entanto quando esta foi associada às inibições obtidas com DL-propranolol para otimizar a separação, concentrações de dibucaina de $10^{-4}M$ se mostraram mais indicadas.

3.1.7 EFEITO DO TEMPO SOBRE OS PERFIS DE INIBIÇÃO.

A discriminação dos fenótipos com R02-0683 (fig. 10) foi máxima entre 25 e 40 minutos de reação, após o que diminuiu a resolução entre os fenótipos U e UF. A inibição com DL-

propranolol (fig. 11) foi pouco influenciada pelo tempo de incubação após 10 minutos, sendo constante entre 25 e 60 minutos.

3.1.8 EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE OS PERFIS DE INIBIÇÃO

A inibição com R02-0683 (fig. 12) mostrou-se crescente com a elevação da temperatura de modo semelhante para todos os fenótipos U, UF e UA, sendo que as alterações nos perfis de inibição foram muito pequenas entre 30 e 37°C para todos os fenótipos estudados. Com DL-propranolol (fig. 13) as inibições obtidas com os fenótipos estudados decresceram com a elevação da temperatura, sendo o fenótipo UF melhor discriminado a 21°C.

3.1.9 DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS

A análise conjunta dos perfis de inibição com R02-0683 e DL-propranolol (fig. 14) mostraram nítida separação entre os fenótipos estudados, sendo esta superior à obtida com dibucaina e DL-propranolol (fig. 15). A média e as amplitudes de variação dos perfis de inibição com R02-0683 e DL-propranolol, para os fenótipos estudados, encontram-se na tabela VI.

3.1.10 INIBIÇÃO COM R02-0683 e DL-PROPRANOLOL EM MISTURAS DE SOROS HOMOZIGOTOS PARA AS VARIANTES U E A

As diluições, obtidas entre as variantes U e A em homozigose (fig. 16), forneceram perfis de inibição que refletem a somatória das inibições isoladas de cada variante, de acordo com sua proporção na mistura.

3.2 PROCEDIMENTO COM BENZOILCOLINA

3.2.3 DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS COM BENZOILCOLINA

A análise dos perfis de inibição com RO2-0693 e DL-propranolol (fig. 17) e dibucaina e DL-propranolol (fig. 18) não indica clara separação das variantes ensaiadas. Ocorre pequena resolução do fenótipo UF enquanto que o fenótipo UA mostra elevada dispersão. As inibições com dibucaina e fluoreto de sódio (fig. 19) não permitiram identificar a variante UF, nas condições de ensaio.

3.3 PROCEDIMENTOS COM PROPIONILTIOCOLINA

3.3.1 ESTABILIDADE DA PROPIONILTIOCOLINA EM SOLUÇÃO

A hidrólise de 0,5% da propioniltiocolina presente na reação, produzindo uma absorvância de 0,136, foi fixada arbitrariamente como limite máximo para a hidrólise espontânea do substrato. Este valor representa uma perda desprezível de substrato e a absorvância produzida permite utilizar a faixa ótima de leitura da maioria dos equipamentos, sem ajustes que prejudiquem a linearidade de resposta do espectrofotômetro. Os substratos preparados em solução 0,1M, independentemente do ajuste do pH, mostraram-se adequados para uso por 30 dias e soluções de 0,02M por 5 dias, quando ambos foram mantidos a 4°C (fig. 20). O congelamento a -20°C manteve por 100 dias a propioniltiocolina 0,1M dentro do limite estabelecido, mesmo quando submetida a vários ciclos de descongelamento.

3.3.2 CURVA DE CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA

A atividade foi linear até a presença de 6,5 ul de soro na reação, correspondendo a uma atividade de cerca de 14 KU/l (fig. 21). A presença de grupos tióis livres no soro não interferem desde que sejam utilizados volumes inferiores a 5 ul de amostra no ensaio. Acima deste

volume, determinações acuradas necessitam de um branco de soro.

3.3.3 SENSIBILIDADE DE DETECÇÃO

Com relação a amostras de pequena atividade, o método se mostrou sensível em detectar atividades de até 0,51 KU/l, que correspondem a um $\Delta A/\text{min}$ de 0,007 (fig. 22). Atividades menores não foram detectáveis ou reprodutíveis.

3.3.4 CINÉTICA DE TEMPO

A reação foi linear com o tempo por 6, 8 e 9 minutos conforme ensaiada a 37, 30 ou 25°C, respectivamente (fig. 23). A hidrólise do substrato foi desprezível a 25°C.

3.3.5 CURVA DE CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO

A figura 24 demonstra que a reação não atingiu a velocidade máxima mesmo em concentrações de substrato 10 e 6 vezes os valores de K_M para as variantes U e A, respectivamente. As retas de regressão do gráfico duplo-recíproco foram: $y = 0,01312x + 0,1354$ e $y = 0,06329x + 0,3733$ para os fenótipos U e A, respectivamente. Os valores de K_M e V_{max} para os fenótipos, obtidos por análise gráfica e computacional, encontram-se na tabela V.

3.3.6 VARIAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DE DTNB e FOSFATO

Concentrações de DTNB no meio de reação 6 vezes menores ou 3 vezes superiores às preconizadas para uso (0,423mM), não mostraram alterações significativas na atividade de soro CHE1 U (fig. 25). Concentrações de tampão fosfato na reação 3 vezes menores ou 7 vezes superiores às utilizadas (0,025M) não alteraram significativamente a atividade das variantes A e U.

3.3.7 CURVA DE CONCENTRAÇÃO DE INIBIDORES

Os perfis de inibição com RO2-0683 (fig. 26), dibucafina (fig. 27), DL-propranolol (fig. 28) e uréia (fig. 29) mostraram boa capacidade discriminativa para o fenótipo A e pequena resolução entre os fenótipos UA e U.

3.4 EFEITOS DE CICLOS DE CONGELAMENTO/DESCONGELAMENTO SOBRE A CHE

A enzima perdeu 12% da atividade inicial após 40 ciclos de congelamento/descongelamento, mantendo inalterada a resposta aos inibidores (fig. 30). Após 20 ciclos, observou-se o crescimento microbiano intenso nas amostras e maior flutuação nas medidas da atividade.

3.5 EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A ESTOCAGEM DA CHE

A enzima apresentou perda na atividade superior a 10% após 1 dia a 37°C, 3 dias a 22°C e 7 dias a 4°C (fig. 31). Não foram detectadas alterações nas amostras estocadas a -20°C. As amostras glicerolizadas e mantidas a 37°C perderam 10% da atividade inicial após 3 e 4 dias conforme 25 ou 50%, respectivamente, de glicerol tenham sido adicionados.

3.6 EFEITO DO EDTA SOBRE A ATIVIDADE E PERFIS DE INIBIÇÃO DA ChE

Concentrações de EDTA no sangue (fig. 32) até 5 vezes superiores às recomendadas de 2 mg/ml de sangue (24) não mostraram diferenças na atividade e fenotipagem superiores a 5% do valor dos controles.

3.7 EFEITO DA HEPARINA SOBRE A ATIVIDADE E PERFIS DE INIBIÇÃO DA ChE

Concentrações de heparina no sangue (fig. 33) até 40 vezes superiores às necessárias para anticoagulação (20 UI/ml de sangue) (24) não mostraram diferenças na atividade e fenotipagem superiores a 4% do valor dos controles, nas condições de ensaio.

3.8 EFEITO DA BILIRRUBINA SOBRE A ATIVIDADE E PERFIS DE INIBIÇÃO DA ChE

Concentrações de bilirrubina (fig. 34) de até 36,7 mg/dl de soro não mostraram diferenças na atividade e fenotipagem superiores a 3% do valor dos controles, nas condições de ensaio.

3.9 EFEITO DA LIPEMIA SOBRE A ATIVIDADE E PERFIS DE INIBIÇÃO DA ChE

Concentrações de triglicerídeos (fig. 35) de até 1.577,0 mg/dl de soro não mostraram diferenças na atividade e fenotipagem superiores a 3% do valor dos controles, nas condições de ensaio.

3.10 EFEITO DA HEMÓLISE SOBRE A ATIVIDADE E PERFIS DE INIBIÇÃO DA ChE

A presença de 0,32 g/dl de hemoglobina no soro (fig. 36), simulando nas condições de ensaio 1% de lise do volume globular, mostrou para as medidas de atividade e fenotipagem uma variação máxima de 3% em relação aos controles isentos de hemoglobina. Lises de 2,4 e 4,4 % (0,80 e 1,45 g de Hb/dl) mostraram variações superiores a 5 e 12%, respectivamente quando comparadas aos controles.

3.11 VALORES DE REFERENCIA PARA A ATIVIDADE DA ChE

O valor de atividade média para a população estudada foi calculado em 5,22 KU/l (com desvio padrão de 1,22). Estes dados foram obtidos pela média aritmética dos valores obtidos na tabela VII. As médias dos indivíduos C5- foram previamente multiplicadas por 0,90 e a dos indivíduos C5+ por 0,10 para manter as condições da população em estudo, onde apenas 10% são indivíduos C5+ (18).

3.12 CONTROLE DE QUALIDADE

As figuras 37 e 38 mostram os gráficos de controle de qualidade, nos quais as amostras se distribuem de forma regular dentro dos limites de dois desvios padrões estipulados, acima e abaixo da média, configurando a reprodutibilidade dos ensaios.

TABELA IV. CURVA DE CALIBRAÇÃO DE ALFA-NAFTOL E FAST RED TR

alfa-naftol conc. Molar $\times 10^{-5}$	Fast Red Tr conc. Molar $\times 10^{-4}$			
	5,5	11,0	22,0	44,0
0,7	0,109	0,107	0,110	0,105
1,4	0,202	0,200	0,201	0,203
2,8	0,400	0,405	0,399	0,410
3,5	0,473	0,477	0,475	0,470
7,0	0,869	0,870	0,885	0,883
14,0	w	1,655	1,645	1,600
21,0	w	w	-	2,290*

As determinações foram realizadas conforme item 2.6.3 de Materiais e Métodos; Os símbolos (w) e (-) indicam respectivamente, alteração na coloração do cromógeno de púrpura para alaranjado e leitura acima da capacidade do espectrofotômetro. A determinação 2,290* foi obtida pela diluição do cromógeno em duponal $4,16 \times 10^{-2}M$ e multiplicação do valor encontrado pela diluição.

Condições de ensaio: os tubos continham tampão fosfato 0,081M pH 7,1 sendo duponal $4,16 \times 10^{-2}M$ utilizado na dissolução do cromógeno.

TABELA V. PARAMETROS CINÉTICOS.

VARIANTE	$K_M \times 10^{-4} M$		$V_{MAX} \text{ uMol. min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$		REF.
	U	A	U	A	
ALFA-NAFTILACETATO					
	9,6	4,8	3,68	2,29	(*)
	7,6	5,8	4,49	3,45	9
	2,4	4,4	4,60	2,32	88
PROPIONILTIOCOLINA					
	9,6	17	7,38	2,68	(*)
	9,7	31	6,91	1,67	27

(*) dados obtidos no presente trabalho.

Os valores de K_M e V_{max} foram obtidos para os fenótipos A e U utilizando alfa-naftilacetato e propioniltiocolina conforme os itens 2.6.6 e 2.8.7, respectivamente, de Materiais e Métodos.

TABELA VI. MÉDIAS E AMPLITUDES DE VARIAÇÃO (A.V.) DAS PERCENTAGENS DE INIBIÇÃO (RON e PN) CONFORME CLASSIFICAÇÃO POR FENÓTIPO.

FENÓTIPOS	N	RON		PN	
		MÉDIA	A.V.	MÉDIA	A.V.
U	41	89	86-91	73	69-78
UF	8	81	78-85	59	55-63
UA	25	60	52-67	47	38-55
A	1	11		4	

As determinações foram realizadas conforme item 2.6.11 de Materiais e Métodos.

Condições de ensaio: alfa-naftilacetato $2,3 \times 10^{-4}$ M; 5 μ l de soro; incubação por 25 minutos a 37°C ; tampão fosfato 0,081 M pH 7,1. Fast Red TR $1,1 \times 10^{-3}$ M. RO2-0683 $3,7 \times 10^{-7}$ M e dl-proprenolol 10^{-5} M.

TABELA VII. VALORES MÉDIOS DE REFERÊNCIA DA ATIVIDADE CONFORME AVALIADA COM PROPIONILTIOCOLINA

	N	CHE2	MÉDIA	DP	MIN	MAX
HOMENS	197	C5-	5,31	1,05	2,43	9,30
	197	C5+	6,47	1,44	3,16	11,2
MULHERES	28	C5-	4,94	1,23	2,68	7,32
	28	C5+	5,58	1,19	3,75	8,68

Os valores de referência da atividade, o desvio padrão (DP) e os valores mínimo (MIN) e máximo (MAX) de uma população saudável, foram obtidos conforme item 2.16 de Materiais e Métodos.

TABELA VIII. AVALIAÇÃO DA REPRODUTIBILIDADE DE MEDIDAS DE ATIVIDADE E PERCENTAGENS DE INIBIÇÃO.

	MÉTODO	PARÂMETRO	MÉDIA	D.P.	C.V.%
99	HORROW e NOTULSKY	Atividade (KU/1)	0,92	0,134	14,3
		R02-0483 (RON)	86	2,11	2,5
		propranolol (PN)	74	2,5	3,4
(*)	HORROW e NOTULSKY mod.	Atividade (KU/1)	0,88	0,116	13,3
		R02-0483 (RON)	89	1,54	1,7
		propranolol (PN)	73	2,33	3,2
29	DIETZ e cols.	Atividade (KU/1)	8,62	0,67	7,8
38	EVANS e URDE	Atividade (KU/1)	4,58	0,20	4,3
(*)	EVANS e URDE	Atividade (KU/1)	5,21	0,22	4,4

(*) dados obtidos no presente trabalho, conforme itens 2.6.10 e 2.8.2 de Materiais e Métodos.

Os resultados representam a média, desvio padrão (D.P.) e coeficiente de variação (C.V.%) de vinte determinações de um pool de soros, realizadas em dias diferentes.

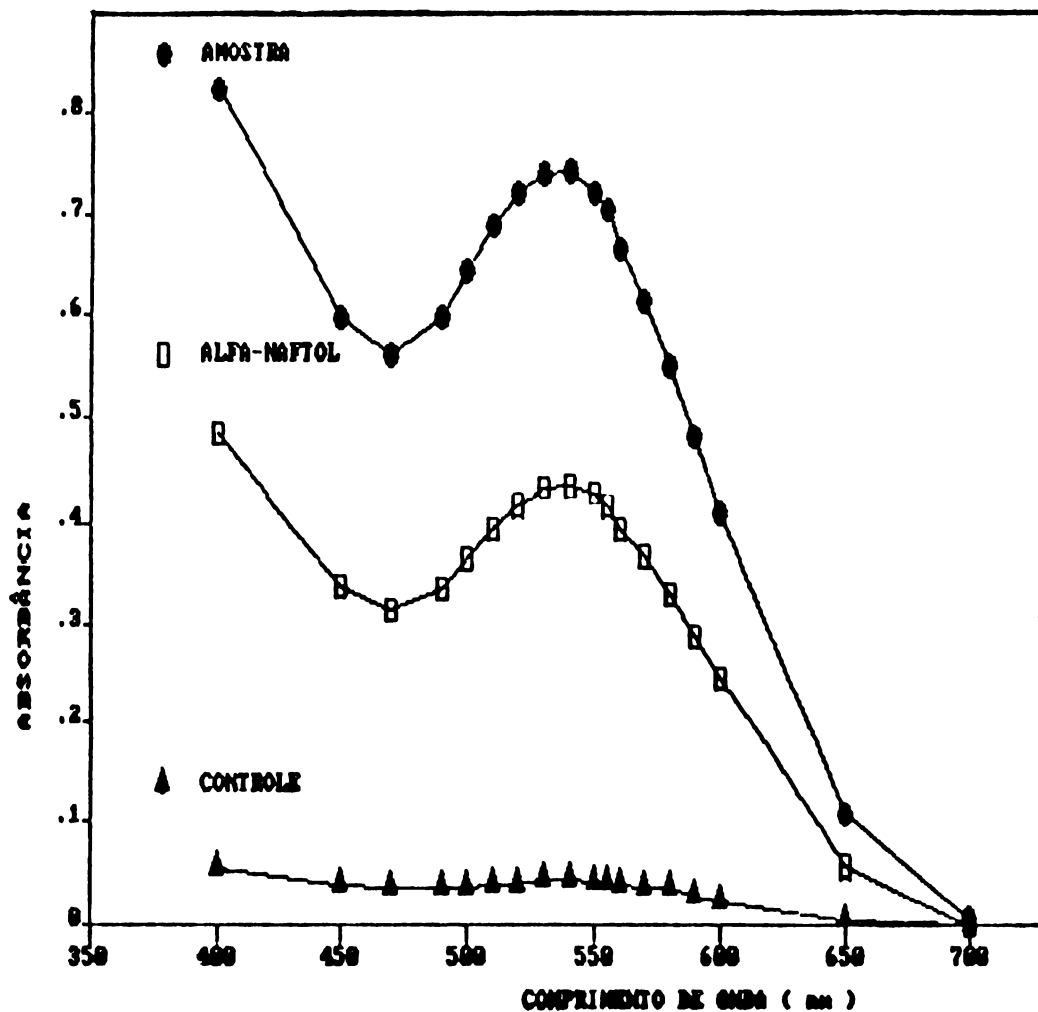


FIGURA 02 ESPECTRO DE ABSORÇÃO DO PRODUTO COLORIDO COM FAST RED TR.

O complexo colorido formado entre alfa-naftol e Fast Red TR foi lido contra água em vários comprimentos de onda. Foram analisados os cromógenos provenientes da reação enzimática (amostra), alfa-naftol $3,46 \times 10^{-5} M$ e do tubo controle da hidrólise espontânea do substrato (controle). Condições de ensaio conforme item 2.6.2 .

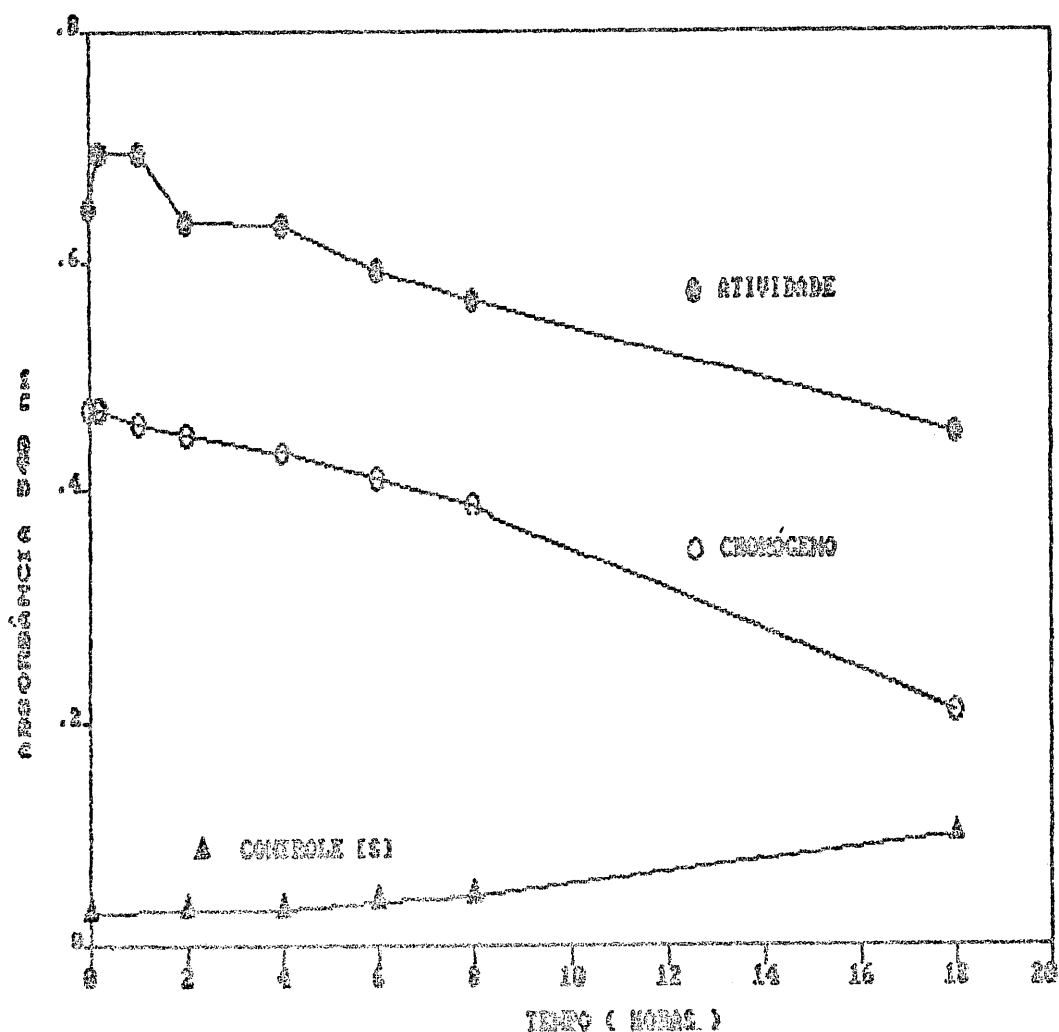


FIGURA 03 ESTABILIDADE DA COLORAÇÃO E DO CROMÓGENO

As absorbâncias dos tubos relativos à atividade e a hidrólise espontânea do substrato (controle), foram observadas imediatamente após a adição do cromógeno (tempo 0) e até 18 horas após. O cromógeno Fast Red TR foi adicionado a tubos contendo alfa-naftol $3,47 \times 10^{-5} M$ imediatamente após o preparo (tempo 0) e até 18 horas deste. Condições de ensaio descritas no item 2.6.4 de Materiais e Métodos.

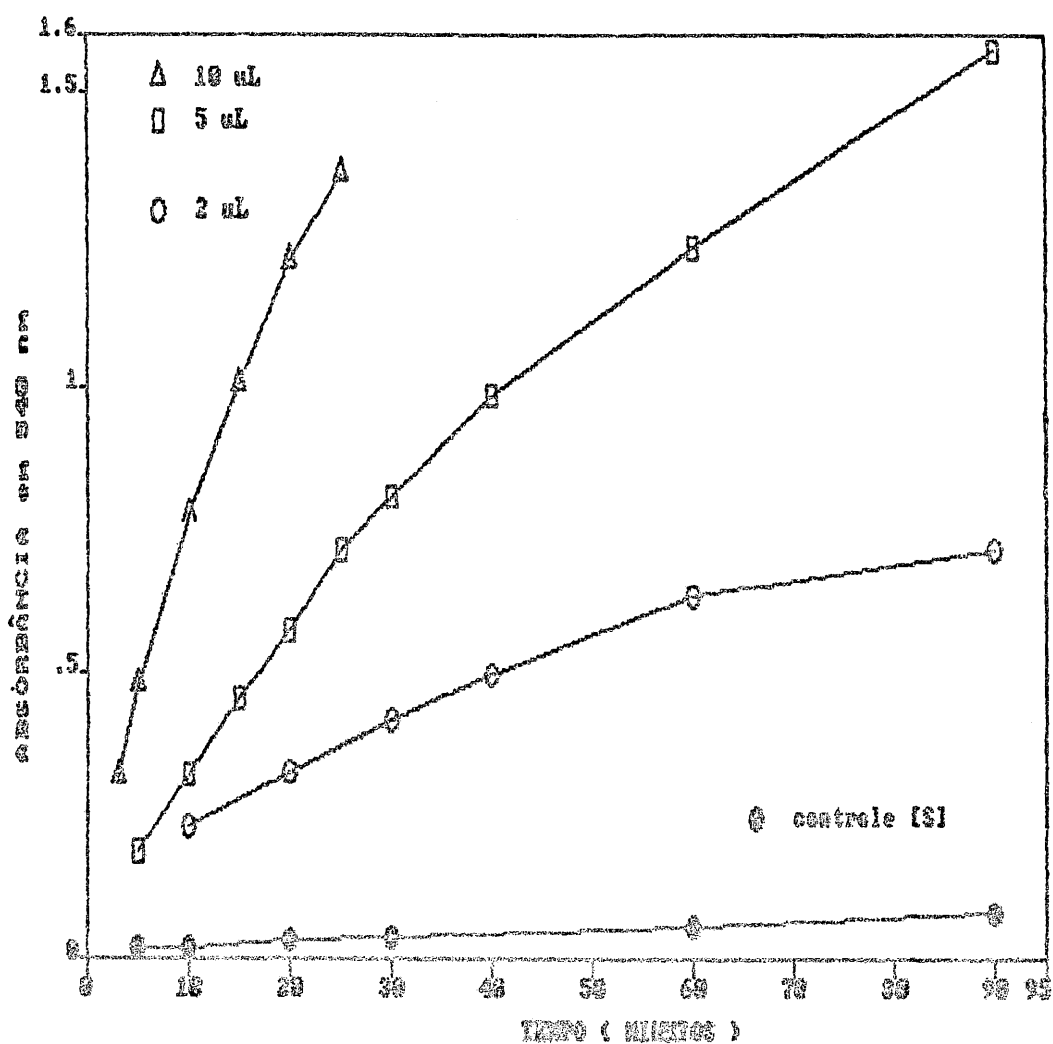


FIGURA 04 EFEITO DO TEMPO E DA CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA UTILIZANDO ALFA-NAFTILACETATO COMO SUBSTRATO

O efeito do tempo de incubação sobre a atividade da ChE foi observado na presença de 10, 5 e 2 uL de um pool de soros na reação e da hidrólise espontânea do substrato conforme item 2.6.5 de Materiais e Métodos.

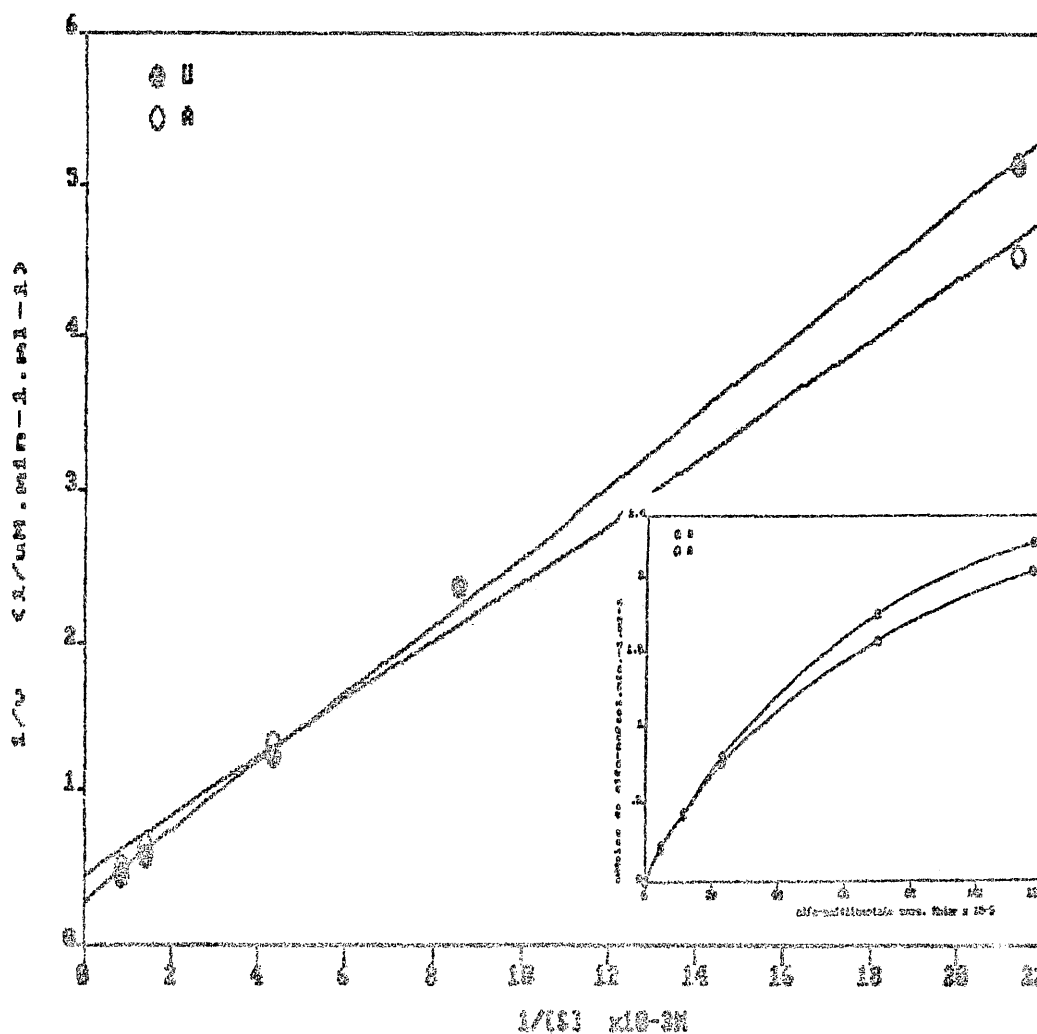


FIGURA 05. GRÁFICO DUPLO-RECÍPROCO COM ALFA-NAFTILACETATO.

Gráfico de Lineweaver-Burk mostrando o efeito de concentração do substrato sobre a hidrólise do alfa-naftilacetato pelos fenótipos U e A. As retas de regressão obtidas foram $y = 0,228x + 0,2778$ e $y = 0,1965x + 0,4344$ para os fenótipos U e A, respectivamente. O inset mostra o gráfico de Michaelis-Menten para as variantes conforme item 2.6.6 de Materiais e Métodos. Condições de ensaio: alfa-naftilacetato $2,3 \times 10^{-4} M$; soro 5 μl ; incubação por 25 minutos a $37^{\circ}C$; tampão fosfato $0,081 M$ pH 7,1 .

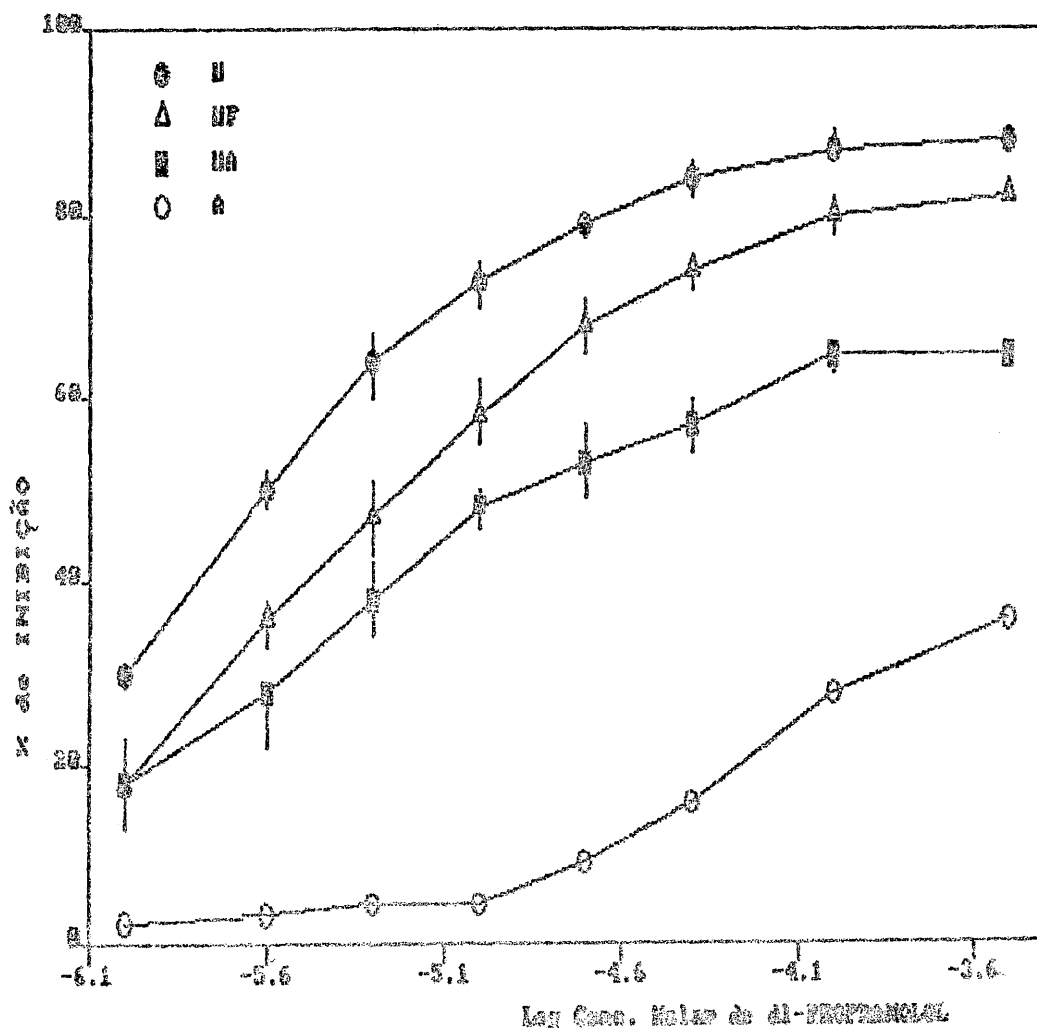


FIGURA 06. CURVA DE INIBIÇÃO COM DL-PROPRANOLOL UTILIZANDO ALFA-NAFTILACETATO COMO SUBSTRATO

Percentagem de inibição dos fenótipos U, UF, UA e A com DL-propranolol em concentrações variando de 10^{-6} a $1,25 \times 10^{-4} M$. Os pontos representam a média e as barras verticais a amplitude de variação, exceto para a variante A que está representada pela média de duas determinações da mesma amostra. Condições de ensaio: alfa-naftilacetato $2,3 \times 10^{-6} M$; amostra 5 μl ; incubação por 25 minutos a $37^{\circ}C$; Fast Red TR $1,1 \times 10^{-3} M$ e tampão fosfato $0,091 M$ pH 7,1

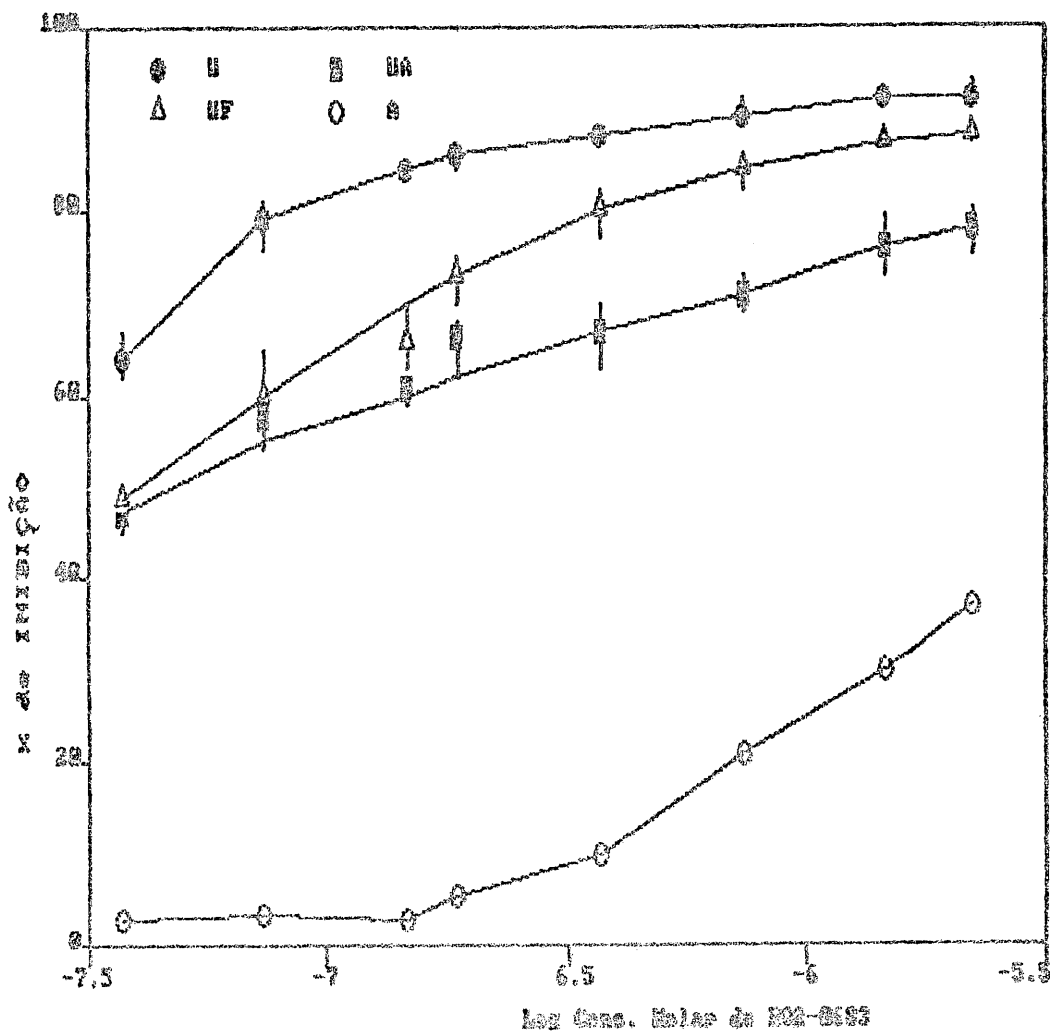


FIGURA 07. CURVA DE INIBIÇÃO COM RO2-0683 UTILIZANDO ALFA-NAFTILACETATO COMO SUBSTRATO

Percentagem de inibição dos fenótipos U, UF, UA e A com RO2-0683 em concentrações variando de $3,7 \times 10^{-8}$ a $2,22 \times 10^{-6}$ M. Os pontos representam a média e as barras verticais a amplitude de variação, exceto para a variante A que está representada pela média de duas determinações. Condições de ensaio: alfa-naftilacetato $2,3 \times 10^{-4}$ M; amostra 5 μ l; incubação por 25 minutos a 37°C ; Fast Red TR $1,1 \times 10^{-3}$ M e tampão fosfato 0,081 M pH 7,1

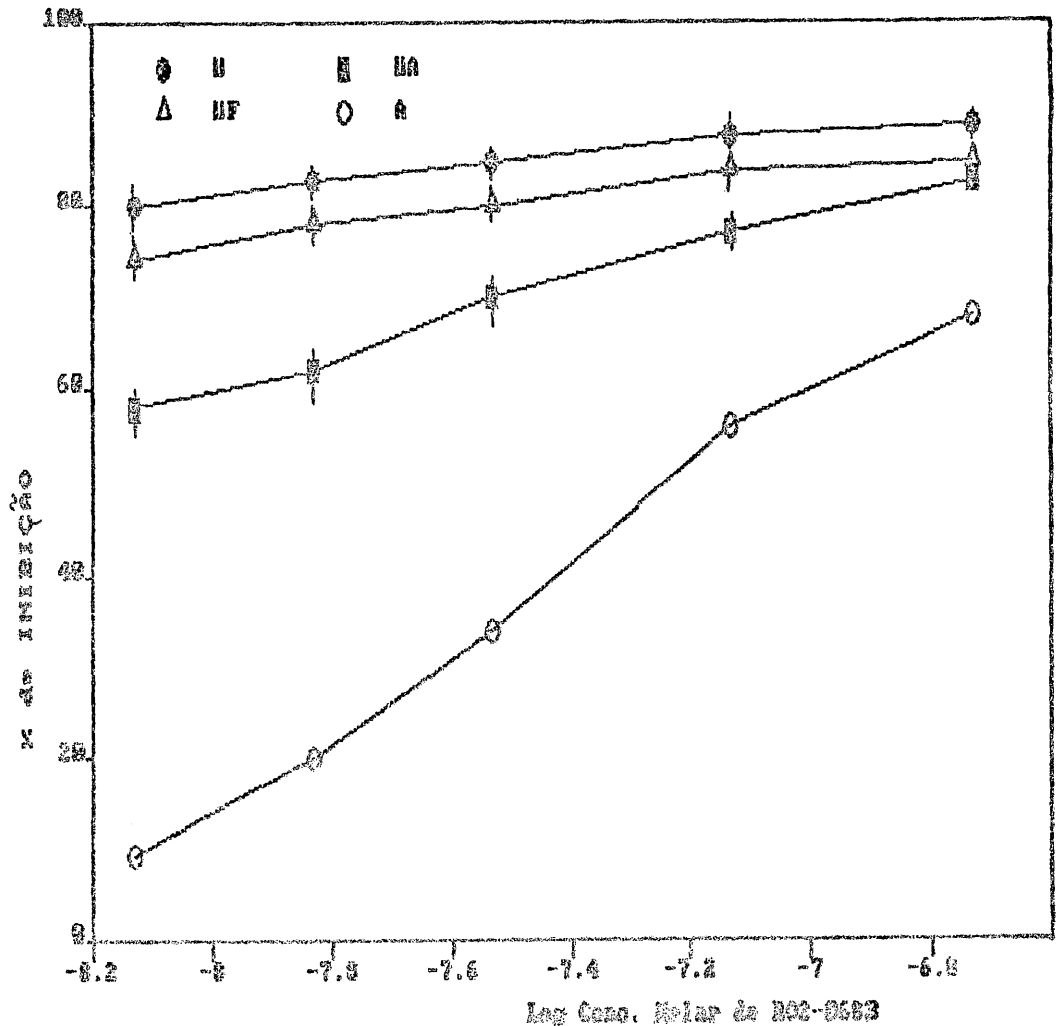


FIGURA 08. CURVA DE INIBIÇÃO COM RO2-0683 PRÉ-INCUBADO COM SORO POR 2 HORAS UTILIZANDO ALFA-NAFTILACETATO COMO SUBSTRATO

Percentagem de inibição dos fenótipos U, UF, UA e A com RO2-0683 pré-incubado com o soro, em concentrações variando de $7,4 \times 10^{-9}$ a $1,95 \times 10^{-7}$ M. Os pontos representam a média e as barras verticais a amplitude de variação, exceto para a variante A que está representada pela média de duas determinações da mesma amostra. Condições de ensaio: alfa-naftilacetato $2,3 \times 10^{-4}$ M; amostra 5 μ l; incubação por 25 minutos a 37°C ; Fast Red TR $1,1 \times 10^{-5}$ M e tampão fosfato 0,081 M pH 7,1.

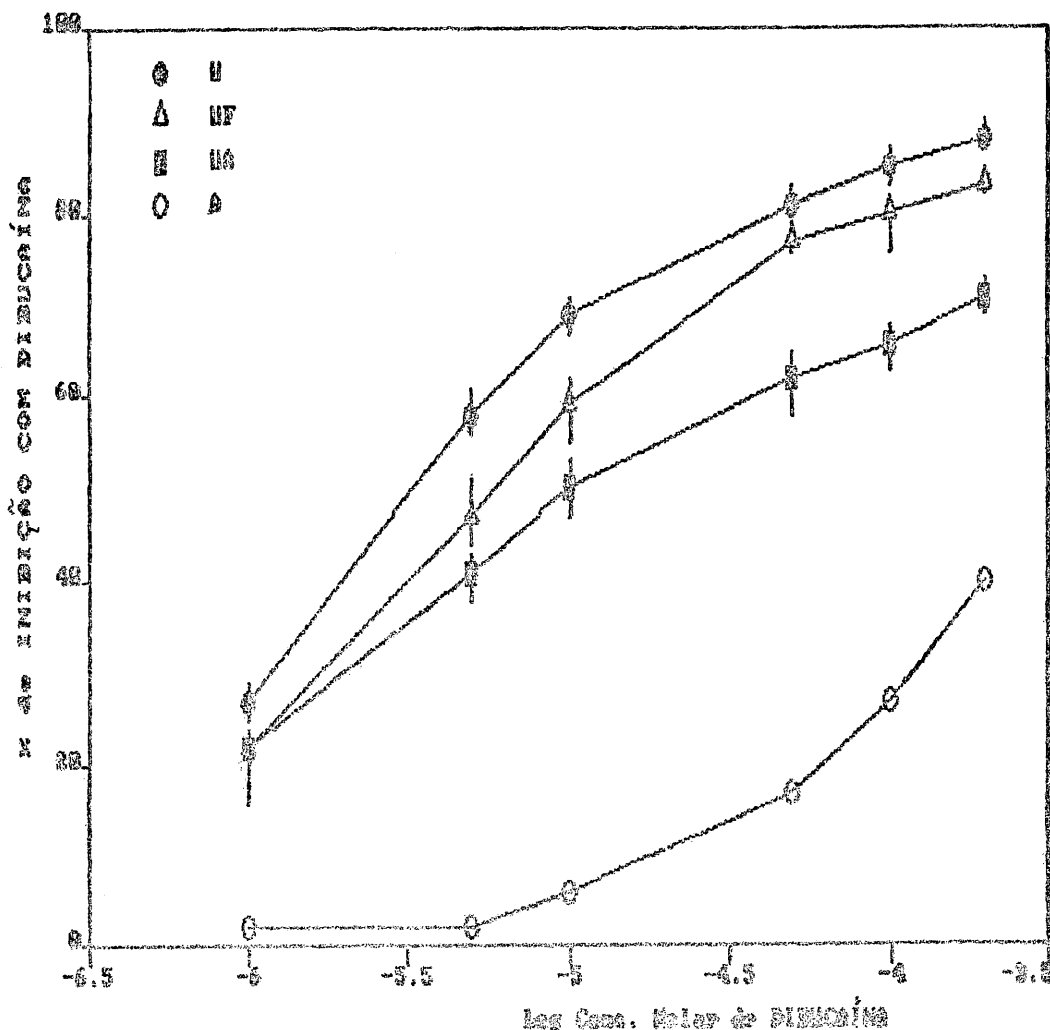


FIGURA 09. CURVA DE INIBIÇÃO COM DIBUCAINA UTILIZANDO ALFA-NAFTILACETATO COMO SUBSTRATO

Porcentagem de inibição dos fenótipos U, UF, UA e A com dibucaina em concentrações variando de 10^{-5} a $2,7 \times 10^{-3}$ M. Os pontos representam a média e as barras verticais a amplitude de variação, exceto para a variante A que está representada pela média de duas determinações da mesma amostra. Condições de ensaio: alfa-naftilacetato $2,3 \times 10^{-6}$ M; amostra 5 μ l; incubação por 25 minutos a 37°C ; Fast Red TR $1,1 \times 10^{-5}$ M e tampão fosfato 0,081 M pH 7,1

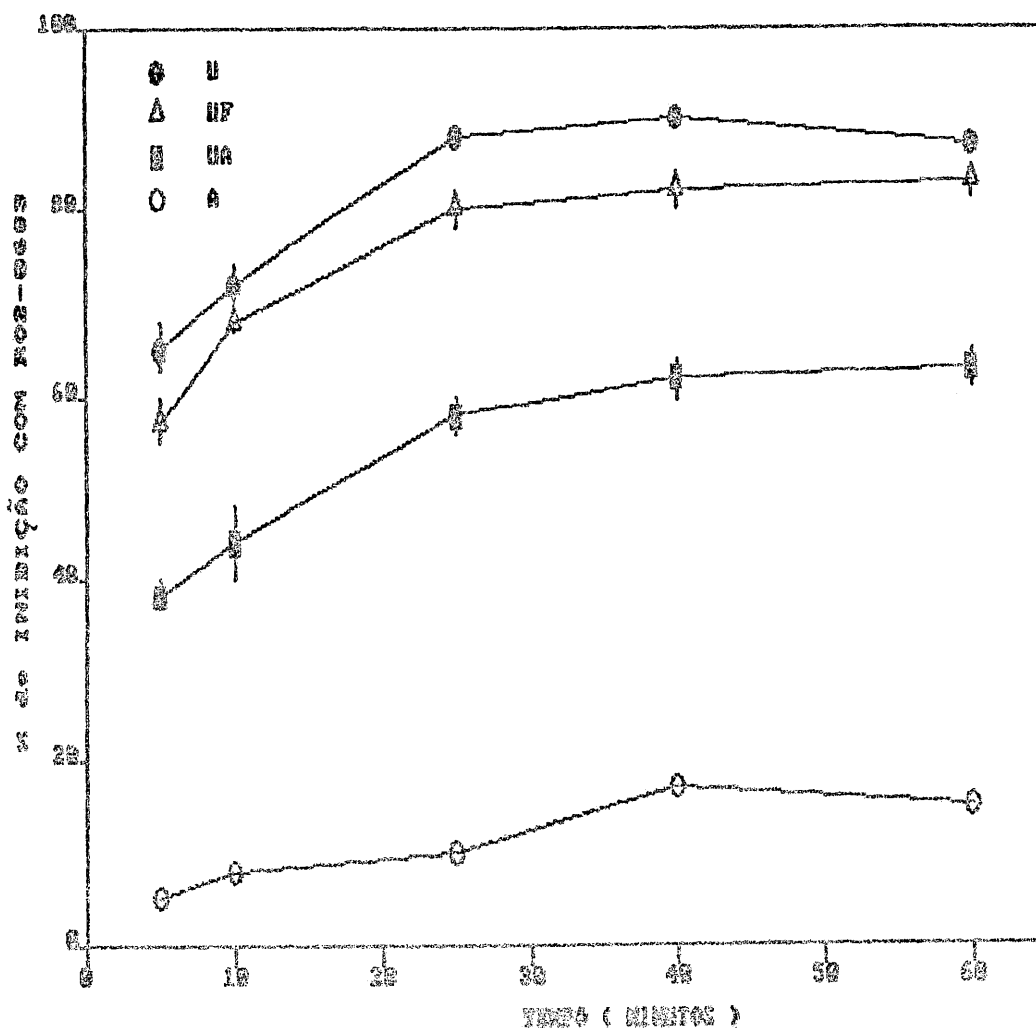


FIGURA 10. EFEITO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO SOBRE A INIBIÇÃO COM RO2-0683 UTILIZANDO ALFA-NAFTILACETATO COMO SUBSTRATO

Amostras dos fenótipos U, UF, UA e A foram ensaiadas conforme item 2.6.3 de Materiais e Métodos. Os pontos representam a média e as barras verticais a amplitude de variação, exceto para a variante A que está representada pela média de duas determinações da mesma amostra.

Condições de ensaio: alfa-naftilacetato $2,3 \times 10^{-4} M$; amostra, 5 μl ; $37^{\circ}C$; Fast Red TR $1,1 \times 10^{-3} M$ e RO0683 $3,7 \times 10^{-7} M$.

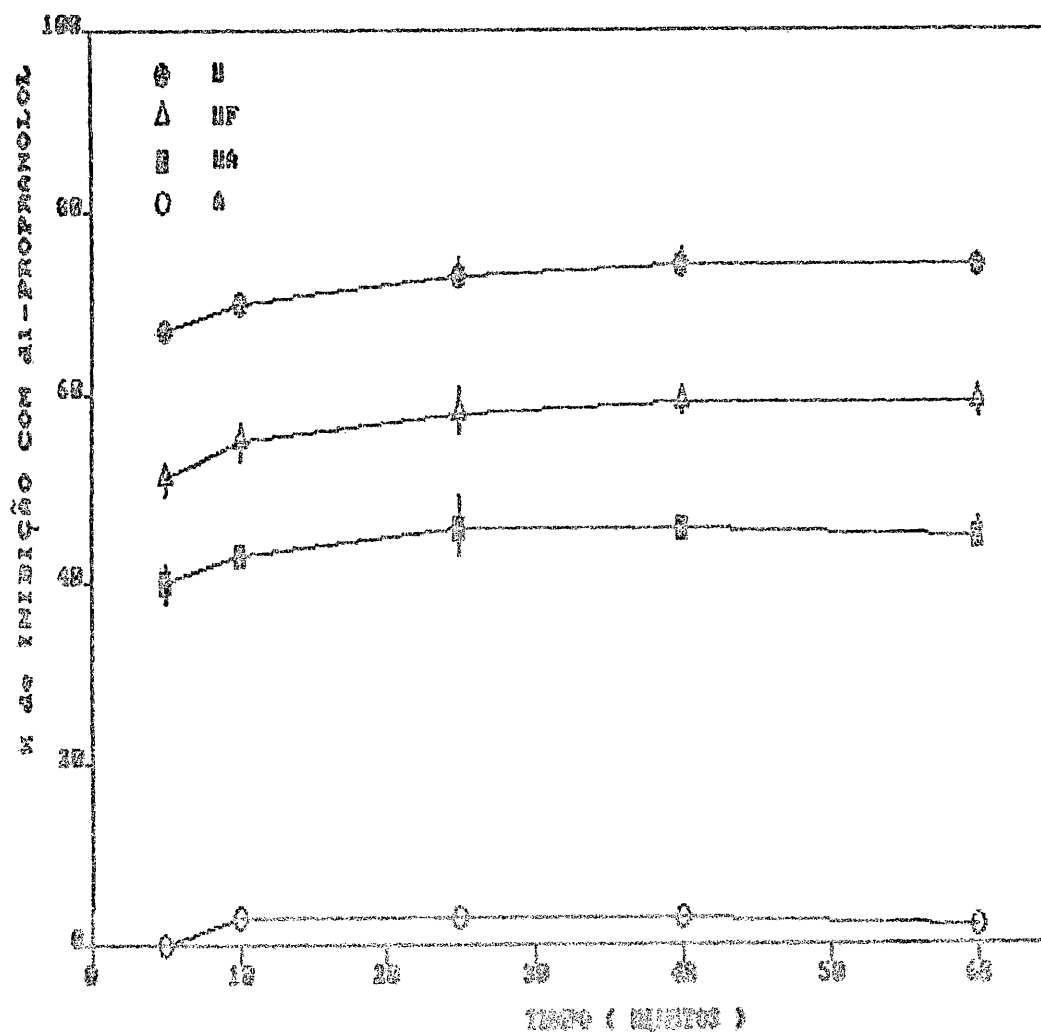


FIGURA 11. EFEITO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO SOBRE A INIBIÇÃO COM DL-PROPRANOLOL UTILIZANDO ALFA-NAFTILACETATO COMO SUBSTRATO

Amostras das variantes U, UF, UA e A foram ensaiadas conforme ítem 2.6.8 de Materiais e Métodos. Os pontos representam a média e as barras verticais a amplitude de variação, exceto para a variante A que está representada pela média de duas determinações.

Condições de ensaio: alfa-naftilacetato $2,3 \times 10^{-6}M$; amostra 5 μl ; $37^{\circ}C$; Fast Red TR $1,1 \times 10^{-3}M$ e DL-propranolol 10^{-5} .

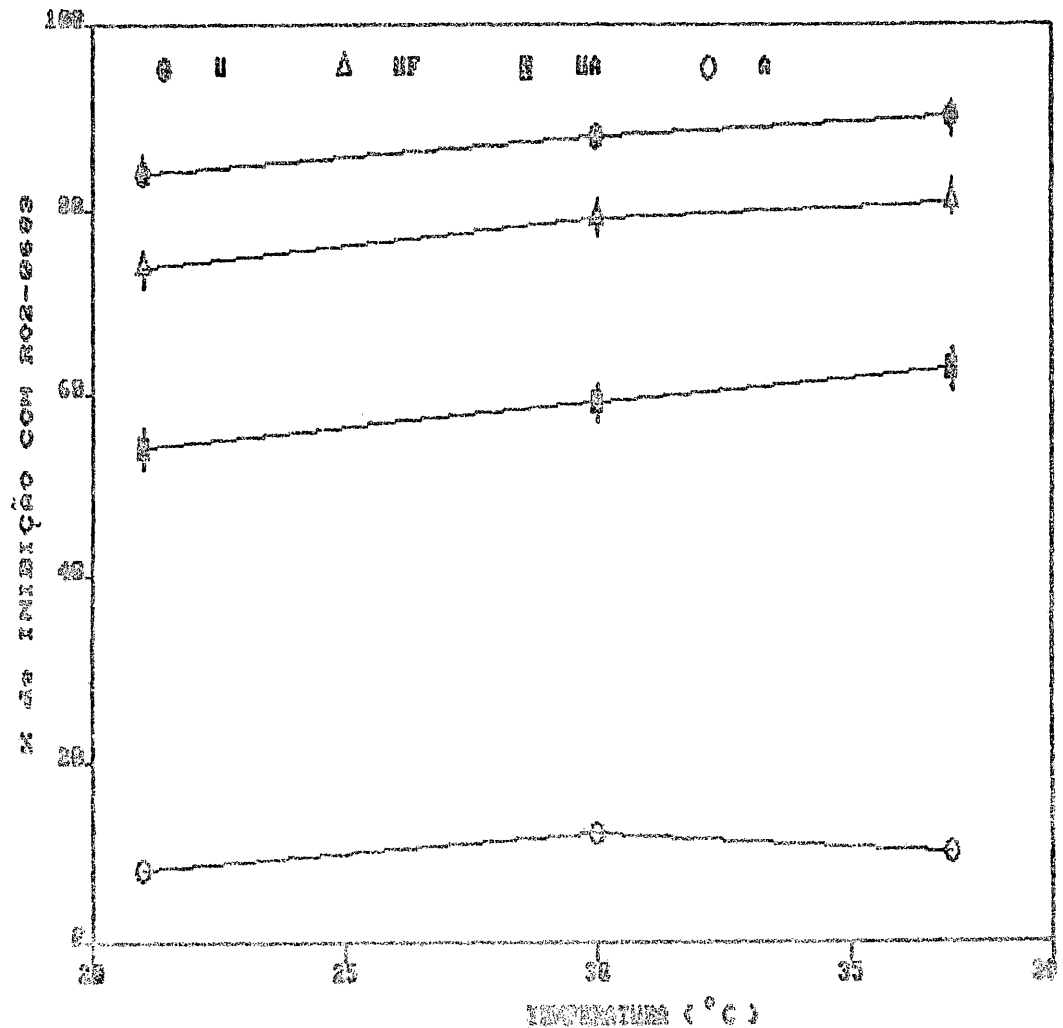


FIGURA 12. EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A INIBIÇÃO COM RO2-0683 UTILIZANDO ALFA-NAFTILACETATO COMO SUBSTRATO

O efeito da temperatura sobre a inibição com RO2-0683 foi observado para os fenótipos U, UF, UA e A. Os pontos representam a média e as barras verticais a amplitude de variação, exceto para a variante A que está representada pela média de duas determinações. As determinações foram realizadas conforme item 2.6.9 de Materiais e Métodos.

Condições de ensaio: alfa-naftilacetato $2,3 \times 10^{-4}$ M; amostra 5 μ l; 37°C ; Fast Red TR $1,1 \times 10^{-3}$ M e RO2-0683 $3,7 \times 10^{-7}$ M.

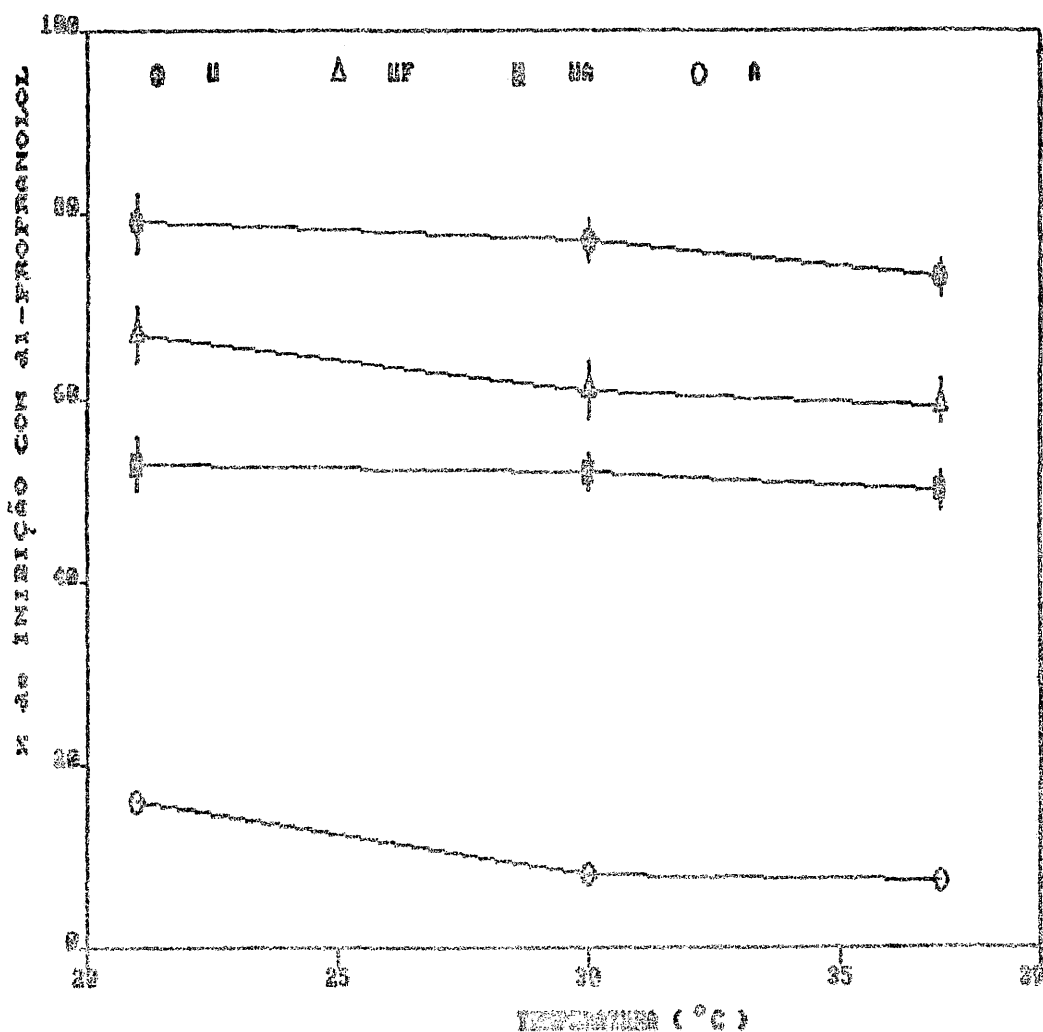


FIGURA 13. EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A INIBIÇÃO COM DL-PROPRANOLOL UTILIZANDO ALFA-NAFTILACETATO COMO SUBSTRATO

O efeito da temperatura sobre a inibição com DL-propranolol foi observado para os fenótipos U, UF, UA e A. Os pontos representam a média e as barras verticais a amplitude de variação, exceto para a variante A que está representada pela média de duas determinações. As determinações foram realizadas conforme item 2.5.12 de Materiais e Métodos.

Condições de ensaio: alfa-naftilacetato $2,3 \times 10^{-4} M$; amostra 5 μl ; $37^{\circ}C$; Fast Red TR $1,1 \times 10^{-3} M$ e DL-propranolol 10^{-5}

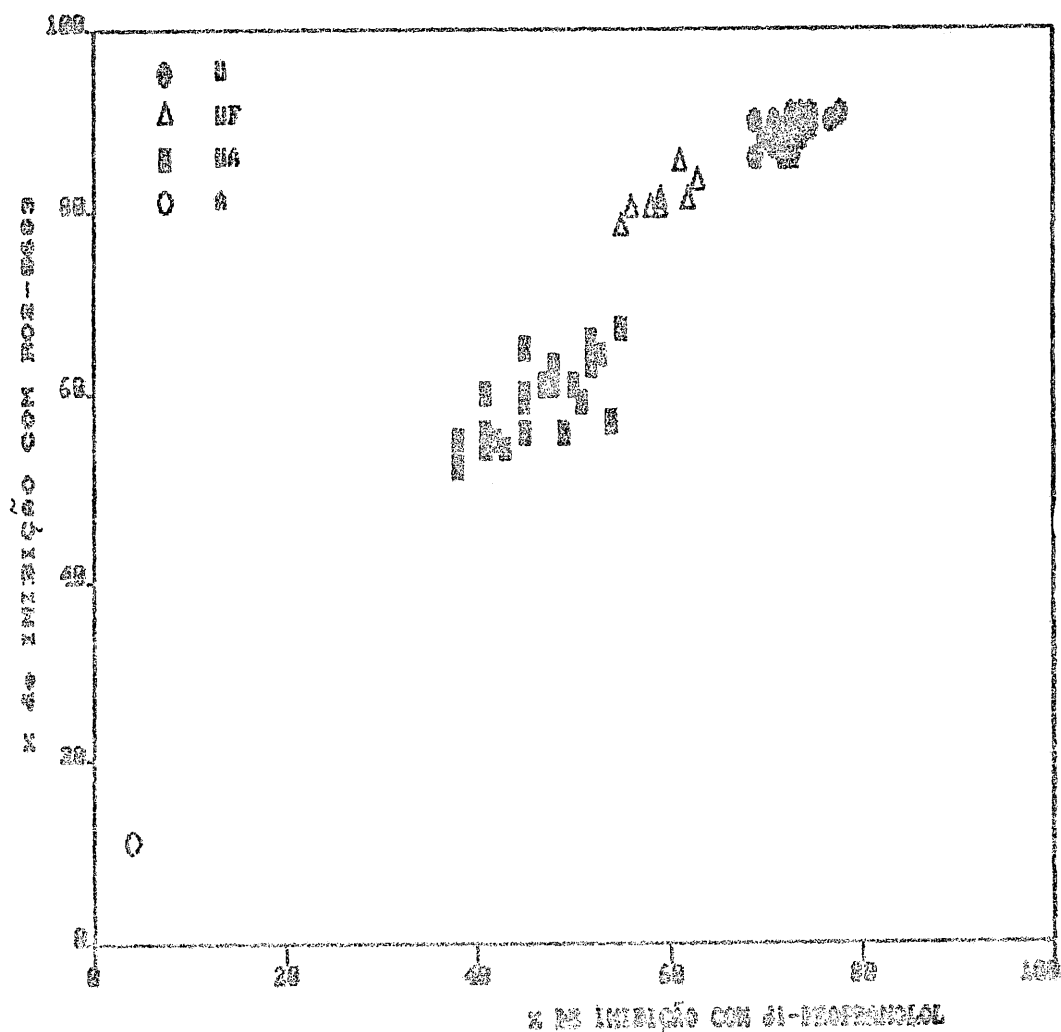


FIGURA 14. DISTRIBUIÇÃO DAS PORCENTAGENS DE INIBIÇÃO COM DL-PROPRANOLOL E RO2-0683 UTILIZANDO ALFA-NAPHTILACETATO COMO SUBSTRATO

Distribuição das percentagens de inibição com DL-propranolol $10^{-5}M$ e RO2-0683 $3,7 \times 10^{-7}M$ em 75 indivíduos, sendo 41 CHEI U, 3 CHEI UF, 25 CHEI UA e 1 CHEI UA. As determinações foram realizadas conforme item 2.6.11 de Materiais e Métodos.

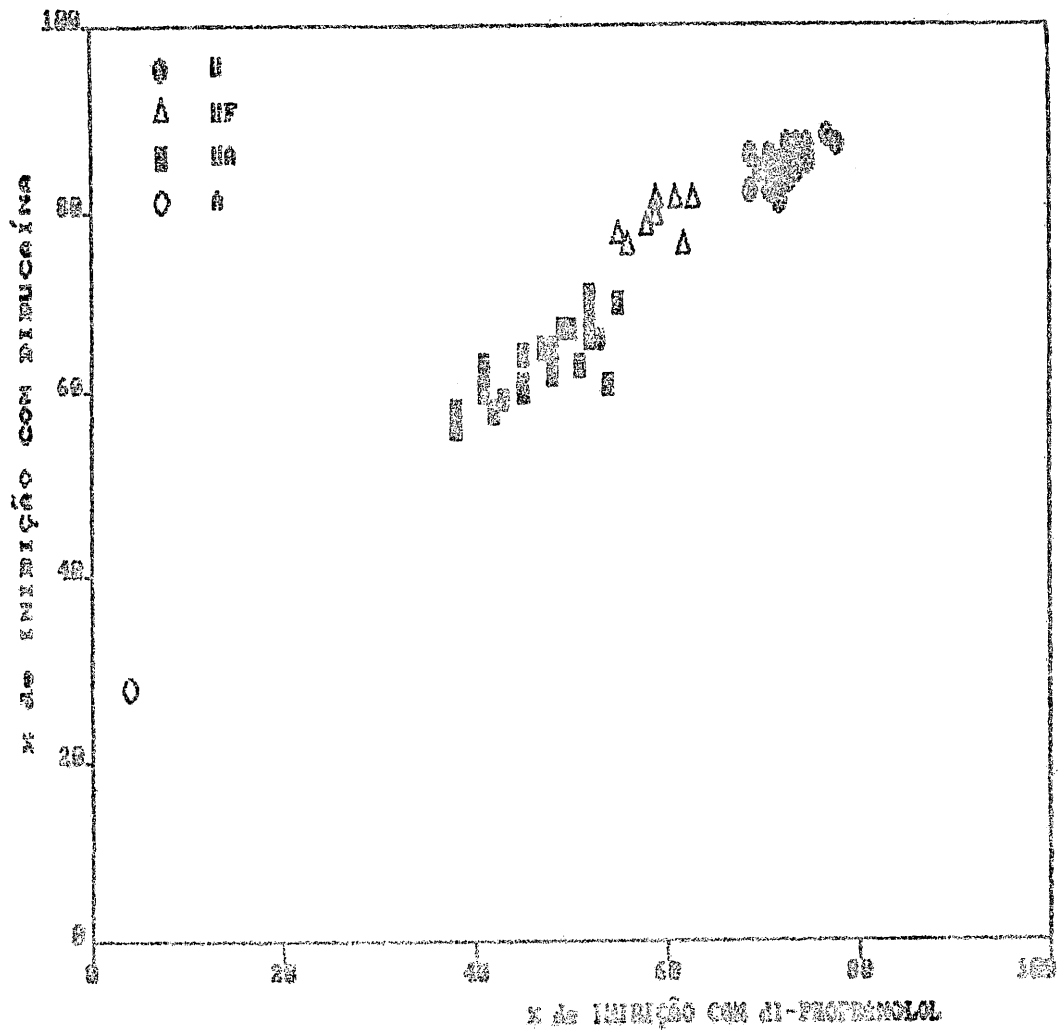


FIGURA 15. DISTRIBUIÇÃO DAS PERCENTAGENS DE INIBIÇÃO COM DL-PROPRANOLOL E DIBUCAINA UTILIZANDO ALFA-NAFTILACETATO COMO SUBSTRATO

Distribuição das percentagens de inibição com DL-propriolol $10^{-5}M$ e dibucaina $10^{-6}M$ em 75 indivíduos, sendo 41 CHEI U, 9 CHEI UF, 25 CHEI UA e 1 CHEI UA. As determinações foram realizadas conforme item 2.6.11 do Materiais e Métodos.

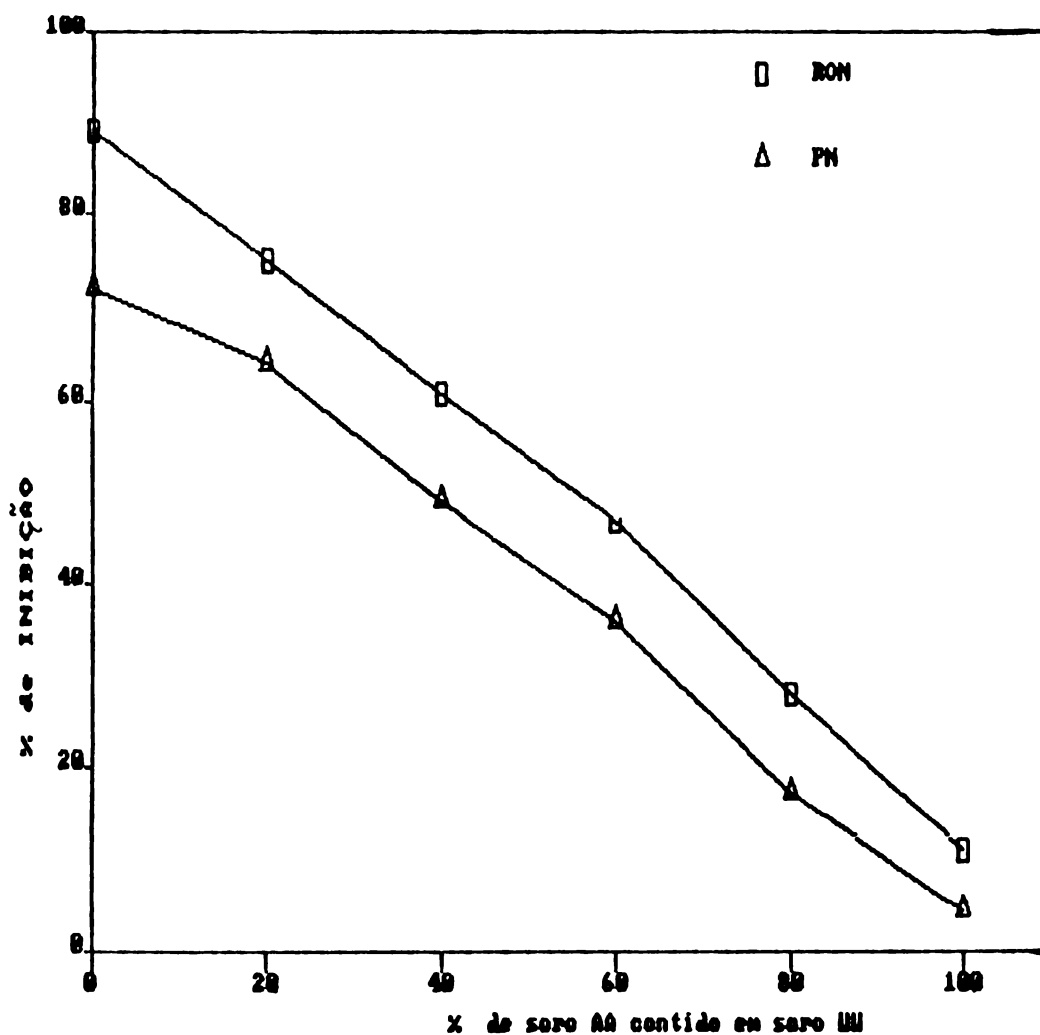


FIGURA 16. EFEITO SOBRE OS PERFIS DE INIBIÇÃO DE AMOSTRAS DAS VARIANTES A e U MISTURADAS EM VÁRIAS PROPORÇÕES

As percentagens de inibição com RO2-0683 (RON) e DL-propranolol (PN) foram observadas em misturas de um soro homozigoto para a variante A com um soro homozigoto para a variante U, bem como as amostras sem diluir, conforme item 2.6.10 de Materiais e Métodos. Os pontos são representados pela média de duas determinações.

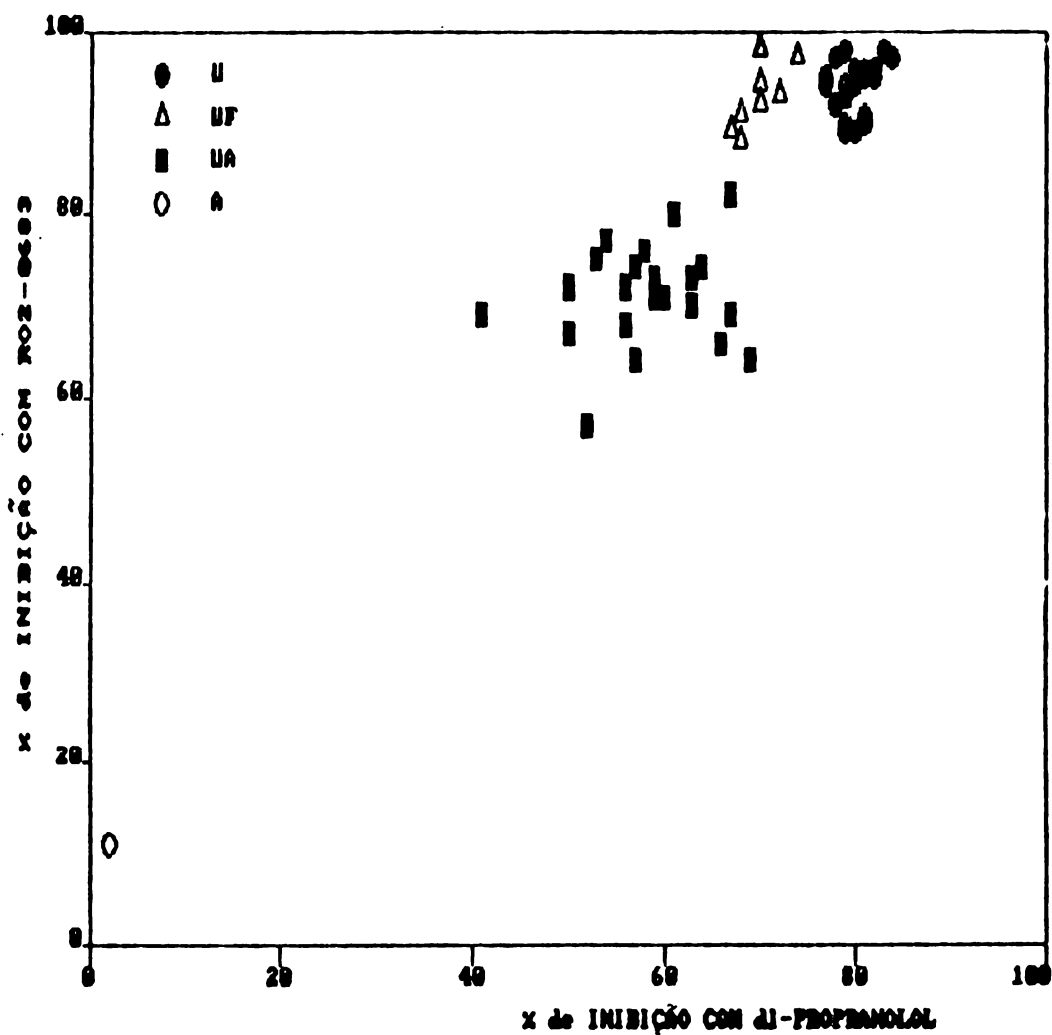


FIGURA 17. DISTRIBUIÇÃO DAS PERCENTAGENS DE INIBIÇÃO COM DL-PROPRANOLOL e RO2-0683 UTILIZANDO BENZOILCOLINA COMO SUBSTRATO.

Distribuição das percentagens de inibição com DL-propranolol $8,45 \times 10^{-6}M$ e RO2-0683 $10^{-6}M$ em 75 indivíduos, sendo 41 CHE1 U, 8 CHE1 UF, 25 CHE1 UA e 1 CHE1 A. As determinações foram realizadas conforme item 2.7.1 de Materiais e Métodos. Condições de ensaio: benzoilcolina $5 \times 10^{-5}M$; amostra 10 μl ; tampão fosfato $0,067M$ pH 7,4; medição cinética a $25^{\circ}C$ em 240 nm

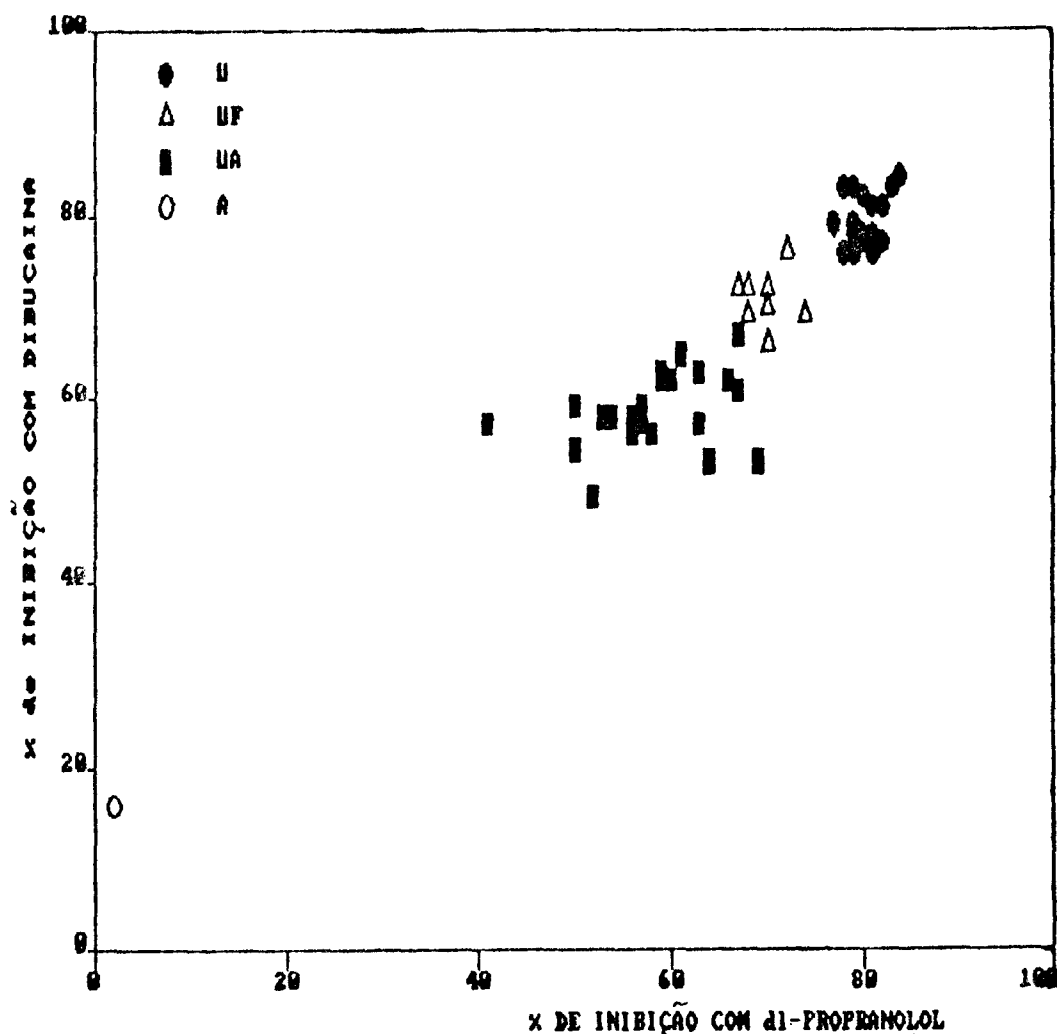


FIGURA 18. DISTRIBUIÇÃO DAS PERCENTAGENS DE INIBIÇÃO COM DL-PROPRANOLOL e DIBUCAÍNA UTILIZANDO BENZOILCOLINA COMO SUBSTRATO.

Distribuição das percentagens de inibição com DL-propranolol $8,45 \times 10^{-6}M$ e dibucaína $10^{-5}M$ em 75 indivíduos, sendo 41 CHEI U, 8 CHEI UF, 25 CHEI UA e 1 CHEI A. As determinações foram realizadas conforme item 2.7.1 de Materiais e Métodos. Condições de ensaio: benzoilcolina $5 \times 10^{-5}M$; amostra 10 μl ; tampão fosfato $0,067M$ pH 7,4; medição cinética a $25^{\circ}C$ em 240 nm.

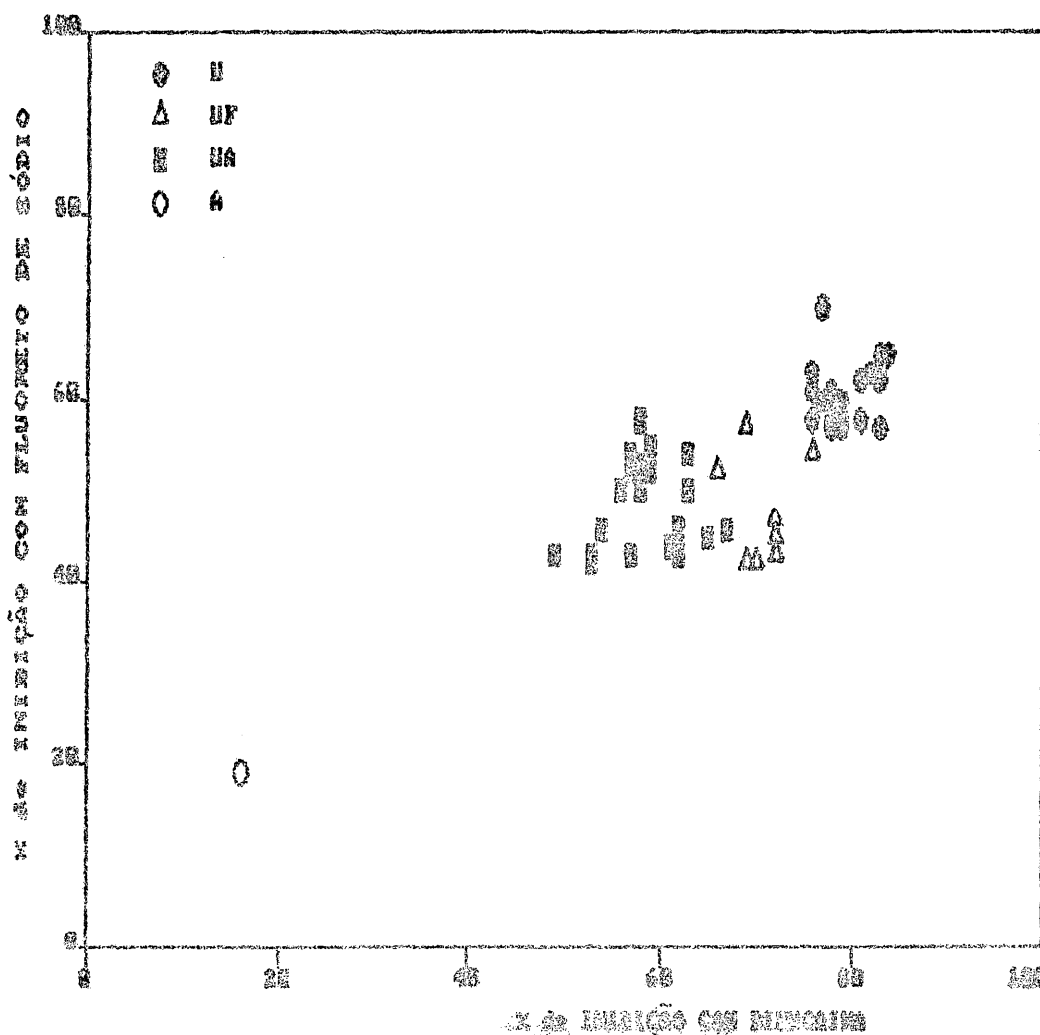


FIGURA 19. DISTRIBUIÇÃO DAS PERCENTAGENS DE INIBIÇÃO COM DIBUCAINA E FLUORETO DE SÓDIO UTILIZANDO BENZOILCOLINA COMO SUBSTRATO.

Distribuição das percentagens de inibição com dibucaina $10^{-5}M$ e fluoreto de sódio $5 \times 10^{-5}M$ em 75 indivíduos, sendo 41 CHE1 U, 8 CHE1 UF, 25 CHE1 UA e 1 CHE1 A. As determinações foram realizadas conforme item 2.7.1 de Materiais e Métodos. Condições de ensaio: benzoilcolina $5 \times 10^{-5}M$; amostra 10 μ l; tampão fosfato $0,067M$ pH 7,4; medição cinética a $25^{\circ}C$ em 240 nm.

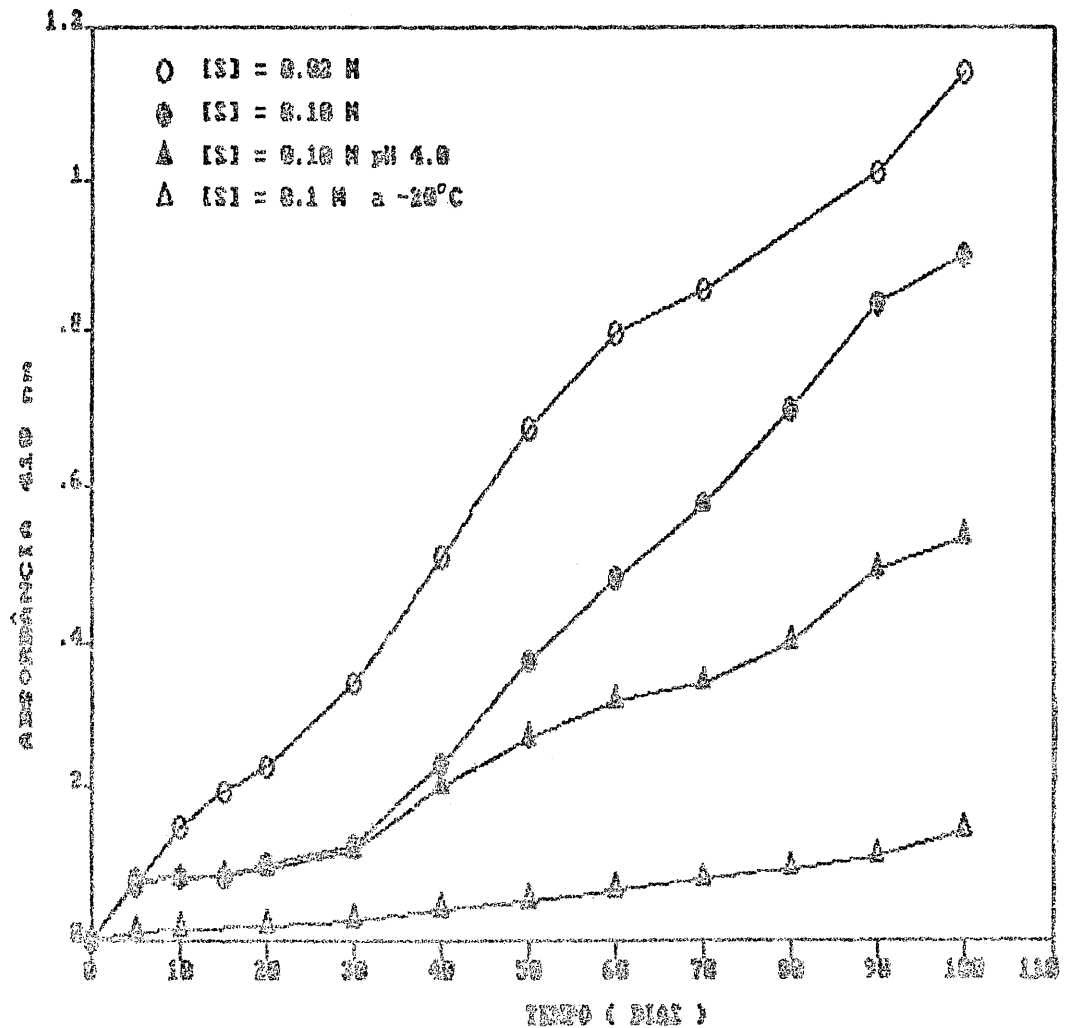


FIGURA 20. ESTABILIDADE DA PROPIONILTIOCOLINA EM SOLUÇÃO

A absorvância de várias soluções de iodeto de propioniltiocolina foram observadas conforme descrito no item 2.8.3 de Materiais e Métodos. Um valor arbitrário correspondente a 0,135 de absorvância foi definido como limite máximo permitido para a hidrólise espontânea do substrato.

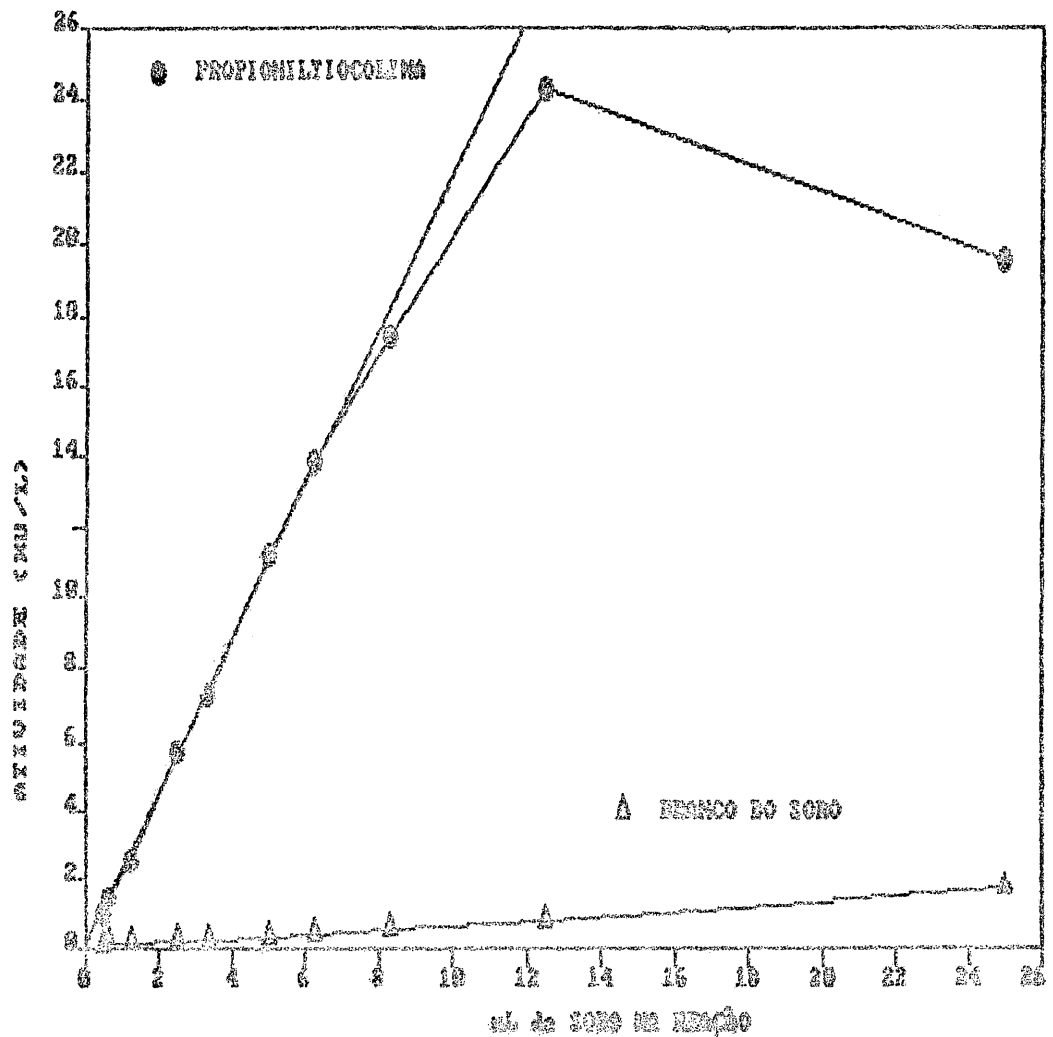


FIGURA 21. CURVA DE CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA UTILIZANDO PROPIONILTIOCOLINA COMO SUBSTRATO

O efeito da concentração da enzima sobre a velocidade de reação foi observada conforme item 2.5.4 de Materiais e Métodos. Uma reta de regressão foi traçada entre os pontos que se mostraram graficamente lineares. A presença de grupos tídios livres no soro foi observada (branco de soro). Os pontos representam a média de duas determinações.

Condições de ensaio: propioniltiocolina $2 \times 10^{-3} M$; tampão fosfato $0,025 M$ pH 7,6; medição cinética a $25^{\circ}C$.

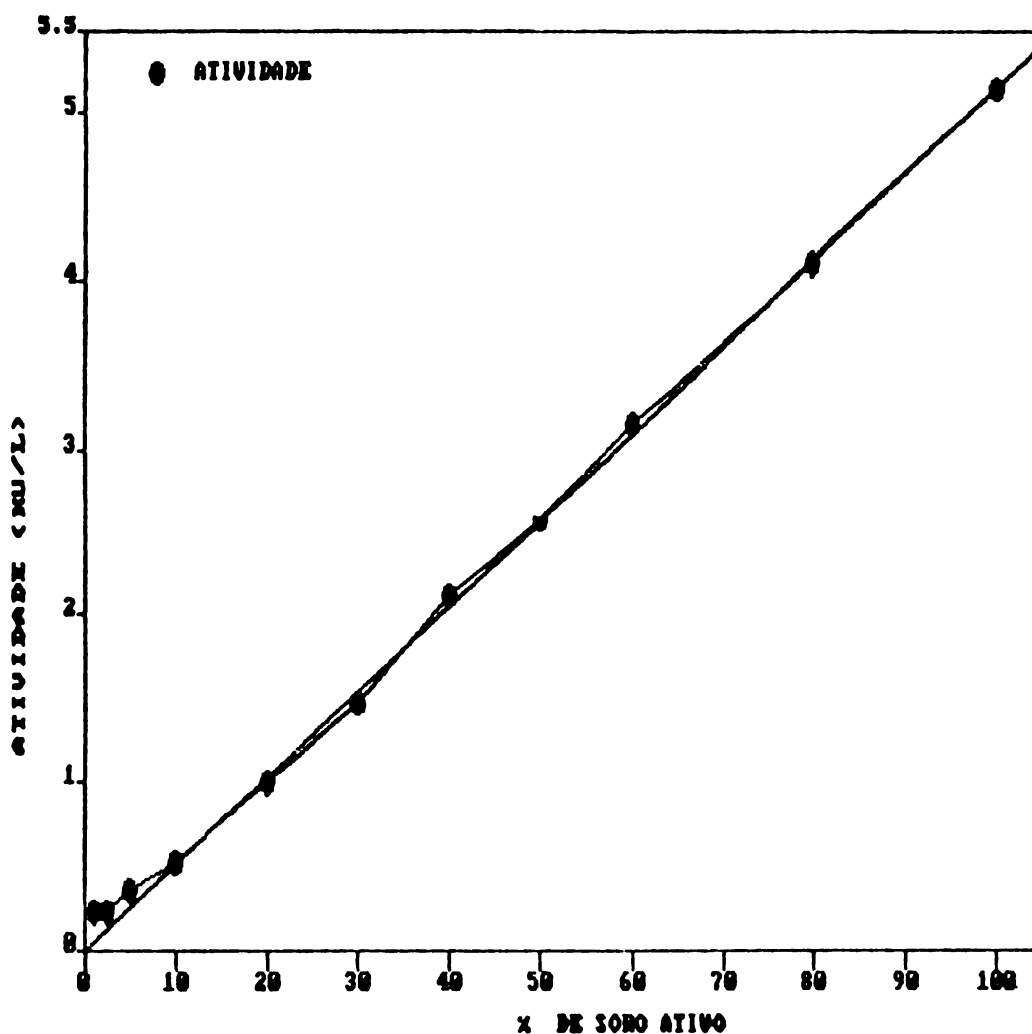


FIGURA 22. VERIFICAÇÃO DA SENSIBILIDADE DO MÉTODO UTILIZANDO PROPIONILTIOCOLINA COMO SUBSTRATO.

Diluições do pool de soros em um soro inativado foram ensaiados conforme item 2.8.5 de Materiais e Métodos. Uma reta de regressão foi traçada entre os pontos graficamente lineares. Os pontos representam a média de duas determinações. Condições de ensaio: propioniltiocolina $2 \times 10^{-3} M$; amostra 2,5 ul; tampão fosfato 0,025M pH 7,6; medição cinética a 25°C.

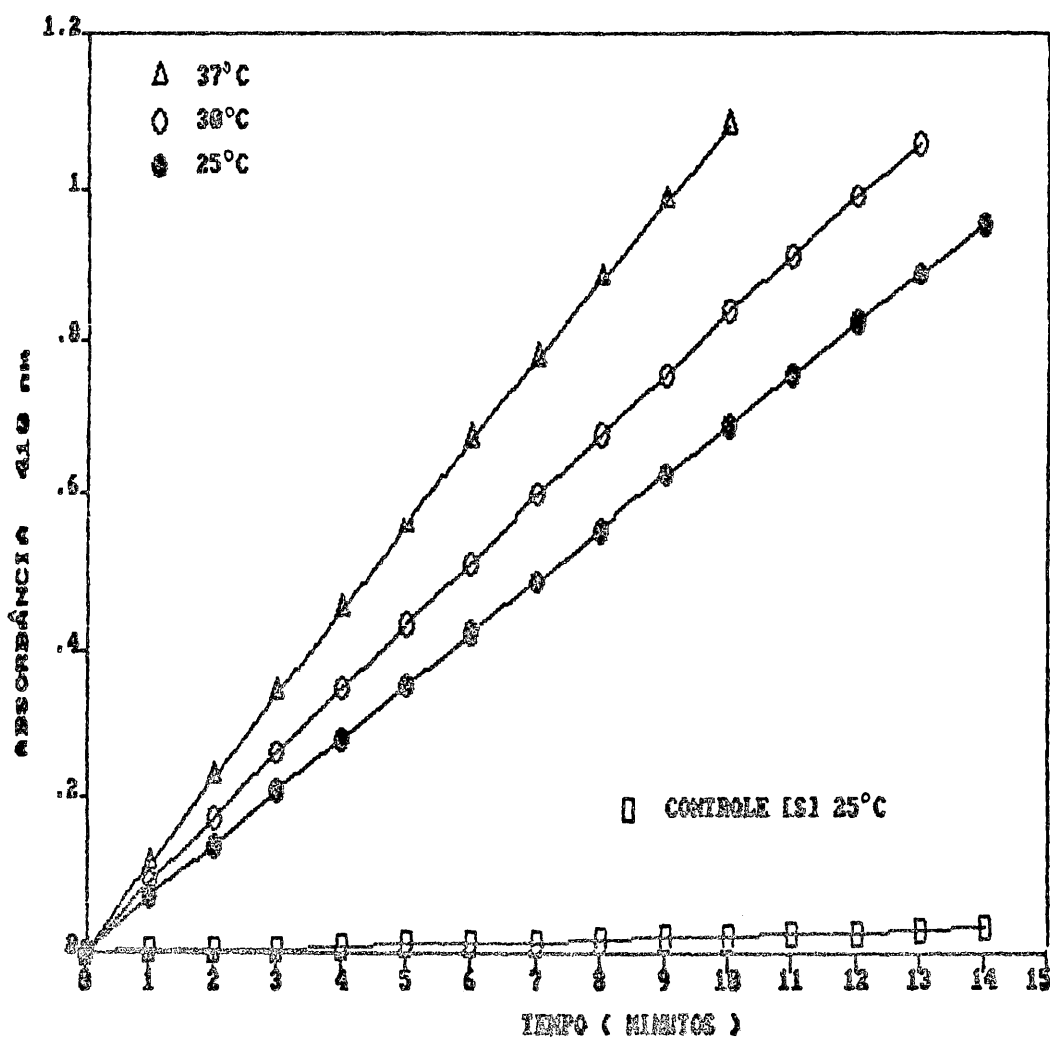


FIGURA 23. EFEITO DO TEMPO SOBRE A HIDRÓLISE DA PROPIONILTIOCOLINA.

O efeito do tempo de incubação sobre a hidrólise da propioniltiocolina foi observado utilizando-se um pool de soros como fonte de enzima conforme item 2.8.6 de Materiais e Métodos. As velocidades de reação foram observadas a 25, 30 e 37°C, bem como a hidrólise espontânea do substrato (controle) a 25°C.

Condições de ensaio: propioniltiocolina $2 \times 10^{-3} M$; amostra 2,5 μl ; tampão fosfato 0,025M pH 7,6; medição cinética a 25°C.

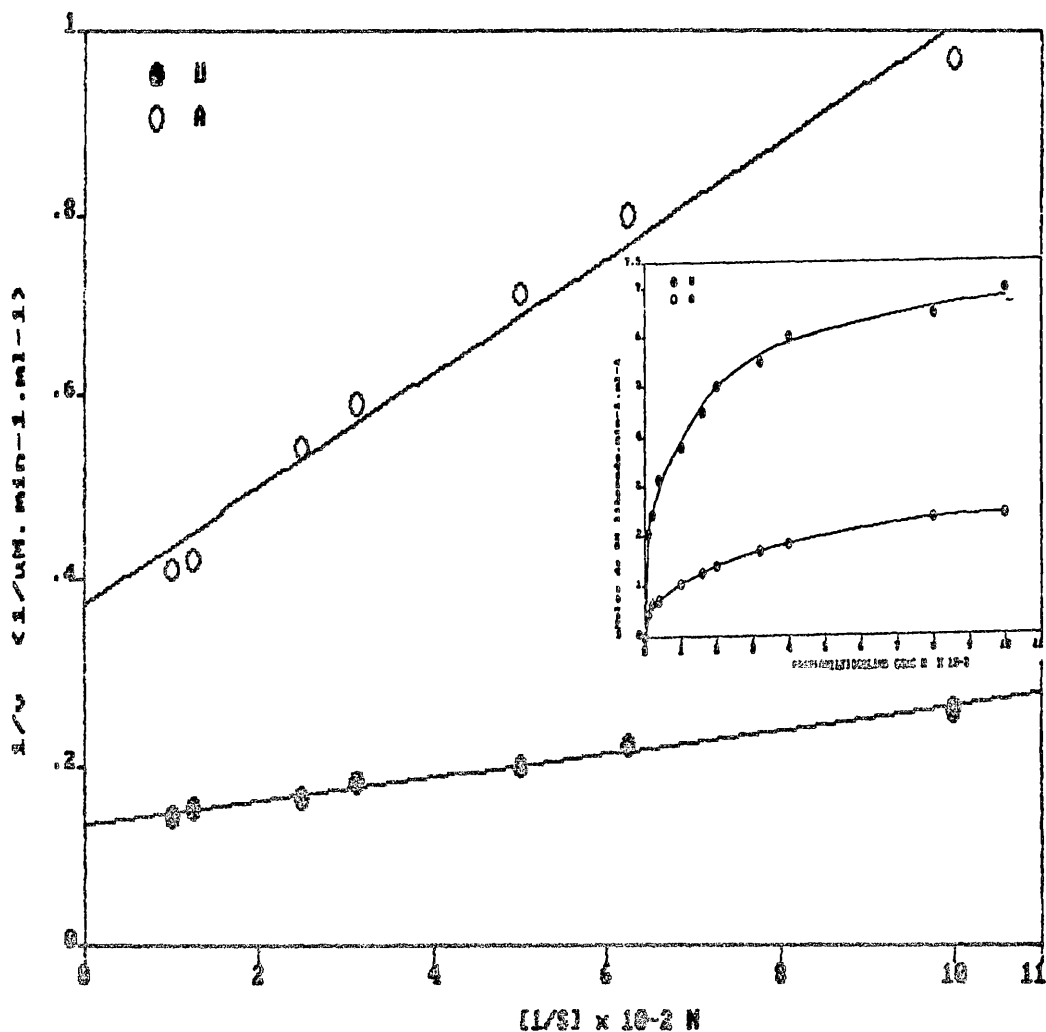


FIGURA 24. GRÁFICO DUPLO-RECÍPROCO COM PROPIONILTIOCOLINA.

Gráfico de Lineweaver-Burk mostrando o efeito da concentração da propioniltiocolina de 10^{-3} a $10^{-2}N$ sobre a velocidade de reação, utilizando como fonte de enzima as variantes U e A conforme item 2.8.7 de Materiais e Métodos. As retas de regressão obtidas foram $y = 0,01312x + 0,1354$ e $y = 0,06329 + 0,3733$ para os fenótipos U e A, respectivamente. O inset mostra o gráfico de Michaelis-Menten.

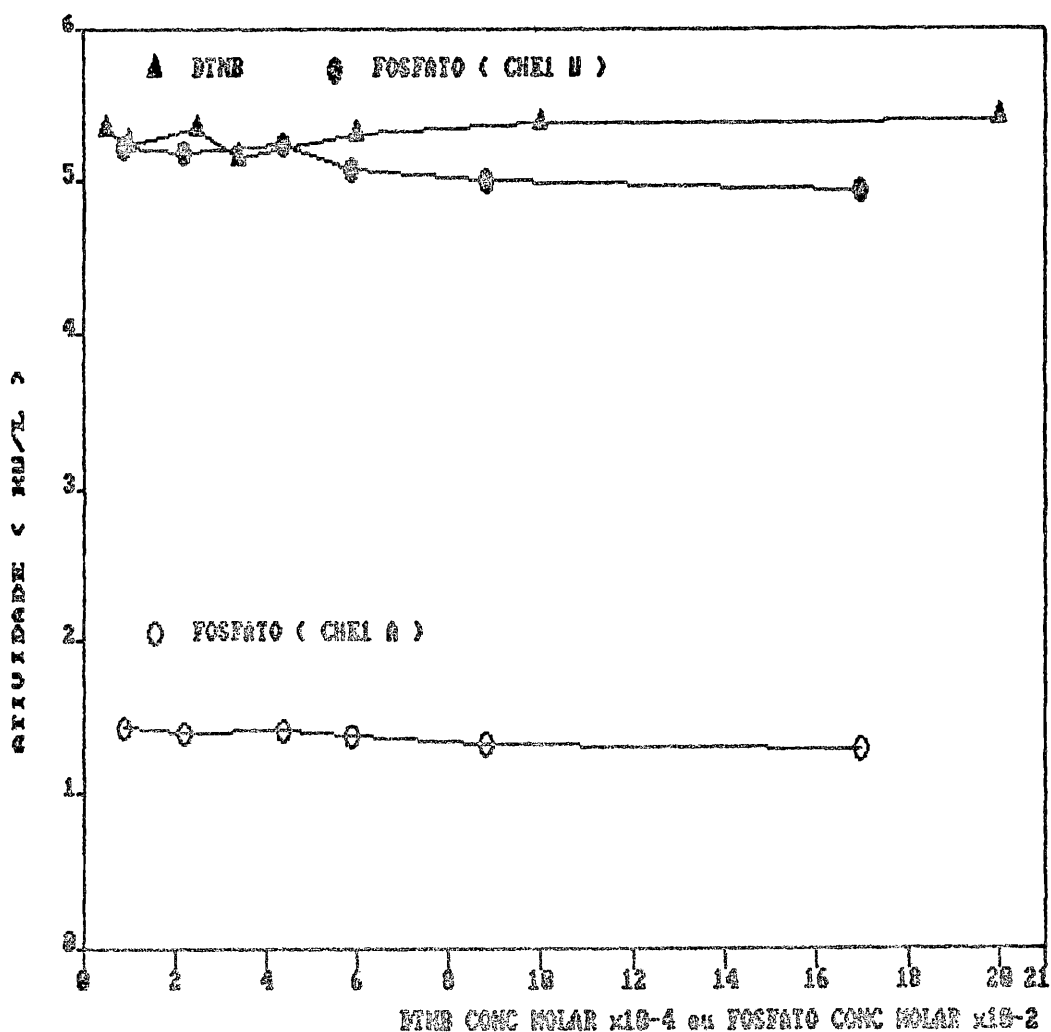


FIGURA 25. EFEITO NA VARIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE DTNB E FOSFATO SOBRE A ATIVIDADE UTILIZANDO PROPIONILTIOCOLINA COMO SUBSTRATO.

O efeito das concentrações de DTNB variando $0,5$ a $20 \times 10^{-4}M$ em tampão fosfato $0,05M$ pH $7,6$ sobre a atividade foi observado utilizando um pool de soro como fonte de enzima. O efeito da variação da concentração de tampão fosfato pH $7,6$ variando de 1 a $20 \times 10^{-2}M$ foi observado para os fenótipos A e U conforme item 2.8.8 de Materiais e Métodos.

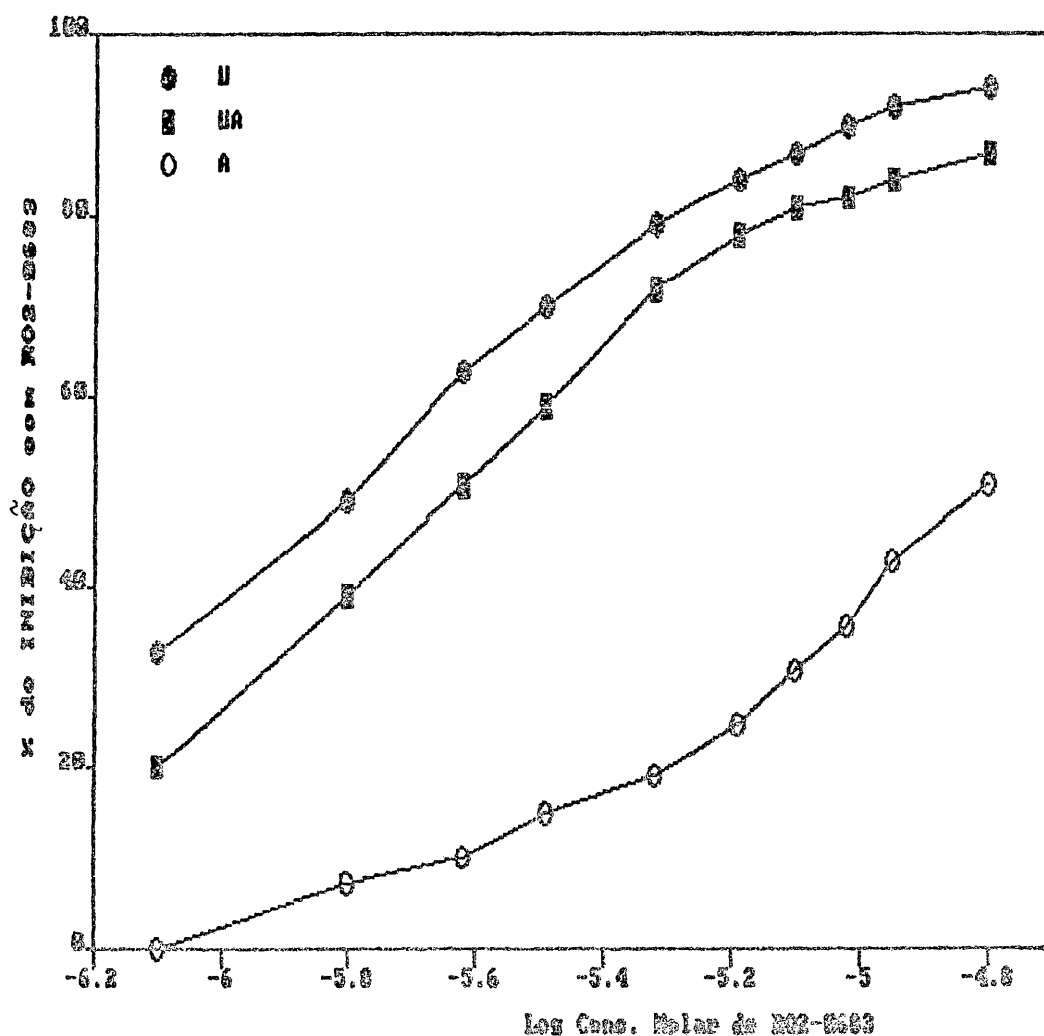


FIGURA 26. CURVA DE INIBIÇÃO COM RO2-0683 UTILIZANDO PROPIONILTIOCOLINA COMO SUBSTRATO.

A porcentagem de inibição dos fenótipos U, UA e A com RO2-0683 8×10^{-7} a $1,6 \times 10^{-5} M$ foi observada conforme item 2.8.11 de Materiais e Métodos. Os pontos representam a média de duas determinações. Condições de ensaio: propioniltiocolina $2 \times 10^{-3} M$; amostra 2,5 μl ; tampão fosfato 0,025M pH 7,6; medições cinéticas a 25°C.

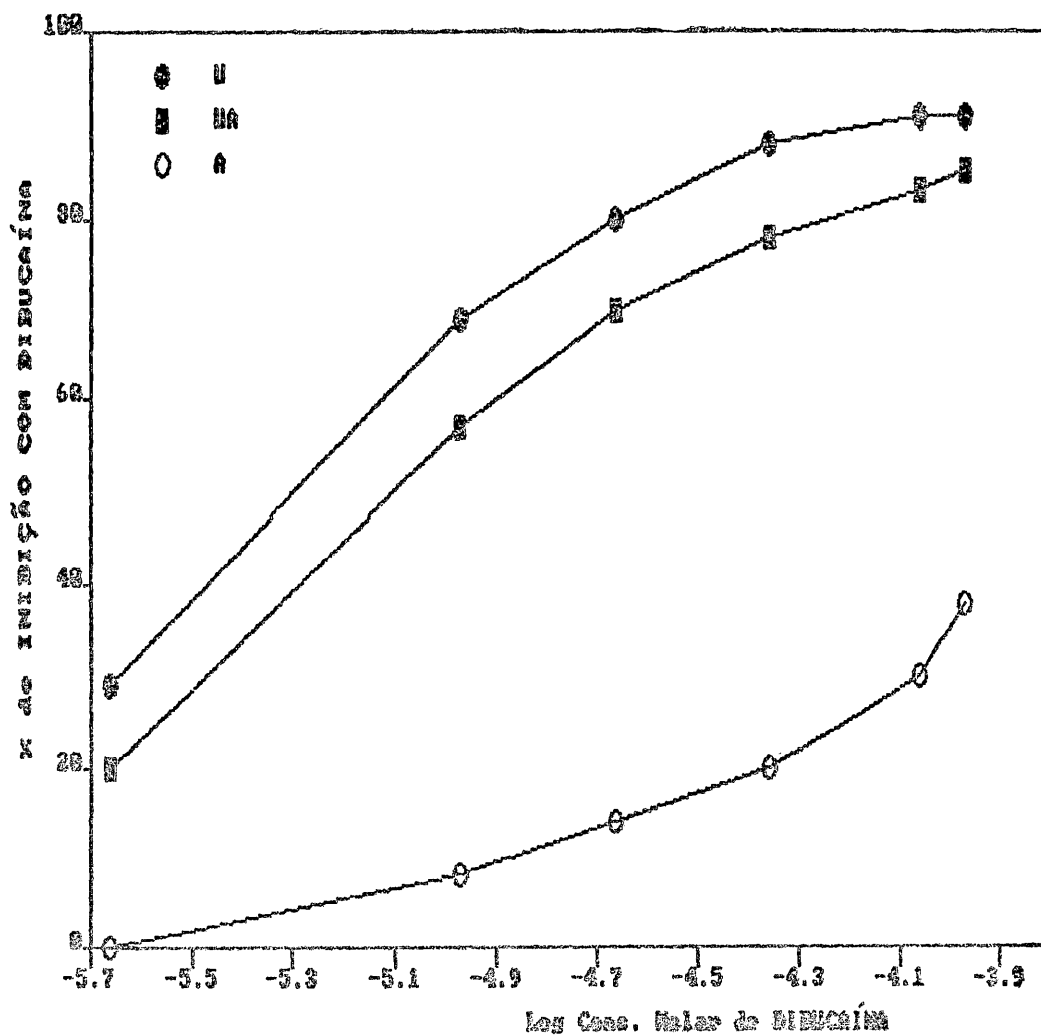


FIGURA 27. CURVA DE INIBIÇÃO COM DIBUCAÍNA UTILIZANDO PROPIONILTIOCOLINA COMO SUBSTRATO.

A porcentagem de inibição dos fenótipos U, UA e A com dibucaina $2,16 \times 10^{-6}$ a $1,08 \times 10^{-4} M$ foi observada conforme item 2.8.11 de Materiais e Métodos. Os pontos representam a média de duas determinações. Condições de ensaio: propioniltiocolina $2 \times 10^{-3} M$; amostra 2,5 μl ; tampão fosfato $0,025 M$ pH 7,6; medições cinéticas a $25^{\circ}C$.

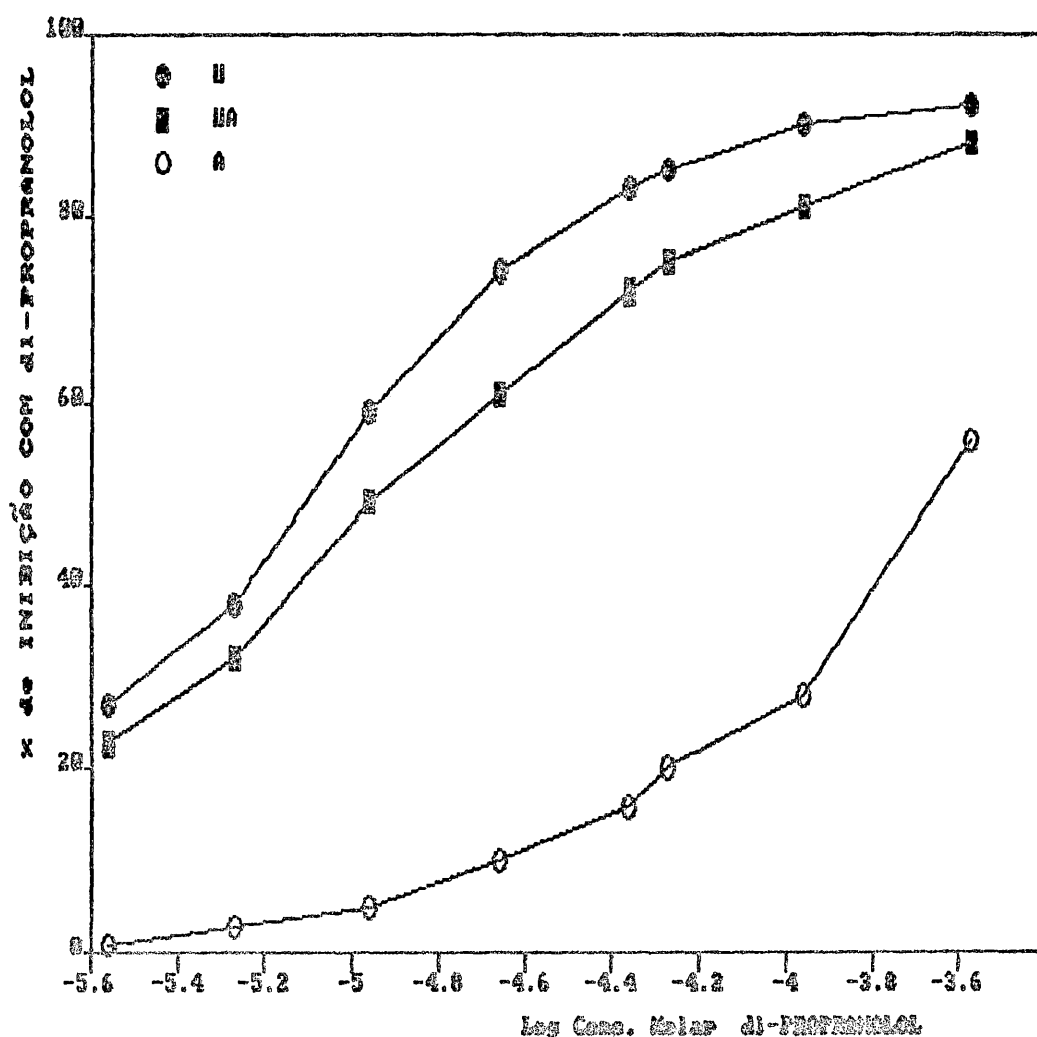


FIGURA 28. CURVA DE INIBIÇÃO COM DL-PROPRANOLOL UTILIZANDO PROPIONILTIOCOLINA COMO SUBSTRATO.

A percentagem de inibição dos fenótipos U, UA e A com DL-propranolol $2,7 \times 10^{-6}$ a $2,7 \times 10^{-4} M$ foi observada conforme item 2.8.11 de Materiais e Métodos. Os pontos representam a média de duas determinações.

Condições de ensaio: propioniltiocolina $2 \times 10^{-3} M$; amostra 2,5 ul; tampão fosfato $0,025 M$ pH 7,6; medições cinéticas a $25^{\circ} C$.

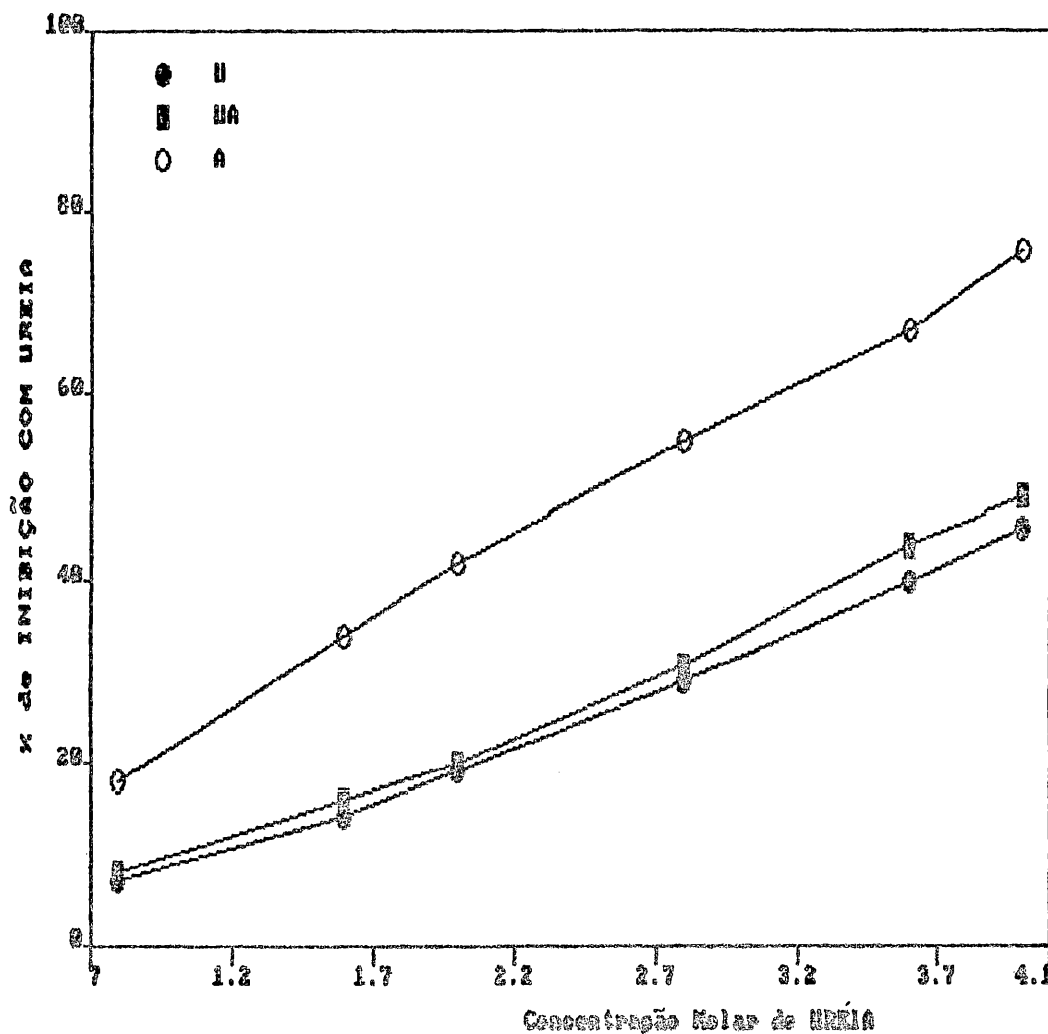


FIGURA 29. CURVA DE INIBIÇÃO COM URÉIA UTILIZANDO PROPIONILTIOCOLINA COMO SUBSTRATO.

A percentagem de inibição dos fenótipos U, UA e A com uréia 0,8 a 4,0M foi observada conforme item 2.8.11 de Materiais e Métodos. Os pontos representam a média de duas determinações. Condições de ensaio: propioniltiocolina $2 \times 10^{-3}M$; amostra 2,5 ul; tampão fosfato 0,025M pH 7,6; medições cinéticas a $25^{\circ}C$.

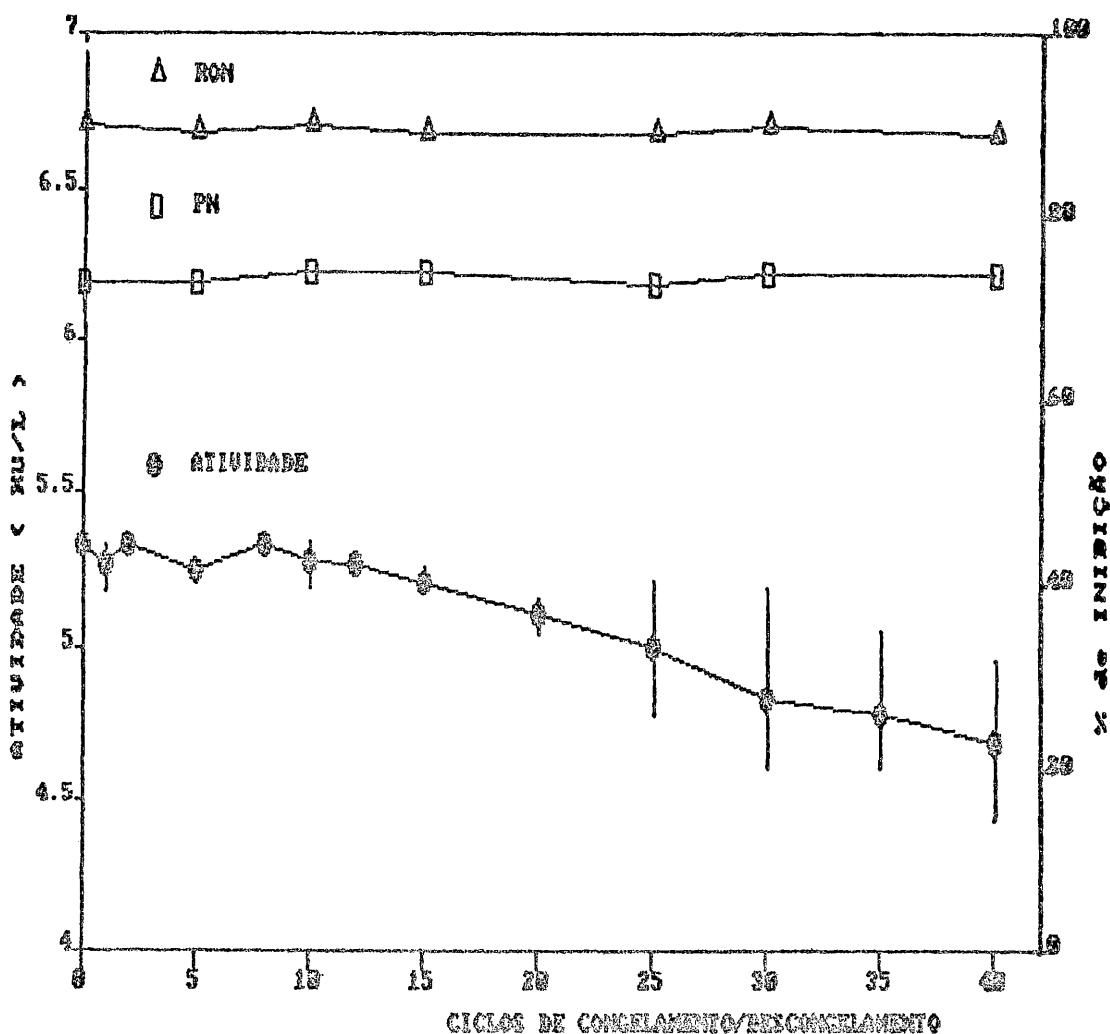


FIGURA 30. EFEITO DE CICLOS CONGELAMENTO/DESCONGELAMENTO SOBRE A ATIVIDADE E PERFIS DE INIBIÇÃO DA Che.

Alíquotas do pool foram submetidas a ciclos de congelamento/descongelamento, sendo ensaiadas para atividade e fenotipagem com RO2-0683 (RON) e dipropranolol (PN) conforme item 2.9 de Materiais e Métodos. Os pontos representando a atividade foram realizados em duplicata ou triplicata.

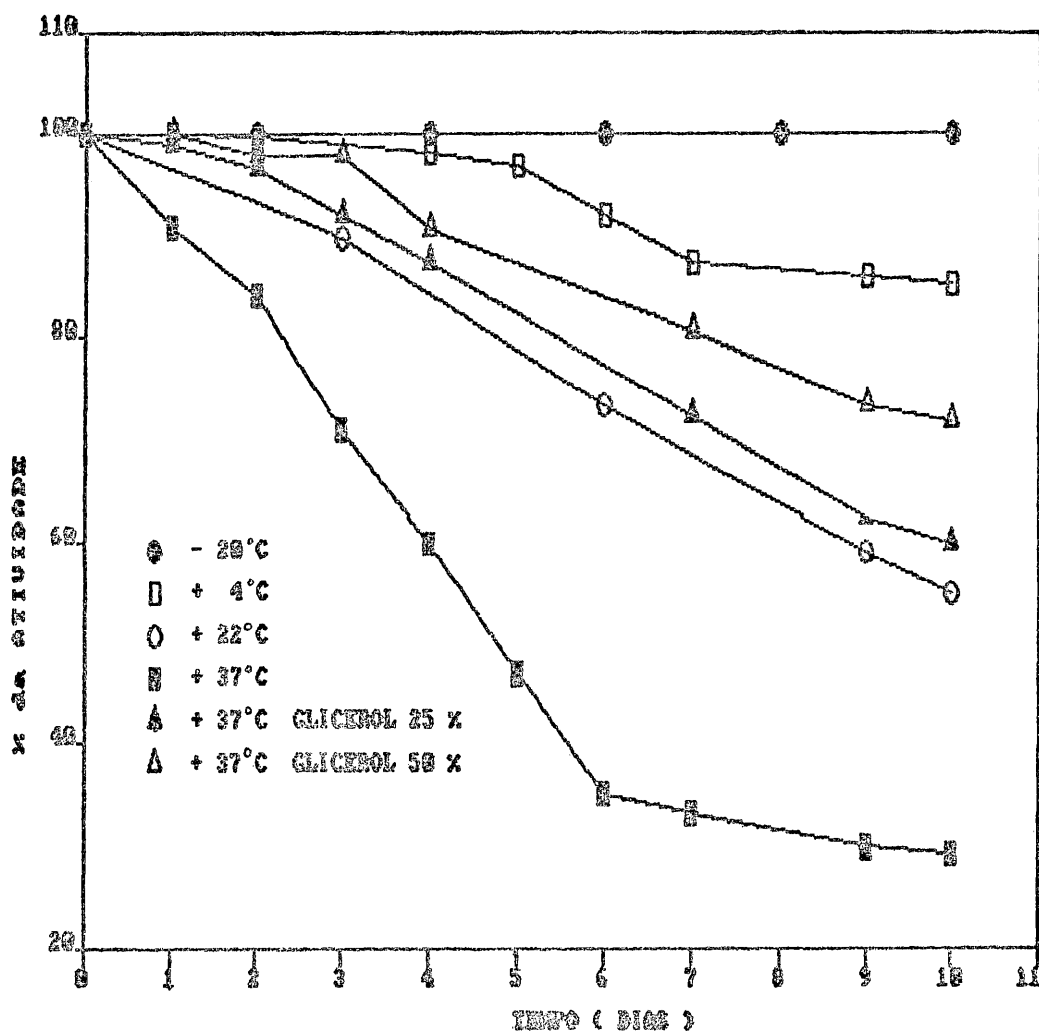


FIGURA 31. EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A ESTOCAGEM DA CHE.

A atividade do pool estocado em várias temperaturas e também na presença de glicerol, foi medida conforme item 2.10 de Materiais e Métodos. A atividade do pool no início do experimento foi considerada 100%. Os pontos representam a média de duas determinações.

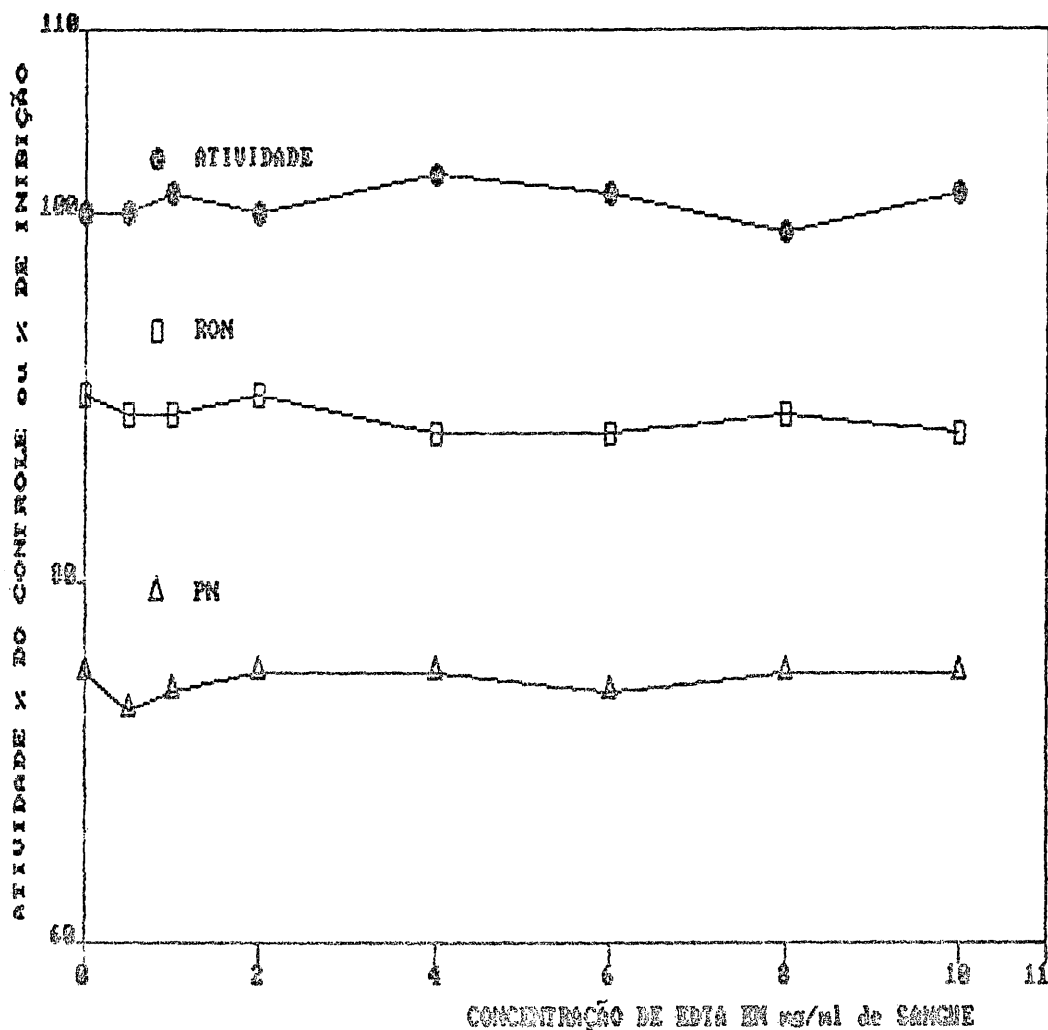


FIGURA 32. EFEITO DO EDTA SOBRE A ATIVIDADE E PERFIS DE INIBIÇÃO DA CHE.

A atividade e os perfis de inibição com RC2-0683 (RON) e DL-propranolol (PN) foram observados na ausência e na presença de EDTA adicionado em várias concentrações a um sangue CHE1 U conforme item 2.11 de Materiais e Métodos. Para a atividade os controles isentos de EDTA foram considerados 100%.

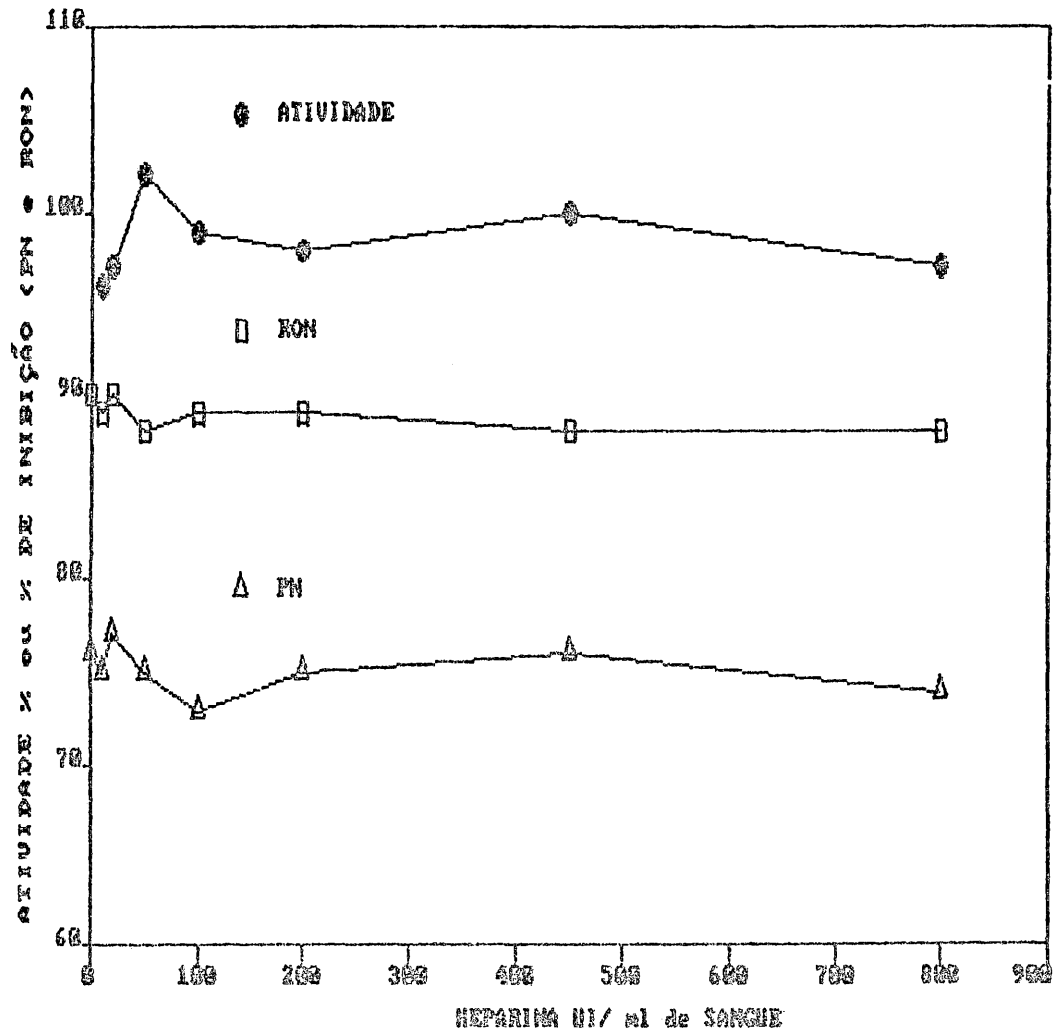


FIGURA 33. EFEITO DA HEPARINA SOBRE A ATIVIDADE E PERFIS DE INIBIÇÃO DA CHE.

A atividade e os perfis de inibição com RO2-0683 (RON) e DL-propranolol (PN) foram observados na ausência e na presença de heparina adicionada em várias concentrações a um sangue CHE1 U conforme item 2.12 de Materiais e Métodos. Para a atividade os controles isentos de heparina foram considerados 100%.

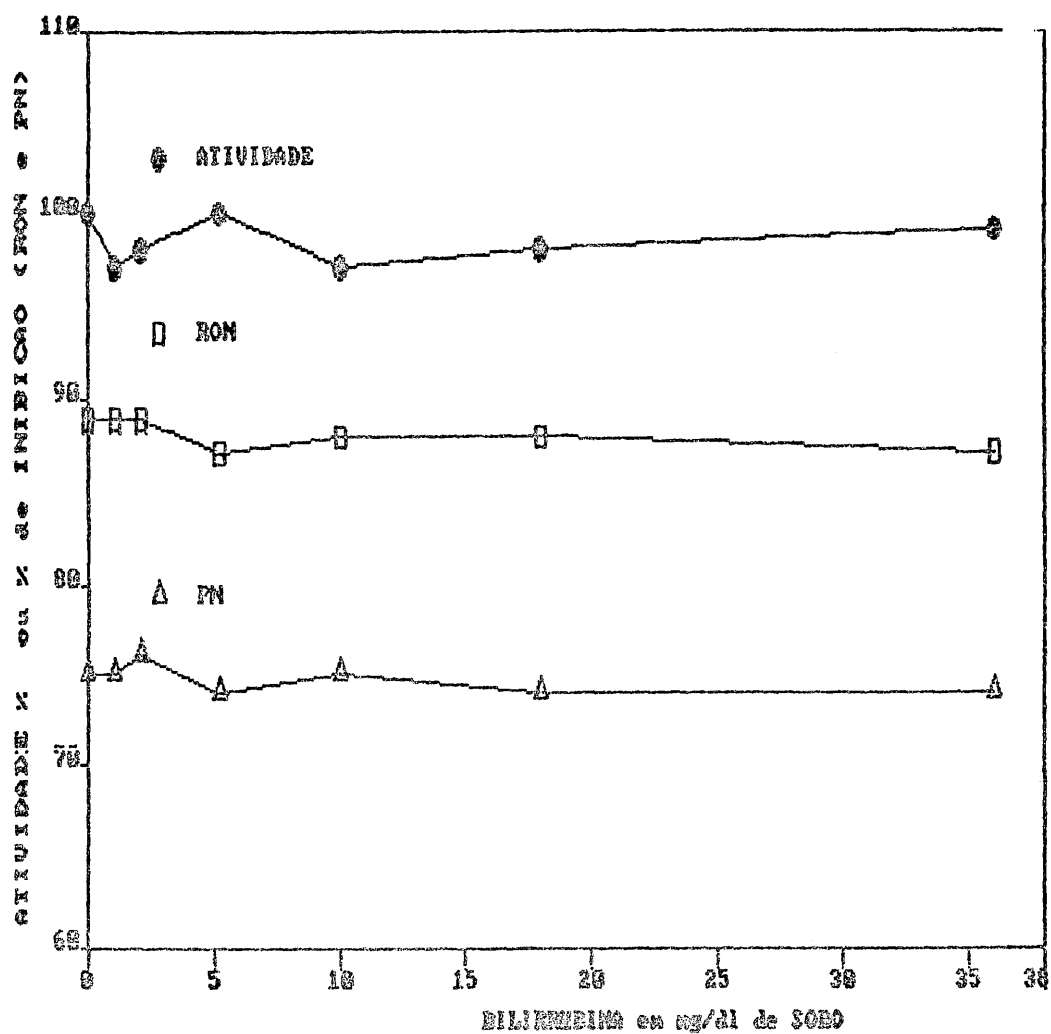


FIGURA 34. EFEITO DA BILIRRUBINA SOBRE A ATIVIDADE E PERFIS DE INIBIÇÃO DA Che.

A atividade e os perfis de inibição com RO2-0583 (RON) e DL-propranolol (PN) foram observados na ausência e na presença de bilirrubina conforme item 2.13 de Materiais e Métodos. Para a atividade os controles isentos de bilirrubina foram considerados 100%.

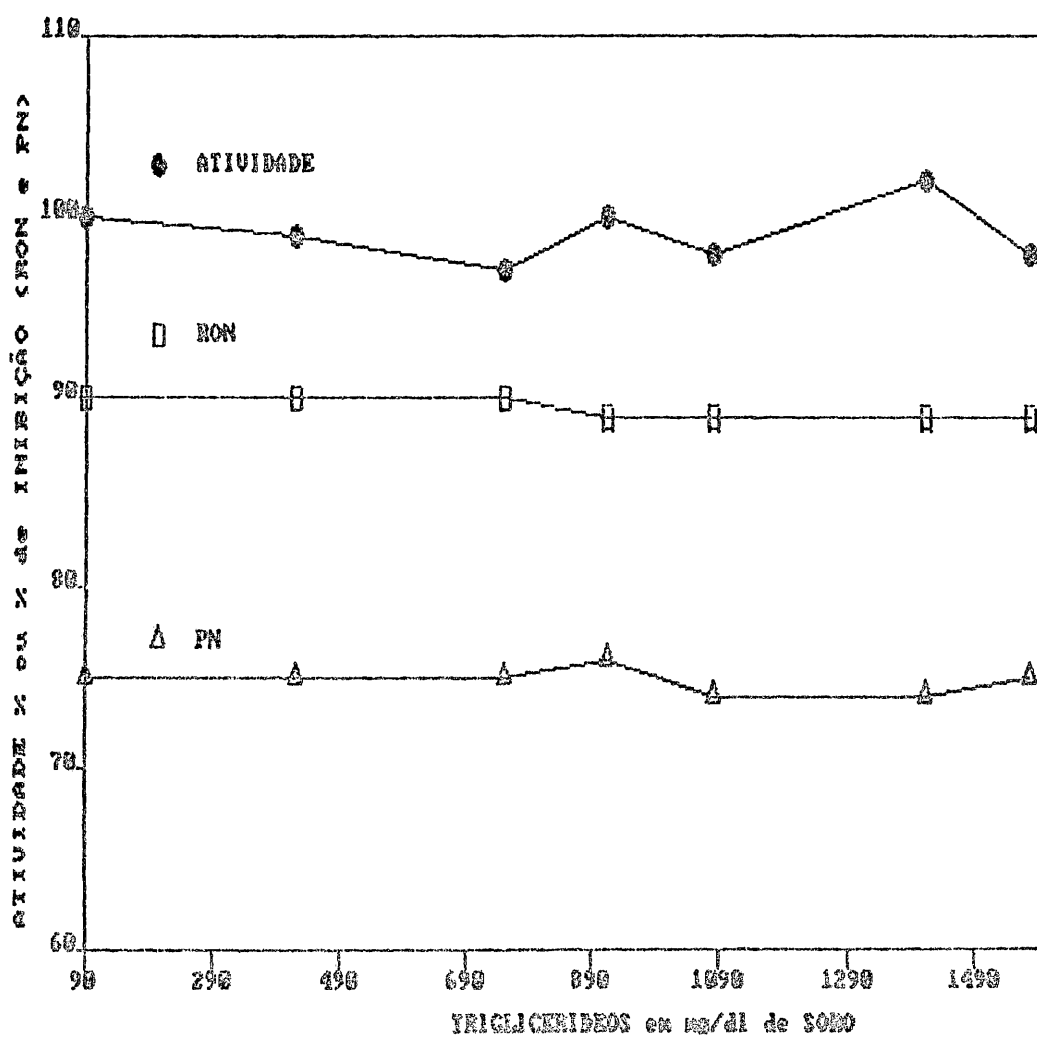


FIGURA 35. EFEITO DA LIPEMIA SOBRE A ATIVIDADE E PERFIS DE INIBIÇÃO DA CHE.

A atividade e os perfis de inibição com RO2-0683 (RON) e DL-propranolol (PN) foram observados na ausência e na presença de lipemia conforme item 2.14 de Materiais e Métodos. Para a atividade os controles isentos de lipemia foram considerados 100%.

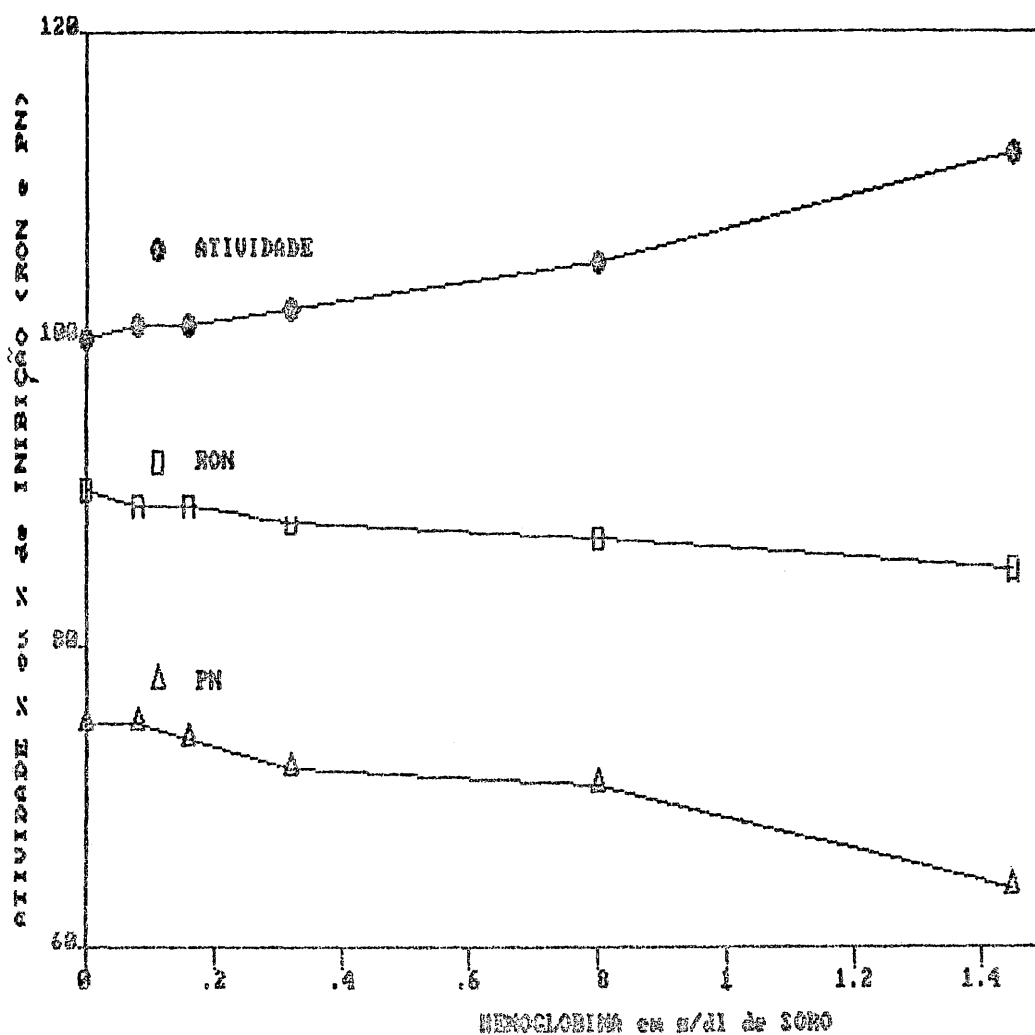


FIGURA 36. EFEITO DA HEMÓLISE SOBRE A ATIVIDADE E PERFIS DE INIBIÇÃO DA Che.

Hemoglobina em concentrações de 0,08 a 1,45g/dl simulando hemólises de 0,24 a 4,44% do volume globular foi adicionado ao pool, sendo este ensaiado para atividade e fenotipagem conforme item 2.15 de Materiais e Métodos. Os valores obtidos para atividade foram expressos em termos de percentagem em relação a controles isentos de hemoglobina, ensaiados nas mesmas condições e considerados com atividade de 100%

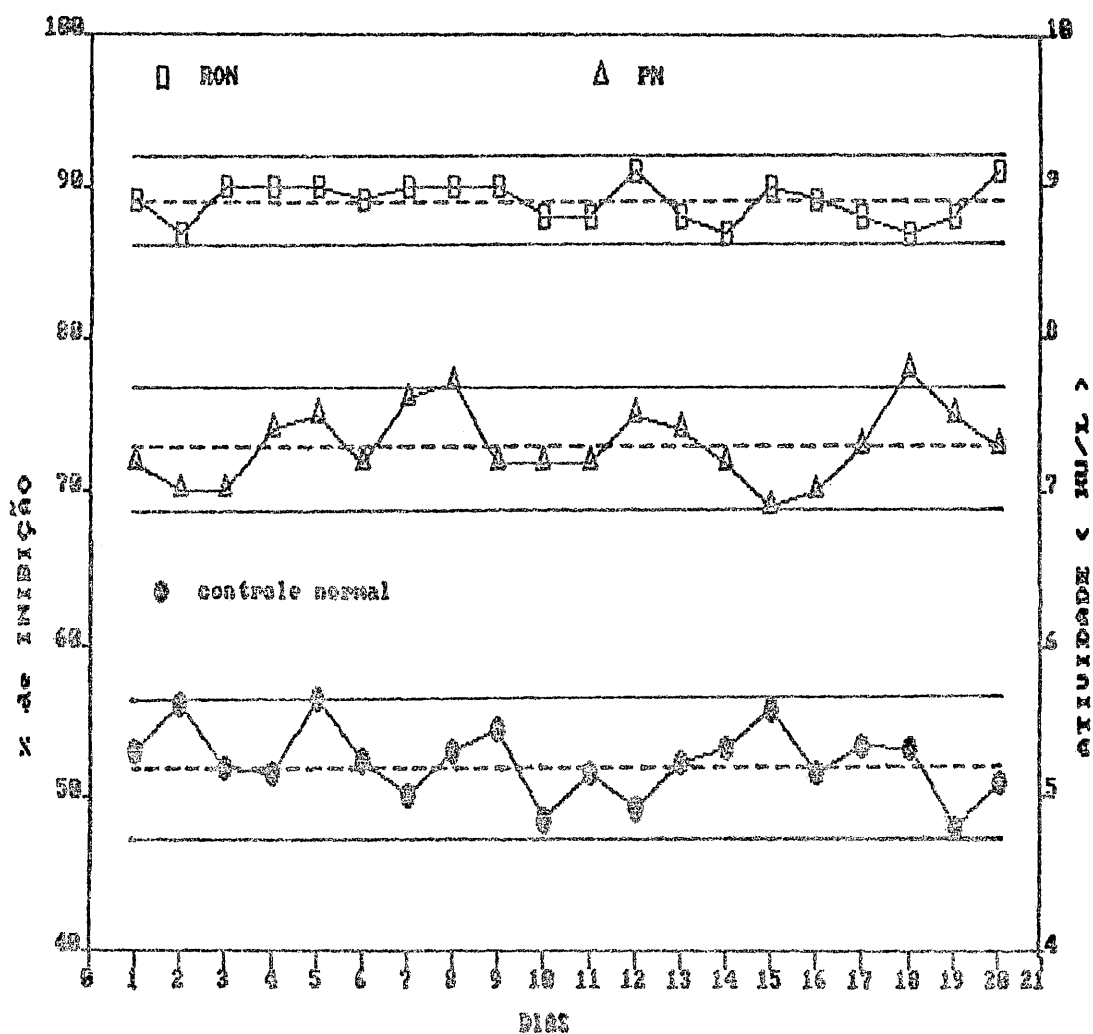


FIGURA 37. GRAFICO DE CONTROLE DE QUALIDADE PARA ATIVIDADE E PERFS DE INIBIÇÃO.

O pool foi utilizado como controle de qualidade para atividade a nível normal e para os perfis de inibição com RQ2-0683 (RON) e DL-propranolol (PN) conforme descrito no item 2.17 de Materiais e Métodos. As linhas cheias para os controles representam dois desvios padrões da média, a qual está representada pela linha tracejada.

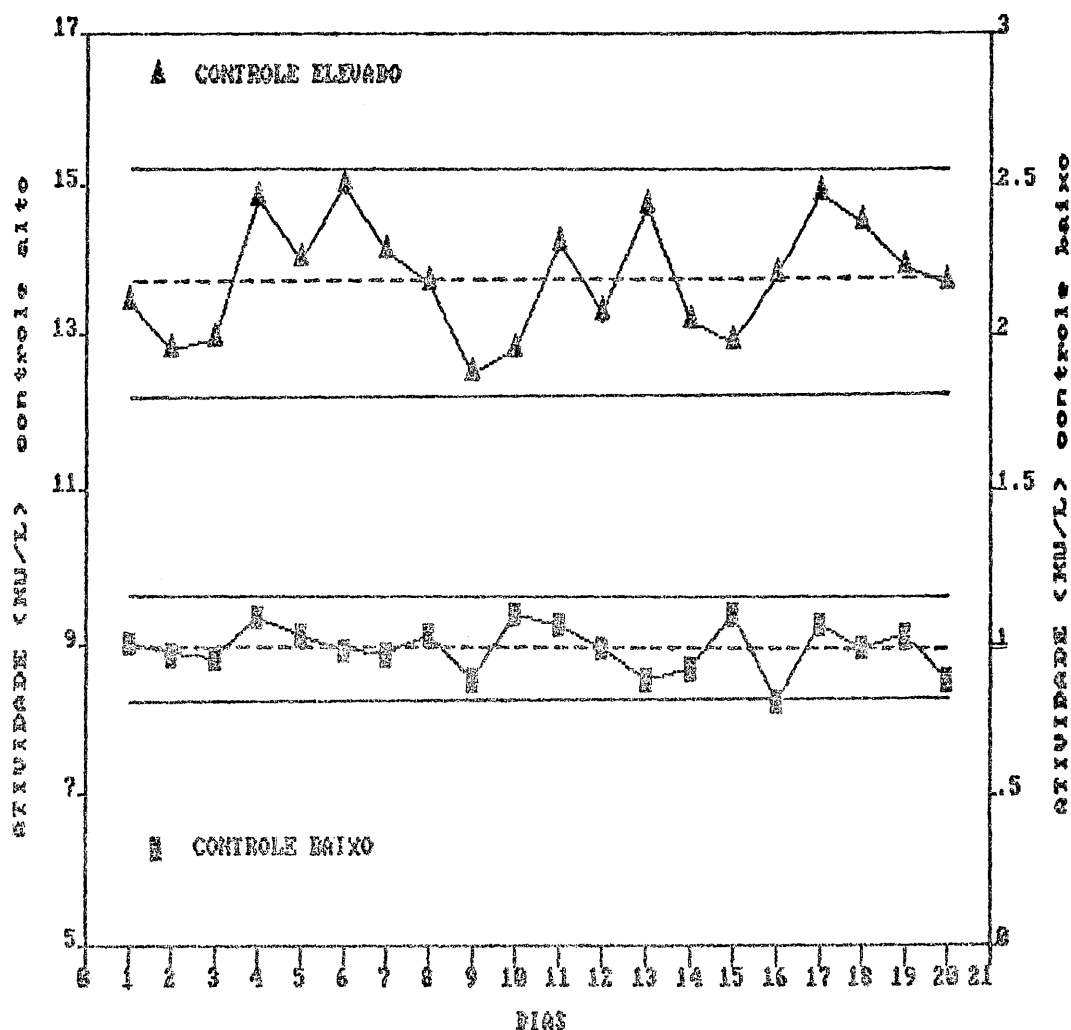


FIGURA 38. GRÁFICO DE CONTROLE DE QUALIDADE PARA ATIVIDADE BAIXA E ELEVADA.

Soros preparados para simular atividade altas e baixas da colinesterase foram utilizados como controle de qualidade conforme item 2.17 de Materiais e Métodos. As linhas cheias para os controles representam dois desvios padrões da média, a qual está representada pela linha tracejada.

4 DISCUSSÃO

Uma variedade de metodologias estão descritas para a determinação da atividade da colinesterase sérica, bem como para a classificação fenotípica, empregando inibidores diferenciais.

A benzoilcolina (35, 143) tem sido utilizada pela maioria dos autores como referência, sendo o substrato que melhor se adapta às medidas de atividade e inibição. No entanto, a metodologia de dosagem não é acessível à maioria dos laboratórios, requerendo equipamento sofisticado, e um controle muito acurado na execução, para que os resultados sejam confiáveis.

Os ésteres tiocolínicos, capazes de promover uma reação rápida com detecção muito sensível quando associados ao DTNB, são utilizados pela maioria dos laboratórios clínicos. A possibilidade de dosagem em concentrações elevadas de substrato e um grau de discriminação dos fenótipos de risco pela atividade são os motivos de sua preferência. No entanto, quando associados a inibidores não produzem discriminações acuradas dos fenótipos.

Decidimos portanto, estudar e otimizar dois tipos de procedimentos: um para a fenotipagem e outro para a atividade da ChE.

Para a fenotipagem, a escolha recaiu no método de Morrow e Motulsky (99), devido à separação nítida dos fenótipos, simplicidade de execução e reprodutibilidade.

Os estudos que desenvolvemos sobre o método de Morrow e Motulsky (99) revelaram como pontos fundamentais a serem otimizados: o tempo de incubação, concentração do cromógeno Fast Red TR e a concentração dos inibidores na reação.

Como não encontramos esses dados na literatura, obtivemos o espectro de absorção do cromógeno (fig. 02) produzido pelo alfa-naftol e Fast Red TR. A absorção máxima obtida foi em 540 nm, diferindo do comprimento de onda utilizado por outros autores (3, 99) que preconizam 555 nm, onde as absorbâncias são cerca de 5% inferiores.

Um dos problemas observados com o método de Morrow e Motulsky (99) foi o desenvolvimento de coloração diferente da usual, quando soros de atividade elevada eram ensaiados. Uma curva de concentração de alfa-naftol (tab. IV) demonstrou que tal alteração era devida a uma concentração insuficiente de Fast Red TR em relação ao alfa-naftol presente no meio. Tal deficiência foi corrigida pelo incremento de 30% na concentração do cromógeno Fast Red TR, em relação ao originalmente descrito ($7,7 \times 10^{-4} M$). Concentrações superiores de cromógeno se mostraram desnecessárias pois não ampliam a linearidade dentro da faixa de sensibilidade do espectrofotômetro. Esta modificação propiciou maior praticidade na metodologia, evitando constantes repetições e principalmente eliminando erros grosseiros nos resultados quando as alterações no padrão da coloração não eram detectadas pelo analista.

O corante Fast Red TR, em duponal, mostrou capacidade cromogênica variável conforme o tempo de preparo. Sanford e Harris (9) recomendam prepará-lo imediatamente antes do uso, enquanto Morrow e Motulsky (99) preconizam uma estabilidade de várias horas. Nossos dados (fig. 3) demonstraram que a solução pode ser utilizada até 2 horas após o preparo, quando sua capacidade cromogênica decresce apenas cerca de 5%. Confirmamos ainda, as observações de Morrow e Motulsky (99) que caracterizam a estabilidade para o complexo colorido dentro de 10 a 60 minutos após a adição do cromógeno à mistura de incubação. Este é o tempo ideal dentro do qual se deve proceder a leitura espectrofotométrica. Durante o trabalho utili-

zamos um tubo contendo alfa-naftol $7 \times 10^{-5} M$ em cada bateria ensaiada, como controle de qualidade do cromógeno. Este procedimento foi particularmente útil, demonstrando ser o Fast Red TR um composto muito sensível à luz e à hidratação, deteriorando-se facilmente. Outra característica desfavorável do método de Morrow e Motulsky (99) é o prolongado tempo de incubação de 60 minutos. Objetivando reduzi-lo, observamos o efeito do tempo de incubação sobre a linearidade da reação em várias concentrações de enzima (fig. 4). Decidimos utilizar 5 μl de soro incubados por 25 minutos, composição que permitiu reduzir em 60% o tempo de incubação, mantendo a absorbância similar (cerca de 0,8) à encontrada no método original. A obtenção de absorbâncias desta magnitude para os tubos sem inibidor é necessária. Se os valores forem muito baixos, se produzirá erro na medição espectrofotométrica nos tubos onde a enzima apresentar inibição acentuada.

Os valores de K_M e V_{max} estimados para esta metodologia (fig 5 e tab V) foram similares aos observados por Bamford e Harris (9). Embora ensaiados em diferentes condições, confirmam uma afinidade um pouco superior para o fenótipo A em relação ao fenótipo U, resultado não encontrado por Magna (88). Os valores de K_M são superiores à concentração de alfa-naftilacetato de $2,3 \times 10^{-4} M$ presentes na mistura de incubação. A elevação na concentração do substrato para níveis saturantes, foi limitada pela baixa solubilidade deste em solução aquosa. As concentrações do substrato mais elevadas, já descritas anteriormente, como $5,4 \times 10^{-4} M$ (9) e $2 \times 10^{-3} M$ (88), não se mostraram adequadas nas condições de ensaio, prejudicando a fenotipagem. Decidimos, portanto, manter a concentração de substrato basicamente inalterada em relação à descrita originalmente.

Estabelecidas as condições fundamentais de ensaio, estudamos as concentrações de inibidores, que produzissem a melhor separação fenotípica.

Estudos anteriores (9, 88, 99) demonstraram que a utilização de apenas um inibidor foi incapaz de separação nítida, sem sobreposição do fenótipo UF. Portanto, a escolha da concentração dos inibidores foi realizada de modo que a análise conjunta de dois perfis de inibição diferentes possibilitasse a separação dos fenótipos.

A estratégia, que mostrou melhor resultado, foi utilizar DL-propranolol a 10^{-5} M (fig. 6), onde as inibições dos fenótipos UF e UA estão mais próximas, contrapondo-as com RO2-0683 $3,7 \times 10^{-7}$ M (fig. 7) ou dibucaína 10^{-4} M (fig. 9) onde a inibição do fenótipo UF se aproxima à do fenótipo U.

Vários autores (37, 81, 144) recomendam pré-incubar o inibidor RO2-0683 por 2 horas com o soro, de forma a obter melhores separações fenotípicas. Em nossas condições de ensaio a pré-incubação (fig. 8) não se mostrou vantajosa, ao contrário resultou na perda da discriminação entre os fenótipos U e UF. Os carbamatos, grupo a que pertence o RO2-0683, inibem a ChE de forma lenta e reversível, sendo portanto o tempo de contato com o inibidor fator importante para o grau de inibição (80). Isto poderia justificar um dos fatores pelos quais Morrow e Motulsky não identificaram o fenótipo UF, enquanto nós o fizemos com a modificação da metodologia. Os dados da dispersão dos fenótipos (tab VI) mostraram que a utilização de apenas um inibidor, RO2-0683 ou DL-propranolol, permite sugerir a presença do fenótipo UF. Esta observação nos levou a estudar o efeito do tempo de incubação sobre os perfis de inibição nas condições previamente estabelecidas.

O RO2-0683 (fig. 10) confirmou a perda de discriminação entre os fenótipos U e UF com 60 minutos de incubação,

justificando o porquê Morrow e Motulsky (99) e Alcântara (3), que utilizam este tempo de reação, foram incapazes de discernir estes fenótipos com apenas este inibidor. No entanto, a discriminação dos fenótipos foi estável entre 25 e 40 minutos de incubação. Ao contrário, o DL-propranolol, também um inibidor competitivo, conforme Whittaker e Britten (146) mostrou um perfil de inibição muito pouco influenciado pelo tempo (fig. 11). As características dos inibidores RO2-0683 e DL-propranolol em não alterarem os perfis de inibição de modo significativo, em tempos de incubação próximos ao recomendado (25 minutos) evita a necessidade de um controle rígido do tempo, proporcionando uma útil flexibilidade ao analista.

A temperatura da reação e sua rígida manutenção tem demonstrado para alguns inibidores da ChE, como o fluoreto de sódio, ser de fundamental importância para a obtenção de inibições reproduzíveis e discriminatórias (67, 68,69). Em nossas condições de ensaio o RO2-0683 (fig. 12) mostrou-se pouco influenciado pela temperatura na discriminação dos fenótipos e não alterou os perfis de inibição de modo significativo entre 30 e 37°C. Com DL-propranolol a afinidade pelo inibidor decresceu com o aumento de temperatura, embora sem alterações significativas entre 30 e 37°C. O fenótipo UF com este inibidor mostrou maior discriminação em temperaturas de 21°C, da mesma forma que quando o fluoreto de sódio é utilizado como inibidor (69). Os dados obtidos com RO2-0683 e DL-propranolol mostraram que nas condições de ensaio propostas, a temperatura não é crítica, o que elimina a necessidade de sofisticados sistemas de termostatização.

Testamos a seguir, a metodologia desenvolvida, frente a uma bateria de soros de fenótipos conhecidos. A distribuição dos perfis de inibição quando DL-propranolol foi lançado contra RO2-0683 (fig. 14) permitiu nítida separação dos fenó-

tipos estudados. A substituição de R02-0683 por dibucaína (fig. 15), embora também discrimine os fenótipos, foi de menor resolução.

A identificação das variantes J, K e H quando em heterozigose com a variante A pode ser viável com esta metodologia. Teorizamos que estes alelos relacionados à menor produção da enzima usual, quando em heterozigose com o alelo A, condicionem inibições que se distribuam em sequência linear, entre as inibições dos fenótipos UA e A, observadas na figura 14. Os perfis de inibição produzidos por misturas de enzimas A e U (fig 16) reforçam esta possibilidade.

Como a metodologia clássica descrita na literatura (54, 65, 141) recomenda benzoilcolina como substrato para identificar os fenótipos, decidimos comparar a qualidade das separações fenotípicas obtidas com este substrato com as do método modificado. As mesmas amostras utilizadas no método modificado foram ensaiadas com benzoilcolina.

Os inibidores R02-0683, DL-propranolol e dibucaína, associados de forma idêntica à anteriormente descrita (figs. 17 e 18), mostraram uma difícil identificação do fenótipo UF, enquanto o heterozigoto UA apresentou resultados com maior dispersão em relação aos encontrados em nosso método.

Não conseguimos identificar o fenótipo UF, quando dibucaína e fluoreto de sódio (fig 19), inibidores classicamente citados na literatura, foram utilizados. Estes dados enfatizam a dificuldade nos procedimentos onde a benzoilcolina é associada a inibidores, para discriminação dos fenótipos, situação já ressaltada em vários trabalhos (1, 35, 66, 117).

A discriminação dos fenótipos com o método modificado foi superior à de outros métodos que utilizam o mesmo substrato como Morrow e Motulsky (99), Magna (88) e Zapf e Coghlan (152), os quais também são incapazes de identificar o fenóti-

po UF.

As modificações que inserimos, na técnica originalmente proposta por Morrow e Motulsky (99), resultaram em um método com boa reprodutibilidade para os perfis de inibição (tab. VII), discriminação mais acurada que outros métodos para os fenótipos e fácil adaptabilidade a laboratórios clínicos e de pesquisa, dispensando equipamentos sofisticados.

No entanto, quando o tubo sem inibidor foi utilizado como medida da atividade (tab. VIII), obtivemos um coeficiente de variação de cerca de 13% o que torna a metodologia inadequada à medida da atividade. Tal variação pode ser atribuída à concentração de substrato sub-saturante e à dificuldade na pipetagem acurada deste, pelas características da solução acetona-água utilizada na sua solubilização.

Iniciamos, portanto, o estudo de outra metodologia que se mostrasse adequada à medida da atividade. Para tal, desenvolvemos estudos sobre aspectos básicos desta metodologia uma vez que estes dados não estão disponíveis na literatura.

O estudo das metodologias que utilizam ésteres tiocolínicos como substratos para medida da atividade tem ressaltado a preferência dos pesquisadores para o emprego da butiriltiocolina pela sua estabilidade em solução e especificidade para ChE. No entanto, demonstrou-se que a propioniltiocolina foi o substrato que melhor discriminou os indivíduos sensíveis à succinilcolina (38), oferecendo melhor informação clínica quando avaliado isoladamente, motivo pelo qual decidimos utilizá-lo.

Com a metodologia proposta por Dietz *et al.* (29), obtivemos um coeficiente de variação de 7,8% (tab VIII), superior aos 3,7% descritos pelos autores e acima do máximo de 4% desejado (20). Além da baixa reprodutibilidade, o método permite identificação fenotípica segura apenas para o fenóti-

po A. Evans e Wroe (38) alteraram a concentração de enzima e a temperatura de reação, propostas por Dietz *et al.* (29), obtendo coeficientes de variação de 4,3% para o método assim modificado. Os valores de 4,4% que encontramos (tab. VIII) estão em concordância com os valores descritos por estes autores e nos estimulou a trabalhar com esta metodologia.

A reduzida estabilidade da propioniltiocolina em solução é uma crítica ao uso deste substrato. Dietz *et al.* (29) recomendam preparar o suficiente para uso diário, enquanto Augustinsson *et al.* (8) descrevem que, em solução aquosa 0,24 M e pH 4,0, a estabilidade é de vários meses. Nossos dados (fig. 20) mostraram que uma solução aquosa 0,1 M de iodeto de propioniltiocolina, cinco vezes mais concentrada que a proposta originalmente por Dietz *et al.*, mostrou boa estabilidade por 30 dias a 4°C, mesmo sem ajuste do pH. Passamos, portanto, a preparar o substrato na forma mais concentrada, mantendo inalterada sua concentração na mistura de incubação. A propioniltiocolina mantida a -20°C por um ano, sofrendo mais de 20 ciclos de congelamento/descongelamento, forneceu resultados compatíveis com aquela recém-preparada.

A metodologia proposta por Evans e Wroe (38) mostrou que é capaz de medir atividades até 14 KU/l. Assim, afinidades superiores a 2,6 vezes a média da população, podem ser determinadas sem alteração na metodologia (fig 21)

Para atividades baixas, o método foi capaz de detectar com precisão até 0,51 KU/l (fig 22). A capacidade discriminatória pode ser muito aumentada, pela elevação do volume de amostra até 200 μ l na reação, o que corresponde a 80 vezes o volume usual de ensaio. Neste caso é necessário pré-incubar a amostra com o tampão contendo DTNB, deixando reagir os grupos tídiis livres no soro, antes de adicionar o substrato (25). Outra possibilidade seria elevar a temperatura de reação.

A reação a 25°C permite que nove leituras possam ser tomadas a intervalos de um minuto (fig. 23), quando se desejar um aumento na acurácia para os cálculos da atividade, sem exceder a capacidade do espectrofotômetro.

A concentração de substrato na reação de $2 \times 10^{-3} M$, é superior ao K_M do fenótipo U, porém quase idêntico ao K_M do fenótipo A (fig. 24 e tab. V). Estes dados, bem compatíveis com os de Davies et al. (27) caracterizam a menor afinidade da variante A, justificando a capacidade discriminatória da propioniltiocolina. Concentrações de substrato de $10^{-2} M$, cerca de dez vezes o K_M para o fenótipo usual, ainda não se mostraram completamente saturantes (fig. 24 inset). A discriminação dos fenótipos A e U pela atividade também não se alterou com o incremento de substrato. Estes dados nos levaram a não propor alterações na concentração deste, por entendermos não haver vantagens para tal.

Garry (43) descreveu um efeito inibitório diferencial entre os fenótipos A e U, à medida que a concentração de fosfato se eleva no meio de reação, utilizando butiriltiocolina como substrato. Este efeito não foi observado em nossas condições de ensaio. Alterações nas concentrações de DTNB e fosfato não mostraram quaisquer vantagens discriminatórias em relação às condições originais de ensaio (fig. 25).

Das e Liddell (25) utilizando butiriltiocolina como substrato e realizando as determinações a 25°C, relataram uma discriminação dos fenótipos com RO2-0683 e dibucaína, superiores aos obtidos por Dietz et al. (29). Esta melhor discriminação a 25°C e a confiabilidade que obtivemos para a medida da atividade estimulou o estudo com inibidores, na tentativa de discriminar as variantes com o mesmo método.

Os perfis de inibição com RO2-0683 e dibucaína (figs. 26, 27) mostraram ser possível a identificação segura apenas

para o fenótipo A. Os fenótipos U e UA, os mais frequentes na população, mostraram uma discriminação pobre, sendo detectadas sobreposições em algumas amostras testadas.

As inibições com DL-propranolol (fig 28) ainda não descritas associadas a ésteres tiocolínicos, bem como à uréia (fig.29), um inibidor mais ativo sobre a variante A, também não se mostraram vantajosas.

Estas observações reforçam a análise de Evans (35), quando este demonstra que substratos que discriminam os fenótipos com base na atividade, como a propioniltiocolina, não se adequam a estudos das características inibitórias.

A necessidade de manter a temperatura em 25°C obriga a utilizar um sistema de termostatização mais acurado. Além disso, as medidas da cinética da reação prendem o analista ao espectrofotômetro durante o ensaio. Estes dois pontos são os principais inconvenientes desta metodologia.

Fatores de capital importância para a obtenção de resultados reproduzíveis são a qualidade da água e a limpeza do material. Embora estas premissas sejam básicas para qualquer determinação enzimática, a ChE se mostrou particularmente sensível a estes fatores. Concordamos com Elejalde *et al.* (31) quando recomendam que a água utilizada em todos os reativos seja destilada, deionizada e fervida por 20 minutos.

Estabelecidos os métodos para determinação da atividade e perfis de inibição, estudamos fatores relativos à amostra e os interferentes usuais observados na rotina.

Em relação à estocagem, o pool de soros, que utilizamos em vários experimentos, não mostrou alteração significativa na atividade ou no perfil de inibição, por um período superior a 18 meses, confirmando a grande estabilidade da ChE a -20°C (132). Após 40 ciclos de congelamento/descongelamento (fig. 30) a enzima perdeu 12% da atividade inicial sem al-

terar os perfis de inibição. Observamos uma maior flutuação na medida da atividade após 20 ciclos de congelamento/descongelamento. Este fato foi atribuído à precipitação de proteínas e ao desenvolvimento microbiano, os quais levaram à formação de grumos e partículas que tornaram menos precisa a tomada de amostra com micropipetas.

A atividade da enzima decresceu 67% na primeira semana de estocagem a 37°C (fig 31). A adição de glicerol ao soro mostrou-se um fator de proteção, recomendando-se seu uso para amostras transportadas em condições muito adversas. Excetuando-se os resultados a -20°C, as análises da estabilidade obtidas a 4, 22 e 37°C mostraram ser a ChE mais sensível à relação temperatura/tempo de estocagem, do que descrito na literatura (13, 29, 62,132, 151). É possível que estes trabalhos tenham sido desenvolvidos em condições de esterilidade na coleta e na manipulação das amostras, preocupação que não tivemos por não serem cuidados usuais na rotina do laboratório.

Os dois principais anticoagulantes utilizados em laboratório clínico, EDTA e heparina, não afetaram a atividade e os perfis de inibição, nas concentrações recomendadas para uso e mesmo em concentrações superiores a estas (fig 32 e 33), com o que concordam Tomita *et al.* (129), embora utilizando metodologia de dosagem diversa. A variante A se mostrou inalterada frente a concentrações cinco vezes superiores às usuais destes anticoagulantes. Amostras de plasma estocadas e submetidas a processos de congelamento/descongelamento, foram precipitados grosseiros de fibrina, prejudicando a acurácia na tomada da amostra, pelo que sugerimos o uso de soro.

A bilirrubinemia, lipemia e hemólise são interferentes reconhecidos em qualquer determinação enzimática sérica. Não obtivemos modificações significativas na atividade ou fenoti-

pagem, mesmo em altas concentrações de bilirrubina (fig 34) e triglicerídeos (fig 35). A elevada atividade da ChE permite ensaios em que as amostras tenham uma diluição muito grande no meio de reação, minimizando os efeitos da coloração produzida pela bilirrubina e a turbidez provocada pelos triglicerídeos, mesmo em altas concentrações de ambos.

Um soro mostra hemólise visível quando a concentração de hemoglobina excede a 0,02 g/dl (122). Nossos dados mostram que uma concentração de hemoglobina de 0,32g/dl de soro, simulando uma lise de 1% dos eritrócitos no sangue, não alterou a atividade ou a fenotipagem da amostra (fig 36). Modificações significativas nos resultados ocorreram com lise superior a 2%, situação incomum na rotina. A hemólise moderada não interfere com o uso da propioniltiocolina desde que a amostra seja bem centrifugada para retirar os restos eritrocitários e com eles a AChE fixada no estroma (29). A velocidade de hidrólise quase duas vezes superior para ChE em relação à AChE com propioniltiocolina (4), também contribui para a menor interferência da hemólise.

Morrow e Motulsky (99) rejeitam amostras hemolisadas, com o uso de alfa-naftilacetato e RO2-0683 para a fenotipagem. Embora estes autores não mencionem o grau de hemólise, nossos dados apóiam as observações de Zapf e Coghlan (152) que também não obtiveram interferência com este substrato em hemólises moderadas.

A metodologia com propioniltiocolina confirmou, em estudos de uma população supostamente sadia, a ampla distribuição da atividade da ChE e o incremento desta nos indivíduos que apresentaram a isoenzima C5 (tab. VII). Arbitariamente alguns autores (29, 95) propuseram uma linha divisória entre os indivíduos sensíveis daqueles insensíveis aos efeitos da ação prolongada da succinilcolina. Este valor foi caracteri-

zado como a atividade obtida para ChE, considerando-se 2,5 desvios padrões abaixo da média de uma população considerada homocigota para a variante U. Evans e Wroe (38), estudando casos de apnéia prolongada com succinilcolina, confirmaram a sensibilidade deste valor para a linha divisória e propuseram como valor limítrofe a atividade de 1,68 KU/l. Para a população que estudamos, o valor médio encontrado foi 2,15 KU/l, significativamente superior àquele descrito por Evans e Wroe, embora os desvios padrões sejam semelhantes. Esta diferença poderia ser explicada pela presença de alta frequência de soros lipêmicos em nossa amostra, os quais mostraram possuir atividade média superior a soros não lipêmicos, o que elevaria a média da população. Observamos no curso do trabalho, que a amostra diluída, mantida na ausência de substrato, apresenta graus variados de inibição em estreita correlação com a qualidade da água utilizada no preparo dos reativos e na diluição da amostra. Caso Evans e Wroe não atentassem para este fato, tal achado poderia justificar o menor valor encontrado por estes autores em relação a nossos dados.

A necessidade de boa reprodutibilidade na metodologia (20) torna imperiosa a utilização de um sistema de controle de qualidade. O estudo que realizamos sobre a metodologia com alfa-naftilacetato e propioniltiocolina foi o passo fundamental para o controle do procedimento. A estabilidade da enzima a -20°C permitiu que um pool de soros, estocado em alíquotas nesta temperatura, fosse usado em cada experimento como controle. O lançamento dos valores obtidos para atividade e perfis de inibição com R02-0683 e DL-propranolol em gráficos de controle (98) mostrou rápida visualização das variações, confirmando a eficiência do processo em detectar erros e monitorar a reprodutibilidade do ensaio. Um exemplo do gráfico de controle pode ser observado na figura 37, na qual

consideramos como limites extremos para o controle, dois desvios padrões acima e abaixo da média. A utilização de soros com atividades artificialmente baixas e elevadas, permitiu controlar a metodologia em seus limites extremos de confiabilidade, regiões de maior interesse clínico (fig. 38).

O estudo e as modificações que implantamos, nas metodologias com propioniltiocolina e alfa-naftilacetato, permitem medidas de atividade e fenotipagem rápidas, reprodutíveis e adequadas à rotina de laboratórios clínicos e de pesquisa não sofisticados.

O passo seguinte deverá ser o estabelecimento de um intercâmbio, com trocas de amostras com outros laboratórios, caracterizando um programa de controle de qualidade externo, fundamental ao desenvolvimento das pesquisas.

5 CONCLUSÕES

1. A metodologia proposta, utilizando alfa-naftilacetato associado aos inibidores R02-0683 e di-propranolol, permitiu a identificação dos fenótipos CHE1 U, CHE1 UF, CHE1 UA e CHE1 A, com boa reprodutibilidade, simplicidade de execução e melhor discriminação quando comparada a outras metodologias disponíveis.

2. A metodologia proposta por Evans e Wroe utilizando propioniltiocolina a 25°C mostrou-se adequada à medida da atividade e recomendamos o procedimento para uso clínico.

3. As metodologias estudadas não sofreram influência dos anticoagulantes EDTA e heparina, bem como da bilirrubinemia, lipemia e hemólise moderada.

4. A colinesterase sérica é estável no mínimo 18 meses estocada a -20°C, permitindo que uma amostra, mantida em alíquotas, seja utilizada como controle de qualidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ABERNETHY, M.H.; GEORGE, P.M.; HERRON, J.L. e EVANS, R.T. Plasma cholinesterase phenotyping with use of visible-region spectrophotometry. Clin. Chem., 32:194-197, 1986.
- 2 AGARWAL, D.P.; SRIVASTAVA, L.M. e GOEDDE, H.W. A note on suxamethonium sensitivity and serum cholinesterase variants. Hum. Genet., 32:85-88, 1976.
- 3 ALCANTARA, V.M. Fenótipos CHE1 UF e CHE1 AK em amostras de brancos e negróides de Curitiba. Curitiba, 1989. 78p. Tese, Nestrado, Universidade Federal do Paraná.
- 4 ALDRIDGE, W.N. The differentiation of true and pseudo cholinesterase by organo-phosphorus compounds. Biochem. J., 53:62-67, 1953.
- 5 ARTISS, J.D., MCGOWAN, M.W.; STRANDBERGH, D.R. e ZAK, B. A procedure for kinetic colorimetric determination of serum cholinesterase activity. Clin. Chim. Acta, 124:141-148, 1982.
- 6 ATACK, J.R.; PERRY, E.K.; BONHAM, J.R. e PERRY, R.H. Molecular forms of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in human plasma and cerebrospinal fluid. J. Neurochem., 48:1845-1849, 1987.
- 7 AUGUSTINSSON, K.B. Cholinesterase and anticholinesterase agents. In: KOELLE, G.B. ed. Handbook of experimental pharmacology. Berlin, Springer-Verlag, 1963. p.89-128.
- 8 AUGUSTINSSON, K.B.; ERIKSSON, H. e FAIJERSSON, Y. A new approach to determining cholinesterase activities in sample of whole blood. Clin. Chem. Acta, 89:239-252, 1978.

- 9 BAMFORD, K.F. e HARRIS, H. Studies on "usual" and "atypical" serum cholinesterase using alpha-naphtylacetate as substrate. Ann. Hum. Genet. 27:417-425, 1964.

- 10 BEREND, F.; POSTHUMUS, C.H.; SLUYS, I.V.D. e DEIERKAUF, F.A. The chemical basis of the "ageing process" of DFP-inhibited pseudochoolinesterase. Biochem. Biophys. Acta, 34:576-578, 1959.

- 11 BERGMEYER, H.U. Determination of the catalytic activity of enzymes. In: BERGMEYER, H.U. ed. Methods of enzymatic analysis. 3.ed. Weinheim, Verlag Chemie, 1983. V.1, p.104-108.

- 12 BRIMIJOIN, S.; NINITZ, K.P. e ALLEY, M.C. Production and characterization of separate monoclonal antibodies to human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. Mol. Pharmacol., 24:513-520, 1983.

- 13 BROWN, S.S.; KALOW, W.; PILZ, W.; WHITTAKER, M. e WORONICK, C.L. The plasma cholinesterases: a new perspective. Adv. Clin. Chem., 22:1-122, 1981.

- 14 BROWN, S.S. e PRICE, E.M. Criticism of a selected method: propionylthiocholinesterase. Clin. Chem., 21:1041-1042, 1975.

- 15 CAUET, G.; FRIBOULET, A e THOMAS, D. Horse serum butyrylcholinesterase kinetics: a molecular mechanism based on inhibition studies with dansylaminoethyltrimethylammonium. Biochem. Cell. Biol., 65:529-535, 1987.

- 16 CESTARIC, E.S. Clinical enzymology. In: HENRY, J.B. ed. American Society of Clinical Pathologists Commission on Continuing Education - Pre-workshop manual. Chigago, 1964. p.71-88.

- 17 CHATONNET, A. e LOCKRIDGE, O. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. Biochem. J., 260:625-634, 1989.

- 18 CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Relação entre os fenótipos do loco CHE2 da colinesterase do soro e o peso individual em duas amostras do sul do Brasil. Curitiba, 1989. 125p. Tese, Professor Titular, Universidade Federal do Paraná.
- 19 CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.; LOURENÇO, M.A.C. e JUGEND, R.M. Phenotype frequencies of the CHE2 locus of serum cholinesterase in a sample collected in Curitiba. Rev. Bras. Genet., 4:709-715, 1984.
- 20 CHU, S.Y. Depression of serum cholinesterase. Clin. Biochem., 18:323-326, 1985.
- 21 CIMASONI, G. Inhibition of cholinesterase by fluoride in vitro. Biochem. J., 99:133-137, 1966.
- 22 CUCUIANU, M.; POPESCU, T.A. e HARAGUS, S.T. Pseudocholinesterase in obese and hyperlipemic subjects. Clin. Chim. Acta, 22:151-155, 1968.
- 23 CUCUIANU, M.; OPINCARU, A. e TAPALACK, D. Similar behaviour of lecithin:cholesterol acyltransferase and pseudocholinesterase in liver disease and hyperlipoproteinemia. Clin. Chim. Acta, 85:73-79, 1978.
- 24 DACIE, J.V. e LEWIS, S.M. Hematología práctica. 2.ed. Barcelona, Ediciones Toray, 1970. p.505-506.
- 25 DAS, P.K. e LIDDELL, J. Value of butyrylthiocholine assay for identification of cholinesterase variants. J. Med. Genet., 7:351-355, 1970.
- 26 DAVIES, D.R. e GREEN, A.L. The mechanism of hydrolysis by cholinesterase and related enzymes. Adv. Enzymol., 20:283-318, 1958.

- 27 DAVIES, R.O.; MARTON, A.V. e KALOW, W. The action of the normal and atypical cholinesterase of human serum upon a series of esters of choline. Can. J. Biochem., 38:545-551, 1960.
- 28 DIETZ, A.A.; RUBINSTEIN, H.M.; LUBRANO, T. e HODGES, L.K. Improved method for the differentiation of cholinesterase variants. Amer. J. Hum. Genet., 24:58-64, 1972.
- 29 DIETZ, A.A.; RUBINSTEIN, H.M. e LUBRANO, T. Colorimetric determination of serum cholinesterase and its genetic variants by the propionylthiocholine-dithiobis(nitrobenzoic acid) procedure. Clin. Chem., 19:1309-1313, 1973.
- 30 ECOBICHON, D.J. e KALOW, W. The effects of sialidase on pseudo-cholinesterase types. Can. J. Biochem. Physiol., 41:959-974, 1963.
- 31 ELEJALDE, B.R.; PECK, G. e ELEJALDE, M.M. Determination of cholinesterase and acetylcholinesterase in amniotic fluid. Clin. Genet., 29:196-203, 1986.
- 32 ELLMAN, G.L. Tissue sulfhydryl groups. Arch. Biochem. Biophys., 82:70-77, 1959.
- 33 ELLMAN, G.L.; COURNEY, K.D.; ANDRES, V.Jr. e FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharmacol., 7:88-95, 1961.
- 34 EPSTEIN, H.M.; JARZEMSKY, D.; ZUCKERMAN, L. e VAGNER, P. Plasma cholinesterase activity in bank blood. Anesth. Analg., 59:211-214, 1980.
- 35 EVANS, R.T. Cholinesterase phenotyping: clinical aspects and laboratory applications. Crit. Rev. Clin. Lab. Sci., 23:35-64, 1986.

- 36 EVANS, R.T.; WALKER, A. e BOWNESS, K.M. Improved accuracy of cholinesterase phenotyping after participation in a proficiency survey. Clin. Chem., 33:823-825, 1987.
- 37 EVANS, R.T. e WARDEL, J. On the identification and frequency of the J and K cholinesterase phenotypes in a Caucasian population. J. Med. Genet., 21:99-102, 1984.
- 38 EVANS, R.T. e WROE, J. Is serum cholinesterase activity a predictor of succinylcholine sensitivity? An assessment of four methods. Clin. Chem., 24:1762-1766, 1978.
- 39 EVANS, R.T. e WROE, J. Plasma cholinesterase changes. Anaesthesia, 35:651-655, 1980.
- 40 FAYE, S. e EVANS, R.T. Is succinylidicholine the substrate of choice for the measurement of cholinesterase activity? Clin. Chem., 32:1477-1480, 1986.
- 41 FERRO, A. e MASSON, P. Kinetic evidence for thermally induced conformational change of butyrylcholinesterase. Biochem. Biophys. Acta, 916:193-199, 1987.
- 42 FRIEDMAN, R.B.; ANDERSON, R.E.; ENTINE, S.M. e HIRSHBERG, S.B. Effects of diseases on clinical laboratory tests. Clin. Chem., 26:213D, 1980.
- 43 GARRY, P.J. Serum cholinesterase variants: examination of several differential inhibitors, salts and buffers used to measure enzyme activity. Clin. Chem., 17:183-191, 1971.
- 44 GARRY, P.J.; DIETZ, A.A.; LUBRANO, T.; FORD, P.C.; JAMES, K. e RUBINSTEIN, H.M. New allele at cholinesterase locus 1. J. Med. Genet., 13:38-42, 1976.

- 45 GARRY, P.J.; OWEN, G.M. e LUBIN, A.H. Identification of serum cholinesterase fluoride variants by differential inhibition in tris and phosphate buffers. Clin. Chem., 18:105-109, 1972.
- 46 GARRY, P.J. e ROUTH, J.I. A micro method for the serum cholinesterase. Clin. Chem., 11:91-96, 1965.
- 47 GIBLETT, E.R. Genetic Markers in Human Blood. Oxford, Blackwell Scientific, 1969. p.192-225.
- 48 GOEDDE, H.W.; GEHRING, D. e HOFMANN, R.A. On the problem of a "silent gene" in pseudocholinesterase polymorphism. Biochim. Biophys. Acta, 107:391-393, 1965.
- 49 GOMORI, G. Human esterases. J. Lab. Clin. Med., 42:445-453, 1953.
- 50 GUILBAULT, G.G. e IWASE, A. Assay of cholinesterase in an electrode system with an immobilized substrate. Anal. Chim. Acta, 85:295-300, 1976.
- 51 HANEL, H.K. e MOGENSEN, J.V. Urea inhibition of human pseudocholinesterase. Brit. J. Anaesth., 43:51-53, 1971.
- 52 HARRIS, H.; HOPKINSON, D.A. e ROBSON, E.B. Two-dimensional electrophoresis of pseudocholinesterase components in human serum. Nature, 196:1226-1228, 1962.
- 53 HARRIS, H. e ROBSON, E.B. Screening tests for the "atypical" and "intermediate" serum-cholinesterase types. Lancet, 2:218-221, 1963.

- 54 HARRIS, H. e WHITTAKER, H. Differential inhibition of human serum cholinesterase with fluoride: recognition of two new phenotypes. Nature, 191:496-498, 1961.
- 55 HAUPT, H.; HEIDE, K.; ZWISLER, O. e SCHWICK, H.G. Isolierung und physikalischchemische charakterisierung der cholinesterase aus humanserum. Blut, 14:65-75, 1966.
- 56 HOOVER, D.B.; KOSA, J.; COLASANTI, B.K. e CRAIG, C.R. A modified assay for cholinesterase. Microchem. J., 21:267-271, 1976.
- 57 HOXTER, G. Suggested isosbestic wavelength calibration in clinical analysis. Clin. Chem., 29:1031-1033, 1983.
- 58 HUIZENGA, J.R.; VAN DER BELT, K. E GIPS, C.H. The effect of storage at different temperatures on cholinesterase activity in human serum. J. Clin. Chem. Biochem., 23:283-285, 1985.
- 59 INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY. Enzyme nomenclature recommendations (1978) of the International Union of Biochemistry. Academic Press, 1979. p.84-85.
- 60 JAIN, R.; KUTTY, K.M.; HUANG, S. e KEAN, K. Pseudocholinesterase/high density lipoprotein cholesterol ratio in serum of normal persons and hyperlipoproteinemics. Clin. Chem., 29:1031-1033, 1983.
- 61 JANSZ, H.S.; BRONS, D. e WARRINGA, M.G.P.J. Chemical nature of the DFP-binding site of pseudocholinesterase. Biochim. Biophys. Acta, 34:573-575, 1959.
- 62 JOHNSTON, D.G. e HUFF, W.C. Stability of cholinesterase in frozen plasma. Clin. Chem., 11:729-732, 1965.
- 63 JUUL, P. Human plasma cholinesterase isoenzymes. Clin. Chem. Acta, 19:205-208, 1968.

- 64 KALOW, W. e DAVIES, R.O. The activity of various esterase inhibitors towards atypical human serum cholinesterase. Biochem. Pharmacol., 1:183-192, 1958.
- 65 KALOW, W. E 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.
- 66 KALOW, W. e 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.
- 67 KING, J. e DIXON, R.I. A source of error in the determination of inhibitor constants of serum cholinesterase. Brit. J. Anaesth., 42:698-701, 1970.
- 68 KING, J.; McQUEEN, M.J. e MORGAN, H.G. The effect of temperature on fluoride-resistant serum cholinesterase. Brit. J. Anaesth., 43:669-672, 1971.
- 69 KING, J. e MORGAN, H.G. The temperature activity relationships of serum cholinesterases. J. Clin. Path., 23:730-732, 1970.
- 70 KRAUSE, A.; LANE, A.B. e JENKINS, T. A new high activity plasma cholinesterase variant. J. Med. Genet., 25:677-681, 1988.
- 71 KUNEC-VAJIC, E.; BRADAMANTE, V. e VROIC, B. The effect of local anaesthetics and pnenothizine derivatives on cholinesterase, investigated by a chemiluminescence method. Acta Pharm. Jugosl., 35:133-136, 1985.

- 72 KUTTY, K.M. Biological function of cholinesterase. Clin. Biochem., 13:239-243, 1980.
- 73 KUTTY, K.M.; REDHEENDRAN, R. e MURPHY, D. Serum cholinesterase: function in lipoprotein metabolism. Experientia, 33:420-421, 1977.
- 74 KUTTY, K.M.; ROWDEN, G. e COX, A.R. Interrelationship between serum β -lipoprotein and cholinesterase. Can. J. Biochem., 51:883-887, 1973.
- 75 LABTEST. Sistemas para diagnósticos. Belo Horizonte, 1988. 87p.
- 76 LA DU, B.N. e LOCKDRIDGE, D. Molecular biology of human serum cholinesterase. Federation Proc., 45:2965-2968, 1986.
- 77 LA MOTTA, R.V.; McCOMB, R.B.; NOLL, C.R.; WETSTONE, H.J. e REINFRANK, R.F. Multiple forms of serum cholinesterases. Arch. Biochem. Biophys., 124:299-305, 1968.
- 78 LA MOTTA, R.V.; WORONICK, C.L. e REINFRANK, R.F. Multiple forms of serum cholinesterase: molecular weights of the isoenzymes. Arch. Biochem. Biophys., 136:448-451, 1970.
- 79 LA MOTTA, R.V. e WORONICK, C.L. Molecular heterogeneity of human serum cholinesterase. Clin. Chem., 17:135-144, 1971.
- 80 LARINI, L. Toxicologia dos inseticidas. São Paulo, Sarvier, 1979. p.51-71.
- 81 LIDDELL, J.; NEUMAN, G.E. e BROWN, D.F. A pseudo-cholinesterase variants in human tissues. Nature, 198:1090-1091, 1963.

- 82 LIDDELL, J.; LEHMANN, H. e SILK, E. A "silent" pseudochoolinesterase gene. Nature, 193:561-562, 1962.
- 83 LOCKRIDGE, O.; ADKINS, S. e LA DU, B. Location of disulfide bonds within the sequence of human serum cholinesterase. J. Biol. Chem., 262:12945-12952, 1987.
- 84 LOCKRIDGE, O.; BARTELS, C.F.; VAUGHAN, T.A.; WONG, C.K.; NORTON, S.E. e JOHNSON, L.L. Complete amino acid sequence of human serum cholinesterase. J. Biol. Chem., 262:549-557, 1987.
- 85 LOCKRIDGE, O.; ECKERSON, H.W. e LA DU, B.N. Interchain disulfide bonds and subunit organization in human serum cholinesterase. J. Biol. Chem., 254:8324-8330, 1979.
- 86 LOCKRIDGE, O. e LA DU, B.N. Loss of the interchain disulfide peptide and dissociation of the tetramer following limited proteolyses of native human serum cholinesterase. J. Biol. Chem., 257:12012-12018, 1982.
- 87 LOCKRIDGE, O. e LA DU, B.N. Amino acid sequence of the active site of human serum cholinesterase from usual, atypical and atypical-silent genotypes. Biochem. Genet., 24:485-498, 1986.
- 88 MAGNA, L.A. A practical method for screening atypical pseudochoolinesterase. Clin. Chim. Acta, 123:333-338, 1982.
- 89 MAHLER, H.R. e CORDES, E.H. Biological Chemistry. New York, Harper International, 1969. p.237.
- 90 MASSON, P. Formes moleculaires multiples de la butyrylcholinesterase du plasma humain. Biochim. Biophys. Acta, 578:493-504, 1979.

- 91 MASSOULIÉ, J. e BON, S. The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates. Ann. Rev. Neurosci., 5:57-106, 1982.
- 92 Mc GILVERY, R.W., Bioquímica. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 1972. p.106-113.
- 93 Mc GUIRE, M.C.; NOGUEIRA, C.P.; BARTELS, C.F.; LIGHTSTONE, H.; HAJRA, A.; VAN DER SPECK, A.F.L.; LOCKRIDGE, O. e 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.
- 94 Mc LAREN, R.G. e MOFFITT, E.A. Prolonged apnea after succinylcholine in a dental outpatient. Anaesth. Analg., 55:737-739, 1976.
- 95 Mc QUEEN, M.J. Inhibition inversion in the AACC selected method for serum cholinesterase. Clin. Chem., 25:1511-1512, 1979.
- 96 MENDEL, B. e RUDNEY, H. Cholinesterase and pseudo-cholinesterase. Biochem. J., 37:59-63, 1943.
- 97 MICHEL, H.D. An electrometric method for the determination of red blood cell and plasma cholinesterase activity. J. Lab. Clin. Med., 34:1564-1570, 1949.
- 98 MOTTA, V.T. Controle de qualidade no laboratório clínico. Caxias do Sul, Editora da Universidade de Caxias do Sul, 1977. 83p.
- 99 MORROW, A. e MOTULSKY, A.G. Rapid screening method for the common atypical pseudo-cholinesterase variant. J. Lab. Clin. Med., 71:350-356, 1968.

- 100 MUENSCH, H.; GOEDE, H.W. e YOSHIDA, A. Human serum cholinesterase subunits and number of active sites of the major component. Eur. J. Biochem., 70:217-223, 1976.
- 101 NEITLICH, H.W. Increased plasma cholinesterase activity and succinylcholine resistance: a genetic variant. J. Clin. Invest., 45:380-387, 1966.
- 102 O'BRIEN, R.D. Binding sites of cholinesterases - alkylation by aziridium derivative. Biochem. J., 113:713-719, 1969.
- 103 O'FARREL, H.K.; CHATTOPADHYAY, S.K. e BROWN, H.H. Colorimetry of cholinesterase activity in serum. Clin. Chem., 23:1853-1856, 1977.
- 104 OHKAWA, J.; FURUYA, I.; TABATA, S.; SAEKI, S.; OIMOMI, T. e BABA, S. Chemical characterization of C5 cholinesterase isoenzyme. Enzyme. 7^o Intern. Congress on Clinical Enzymology, Osaka, 1988.
- 105 OKABE, H.; SAGESAKA, K.; NAKAJIMA, N. e NOMA, A. New enzymatic assay of cholinesterase activity. Clin. Chim. Acta, 80:87-94, 1977.
- 106 PALMER, T. Understanding enzymes. 2.ed. New York. Ellis Horwood Limited, 1985. p.368.
- 107 PRICE, E.M. e BROWN, S.S. Scope and limitations of propionylthiocholinesterase in the characterization of cholinesterase variants Clin. Biochem., 8:384-390, 1975.
- 108 ROSES, O.E. Plaguicidas organofosforados y colinesterasas. In: Ióvine, E. e Selva, A.A. ed. El Laboratorio en la Clínica. 2.ed. Buenos Aires, Panamericana, 1979. p.1033-1048.

- 109 ROUFOGALIS, B.D. e QUIST, E.E. Relative binding sites of pharmacologically active ligands on bovine erythrocyte acetylcholinesterase. Mol. Pharmacol., 8:41-49, 1972.
- 110 RUBINSTEIN, H.M.; DIETZ, A.A. e LUBRANO, T. E , Another quantitative variant at cholinesterase locus 1. J. Med. Genet., 15:27-29, 1978.
- 111 RUSH, R.S.; RALSTON, J.S. e WOLFE, A.D. Aprophen: a substrate and inhibitor of butyrylcholinesterase and carboxylesterases. Biochem. Pharmac., 34:2063-2068, 1985.
- 112 SCOTT, E.M. e POWERS, R.F. Human serum cholinesterase, a tetramer. Nature New Biol., 236:83-84, 1972.
- 113 SCOTT, E.M. e POWERS, R.F. Properties of the C5 variant form of human serum cholinesterase. Am. J. Hum. Genet., 26:189-194, 1974.
- 114 SCOTT, E.M. e WRIGHT, R.C. A third type of serum cholinesterase deficiency in Eskimos. Am. J. Hum. Genet., 28:253-256, 1976.
- 115 SECEL, I.H. Bioquímica teoria e problemas. Rio de Janeiro, Livros Técnicos e Científicos, 1979. p.287-290.
- 116 SIDELL, F.R. e KAMINSKIS, A. Temporal intrapersonal physiological variability of cholinesterase activity in human plasma and erythrocytes. Clin. Chem., 21:1961-1963, 1975.
- 117 SILK, E.; KING, J. e WHITTAKER, M. Assay of cholinesterase in clinical chemistry. Ann. Clin. Biochem., 16:57-75, 1979.

- 118 SIMPSON, N.E. e ELLIOT, C.R. Cholinesterase Newfoundland: a new succinylcholine-sensitive variant of cholinesterase at locus 1. Am. J. Hum. Genet., 33:366-374, 1981.
- 119 SOMORIN, O. Cholinesterase assay by gas-solid chromatography. Anal. Biochem., 88:442-445, 1978.
- 120 SOMORIN, O. e SKOREPA, J. Aliesterase activity in normal and postheparin human blood sera. J. Biochem., 83:617-623, 1978.
- 121 SOREQ, H.; ZAMIR, R.; ZEWIN-SONKIN, D. e ZAKUT, H. Human cholinesterase genes localized by hybridization to chromosomes 3 and 16. Hum. Genet., 77:325-328, 1987.
- 122 STATLAND, B.E. e WINKEL, P. Source of variation in laboratory measurements. IN: HENRY, J.B. ed. Clinical diagnosis an management by laboratory methods. 16.ed. Philadelphia, W.B. Saunders, 1979. v.1, p.13-16.
- 123 STEDMAN, E., STEDMAN, E. e EASSON, L.H. Cholinesterase. An enzyme present in the blood-serum of the horse. Biochem. J., 26:2056-2065, 1932.
- 124 STRYER, L. Biochemistry. 3.ed. New York, W.H. Freeman, 1988. p.220-228.
- 125 _____. Biochemistry. 3.ed. New York, W.H. Freeman, 1988. p.1021-1025.
- 126 SWIFT, M.R. e LA DU, B.N. A rapid screening test for atypical serum-cholinesterase. Lancet, 1:513-514, 1966.
- 127 TIETZ, N.W. Química Clínica Moderna. Interamericana, 1.ed., 1972. p. 434.

- 128 TIETZ, N. Guia clinica de pruebas de laboratorio. Buenos Aires, Panamericana, 1985. p.130.
- 129 TOMITA, K.; KAMEL, S.; SHIRAISHI, T.; HASHIMOTO, Y. e YAMANAKA, M. Ultraviolet spectrophotometric method for determination of cholinesterase activity with acetylcholine as a substrate. J. Appl. Biochem., 7:303-310, 1985.
- 130 TORTOLERO, M. e MEDINA, J.R. Las isoenzimas C4 y C5 de la pseudocolinesterasa humana. Sangre, 23:157-162, 1978.
- 131 TSUJITA, T.; NAGAI, K. e OKUDA, H. Purification and properties of human serum esterase. Biochim. Biophys. Acta, 570:88-95, 1979.
- 132 TURNER, J.M.; HALL, R.A.; WHITTAKER, H. e KRICKA, L.J. Effects of storage and repeated freezing and thawing on plasma cholinesterase activity. Ann. Clin. Biochem., 21:363-365, 1984.
- 133 UETE, T.; MIYANATO, Y.; OHNISHI, H. e SHIMANO, N. Spectrophotometric micromethod for measuring cholinesterase activity in serum or plasma. Clin. Chem., 18:454-458, 1972.
- 134 WAKID, N.W.; TURBEH, R. e BARAKA, A. Assay of serum cholinesterase with succinylcholine and propionylthiocholine as substrates. Anaesthesiology, 62:509-512, 1985.
- 135 WEINER, N. e TAYLOR, P. Transmissão neuro-humoral. IN: GOODMAN, G. e GILMAN, D. , ed. As bases farmacológicas da terapêutica. 7.ed. Rio de Janeiro. Guanabara, 1987. p.47-48.

- 136 WESCOE, W.C.; HUNT, C.C.; RIKER, W.F. e LITT, I.C. Regeneration rates of serum cholinesterase in normal individuals and in patients with liver damage. Am. J. Physiol., 149:549-551, 1947.
- 137 WETHERELL, J.R. e FRENCH, M.C. The hydrolysis of succinylidithiocholine and related thiocholine esters by human plasma and purified cholinesterase. Biochem. Pharmacol., 35:939-945, 1986.
- 138 WETSTONE, H.J. e LA NOTTA, R.V. The clinical stability of serum cholinesterase activity. Clin. Chem., 11:653-663, 1965.
- 139 WHITTAKER, M. e BRITTEN, J.J. Inhibition of the plasma cholinesterase variants by pancuronium bromide and some of its analogues. Clin. Chem. Acta, 108:89-94, 1980.
- 140 WHITTAKER, M. Plasma cholinesterases variants and the anaesthetist. Anaesthesia, 35:174-197, 1980.
- 141 WHITTAKER, M. Cholinesterases. IN:BERGMEYER, H.U. ed. Methods of enzymatic analysis. 3.ed. Weinheim, Verlag Chemie, 1983. v.1, p.52-74.
- 142 WHITTAKER, M. e BRITTEN, J.J. Differential inhibition of plasma cholinesterase variants using the dibutyrate analogue of pancuronium bromide. Hum. Hered., 31:242-247, 1981.
- 143 _____. A comparison of some methods of phenotyping the plasma cholinesterase variants using benzoylcholine as substrate. Ann. Clin. Biochem., 19:9-14, 1981.
- 144 WHITTAKER, M. e BRITTEN, J.J. E_1^h , a new allele at cholinesterase locus 1. Human. Hered., 37:54-58, 1987.

- 145 WHITAKER, M.; BRITTEN, J.J. e DAWSON, P.J.G. Comparison of a commercially available assay system with two reference methods for the determination of plasma cholinesterase variants. Clin. Chem., 29:1746-1751, 1983.
- 146 WHITTAKER, M.; BRITTEN, J.J. e WICKS, R.J. Inhibition of the plasma cholinesterase variants by propranolol. Br. J. Anaesth., 53:511-516, 1981.
- 147 WHITTAKER, M.; WICKS, R.J. e BRITTEN, J.J. Studies on the inhibition by propranolol of some human erythrocyte membrane enzymes and plasma cholinesterase. Clin. Chem. Acta, 119:107-113, 1982.
- 148 WILKINSON, J.H. Isoenzymes. 2.ed. London, Chapman and Hall LTD., 1970. p.280-300.
- 149 WITTER, R.F. Measurement of blood cholinesterase. Arch. Environ. Health, 6:537-562, 1963.
- 150 YOSHIDA, A. e MOTULSKY, A.G. A pseudocholinesterase variant (E Cynthiana) associated with elevated plasma enzyme activity. Am. J. Hum. Genet., 21:486-498, 1969.
- 151 YOUNG, D.S.; PESTANER, L.C. e GIBBERMAN, V. Effects of drugs on clinical laboratory tests. Clin. Chem., 21:281D, 1975.
- 152 ZAPF, P.W. e COOHLAN, C.H.M. A kinetic method for the estimation of pseudocholine esterase using naphthyl acetate substrate. Clin. Chem. Acta, 43:237-242, 1974.
- 153 ZSIGMOND, E.K.; FLYNN, K.B. e KOTHARY, S.P. Improved method for the identification of the fluoride-resistant plasmacholinesterase genotypes. Biochem. Genet., 18:861-867, 1980.