

CYNTIA MARIA TELLES FADEL - PICHETH

VARIABILIDADE DO LOCO BCHE DA
BUTIRILCOLINESTERASE E PESO DO
ADULTO EM AMOSTRA DE CURITIBA

Tese aprovada pelo Curso
de Pós-Graduação em
Genética da Universidade
Federal do Paraná, para
obtenção do título de
Mestre em Ciências, na
área de Genética.

CURITIBA

1991

ORIENTADORA:

Profª Drª Eleidi Alice Chautard Freire Maia

A DEUS,
que ilumina o meu caminho.

AGRADECIMENTOS

A Prof^a Dr^a Eleídi Alice Chautard Freire Maia, pela orientação e colaboração na realização deste trabalho.

Ao Geraldo, pelo incentivo e sugestões.

Aos meus pais, Ivan e Maria, irmãos, e sogros, Felipe e Aimée, pelo apoio e estímulo transmitidos.

Aos meus filhos, Guilherme e Eduardo.

Aos amigos do IPE, de modo especial à Dr^a Kazuko Koto e à Doraci Borges.

Ao Prof. Dr. Lodércio Culpi, pelo apoio dedicado durante o curso de Mestrado.

Aos Profs. Sérgio Primo-Parmo e Maria Angelina C. de Lourenço, pelo auxílio e amizade.

Ao Prof. Yoshio Yashimoto, pelo auxílio e disponibilidade.

Ao Carlos Rodríguez e Cristina Telles Fadel, pelo valioso auxílio durante a impressão desta tese.

A Dr^a Christine Nogueira, por fornecer soros que foram de auxílio inestimável no desenvolver deste trabalho.

Ao Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná, por fornecer as amostras de sangue utilizadas no presente trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

SUMARIO

	Pg
Lista de tabelas	VIII
Lista de figuras	X
Lista de abreviaturas	XI
Resumo.....	XII
1 Introdução	01
1.1 Histórico	01
1.2 Caracterização das colinesterases	02
1.3 Butirilcolinesterase	08
1.3.1 Aspectos gerais	08
1.3.2 Estrutura do gene da BChE	11
1.3.3 Importância clínica do estudo da BChE	16
1.3.4 Possíveis funções da BChE	17
1.3.5 Fatores que interferem na atividade da BChE	18
1.3.6 BChE e defensivos agrícolas.....	20
1.3.7 BChE e succinilcolina	21
1.4 Variabilidade genética	22
1.4.1 Loco <u>BCHE</u>	23
1.4.1.1 Alelo BCHE*U	25
1.4.1.2 Alelo BCHE*A	27
1.4.1.3 Alelo BCHE*F	27
1.4.1.4 Alelos silenciosos	28
1.4.1.5 Alelo BCHE*J	29
1.4.1.6 Alelo BCHE*SU	29

1.4.1.7	Alelo BCHE*K	30
1.4.1.8	Alelo BCHE*NFDL	31
1.4.1.9	Alelo BCHE*H	33
1.4.2	Variantes da BChE com atividade aumentada	33
1.4.3	Loco <u>CHE2</u>	34
1.5	Medida da atividade da BChE	36
1.5.1	Inibidores da BChE para fenotipagem	39
1.6	BChE e peso	40
1.7	Objetivos	41
2	Materiais e métodos	43
2.1	Amostra	43
2.2	Métodos para fenotipagem do loco BCHE	46
2.2.1	Método de Morrow e Motulsky modificado	46
2.2.2	Método de Kalow e Genest.....	50
2.3	Metodologia para fenotipagem do loco <u>CHE2</u>	56
2.4	Procedimento para medida de atividade	59
2.5	Análise Estatística.....	61
2.5.1	Cálculo das frequências alélicas	61
2.5.2	Análises computacionais	63
3	Resultados	65
3.1	Metodologia e controle de qualidade	65
3.1.1	Perfis de inibição obtido pelo método de Morrow e Motulsky modificado	65
3.1.2	Reprodutibilidade do método de Morrow e Motulsky modificado	66
3.1.3	Amplitudes de variação dos números de inibição obtidos com o método de Kalow e Genest mod.	66

3.1.4	Coeficientes de correlação apresentados pelas amostras não usuais	67
3.1.5	Variabilidade nas amostras de fenótipos BCHE UF..	68
3.1.6	Porcentagens da inibição obtidas com diferentes inibidores.....	69
3.1.7	Atividade	77
3.2	Freqüências fenotípicas e alélicas	78
3.2.1	Freqüências fenotípicas	78
3.2.2	Freqüência do fenótipo BCHE AK entre portadores do alelo <u>BCHE</u> *A.....	78
3.2.3	Freqüências alélicas	78
3.3	Peso e fenótipos do loco <u>BCHE</u>	79
3.3.1	Correlações peso e atividade	79
3.3.2	Distribuição do peso na amostra	80
3.3.3	Análises de Regressão Múltipla Escalonada	80
3.3.4	Análise da Altura e fenótipo do loco <u>BCHE</u>	84
4	Discussão	85
4.1	Metodologia	85
4.2	Freqüências fenotípicas e alélicas	93
4.3	Peso e fenótipos do loco <u>BCHE</u>	95
5	Conclusões	102
6	Referências bibliográficas	104

LISTA DE TABELAS

	pg
01 Nomenclatura e características diferenciais entre acetilcolinesterase e butirilcolinesterase	4
02 Valores de pI_{50} de alguns inibidores seletivos das colinesterases encontradas no sangue humano	5
03 Freqüências dos alelos do loco BCHE em algumas populações brasileiras.....	24
04 Nomenclatura referente às variantes genéticas da BChE, identificadas através de sequenciamento de ADN	26
05 Comparação entre dados obtidos para algumas das variantes genéticas da BChE, através de métodos de inibição enzimática e PCR	32
06 Médias e amplitudes de variação das porcentagens de inibição (RON e PN) por fenótipo, segundo Picheth e cols. (1990)	49
07 Números de inibição dos principais fenótipos do loco BCHE utilizando benzoilcolina como substrato	55
08 Médias e amplitudes de variação dos números de inibição, obtidos através do método de Morrow e Motulsky modificado, classificadas por fenótipo	65
09 Parâmetros estimados através do método de Morrow e Motulsky modificado, com utilização de um pool de soros, visando controle de qualidade	66
10 Amplitudes de variação dos números de inibição para alguns fenótipos da BChE, utilizando-se benzoilcolina como substrato	67
11 Coeficientes de correlação entre os números de inibição obtidos com amostra não usual com os métodos de Kalow e Genest e Morrow e Motulsky modificado, classificados de acordo com o ano de coleta.....	68
12 Valores médios de inibição do fenótipo BCHE UF classificados em quatro grupos com base nos resultados do método de Morrow e Motulsky mod.	69
13 Freqüência dos fenótipos da BChE (\pm E.P.).....	78
14 Freqüências alélicas (\pm E.P.) determinadas em amostra da população de Curitiba	79

15	Coefficientes de correlação entre as variáveis peso e atividade, classificados pelos fenótipos da BChE.....	79
16	Coefficientes de correlação padronizados e valores de r^2 , obtidos dos modelos mais econômicos das análises de R.M.E., que levaram em conta a atividade	82
17	Coefficientes de correlação padronizados e valores de r^2 , obtidos dos modelos mais econômicos das análises de R.M.E., que não levaram em conta a atividade	83
18	Coefficientes de correlação padronizados e valores de r^2 , obtidos dos modelos mais econômicos das análises de R.M.E., referentes a determinados fenótipos	84

LISTA DE FIGURAS

01	Formas moleculares múltiplas da AChE e BChE	6
02	Características estruturais do gene da BChE humana ...	13
03	Comparação do gene <u>BCHE</u> humano com os genes <u>ACHE</u> de <u>Torpedo californica</u> e <u>Drosophila</u>	14
04	Representação do perfil de migração eletroforética de soros CHE2 C5+ e CHE2 C5-	58
05	Distribuição das porcentagens de inibição com Ro2-0683 e Dl-propranolol, utilizando alfa-naftilacetato como substrato	70
06	Distribuição das porcentagens de inibição com Ro2-0683 e dibucaína, utilizando benzoilcolina como substrato	71
07	Distribuição das porcentagens de inibição com Ro2-0683 e Dl-propranolol, utilizando benzoilcelina como substrato	72
08	Distribuição das porcentagens de inibição com dibucaína e Dl-propranolol, utilizando benzoilcolina como substrato	73
09	Distribuição das porcentagens de inibição com Ro2-0683 e fluoreto de sódio, utilizando benzoilcolina como substrato	74
10	Distribuição das porcentagens de inibição com dibucaína e fluoreto de sódio, utilizando benzoilcolina como substrato.....	75
11	Distribuição das porcentagens de inibição com Dl-propranolol e fluoreto de sódio, utilizando benzoilcolina como substrato.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS

AChE	acetilcolinesterase
ASTRA 1397	cloridrato de 10-(alfa-dietilaminopropionil)-fenotiazina
BChE	butirilcolinesterase
<u>BCHE</u>	gene codificador da butirilcolinesterase
BW 284C51	dibrometo de 1,5 bis (4-alildimetilamoniofenil) pentan-3 ona
C ₁ a C ₅	isoenzimas da butirilcolinesterase
<u>CHE2</u>	gene responsável pela variabilidade da isoenzima C ₅ da butirilcolinesterase
CHE2*C5+	alelo que determina a presença da isoenzima C ₅
CHE2*C5-	alelo que determina a ausência da isoenzima C ₅
DFP	diisopropilfluorofosfato
DTNB	ácido 5.5' - ditio bis 2 nitrobenzóico
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	enzimaimunoensaio com imunoadsorvente
Iso-OMPA	tetramonoisopropil pirofosforamida
kDa	quilo Dalton
LDL	lipoproteína de baixa densidade
PCR	reação em cadeia da polimerase
VLDL	lipoproteína de densidade muito baixa

RESUMO

Uma amostra constituída por 1.800 doadores de sangue da região de Curitiba foi analisada quanto à frequência das variantes genéticas da butirilcolinesterase humana. As frequências (\pm E.P.) encontradas para os alelos do loco BCHE foram: BCHE*U 89,94 \pm 4,75%; BCHE*F 0,61 \pm 0,13%; BCHE*A 1,11 \pm 0,17% e BCHE*K 8,34 \pm 4,37%.

A fenotipagem foi realizada através do método de Morrow e Motulsky (1968) com modificações introduzidas por Alcântara (1989) e Picheth e cols. (1990). A classificação das variantes não usuais foi confirmada através do método de Kalow e Genest (1957), e houve concordância entre as duas metodologias, com exceção de uma amostra que apresentou comportamento anômalo.

Os indivíduos de fenótipo não usual foram pareados quanto a sexo, altura, idade e cor, com indivíduos de fenótipo usual com a finalidade de avaliar a possível influência do loco BCHE sobre o peso. Em relação ao loco CHE2 todos esses indivíduos apresentavam o fenótipo CHE2 C5- . Nossos achados indicam que parece não haver influência do loco BCHE sobre o peso.

1 INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRICO

O termo colinesterase foi utilizado pela primeira vez em 1932 para descrever uma enzima presente no soro de cavalo, que hidrolisa ésteres de colina (Stedman e Easson, 1932). Posteriormente esta propriedade também foi demonstrada numa proteína presente nos eritrócitos e soro humanos, sendo que um estudo com material humano estabeleceu que as duas enzimas são diferentes e apresentavam propriedades bioquímicas características e distintas (Alles e Hawes, 1940). A enzima presente nos eritrócitos, quase que específica para ésteres de colina, foi denominada "colinesterase verdadeira" enquanto que a enzima sérica, que hidrolisa outros ésteres além dos ésteres de colina, foi designada "pseudocolinesterase" (Mendel e Rudney, 1943). Estas enzimas receberam mais tarde as denominações de acetilcolinesterase e colinesterase do soro, respectivamente. A literatura atual tem recomendado a designação de butirilcolinesterase para a enzima sérica, a qual se refere pela abreviatura BChE.

Kalow (1956) e Kalow e Genest (1957) descreveram a primeira variante genética da BChE, a partir do estudo de

indivíduos suscetíveis à succinilcolina (relaxante muscular de curta duração). Esta variante foi denominada "atípica" devido ao seu comportamento anômalo frente à dibucaína, um inibidor da enzima (Kalow, 1956; Kalow e Genest, 1957; Kalow e Staron, 1957). A partir de então, outras variantes genéticas da enzima foram descritas.

Harris e cols. (1962; 1963a,b), examinando a BChE através de técnicas de eletroforese, detectaram uma banda eletroforética extra que foi denominada C₅. Verificaram também que esta banda era herdada independentemente das variantes genéticas já descritas, evidenciando o não alelismo entre estes genes.

Lockridge e cols. (1987b) estabeleceram a seqüência de aminoácidos da BChE de tipo usual. Os trabalhos simultâneos de Prody e cols. (1987) e McTiernan e cols. (1987) confirmaram a seqüência de aminoácidos da enzima, através de seqüenciamento de ADN.

Arpagaus e cols.(1990) estabeleceram a estrutura do gene da BChE e trabalhos recentes também a nível de ADN têm revelado as mutações responsáveis pela síntese de algumas das variantes genéticas da enzima (McGuire e cols., 1989; Nogueira e cols., 1990; La Du e cols. , 1990).

1.2 CARACTERIZAÇÃO DAS COLINESTERASES

Embora todos os organismos animais pareçam ter algum tipo de enzima capaz de hidrolisar a acetilcolina, a demonstração da existência de AChE e BChE tem sido feita

somente em vertebrados. Estas enzimas são produtos de genes diferentes mas relacionados, que presumivelmente surgiram através de duplicação de um gene ancestral, durante a emergência dos vertebrados. Ambas são glicoproteínas e apresentam alto grau de homologia nas suas seqüências de aminoácidos e formas moleculares (revisões em Lehmann e Liddell, 1964; Chatonnet e Lockridge, 1989).

Estas enzimas pertencem à classe das esterases, e a designação colinesterase caracteriza esterases que hidrolisam outros ésteres além dos ésteres de colina e são inibidas pela fisostigmina $10^{-5}M$ (Augustinsson, 1963). As colinesterases também são inibidas irreversivelmente pelo diisopropilfluorofosfato e têm marcada afinidade pelos íons de amônio quaternário (Giblett, 1969; Tietz, 1972; Whittaker, 1980).

Apesar de atuarem sobre uma variedade de ésteres não-colínicos, as colinesterases podem ser diferenciadas com base no grau de especificidade pelo substrato (tabela 01), sensibilidade à inibição por compostos orgânicos (tabela 02) e também através do reconhecimento por anticorpos monoclonais (Aldridge, 1953; Cestaric, 1964; La Motta e Woronick, 1971; Brimijoin e cols., 1983). Além dos inibidores citados na tabela 02, uma outra droga que causa inibição seletiva das colinesterases é o bambuterol (bisdimetilcarbamato de terbutalina) que em doses terapêuticas só inibe a BChE e discrimina entre AChE e BChE mais seletivamente que os

TABELA 01. NOMENCLATURA E CARACTERÍSTICAS DIFERENCIAIS ENTRE ACETILCOLINESTERASE E BUTIRILCOLINESTERASE.

Nomenclatura e características diferenciais	AChE	BChE
Designações	acetilcolinesterase colinesterase verdadeira colinesterase I colinesterase tipo E colinesterase específica	butirilcolinesterase pseudocolinesterase colinesterase II colinesterase tipo S colinesterase do soro colinesterase não específica
benzoilcolinesterase		
Nome sistemático	acetilcolina acetilhidrolase (EC 3.1.1.7)	acilcolina acilhidrolase (EC 3.1.1.8)
Substratos	pequeno número de ésteres de colina; alguns ésteres acéticos	número relativamente grande de ésteres de colina e outros ésteres, tais como derivados do ácido benzóico
Substrato ótimo	acetilcolina	butirilcolina
Substrato específico	acetil- β -metilcolina	benzoilcolina
Distribuição	massa cinzenta do SNC, placas motoras, eritrócitos, placenta, líquido amniótico	massa branca do SNC, mucosa do intestino, fígado, pele, plasma, coração, pâncreas
Função	hidrólise da acetilcolina nas junções neuromusculares	desconhecida

clássicos iso-OMPA e BW284C51 (Lockridge, 1990a). Uma outra diferença entre as colinesterases é que a AChE é inibida em altas concentrações de acetilcolina, o que não ocorre com a BChE.

TABELA 02. VALORES DE pI_{50} * DE ALGUNS INIBIDORES SELETIVOS DAS COLINESTERASES ENCONTRADAS NO SANGUE HUMANO.

Inibidor	AChE	BChE
Iso-OMPA	3,52	5,22
DFP	5,40	7,70
Astra 1397	2,00	6,00
BW 284C51	7,00	3,00
Ro2-0683	6,05	8,50

* logaritmo negativo da concentração molar do inibidor que causa 50% de inibição da atividade da enzima.

Com relação à variabilidade molecular, ambas as enzimas apresentam diversas formas moleculares presentes no mesmo organismo, incluindo monômeros, dímeros, tetrameros e oligômeros complexos contendo uma subunidade semelhante a colágeno, formando uma estrutura em cauda. Estas diferentes formas (fig. 01) são tecido específicas e classificadas em dois grupos principais, conforme exposto a seguir:

a) Formas hidrofílicas: correspondem às formas globulares (G) e podem constituir-se de 1, 2 ou 4 subunidades catalíticas, que são denominadas respectivamente G_1 , G_2 e G_4 . Estas formas são secretadas nos fluidos corpóreos. Formas G_4 de AChE são

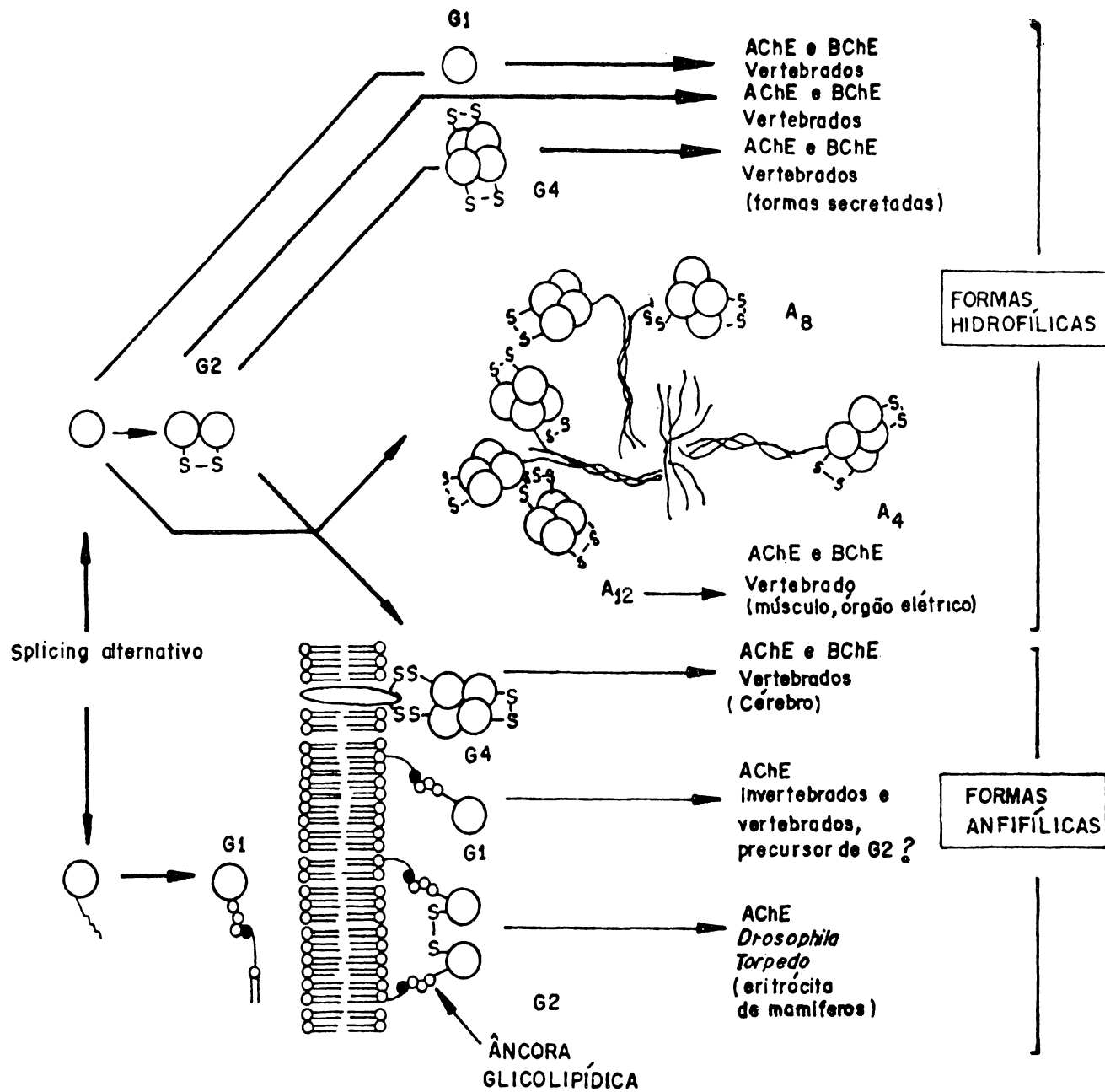


FIGURA 01. FORMAS MOLECULARES MÚLTIPLAS DA AChE E BChE, segundo Chatonnet e Lockridge, 1989, com modificações.

secretadas pelas células nervosas periféricas. As formas G₁, G₂ e G₄ de BChE são encontradas no plasma.

b) Formas imobilizadas

b.1) Formas assimétricas (A₄ - A₈ - A₁₂) : contém de 1 a 3 tetrâmeros hidrofílicos globulares (G₄) ligados a caudas colagenosas que se unem às membranas por fortes interações com outras moléculas. Estas formas são encontradas no músculo de vertebrados primitivos mas não em invertebrados. Formas A₁₂ de AChE e BChE são encontradas nas junções neuromusculares de pássaros e mamíferos. Formas assimétricas de AChE também são encontradas na enguia e Torpedo californica.

b.2) Formas globulares anfifílicas (G): são formas globulares que se ligam às membranas através de âncoras hidrofóbicas. No cérebro de mamíferos encontram-se formas anfifílicas G₄ de AChE e BChE. Formas anfifílicas G₂ de AChE são observadas nos eritrócitos de mamíferos (Massoulié, 1980; Massoulié e Bon, 1982; Lee e Taylor, 1982; Chatonnet e Lockridge, 1989).

O centro ativo destas enzimas é constituído por duas regiões responsáveis pela hidrólise do substrato: o sítio aniônico e o esterásico. O sítio aniônico é uma região negativamente carregada da superfície da enzima, que se combina com o grupo positivamente carregado do substrato (Lehmann e Liddell, 1964; Cestaric, 1964). Trabalhos recentes

indicam que Asp⁷⁰ deve ocupar uma posição importante dentro ou muito próxima do sítio ativo da BChE, uma vez que a sua substituição reduz a afinidade da enzima para ésteres de colina (McGuire e cols., 1989). O sítio esterásico combina-se à ligação éster da molécula do substrato e realiza a hidrólise. Apresenta um grupo hidroxila do aminoácido serina (198^o resíduo), um grupo básico (nitrogênio imidazólico da histidina) e um centro catiônico ainda não perfeitamente caracterizado (Lehmann e Liddell, 1964; Cestaric, 1964; Larini, 1979).

1.3 BUTIRILCOLINESTERASE

1.3.1 Aspectos gerais.

A BChE é uma sialoglicoproteína sintetizada quase que exclusivamente no fígado e tem meia vida de 8-14 dias (Wescoe e cols., 1947; Giblett, 1969; Whittaker, 1980). As formas de BChE encontradas no cérebro não são provenientes do fígado, mas segundo McTiernan e cols. (1987) e Prody e cols. (1987), são sintetizadas no próprio cérebro.

A enzima sérica consiste de quatro formas moleculares principais, designadas por Harris e cols. (1962) C₁, C₂, C₃, e C₄ em ordem decrescente de mobilidade eletroforética, embora outros componentes tenham sido descritos (Harris e cols., 1962 e 1963a; Van Ros e Druet, 1966; Ashton e Simpson, 1966;

Yamamoto e cols., 1986 e 1987) e outros sejam observados dependendo das condições de armazenamento (Harris e cols., 1962; Joshi e cols., 1979) ou eletroforese (Juul, 1968).

As formas C₁ e C₃ correspondem, respectivamente, ao monômero e dímero, enquanto que C₂ é uma associação através de ponte dissulfeto, entre o monômero de BChE e albumina e possui peso molecular aproximado de 150 kDa (Masson, 1989). O monômero C₁ tem peso molecular de 85 kDa, é constituído por 574 aminoácidos e das 10 asparaginas presentes 9 encontram-se ligadas a unidades oligossacarídeas. Demonstrou-se que 24% do peso da enzima é devido a carboidratos e sugere-se que as cadeias glicosídicas são do tipo complexo terminando em ácido siálico, cuja remoção por sialidases não afeta as propriedades cinéticas da enzima, apenas alterando a sua mobilidade eletroforética (Ecobichon e Kalow, 1963; Lockridge e cols., 1987b). A serina do sítio ativo é o 198º resíduo a partir da região aminoterminal. A forma monomérica apresenta 3 pontes dissulfeto internas, e a cisteína (Cys⁵⁷¹) possibilita a formação de uma ponte dissulfeto com Cys⁵⁷¹ de outra subunidade idêntica. Esta ponte dissulfeto dista 4 aminoácidos da região carboxi-terminal, e quando a enzima é submetida à ação da tripsina, um peptídeo contendo esta ligação é prontamente clivado .

O componente C₄, responsável por 95% da atividade sérica da BChE, é um tetrâmero constituído por 4 subunidades idênticas, cada uma apresentando um sítio ativo (Lockridge e

cols., 1979, 1982 e 1987a; Masson, 1979), embora já tenham sido descritos apenas dois sítios ativos por molécula (Muensch e cols., 1976). Esta discrepância pode ser explicada pela presença de grandes quantidades de BChE inativa no plasma ou pela inativação da enzima durante o processo de purificação (Masson, 1991). C₄ possui peso molecular aproximado de 340 kDa (Lockridge e cols., 1987b). Segundo Lockridge e cols. (1979), o tetrâmero apresenta forma globular G₄, e está agrupado como dímero de dímeros. Após redução e alquilação das pontes dissulfeto intercadeias a enzima continua um tetrâmero e completamente ativa. Conclui-se que estas não são necessárias para a manutenção da estrutura tetramérica ou para a atividade mas somente para estabilizar a enzima, e que as quatro subunidades se mantêm unidas por ligações não covalentes.

Os componentes C₁, C₃ e C₄ são parcialmente interconvertíveis, assim C₁ e C₃ podem ser precursores e/ou produtos de degradação de C₄ (La Motta e cols., 1968; Masson, 1979).

Devido ao fato de que sob condições de proteólise parcial observa-se uma forma com mobilidade intermediária entre C₃ e C₄, uma outra nomenclatura tem sido utilizada: ChE₁ para C₁; ChE₂ para C₂; ChE₃ para C₃; ChE₄ para a forma citada e ChE₅ para C₄. A forma ChE₄ gerada a partir do tetrâmero sob ação de proteinases é um trímero (Masson, 1989). Segundo Masson (1989) uma nomenclatura baseada na estrutura molecular

seria mais conveniente do que numerar as formas de acordo com suas mobilidades eletroforéticas. Como C₁, C₃ e C₄ representam formas globulares monomérica, dimérica e tetramérica da enzima, recomendam-se as designações G₁, G₂ e G₄ de acordo com o número de subunidades. A forma C₂ é referida como G₁-ALB.

Também foram atribuídas à BChE atividades de arilacilamidase e de peptidase (Lockridge, 1982; Rao e Balasubramanian, 1990), embora alguns autores considerem que estas atividades sejam decorrentes da ação de substâncias contaminantes (Checler e cols., 1990; Lockridge, 1990).

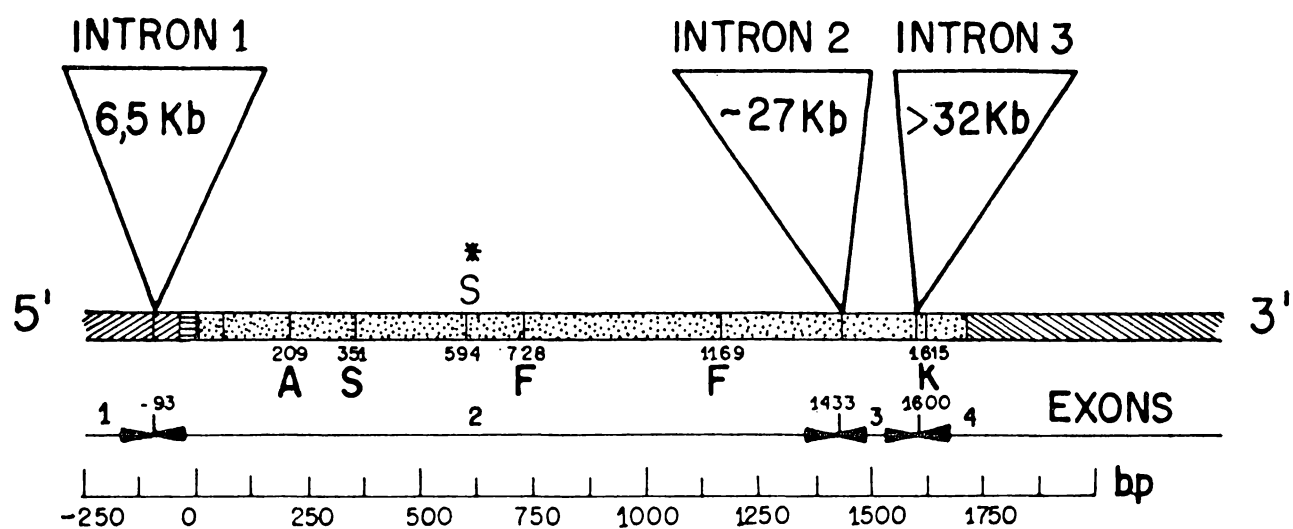
1.3.2 Estrutura do gene da BChE

Arpagaus e cols. (1990) estabeleceram a estrutura do gene da BChE humana, além de fornecerem indícios da existência de um único gene que codifica esta enzima. O gene possui aproximadamente 73 quilo bases e contém quatro exons que somam 2416 pares de bases. O exon 1 contém seqüências não traduzidas e dois potenciais sítios de iniciação de tradução. O exon 2 possui 1525 pares de bases e contém 83% da seqüência codificadora para a proteína madura, incluindo a porção amino-terminal e o sítio ativo serina. Possui também um terceiro sítio de iniciação de tradução, possivelmente funcional. O exon 3 possui 167 nucleotídeos e o exon 4, que contém 604 pares de base, codifica a porção carboxi-terminal

da proteína e a região 3' não traduzida onde dois sinais de poliadenilação foram identificados. O intron 1 possui 6,5 quilo bases e o tamanho mínimo dos introns 2 e 3 foi estimado em 27 e 32 quilo bases, respectivamente (fig. 02). Não se descartou a possibilidade da existência de um exon adicional à extremidade 5' do exon 1 .

Ainda não se conhece a seqüência de aminoácidos da AChE humana, mas ao se comparar a seqüência da BChE humana com a da AChE de outros animais encontraram-se homologias apesar das enzimas serem provenientes de espécies evolutivamente distantes (Chatonnet e Lockridge, 1989).

A seqüência de aminoácidos da BChE humana plasmática mostra 54% de homologia com a AChE de Torpedo californica e Torpedo marmorata e 38% com AChE de Drosophila melanogaster; mostra também 28% de identidade com a porção carboxi-terminal das tireoglobulinas bovina e de rato. Os introns 2 e 3 do gene BCHE humano estão presentes na mesma localização nos genes ACHE de Torpedo e Drosófila (fig. 03). O gene da AChE de Torpedo também possui um grande exon contendo a maioria da seqüência codificadora da proteína madura, equivalente ao nosso exon 2. Esta grande homologia entre os genes da BChE humana e AChE de Torpedo sugere que a AChE e a BChE dos vertebrados derivaram de um gene ancestral comum. O gene da AChE de Drosófila possui sete exons na região onde os genes ACHE e BCHE de vertebrados têm um único exon, o que indica



- ▨ Região 5' não traduzida
- ▨ Sequência líder
- ▨ Região 3' não traduzida
- ▨ Seq. codificada da proteína madura

FIGURA 02. CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DO GENE DA BChE HUMANA, segundo La Du e cols., 1990.

S* representa a serina do sítio ativo da enzima. As demais letras maiúsculas representam a posição das mutações que originam algumas das variantes genéticas da BChE.

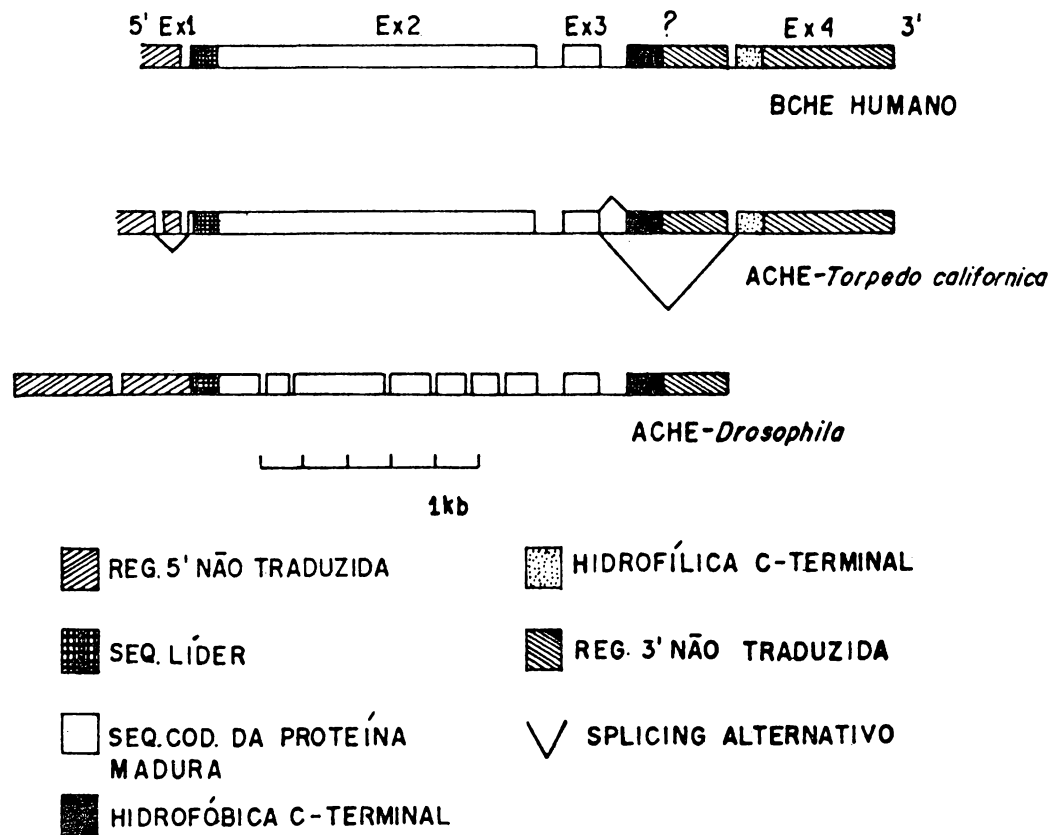


FIGURA 03. COMPARAÇÃO DO GENE BCHE HUMANO COM OS GENES ACHE DE Torpedo californica e Drosophila, segundo Arpagaus e cols., 1990.

Os introns não estão em escala. Um exon alternativo hipotético na extremidade 3' do gene BCHE humano foi indicado com um ponto de interrogação.

que a divergência entre as colinesterases dos insetos e vertebrados ocorreu antes que o gene da colinesterase dos vertebrados se duplicasse em genes codificadores de AChE e BChE (Chatonnet e Lockridge, 1989).

A estrutura descrita para o gene da BChE humana explica a existência da forma hidrofílica G_4 presente no plasma. Lockridge (1990b), através de técnicas de ADN recombinante, conseguiu expressar BChE com as especificidades normais para substratos e inibidores, e com a organização tetramérica, em células CHO (Chinese Hamster Ovary). Isto mostra que a seqüência que codifica para os 574 aminoácidos da proteína madura mais a região que inclui a seqüência líder são suficientes para a secreção e reunião em um tetrâmero.

A forma hidrofílica G_4 também é produzida no cérebro, onde a enzima se encontra ligada às membranas através de um domínio hidrofóbico, formando o tipo globular anfifílico.

A hipótese sugerida para explicar este fato é que o tetrâmero anfifílico seja constituído pela associação das estruturas catalíticas (hidrofílicas) a um elemento hidrofóbico não catalítico, não codificado pelo gene da BChE, que media a ligação à membrana (Chatonnet e Lockridge, 1989). Entretanto, o gene da AChE de Torpedo produz os dois tipos de unidades catalíticas (hidrofóbica e hidrofílica) por "splicing" alternativo de dois exons na extremidade 3'. Devido à homologia estrutural entre estes genes, não seria de todo improvável que tal mecanismo também existisse no gene da

BChE humana, mas neste caso um outro exon deveria existir na extremidade 3' do gene e seu transcrito seria alternativamente clivado com o do exon 4.

1.3.3 Importância clínica do estudo da BChE

A BChE participa do metabolismo de drogas que contém ésteres, como AAS, heroína, aprophen, mivacurium, acetato de metilprednisolona, succinilcolina, certos anestésicos derivados do ácido benzóico como procaína e ametocaina, e do bambuterol (bisdimetilcarbamato de terbutalina), um bronco-dilatador de ação prolongada, que é degradado enzimaticamente principalmente por esta enzima, para então fornecer o composto ativo terbutalina. No caso do bambuterol, o processo catalítico é acompanhado por uma inibição reversível da BChE. (Bang e cols., 1990 a,b).

Esta enzima é utilizada como prova de função hepática e também como indicador de exposição a compostos organofosforados e carbamatos, que são potentes inibidores da BChE. Medidas da atividade da enzima são realizadas nas intoxicações por estes compostos (Smith, 1974; Long, 1975; Zimmerman e Henry, 1979; Chu, 1985; King, 1987).

1.3.4 Possíveis funções da BChE

A função fisiológica da BChE não é conhecida (Giblett, 1969; Whittaker, 1980; Brown e cols., 1981; Evans, 1986) e embora existam várias proposições, nenhuma delas ainda foi comprovada. Foi proposto que a BChE estaria relacionada com os processos de condução lenta das células nervosas; que seria importante em limitar respostas a agentes colinérgicos hidrolisáveis e que funcionaria como proteção para a AChE contra produtos que a possam inibir (revisões em Lehmann e Liddel, 1964; Whittaker, 1980). Kutty (1980) cita algumas possíveis funções: BChE participando da estrutura da mielina; responsável pelo controle dos níveis plasmáticos da acetilcolina e acetilcolinesterase; associada com a remoção de colinésteres intermediários. Layer e Sporns (1987) relatam forte correlação positiva entre atividade da BChE e proliferação celular. Diversos autores sugerem que a BChE estaria relacionada com o metabolismo de lipídios. Clitherow e cols. (1963) propõem que a principal função da BChE seria desdobrar ésteres butíricos formados no metabolismo dos lipídios. Segundo Kutty e Acharya (1972) e Kutty e cols., (1973, 1975 e 1977) a BChE estaria relacionada com a assimilação dos alimentos. Os mesmos autores sugerem que a BChE estaria associada com a estrutura das beta lipoproteínas e que seria responsável pela transformação das lipoproteínas VLDL em LDL. Foram descritas correlações positivas entre

atividade da BChE e peso em indivíduos normais (Stueber-Odebrecht e cols., 1985; Brock e Brock, 1990). Chautard-Freire-Maia e cols. (1991a) propõem relação entre expressão da aloenzima C₅ e peso. Foi observado o aumento da atividade da enzima em condições associadas com o metabolismo anormal de lipídios, como nas hiperlipoproteinemias, obesidade e diabetes (Cucuianu e cols., 1968 ; Chu e cols., 1978; Kutty e cols., 1981; Deshmukh, 1986). Cucuianu e cols. (1978) sugerem que a enzima tenha a secreção induzida por um "turn over" acelerado de lipídios e lipoproteínas. Osada e cols. (1980) descreveram a suscetibilidade da BChE aos componentes da dieta e defendem uma possível função no metabolismo de lipídios.

Segundo Evans (1986), é provável que a BChE não tenha função importante, ou que esta possa ser executada através de outra via metabólica, uma vez que existem indivíduos sem atividade detectável da enzima no plasma e que não apresentam sintomas clínicos.

1.3.5 Fatores que interferem na atividade da BChE

Fatores genéticos são muito importantes na determinação da atividade da BChE, mas diversos fatores fisiológicos e patológicos podem influenciá-la, assim como certas substâncias medicamentosas e até mesmo o conteúdo da dieta.

Alterações Fisiológicas

Durante o primeiro trimestre da gravidez ocorre uma queda de, em média, 30% na atividade da BChE e o retorno aos níveis normais ocorre entre a 2^a e 6^a semanas pós-parto. Ao nascer, os níveis da enzima são baixos, aproximadamente 50% do adulto, e entre os 3 e 6 anos de vida a atividade média é aproximadamente 30% superior à apresentada pelos adultos. A partir de então, a atividade começa a decrescer até chegar na época da puberdade, aos níveis dos adultos (revisões em Giblett, 1969; Whittaker, 1980; Tietz, 1985; Evans, 1986). Após este período não ocorre variação apreciável na atividade intraindividual (Wetstone e La Motta, 1965; Chu, 1985; Brock e Brock, 1990). Os homens apresentam, em média, atividade mais alta que as mulheres (Sidell e Kaminskis, 1975; Stueber-Odebrecht e cols., 1985).

Alterações Patológicas

Como a BChE é sintetizada no fígado (Wescoe e cols., 1947), doenças hepáticas que afetam as células do parênquima resultam em atividade diminuída da enzima. Atividade diminuída da BChE também ocorre em infarte do miocárdio, doenças do colágeno, má nutrição, hiperpirexia, uremia, anemias crônicas, infecções agudas, queimaduras, carcinomas e tuberculose. Atividade elevada da enzima está associada com

obesidade, hiperlipidemia, hipertensão essencial, nefrose, asma, alcoolismo, estados de ansiedade e tirotoxicose (Cestarcic, 1964; Whittaker, 1980; Brown e cols., 1981).

Alterações induzidas por drogas

Certas drogas reduzem a atividade da BChE por influenciar a taxa de síntese ou por inibir diretamente a enzima no plasma. Citam-se os glicocorticóides, estrogênios sintéticos, ecotiopato e ciclofosfamida sendo que os dois últimos ligam-se irreversivelmente à enzima. Hexafluorenio, tetrahydroaminacridina, bambuterol e edrofonio são drogas que causam inibição reversível da BChE. Fisostigmina e neostigmina inibem a BChE por formarem um composto intermediário (carbamoil-enzima), que é hidrolisado numa velocidade muito baixa (Stryer, 1988). Outras drogas que interferem com a atividade da BChE: lítio, pancurônio, fenelzine, clorpromazina e inibidores da monoaminaoxidase (Cestarcic, 1964; Young e cols., 1975; Whittaker, 1980; Tietz, 1985; Evans, 1986).

1.3.6 BChE e Defensivos Agrícolas

As colinesterases são inibidas pelos compostos organofosforados e carbamatos que são utilizados na agricultura como pesticidas e herbicidas (Larini, 1979). Os

compostos organofosforados inibem as colinesterases através da ligação do grupo fosforil à serina do sítio ativo, formando um complexo covalente fosforil-enzima muito estável. A ação dos carbamatos ocorre pela formação da ligação do grupo carbamoil à serina do sítio ativo. Este composto é hidrolisado numa taxa muito lenta em contraste com a acil-enzima correspondente (Stryer, 1988).

1.3.7 BChE e succinilcolina

A succinilcolina é um éster dicolina utilizado para produzir relaxamento muscular em procedimentos cirúrgicos. É hidrolisada pela BChE formando succinilmonocolina e colina. O diéster é um poderoso relaxante muscular, e o monoéster tem pequena atividade farmacológica. Quando a succinilcolina é injetada via endovenosa, aproximadamente 90% da dose é hidrolisada pela BChE, em um minuto. Portanto, a dose real de succinilcolina, que atinge as junções neuromusculares, é muito menor que a dose injetada. A succinilcolina é um inibidor do receptor da acetilcolina (Stryer, 1988). Na placa motora terminal, a succinilcolina atua diretamente sobre o receptor da acetilcolina fazendo com que a placa seja despolarizada e perca a sensibilidade ao neurotransmissor acetilcolina, causando completa paralisia muscular. A recuperação é rápida se a dose de succinilcolina que atinge a placa motora é baixa. Entretanto, a dose que normalmente

produz relaxamento de dois minutos, provoca uma apnéia prolongada na ausência de hidrólise pela BChE. A recuperação não começa até que a maioria da succinilcolina tenha sido hidrolisada ou clareada do sangue e fluido extracelular. Após o sangue e fluido extracelular terem sido clareados da succinilcolina, a taxa de recuperação da apnéia depende da concentração remanescente nas placas motoras, ou do número de receptores ocupados, e da taxa de difusão desta substância para fora da placa motora terminal. A BChE não tem efeito sobre a succinilcolina uma vez que a droga esteja na placa motora terminal.

A resposta exagerada de pessoas homozigotas da BChE atípica é explicada pela inabilidade desta variante enzimática hidrolisar a succinilcolina. A enzima atípica tem baixa afinidade por este miorelaxante, e não o hidrolisa em concentração farmacológica. A consequência da baixa afinidade da enzima atípica pela succinilcolina é que a droga não é hidrolisada no sangue, e a placa motora recebe uma dose extra 50 a 100 vezes superior à normal (Lockridge, 1990a).

1.4 VARIABILIDADE GENÉTICA

Até há pouco tempo considerava-se que a BChE fosse determinada por dois locos genéticos previamente designados E₁ e E₂. Posteriormente estes locos foram designados CHE1 e CHE2 e atualmente a denominação CHE1 foi substituída por

BCHE. O loco BCHE apresenta polialelismo e é responsável pela síntese da maioria das variantes genéticas da BChE. Essas variantes são detectadas principalmente através de testes de inibição enzimática.

Tem sido suposto que o loco CHE2 dirija a produção de uma forma adicional de BChE, detectada através de eletroforese, denominada C₅ por apresentar menor migração. Esse loco apresenta dois alelos reconhecidos (Harris e cols., 1963 a, b).

1.4.1 Loco BCHE

Na década de 50, logo depois que a succinilcolina tornou-se comercialmente disponível, observou-se que nem todos os pacientes recuperavam-se dos seus efeitos tão rapidamente como era previsto e foram registrados episódios de paralisia muscular e apnéia que duravam várias horas. Demonstrou-se que esta resposta exagerada frente à uma dose padrão de succinilcolina era uma característica hereditária, não devida a uma baixa concentração da enzima normal, mas a uma enzima variante menos efetiva em hidrolisar substratos. Esse foi o primeiro passo para a detecção das variantes genéticas da BChE. Variantes genéticas determinadas pelo loco BCHE compreendem os alelos BCHE*A, BCHE*F, BCHE*S, BCHE*R, BCHE*T, BCHE*J, BCHE*K, BCHE*H, BCHE*NFDL, que resultam numa atividade média inferior à observada nos homozigotos para o alelo BCHE*U. Na tabela 03 encontram-se dados referentes às

Tabela 03. FREQUÊNCIAS DOS ALELOS DO LOCO BCHE DESCRITOS ENTRE ALGUMAS POPULAÇÕES BRASILEIRAS COM PREDOMINÂNCIA DE CAUSÓIDES

Região	Alelo <u>BCHE</u> *A		Alelo <u>BCHE</u> *F		Alelo <u>BCHE</u> *K		
	N	Freq. %	N	Freq. %	N	Freq. %	
Belém	259	1,5	---	---	---	---	(Guerreiro e Chautard-Freire-Maia, 1984)
Nordeste	110	2,7	---	---	---	---	(Magna e cols., 1983)
Sudeste	406	2,6	---	---	---	---	(Magna e cols., 1980)
Blumenau	597	0,4	---	---	---	---	(Stuber-Odebrecht e cols., 1985)
Curitiba	999	1,5	---	---	---	---	(Chautard-Freire-Maia e cols, 1984)
Curitiba	---	---	1.069	0,51	2.014	2,04	(Alcântara e cols., 1990a, 1990b)
Nordeste	2.138	1,5	2.138	0,49	---	---	(Simpson e Kalow, 1965)

--- = não analisados

freqüências de alguns fenótipos da BChE determinados em algumas populações brasileiras.

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

As variantes são evidenciadas através da utilização de inibidores diferenciais como dibucaína, fluoreto de sódio, DL-propranolol, Ro2-0683, etc.

Após a identificação, por seqüenciamento de ADN, das mutações responsáveis pela síntese de algumas das variantes genéticas da BChE, foram propostas designações formais para cada alelo, como indicado na tabela 04.

1.4.1.1 Alelo BChE*U

Esse alelo é responsável pela síntese da forma mais comum de BChE, designada "usual" e que apresenta a maior inibição frente à maioria dos inibidores utilizados. O seqüenciamento deste gene foi realizado por Arpagaus e cols. (1990) e constitui-se como base para o estabelecimento das mutações responsáveis pelas outras variantes genéticas do loco BChE.

TABELA 04. NOMENCLATURA REFERENTE AS VARIANTES GENÉTICAS DA BCHE IDENTIFICADAS ATRAVÉS DE SEQUENCIAMENTO DE ADN.*

<u>Fenótipos</u>	<u>Alteração de aminoácido</u>	<u>Alteração no ADN</u>	<u>Nome formal do alelo</u>
Normal (usual)	nenhuma	nenhuma	BCHE
Resistente à dibucaína (atípico)	70 Asp->Gly	nt 209 (GAT->GGT)	BCHE*70G
Silencioso, sem atividade	117 Gly-> frame shift	nt 351(GGT->GGAG)	BCHE*FS117
Resistente ao fluoreto	243 Thr->Met	nt 728 (ACG->ATG)	BCHE*243M
Resistente ao fluoreto	390 Gly->Val	nt 1169(GGT->GTT)	BCHE*390V
K	539 Ala->Thr	nt 1615(GCA->ACA)	BCHE*539T
H	142 Val->Met	nt 424 (GTG->ATG)	BCHE*142M

* Segundo La Du e cols., 1991.
nt = nucleotideo

1.4.1.2 Alelo BCHE*A

Esse alelo condiciona a enzima "atípica", identificada por Kalow (1956). Tem afinidade reduzida para substratos e inibidores que possuam carga positiva. Eckerson e cols. (1983) verificaram que anti-soros preparados contra BChE usual altamente purificada reagem igualmente com a atípica, e também demonstraram que a última possui propriedades catalíticas alteradas. Uma mutação de ponto no nucleotídeo 209, que resulta na substituição de Asp⁷⁰ (GAT) por glicina (GGT) é a responsável pela determinação da variante atípica. Esta modificação na estrutura produz a substituição de um resíduo ácido por um neutro, e presumivelmente afeta o sítio aniônico do centro ativo da enzima, o que seria uma explicação para a afinidade reduzida que a enzima atípica apresenta frente a ésteres de colina (McGuire e cols., 1989; Neville e cols., 1990).

1.4.1.3 Alelo BCHE*F

Harris e Whittaker (1961) descreveram uma variante da BChE resistente ao inibidor fluoreto de sódio. As variantes resistentes ao fluoreto constituem um grupo heterogêneo. Bartels e cols. (1990) demonstraram em dois membros de uma família portadora desta variante, uma mutação que acarreta a substituição de treonina (Thr²⁴³) por metionina (Met). Numa

outra família portadora da enzima resistente ao fluoreto, os mesmos pesquisadores identificaram uma mutação que afeta o aminoácido 390, trocando glicina por valina.

1.4.1.4 Alelos silenciosos

Liddell e cols. (1962) relataram o primeiro caso de deficiência completa de atividade da BChE, sem causa patológica que a justificasse, revelando assim a existência de um homozigoto para o alelo silencioso. Subsequentemente vários outros casos foram relatados e se detectou a existência de heterogeneidade genética entre os fenótipos silenciosos observados (Gutsche e cols., 1967; Kattamis e cols., 1967; Rubinstein e cols., 1970; Scott e Wright, 1976). O alelo S (também designado tipo I ou tipo O) ocasiona deficiência completa da enzima, o alelo T (tipo II) condiciona 1-3% da atividade da enzima normal e o seu produto pode ser precipitado com anti-soro para a enzima usual. O terceiro alelo descrito R, é o responsável pela variante que apresenta menos de 10% da atividade normal e que mostra uma banda de mobilidade levemente mais rápida que a da enzima usual, em eletroforese em gel de amido (Goedde e cols., 1965). Nogueira e cols. (1990) identificaram uma mutação que causa uma alteração na seqüência de leitura a partir do codon 117, onde GGT (Gly) passa a ser ocupado por GGAG, levando à criação de um código de parada na posição 129. A mutação leva

à tradução de somente 128 aminoácidos, sendo anterior ao codon que codifica a serina do sítio ativo (Ser¹⁹⁸). Assim, se o polipeptídeo correspondente fosse produzido, ele teria somente 22% do comprimento da enzima normal. A mutação descrita explica a existência do alelo S.

Whittaker e cols., (1990b), utilizando imuno eletroforese em foguete e ELISA para quantificar, e benzoilcolina e butirilcolina para medir a atividade da enzima de homozigotos silenciosos, confirmaram a existência de heterogeneidade genética e sugeriram a ocorrência de um quarto alelo silencioso, que se caracterizaria por altos níveis de proteína imuno reativa.

1.4.1.5 Alelo BCHE*J

Garry e cols. (1976) identificaram uma variante da BChE associada com uma redução de 66% do número de moléculas circulantes. Este dado foi posteriormente confirmado por Rubinstein e cols. (1976).

1.4.1.6 Alelo BCHE*SU

Este alelo foi identificado por Agarwal e cols. (1976), ao analisarem soros de indivíduos considerados como portadores do fenótipo usual, mas que apresentaram apnéia prolongada frente à dose padrão de succinilcolina. Goedde e

Agarwal (1978), ao analisarem estes soros, utilizando paralelamente como substrato tanto a benzoilcolina como a succinilcolina e dibucaína como inibidor, verificaram inibição anômala frente ao último substrato.

1.4.1.7 Alelo BCHE*K

Rubinstein e cols. (1978) descreveram uma variante da BChE, denominada K em honra a Werner Kalow, que foi identificada em heterozigose com a variante atípica, por apresentar resultados característicos no perfil de inibição com dibucaína. A presença deste alelo resulta na redução de 33% das moléculas circulantes. Evans e Wardell (1984) e Whittaker e Britten (1985), pesquisando a frequência do fenótipo BCHE AK, entre indivíduos anteriormente identificados como BCHE UA, encontraram os valores 11,5% e 13,3%, respectivamente. A frequência deste fenótipo avaliada em 2,04% para uma amostra da população de Curitiba é significativamente menor que as acima citadas (Alcântara e cols. 1990).

Atualmente não se pode distinguir os indivíduos BCHE UK e BCHE KK dos BCHE UU através de testes de inibição (Whittaker e Britten, 1990a). A variante K é resultado de uma mutação que causa a substituição de alanina por treonina na posição 539. La Du e cols. (1990), utilizando a técnica da PCR, detectaram um desequilíbrio de ligação entre as

variantes atípica e K, verificando que cerca de 90% das mutações atípicas estão ligadas em tandem com a mutação K.

O mesmo grupo de pesquisadores têm identificado, através de análise de ADN, genótipos que não poderiam ser distinguidos através dos testes de inibição (tabela 05).

Deve-se ressaltar que entre os fenótipos classificados como BCHE AK, através de métodos de inibição enzimática, encontram-se os genótipos BCHE AK/K, BCHE A/K e BCHE A/U pela análise de ADN (La Du, 1990)*. Percebe-se também que o fenótipo BCHE UA, identificado através de métodos de inibição enzimática, apresenta as mutações A e K em cis, possuindo o genótipo BCHE AK/U.

A frequência do alelo K, determinada pela análise do ADN através da utilização da técnica da PCR é de 11,3% (La Du e cols., 1990).

1.4.1.8 Alelo BCHE*NFDL

Este alelo foi descrito por Simpson e Elliott (1981) numa família de Newfoundland. É reconhecido por apresentar alta porcentagem de inibição pela dibucaína, particularmente quando o substrato utilizado é a succinilditiocolina.

* Painei apresentado no 3º Congresso Internacional sobre Colinesterases, França 1990.

TABELA 05. COMPARAÇÃO ENTRE DADOS OBTIDOS PARA ALGUMAS DAS VARIANTE GENÉTICAS DA BChE, ATRAVÉS DE MÉTODOS DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA E PCR*.

Classificação das Variantes Genéticas		Aminoácido afetado	
<u>Métodos:</u>			
<u>Inibição</u>	<u>PCR</u>	<u>Alelo um</u>	<u>Alelo dois</u>
Usual	U/U	normal	normal
Usual	U/K	539 Ala-Thr	539 Ala-Thr
Usual	U/K	normal	539 Ala-Thr
Usual	U/S	normal	117 Gly-frame shift
UF	U/F	normal	390 Gly-Val
UF	U/F	normal	243 Thr-Met
Atípica	AK/AK	70 Asp-Gly & 539 Ala-Thr	70 Asp-Gly & 539 Ala-Thr
Atípica	A/AK	70 Asp-Gly	70 Asp-Gly & 539 Ala-Thr
Atípica	AK/S	70 Asp-Gly & 539 Ala-Thr	117 Gly-frame shift
AK	AK/K	70 Asp-Gly & 539 Ala-Thr	539 Ala-Thr
AK	A/U	70 Asp-Gly	normal
UA	AK/U	70 Asp-Gly & 539 Ala-Thr	normal
AF	A/F	70 Asp-Gly	390 Gly-Val
AF	A/F	70 Asp-Gly	243 Thr-Met
Silenciosa	S/S	117 Gly-frame shift	117 Gly-frame shift

* Segundo La Du e cols (1991).

1.4.1.9 Alelo BCHE*H

Foi descrito por Whittaker e Britten (1987a) ao analisarem o soro de dois indivíduos sensíveis à succinilcolina. Estes apresentavam uma drástica redução da atividade enzimática, tal como a encontrada em alguns dos fenótipos silenciosos e inibição incomum com o Ro2-0683, embora as inibições com dibucaína e fluoreto de sódio fossem sugestivas de fenótipo BCHE A. Esse alelo só tem sido identificado nos testes de inibição enzimática quando em heterozigose com o alelo BCHE*A. Recentemente uma mutação que substitui Val¹⁴² por Met (GTG-ATG) foi associada com esta variante (Jensen e cols., 1990).

1.4.2. Variantes da BChE com atividade aumentada

Algumas variantes da BChE apresentam atividade de duas a quatro vezes maior que a normal. Comportam-se como BChE usual frente aos inibidores dibucaína e fluoreto de sódio. Não se conhece o processo que as origina.

Cynthiana: eletroforeticamente apresenta uma banda extra que migra mais lentamente que as bandas C₄ e C₅. Esta banda de menor mobilidade parece ser o resultado de uma isoenzima com peso molecular muito alto, indicando que as moléculas da enzima variante se agregam para formar uma molécula maior com mais subunidades. A atividade específica e

a estabilidade da enzima variante são semelhantes àquelas mostradas pela enzima normal. O aumento da atividade observado nos portadores da enzima variante presumivelmente é devido a um aumento no número de moléculas (Neitlich, 1966; Yoshida e Motulsky, 1969; Delbruck e Henkel, 1979).

Johannesburg: apresenta mobilidade eletroforética normal, é mais estável ao calor que a enzima usual. A atividade aumentada provavelmente é resultado da produção numa taxa normal, de uma enzima hiper ativa (Krause e cols., 1988).

1.4.3 Loco CHE2

Harris e cols. (1962 e 1963a) observaram a presença de uma zona adicional com atividade de BChE, de migração mais lenta, que foi denominada C₅. No mesmo trabalho demonstraram o não-alelismo entre essa variante e as do loco BCHE. Considera-se que o componente C₅ da BChE seja o produto do gene CHE2. Foi demonstrado que os indivíduos CHE2 C₅⁺ são menos sensíveis à succinilcolina que os indivíduos CHE2 C₅⁻ (Sugimori, 1986). Também verificou-se que os indivíduos que apresentam fenótipo CHE2 C₅⁺ possuem, em média, 30% a mais de atividade de BChE que os CHE2 C₅⁻ (Harris e cols., 1963a).

Foi descrita considerável variação na intensidade do componente C₅ presente entre os indivíduos CHE2 C₅⁺ (Robson e

Harris, 1966; Chautard-Freire-Maia e cols., 1984a e 1991). Observou-se que indivíduos CHE2 C5+ podem se tornar transitoriamente CHE2 C5- (Masson e cols., 1990).

Os dados de Harris e cols. (1963a) indicam que a frequência de indivíduos CHE2 C5+ não varia entre os sexos, enquanto que os dados de Ashton e Simpson (1966) e Chautard-Freire-Maia e cols. (1991b) mostram diferenças significativas.

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

A demonstração de que a isoenzima C₂ é formada pela associação BChE-albumina (Masson, 1989) indica que a variante C₅ seja uma enzima híbrida composta pelo produto do loco BChE associado a outra proteína. Essa hipótese foi recentemente fortalecida com as evidências da existência de um único gene codificador da BChE humana (Arpagaus e cols., 1990) e ainda mais com o trabalho de Masson e cols. (1990) que mostra ser a produção de C₅ não dirigida por um segundo gene da BChE. Esses últimos autores mostram, através de análises de ADN de

indivíduos CHE2 C5+ não relacionados, a presença de um único gene codificador da BChE.

Um trabalho recente (Masson, 1991) considera C₅ como uma enzima híbrida formada pela associação não-covalente do tetrâmero de BChE com uma proteína desconhecida (X). X apresenta peso molecular de 60 kDa, e não é AChE, albumina, fragmento de colágeno, fragmento de imunoglobulina nem fragmento de fibronectina. Atualmente aceita-se que a expressão de X possa ser governada por um gene localizado no braço longo do cromossomo 2 (Eiberg e cols., 1989), enquanto que outros pesquisadores utilizando hibridização "in situ" e análise de ligação com resultados sugestivos, mas não significativos, defendem sua localização no cromossomo 16 (Lovrien e cols., 1978; Soreq e cols., 1987; Marazita e cols., 1989).

1.5 MEDIDA DA ATIVIDADE DA BChE

Dispõe-se de um grande número de procedimentos para medir a atividade da BChE sérica. As revisões de Witter (1963) e Evans e Wroe (1978) fornecem maiores detalhes sobre estes procedimentos.

Os substratos que melhor se adaptam à rotina e com isso ganharam aceitação foram a benzoilcolina, vários ésteres tiocolínicos e o alfa-naftilacetato.

BENZOILCOLINA

A possibilidade de visualizar a reação medindo a redução na absorbância em 240 nm quando a benzoilcolina é enzimaticamente hidrolisada em colina e ácido benzóico, faz com que este substrato seja auto-indicador da reação. Este fato, associado a ter sido o primeiro substrato utilizado para caracterização de variantes da BChE (Kalow e Genest, 1957) tornou o método muito popular. O procedimento foi conservado ao longo do tempo sem alterações significativas e para quase todas as variantes, descobertas com inibidores, a benzoilcolina foi o substrato do ensaio.

A determinação é específica para BChE, sendo a reação com AChE muito lenta, não interferindo no resultado. Como pontos negativos podemos citar que o ensaio é realizado em 240nm, região do espectro que requer um equipamento de alta qualidade para defini-la, e onde as proteínas da amostra absorvem intensamente, reduzindo a precisão das leituras. (Abernethy e cols., 1986)

ÉSTERES TIOLÍNICOS

Ellman e cols. (1961) descreveram um procedimento onde a tiocolina liberada pela reação enzimática era quantificada pela reação com o ácido 5,5' -ditiobis-(2-nitrobenzóico) ou DTNB. A velocidade rápida de hidrólise e a

intensa absorbância do indicador compuseram uma metodologia sensível e conveniente ao uso no laboratório.

Entre os ésteres de tiocolina mais utilizados como substratos encontram-se a acetil, propionil e butiriltiocolinas, sendo este último específico para a BChE.

O procedimento descrito por Dietz e cols., (1973) utilizando propioniltiocolina associada ao DTNB foi referendado como método selecionado. Este substrato não é específico para BChE, mas é desdobrado pela AChE em menor velocidade (Aldridge, 1953).

Evans e Wroe (1978) propuseram modificações à metodologia descrita por Dietz e cols. (1973) e demonstraram que a propioniltiocolina era o substrato que melhor discriminava os indivíduos sensíveis à succinilcolina, quando a atividade era o único parâmetro tomado. Com isso o uso da propioniltiocolina vem se consolidando como mostra a literatura.

ALFA-NAFTILACETATO

Os substratos que não são ésteres colínicos ou seus derivados, têm mostrado uso limitado para a medida da atividade. A falta de especificidade e a baixa solubilidade do alfa-naftilacetato reduzem ainda mais sua utilidade neste campo. No entanto, todas as variantes da BChE desdobram o alfa-naftilacetato com velocidades semelhantes e K_m próximos,

o que determina o bom desempenho deste substrato nos procedimentos de inibição enzimática para caracterização fenotípica, processo ao qual ele está restrito atualmente. (Evans, 1986).

1.5.1 INIBIDORES DA BChE PARA FENOTIPAGEM

Estão descritos vários compostos com capacidade discriminatória de fenótipos (Kalow e Davies, 1958), no entanto, se destacam, pelo seu uso frequente, a dibucaína, Ro2-0683, fluoreto de sódio e DL-propranolol.

A dibucaína é um inibidor de ação imediata que produz perfis de inibição semelhantes ao Ro2-0683. Este último, um carbamato, inibe a BChE de forma lenta e progressiva em relação ao tempo, proporcionando com isso certas vantagens sobre a dibucaína na caracterização das variantes.

A inibição com fluoreto de sódio é reconhecidamente sensível à temperatura e condições de ensaio, o que o torna de difícil manejo (King e Morgan, 1970 e King e Dixon, 1970).

Whittaker e cols (1981) introduziram no rol dos inibidores diferenciais da BChE um beta bloqueador, o propranolol. Sua inibição é imediata e os perfis de inibição oferecem boa discriminação das variantes.

1.6 BChE E PESO

Diversos autores têm descrito relação entre atividade da BChE e peso. Berry e Cowin (1954) relataram uma correlação positiva entre atividade da BChE e gordura subcutânea. Demonstrou-se que indivíduos com maior peso apresentam, em média, maior atividade da BChE (Simpson, 1966; Stueber-Odebrecht e cols., 1985; Brock e Brock, 1990) e que nos obesos a atividade média da enzima é mais alta (Cucuianu e cols., 1968).

Em um estudo no qual a variabilidade genética do loco CHE2 foi considerada, demonstrou-se a existência de uma correlação positiva entre atividade da BChE e peso do adulto nos indivíduos de fenótipo CHE2 C5- (Chautard-Freire-Maia e cols., 1990). No mesmo trabalho a distribuição do peso nos indivíduos de fenótipo CHE2 C5+ mostrou ser independente da atividade da enzima, embora estes indivíduos apresentem maior atividade média da BChE.

Chautard-Freire-Maia e cols. (1991a), analisando a distribuição do peso do adulto em relação à variabilidade apresentada na intensidade da banda C₅, demonstraram que indivíduos de fenótipo CHE2 C5+ intenso, que apresentam a maior atividade média de BChE, possuem em média cerca de 6 kg a menos que seus controles CHE2 C5-. Os indivíduos que apresentam banda C₅ fraca mostram uma correlação positiva entre peso e atividade da BChE, e correlação negativa entre

peso e intensidade da banda C₅. Embora possuam atividade média da BChE mais alta que os seus controles CHE2 C₅-, não diferem deles quanto ao peso.

1.7 OBJETIVOS

No Laboratório de Polimorfismos e Ligação têm-se desenvolvido trabalhos sobre a variabilidade genética da butirilcolinesterase humana, em que são considerados os locos BCHE e CHE2. Diversos trabalhos relatam as frequências alélicas das variantes da butirilcolinesterase em várias populações brasileiras (Chautard-Freire-Maia e cols., 1984 a,b; Guerreiro e Chautard-Freire-Maia, 1984; Stueber-Odebrecht e cols., 1985; Primo-Parmo e cols., 1986; Alcântara e cols., 1991), e recentemente os pesquisadores deste laboratório demonstraram uma relação entre o peso de adultos e fenótipos do loco CHE2 (Chautard-Freire-Maia e cols., 1990 e 1991).

Em continuidade a esta linha de pesquisa, que estuda relações entre peso e butirilcolinesterase, formulamos o primeiro objetivo do presente trabalho: analisar o comportamento do peso do adulto frente à variabilidade genética do loco BCHE, numa amostra de indivíduos de fenótipo CHE2 C₅-. Durante o processo de fenotipagem do loco CHE2,

introduzimos modificações na metodologia até então utilizada, que serão comentadas neste trabalho.

Uma vez que teríamos de fazer um rastreamento populacional dos fenótipos do loco BCHE, para concretizar o primeiro objetivo, decidimos que nosso segundo objetivo seria determinar a freqüência do fenótipo BCHE AK entre portadores do alelo BCHE*A. A razão deste objetivo é que houve discordância entre os dados apresentados anteriormente para esta mesma população (Alcântara e cols., 1990) e aqueles citados na literatura (Evans e Wardell, 1984; Whittaker e Britten, 1985).

A metodologia que empregamos para a fenotipagem do loco BCHE foi desenvolvida recentemente (Alcântara, 1989; Picheth e cols., 1990) e seu comportamento analisado frente às variantes da butirilcolinesterase de que o laboratório dispunha na época. Como este procedimento não havia ainda sido empregado em estudos populacionais, decidimos avaliar sua discriminação frente a soros de referência com genótipos caracterizados através da análise de ADN, bem como comparar com a metodologia clássica, de uso corrente.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 AMOSTRA

Para a realização deste trabalho foram utilizadas amostras de sangue, cedidas pelo Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (Hemepar), obtidas de doadores de sangue da região de Curitiba. Foram fornecidas informações de cada indivíduo quanto a sexo, idade, altura, peso e raça. As amostras de sangue foram coletadas durante os anos de 1988 e 1990.

Da amostra coletada em 1988 separaram-se de 1326 soros, previamente examinados quanto ao loco CHE2, possuindo todos o fenótipo CHE2 C5-. Esta amostra permaneceu estocada a -20°C até a data do ensaio. A amostra obtida em 1990 é constituída de 474 plasmas, coletados com EDTA dissódico líquido a 1%, na proporção de 2ml do anticoagulante para 20ml de sangue. Esses plasmas foram estocados a -20°C até a data do ensaio.

As 1800 amostras de sangue foram utilizadas para a determinação da variabilidade genética da BChE em Curitiba. Foram fenotipadas pelo método de Morrow e Motulsky (1968) com modificações introduzidas por Alcântara (1989) e Picheth e cols. (1990), utilizando-se inicialmente como inibidor somente o DL-propranolol. As amostras que se

comportaram como não usuais tiveram seus fenótipos confirmados através da mesma metodologia empregando-se então, além do DL-propranolol, o inibidor Ro2-0683. As amostras de fenótipo não usual assim selecionadas foram também examinadas pelo método de Kalow e Genest modificado (1957), empregando-se como inibidores diferenciais dibucaína, fluoreto de sódio, DL-propranolol e Ro2-0683.

Para análise da variabilidade do loco BCHE em relação ao peso do adulto, utilizaram-se informações dos indivíduos cujas amostras de sangue se comportaram como não usuais. Cada um destes indivíduos foi pareado com dois controles de fenótipo usual. O pareamento foi realizado com base nas variáveis sexo, altura, idade e raça, sem que se tivesse conhecimento do peso.

A amostra de fenótipos não usuais é constituída por 55 homens (88,7%) e 7 mulheres (11,3%), com idade média (\pm E.P.) de $28,0 \pm 1,3$ anos, variando de 18 a 54 anos. Quanto à raça, 91,9% dos indivíduos são brancos, 1,6% negros e em 6,5% dos casos a raça não foi determinada. A altura média (\pm E.P) é de $170,3 \pm 1,0$ cm, variando de 152 a 186 cm.

O grupo de indivíduos de fenótipo usual utilizados como controles é constituído por 110 homens (88,7%) e 14 mulheres (11,3%), com idade média (\pm E.P.) de $27,9 \pm 0,8$ anos, variando de 18 a 52 anos. Quanto à distribuição racial, 98,4% dos indivíduos são brancos e em 1,6% dos casos, a raça não foi determinada. A altura média (\pm E.P.) é de $170,4 \pm 0,7$

cm, variando de 151 a 187 cm.

A amostra de indivíduos de fenótipo não usual não difere da amostra controle quanto a sexo, idade ($t= 0,12$; $p>90\%$) e altura ($t=0,06$; $p>90\%$).

As 186 amostras de sangue foram fenotipadas quanto ao loco CHE2 conforme item 2.5 e caracterizadas como CHE2 C5-.

A atividade da BChE foi determinada conforme item 2.4. Os plasmas tiveram a atividade corrigida devido à diluição ocasionada pela utilização do anticoagulante líquido.

Soros fornecidos pela Dra. Christine Nogueira, então do Departamento de Farmacologia da Universidade de Michigan, foram utilizados como referência na fenotipagem do loco BCHE. Estes soros possuíam os seguintes genótipos: BCHE K/K, BCHE AK/K, BCHE U/K, BCHE U/AK, BCHE U/F e BCHE A/F, caracterizados através da análise de ADN. Também foram utilizados dois soros de fenótipo BCHE A, caracterizados anteriormente em nosso laboratório. Para o controle de qualidade utilizou-se um "pool" de soros, obtido a partir da mistura de aproximadamente 100 soros excedentes de rotina clínica, isentos de icterícia, hemólise e lipemia. Foram coletados durante vários dias e mantidos a -20°C . Após descongelamento, foram misturados por uma hora em agitador magnético a baixa velocidade, seguindo-se filtração em papel de filtro retentor. Sob constante homogenização, alíquotas do filtrado de aproximadamente 1 ml foram envasadas e mantidas a

-20°C. Este "pool" demonstrou comportamento de fenótipo BCHE U, frente às metodologias utilizadas e atividade dentro dos parâmetros normais. Cada alíquota do "pool" foi descongelada uma única vez para uso após o preparo.

2.2 MÉTODOS PARA FENOTIPAGEM DO LOCO BCHE

2.2.1 Método de Morrow e Motulsky modificado.

Foi utilizado o método de Morrow e Motulsky (1968) com as modificações propostas por Alcântara (1989) e Picheth e cols. (1990), com o seguinte procedimento.

A. Reagentes

a) Tampão fosfato 200 mM, pH 7,1

Misture 660 ml de Na_2HPO_4 (PM = 141,96) 200 mM e 330 ml de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (PM = 137,99) 200mM. Se necessário ajuste o pH a 7,1 com uma das soluções de fosfato.

b) DL-propranolol 3,38 mM (solução estoque).

Dissolva 10 mg de cloridrato de DL-propranolol (PM = 295,81) em 10ml de água destilada. Mantenha a -20°C.

c) DL-propranolol 0,135 mM (solução uso).

Dilua 0,2 ml da solução de DL-propranolol estoque 3,38 mM em 4,8 ml de tampão fosfato 200 mM, pH 7,1. Prepare no dia do uso.

d) Ro2-0683 1mM (solução estoque).

Dissolva 39,3 mg de Ro2-0683 (PM = 393) em 100 ml de água destilada. Estável a -20°C.

e) Ro2-0683 5×10^{-3} mM (solução uso).

Dilua 50 ul de Ro2-0683 1mM estoque em 10ml de tampão fosfato 200 mM, pH 7,1.

f) Substrato alfa-naftilacetato 30mM (estoque).

Dissolva 56 mg de alfa-naftilacetato (PM = 186,2) em 5ml de acetona. Após a dissolução acrescente 5 ml de água destilada. A solução é estável por 3 semanas a 4°C.

g) Substrato alfa-naftilacetato 0,3 mM (solução uso).

Prepare no momento do uso:

Tampão fosfato 200 mM, pH7,1.....20 ml

Alfa-naftilacetato 30 mM (estoque).....1 ml

Água destiladaq.s.p.....100 ml

h) Amostra: soro ou plasma diluído 1/100 em tampão fosfato 200 mM, pH 7,1.

i) Reagente de cor.

Prepare no momento do uso:

Fast Red TR salt.....20 mg

Água destilada 3 ml

Duonal 104 mM..... 2 ml

Dissolva o Fast Red TR salt (Sigma NF-1500) em água destilada e adicione o Duonal (PM = 288,4; Lauril sulfato de sódio, 3% p/v) evitando a formação de espuma.

B. Técnica

Reagentes	Ensaio (ml)			
	Controle	Ro2-0683	DL-prop.	Branco
Tampão fosfato 200 mM, pH 7,1	0,2	---	---	0,7
Ro2-0683 5×10^{-3} mM	---	0,2	---	---
DL-propranolol 0,135 mM	---	---	0,2	---
Alfa-naftilacetato 0,3 mM	2,0	2,0	2,0	2,0
Incubar 5 minutos a 37°C.				
Amostra	0,5	0,5	0,5	---
Incubar 25 minutos a 37°C.				
Reagente de cor	0,2	0,2	0,2	0,2

Misturar bem e após 10 minutos ler as absorvâncias dos tubos controle e inibidos contra o branco em 540 nm.

C. Cálculos dos Números de Inibição:

Os Números de Inibição (N.I.) de Ro2-0683 (RON) e de DL-propranolol (PN) foram definidos conforme Kalow e Genest (1957), como:

$$\text{Número de Inibição} = \frac{A_{\text{controle}} - A_{\text{inibidor}}}{A_{\text{controle}}} \times 100$$

Onde A é equivalente à absorvância ou atividade medidas na reação enzimática.

A classificação dos fenótipos foi realizada conforme os dados obtidos por PICHETH e cols (1990) na Tabela 06.

TABELA 06. MÉDIAS (\bar{x}) E AMPLITUDES DE VARIAÇÃO (A.V.) DAS PORCENTAGENS DE INIBIÇÃO (RON E PN) POR FENÓTIPO, segundo Picheth e cols. (1990).

Fenótipos	Números de Inibição				
	N	PN		RON	
		\bar{x}	A.V.	\bar{x}	A.V.
BCHE U	41	73	69-78	89	86-91
BCHE UF	08	59	55-63	81	78-85
BCHE UA	25	47	38-55	60	52-67
BCHE A	01	4	---	11	---

2.2.2 Método de KALOW e GENEST

O substrato benzoilcolina foi utilizado com os inibidores a seguir, de acordo com as respectivas referências, dibucaina (Kalow e Genest, 1957), fluoreto de sódio (Harris e Whittaker, 1961), Ro2-0683 (Liddell e cols., 1963) e DL- propranolol (Whittaker e cols., 1981). Os ensaios foram realizados como descrito a seguir.

A. Reativos

a) Tampão fosfato Sorensen 67mM, pH 7,4.

Dissolva 7,584 g de Na_2HPO_4 anidro (PM= 141,96) e 1,82g de KH_2PO_4 anidro (PM= 136,09) em um volume final de 1000 ml de água destilada.

b) Substrato de Benzoilcolina 20mM (solução estoque).

Dissolva 243,6 mg de cloridrato de benzoilcolina (PM= 243,6) em 50 ml de água destilada. Estável por vários meses a -20°C .

c) Substrato de Benzoilcolina 0,2 mM (solução uso).

Dilua 0,1 ml da solução de benzoilcolina 20 mM a um volume final de 10 ml, com fosfato 67 mM, pH 7,4. Estável por uma semana a 4°C .

d) Dibucaina 4 mM (solução estoque).

Dissolva 76 mg de cloridrato de dibucaina (PM=379,03) em 50 ml de água destilada. Estável por vários meses a -20°C.

e) Dibucaina 0,04 mM (solução uso)

Dilua 0,1 ml da solução de dibucaina 4 mM a um volume final de 10 ml com tampão fosfato 67 mM, pH 7,4. Estável por uma semana a 4°C.

f) Fluoreto de sódio 10 mM (solução estoque).

Dissolva 42 mg de fluoreto de sódio (PM=42) em 100 ml de água destilada. Acondicione em frasco de polietileno. Estável por seis meses a -20°C.

g) Fluoreto de sódio 0,2 mM (solução uso).

Dilua 0,2 ml da solução de fluoreto de sódio 10 mM a um volume final de 10ml com tampão fosfato 67 mM, pH 7,4. Prepare no dia do uso.

h) DL-propranolol 3,38 mM (solução estoque)

Ver item 2.2.1 b de Materiais e Métodos.

- i) DL-propranolol $3,38 \times 10^{-2}$ mM (solução uso).
Diluir 0,1 ml da solução de DL-propranolol 3,38 mM a um volume final de 10 ml com tampão fosfato 67 mM, pH 7,4. Prepare no dia do uso.
- j) Ro2-0683 1 mM (solução estoque).
Ver item 2.2.1 de Materiais e Métodos.
- k) Ro2-0683 10^{-3} mM (solução intermediária).
Diluir 0,1 ml da solução de Ro2-0683 1 mM a um volume final de 100 ml com tampão fosfato 67 mM, pH 7,4. Estável por vários meses a -20°C .
- l) Ro2-0683 3×10^{-5} mM (solução uso).
Diluir 1,5 ml da solução de Ro2-0683 10^{-3} mM a um volume final de 50 ml com tampão fosfato 67 mM, pH 7,4.
- m) Substrato de benzoilcolina em Ro2-0683 (substrato com Ro2-0683 para inibição).
Misture 1 ml da solução de Ro2-0683 10^{-3} mM com 1 ml da solução de benzoilcolina 20 mM e complete o volume para 100 ml com tampão fosfato 67 mM, pH 7,4.

n) Amostra.

Soro ou plasma diluído 1/50 em tampão fosfato 67 mM, pH 7,4 (conforme descrito por La Du e cols., 1990).

B. Técnica

Em 240 nm, zerar o espectrofotômetro com água deionizada e seguir o procedimento descrito abaixo:

<u>Reativos a 25°C</u>	<u>Ensaio (ml)</u>			
	<u>Atividade</u>	<u>Dibucaína</u>	<u>NaF</u>	<u>DL-propranolol</u>
Tampão Fosfato 67 mM, pH 7,4	0,5	---	---	---
Benzoilcolina 0,2 mM	0,5	0,5	0,5	0,5
Dibucaína 0,04 mM	---	0,5	---	---
NaF 0,2 mM	---	---	0,5	---
DL-propranolol $3,38 \times 10^{-2}$ mM	---	---	---	0,5
Amostra	1,0	1,0	1,0	1,0

Misturar bem. Anotar o decréscimo na absorvância por quatro minutos até obter linearidade. Padronizou-se desprezar a leitura do primeiro minuto.

C. Técnica para inibição com Ro2-0683.

Reativos a 25°C	ml
Ro2-0683 3×10^{-5} mM	0,5
Amostra	1,0

Misturar bem e incubar por 60 minutos

Substrato em Ro2-0683 3×10^{-5} mM	0,5
---	-----

Misturar e observar o decréscimo na absorbância em 240 nm, de forma idêntica ao procedimento anterior.

D. Cálculo do Número de Inibição.

Os números de inibição, designados número de dibucaína (DN); número de fluoreto (FN); número de DL-propranolol (PN) e número de Ro2-0683 (RON), foram calculados como descrito no item 2.2.1 C, sendo os valores de absorbância (A) substituídos pelo $\Delta A/\text{min}$. (variação na absorbância por minuto), obtido na reação.

A classificação dos fenótipos foi feita conforme os números de inibição que constam na tabela 07, obtida a partir dos dados de Evans e Wardell (1984), e Whittaker e cols. (1985).

TABELA 07. NÚMEROS DE INIBIÇÃO DOS PRINCIPAIS FENÓTIPOS DO LOCO BCHE. UTILIZANDO BENZOILCOLINA COMO SUBSTRATO. Segundo Evans e Wardell (1984), e Whittaker e cols. (1985 e 1986).

Fenótipo	Números de Inibição			
	DN	FN	RON	PN
BCHE U	77-84	56-68	93-98	81-84
BCHE UA	48-69	44-54	66-80	60-67
BCHE A	8-28	10-32	5-23	5-14
BCHE AF	43-59	27-39	58-69	31-47
BCHE AK	48-64	33-50	49-66	---
BCHE AJ	40-47	35-39	40-49	---
BCHE AS	8-28	10-32	5-28	---
BCHE UF	70-83	41-57	91-100	70-76
BCHE F	64-69	34-48	---	52-55
BCHE UK	77-82	59-63	94-97	---
BCHE JK	82	63	97	---

2.3 METODOLOGIA PARA FENOTIPAGEM DO LOCO CHE2

Foi utilizado o procedimento eletroforético proposto por Robinson e cols. (1957) adaptado por Van Ros e Vervoort (1973), com modificações introduzidas anteriormente em nosso laboratório e também desenvolvidas no presente trabalho. Os ensaios foram realizados como descrito a seguir.

A. Reagentes

- a) Tampão citrato de sódio 500 mM, pH 6,2

Dissolva 147 g de citrato de sódio

($\text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; PM=294,11) em 1000 ml de água

destilada. Ajuste o pH a 6,2 adicionando quantidade suficiente de uma solução de ácido cítrico 1,56 M

($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$; 300 g/l; PM=192,13).

- b) Tampão citrato de sódio 50 mM, pH 6,2.

Diluir o tampão citrato de sódio 500 mM, pH 6,2 na proporção de 1:10, com água destilada. Preparar no dia do uso.

- c) Ágar a 1% p/v

Adicionar 0,5 g de Bacto Agar (Difco) a 50 ml de tampão citrato de sódio 50 mM, pH 6,2. Aquecer a mistura até completa dissolução do ágar. Verter o ágar ainda quente sobre a placa de vidro onde se

realizará a eletroforese e deixar solidificar.

d) Tampão fosfato 200 mM, pH 7,1

Preparar conforme item 2.2.1 a.

e) Substrato de alfa-naftilacetato

Preparar conforme item 2.2.1 f.

f) cromógeno-substrato.

No momento do uso, dissolver 40 mg de Fast Red TR Salt (Sigma NF-1500) em 40 ml de tampão fosfato 200 mM, pH 7,1. Após dissolução acrescentar 1 ml de alfa-naftilacetato 30 mM.

B. Técnica

A eletroforese é realizada em placas de vidro de 230 x 160 mm contendo aproximadamente 3 mm de gel de ágar.

As amostras de soro ou plasma são aplicadas com auxílio de uma lâmina de metal, tendo-se o cuidado de não perfurar o ágar durante a aplicação da amostra. Após a absorção da amostra no ágar, a placa é submetida à eletroforese utilizando-se como tampão nas cubas, citrato de sódio 50 mM, pH 6,2. A corrida eletroforética é realizada a 4°C, com aplicação de 75 mA (aproximadamente 100 V), durante 3 horas. Após este período vete-se sobre a placa o cromógeno-substrato recém preparado e incuba-se a 37°C por

uma hora. Após a revelação das bandas, retira-se o cromógeno-substrato e lava-se a placa com água para retirar o excesso de corante. Faz-se então a classificação do fenótipo por observação visual. O ágar é então colocado sobre uma folha de papel e levado à estufa a 37°C para secagem, após a qual realiza-se nova classificação dos fenótipos por observação visual.

Como controle da metodologia utilizamos, em cada corrida eletroforética, um soro CHE2 C5-, um CHE2 C5+ puro e outro diluído 1:2 em soro CHE2 C5-.

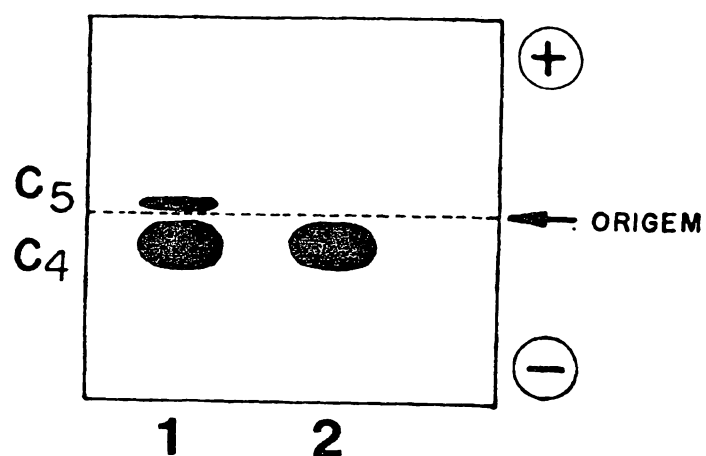


FIGURA 04. REPRESENTAÇÃO DO PERFIL DE MIGRAÇÃO ELETROFORÉTICA DE SOROS CHE2 C5+ (1) E CHE2 C5- (2).

Observar a localização das frações C₄ e C₅ no enzimograma da BChE em ágar, pH 6,2.

2.4 PROCEDIMENTO PARA MEDIDA DA ATIVIDADE.

Para a medida da atividade utilizamos o método de Dietz e cols. (1973), com as modificações introduzidas por Evans e Wroe (1978). As amostras foram ensaiadas como descrito a seguir.

A. Reativos

a) Tampão fosfato pH 7,6.

Misture 60 ml de KH_2PO_4 anidro (PM=136,09) 100 mM a 1000 ml de Na_2HPO_4 anidro (PM=141,96) 33,3 mM. Ajuste o pH a 7,6 com uma das soluções, se necessário.

b) Cromógeno DTNB 0,423 mM.

Dissolva 167 mg de DTNB (ácido 5,5' -ditiobis-2-nitrobenzóico; PM=396,4) em 1000 ml de tampão fosfato pH 7,6. A solução é estável por seis meses a 4°C.

c) Substrato de Propioniltiocolina 100 mM.

Dissolva 303 mg de iodeto de propioniltiocolina (PM=303,2) em 10 ml de água destilada. O reagente é estável em frasco âmbar por trinta dias a 4°C e seis meses a -20°C.

d) Amostra.

Soro ou plasma diluído em água destilada 1/100.

B. Técnica

Zere o espectrofotômetro com água destilada, em 410 nm.

Reativos a 25°C	ml
Cromógeno DTNB 0,423 mM	2,20
Propioniltiocolina 100 mM	0,05
Amostra	0,25

Misture bem e anote a absorbância (A) disparando o cronômetro simultaneamente. Repita a operação com 1,2 e 3 minutos. Calcule o $\Delta A/\text{minuto}$ (variação da absorbância por minuto).

C. Cálculo da atividade.

A atividade enzimática foi definida em Unidades Internacionais por litro de soro (U/l), sendo 1 U/l equivalente à hidrólise de 1 μMol de substrato por minuto, por litro de soro. Neste trabalho a atividade foi expressa pelo múltiplo quilo unidades por litro (KU/l).

$$KU/l = \Delta A/\text{min.} \times 73,53$$

Sendo o fator 73,53 obtido de:

$$\frac{1}{\epsilon_{410d}} \times \frac{VT}{VA}$$

onde:

$$\begin{aligned} \epsilon_{410 \text{ nm}} &= \text{coeficiente de extinção milimolar do ion} \\ &\quad \text{dinitro benzoato} \\ &= 13,6 \text{ mmol. l}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \text{ (Whittaker, 1983)} \end{aligned}$$

d = diâmetro da cubeta = 1 cm

VT = volume total = 2,5 ml

VA = volume de amostra = 0,25/100 = 0,0025 ml.

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

2.5.1 Cálculo das frequências alélicas.

A frequência dos alelos BCHE*A e BCHE*F foi determinada pelo método da simples contagem. O alelo BCHE*K teve a frequência estimada a partir das frequências dos fenótipos BCHE UA e BCHE AK e dos achados de La Du e cols. (1991) referentes à heterogeneidade do fenótipo BCHE AK.

Anteriormente (Evans e Wardell, 1984; Whittaker e Britten, 1985; Alcântara e cols., 1990), a frequência do alelo BCHE*K foi estimada a partir da proporção de fenótipos BCHE AK entre o total de fenótipos BCHE AK e BCHE UA.

Segundo La Du e cols.(1990) entre os fenótipos classificados como BCHE AK encontram-se os genótipos BCHE AK/K, BCHE A/K e BCHE A/U. Segundo os mesmos autores o fenótipo BCHE UA identificado através de inibição enzimática corresponde ao genótipo BCHE AK/U. Também foi relatado que cerca de 90% das mutações atípicas se encontram em tandem com a mutação K. Em vista dos dados obtidos a partir da análise de ADN, resolvemos fazer uma correção no método de estimativa da frequência do alelo BCHE*K, conforme exposto a seguir.

Considerando-se:

x = n^o observado de fenótipos BCHE UA determinados por inibição enzimática.

y = n^o esperado de genótipos BCHE A/U e BCHE AK/U.

$$y = \frac{x}{0,90}$$

z = n^o esperado de genótipos BCHE A/U.

$$z = y - x$$

w = n^o esperado dos genótipos BCHE AK/K e BCHE A/K.

t = n^o observado dos fenótipos BCHE AK.

$$w = t - z$$

$$\text{Frequência do alelo } \underline{\text{BCHE*K}} = \frac{w}{x + t}$$

O cálculo da frequência do alelo BCHE*U foi realizado através da diferença entre um e o somatório da frequência dos alelos não usuais, e para o cálculo do erro, utilizamos $N = 40$ (número de indivíduos BCHE U/A + BCHE A/K).

2.5.2 Análises Computacionais.

Os dados do presente trabalho foram codificados e processados em computador DEC-10 do Centro de Computação Eletrônica da UFPR. As análises estatísticas foram desenvolvidas através dos programas SPSS (Statistical Package for Social Sciences) e MINITAB. Foram utilizados o teste t e o teste do X^2 , e quando necessário, empregamos a correção de Yates.

Em algumas análises utilizou-se a regressão múltipla escalonada, onde:

$$Y = a + \sum_{i=1}^n b_i x_i + e$$

Sendo Y = variável dependente

a = intercepto múltiplo

b_i = i-ésimo elemento do vetor de coeficientes parciais de regressão.

x_i = i-ésima variável independente incluída no modelo

e = desvio de Y que não é explicado pela regressão.

Na análise de regressão múltipla escalonada, as

variáveis independentes são acrescentadas à equação, uma a uma, em ordem decrescente de sua contribuição à soma de quadrados devida à regressão. Empregamos o modelo mais econômico, que leva em conta apenas as variáveis que se mostraram significativas. Utilizamos o coeficiente de correlação padronizado (β) que permite analisar o efeito relativo de cada variável independente sobre a variável dependente.

O peso foi considerado como variável dependente e as variáveis independentes foram as seguintes: sexo, idade, altura, loco BCHE, atividade da BChE e conteúdo lipídico do soro.

2.5.3 Relação das variáveis examinadas na amostra, com respectivos códigos.

Variáveis	Códigos
Sexo	0 - masculino 1 - feminino
Raça	0 - branco 1 - mulato 2 - negro
Loco <u>BCHE</u>	0 - BCHE UA + BCHE AK 1 - BCHE UF 2 - BCHE U
Conteúdo Lipídico do Soro	0 - límpido 1 - lipêmico
Ano de coleta	0 - 1988 1 - 1990

Os códigos omitidos correspondem aos dados de atividade da BChE, idade, peso e altura.

3. RESULTADOS

3.1 METODOLOGIA E CONTROLE DE QUALIDADE

3.1.1 Perfis de inibição obtidos pelo método de Morrow e Motulsky modificado.

A tabela 08 mostra as médias e amplitudes de variação dos números de inibição (PN e RON) obtidas através do uso do método de Morrow e Motulsky modificado. A amplitude de variação do fenótipo BCHE A não foi determinada porque dispúnhamos de soros de apenas 2 indivíduos.

TABELA 08. MÉDIAS (\bar{x}) E AMPLITUDES DE VARIAÇÃO (A.V.) DOS NÚMEROS DE INIBIÇÃO, OBTIDOS ATRAVÉS DO MÉTODO DE MORROW E MOTULSKY MODIFICADO, CLASSIFICADAS POR FENÓTIPO.

Fenótipos	N	Números de Inibição			
		PN		RON	
		\bar{x}	A.V.	\bar{x}	A.V.
BCHE U	128	73,8	(69-78)	88,3	(86-93)
BCHE UF	23	63,0	(55-69)	82,2	(76-87)
BCHE UA	34	50,0	(43-56)	60,2	(54-67)
BCHE A	2	3,0	---	10,0	---
BCHE AK	8	37,6	(35-40)	46,6	(44-49)
BCHE AF	1	24,0	---	46,0	---
BCHE UK	1	72,0	---	91,0	---
BCHE K	1	72,0	---	86,0	---

3.1.2 Reprodutibilidade do método de Morrow e Motulsky modificado.

A tabela 09 contém os dados referentes à média, desvio padrão, amplitude de variação e coeficiente de variação obtidos em ensaios realizados com um "pool" de soros.

TABELA 09. PARÂMETROS ESTIMADOS ATRAVÉS DO MÉTODO DE MORROW E MOTULSKY MODIFICADO, COM UTILIZAÇÃO DE UM POOL DE SOROS, VISANDO CONTROLE DE QUALIDADE.

Número de Inibição	N	\bar{x}	D.P.	A.V.	C.V.
PN	106	74,3	1,38	71,5-77,1	1,86
RON	42	90,6	0,79	89,0-92,2	0,87

D.P.= Desvio padrão; A.V.= Amplitude de variação
C.V.= Coeficiente de variação; \bar{x} = média

3.1.3 Amplitudes de variação dos números de inibição obtidos com o método de Kalow e Genest modificado.

A tabela 10 mostra as amplitudes de variação dos números de inibição, obtidas em nossas condições de trabalho, com os inibidores dibucaína, fluoreto de sódio, Ro2-0683 e DL-propranolol.

TABELA 10. AMPLITUDES DE VARIAÇÃO DOS NÚMEROS DE INIBIÇÃO PARA ALGUNS FENÓTIPOS DA BChE, UTILIZANDO-SE BENZOILCOLINA COMO SUBSTRATO (KALOW E GENEST 1957, MODIFICADO).

Fenótipos	N	Números de Inibição			
		DN	FN	RON	PN
BCHE U	16	75-83	52-71	91-98	80-85
BCHE UF	20	68-81	42-63	87-95	65-80
BCHE UA	34	54-70	40-60	60-74	56-68
BCHE AK	8	44-57	36-54	48-56	44-56
BCHE AF	1	46	29	59	45
BCHE A	2	18	17	10	7
BCHE UK	1	80	61	92	81
BCHE K	1	79	59	91	80

3.1.4 Coeficientes de correlação referentes aos números de inibição apresentados pelas amostras não usuais, nos métodos de Kalow e Genest (1957) e Morrow e Motulsky modificados.

Na tabela 11 encontram-se os coeficientes de correlação obtidos quando se utilizaram os inibidores dibucaina, fluoreto de sódio, Ro2-0683 e DL-propranolol com a benzoilcolina (método de Kalow e Genest), e Ro2-0683 e DL-propranolol, com alfa-naftilacetato (método de Morrow e Motulsky modificado).

São fornecidos os dados separadamente para a amostra total e para as amostras classificadas de acordo com o ano de coleta.

TABELA 11. COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO ENTRE OS NÚMEROS DE INIBIÇÃO OBTIDOS COM AMOSTRA NÃO USUAL, COM OS MÉTODOS DE KALOW E GENEST E MORROW E MOTULSKY MODIFICADO, CLASSIFICADOS DE ACORDO COM O ANO DE COLETA.

Métodos	1990		1988		TOTAL	
	r	N	r	N	r	N
Kalow e Genest						
RON - PN	0,96	12	0,92	44	0,93	56
DN - PN	0,96	12	0,91	49	0,92	61
FN - PN	0,71	12	0,41	49	0,47	61
FN - RON	0,57	12	0,28	44	0,34	56
DN - RON	0,98	12	0,91	44	0,91	56
FN - DN	0,60	12	0,38	49	0,42	61
Morrow e Motulsky						
RON - PN	0,91	12	0,93	50	0,93	62

r = Coeficiente de correlação.

3.1.5 Variabilidade nas amostras de fenótipo BCHE UF.

As amostras de fenótipo BCHE UF foram agrupadas em quatro classes conforme os Números de Inibição obtidos com benzoilcolina e alfa-naftilacetato.

TABELA 12. VALORES MÉDIOS DE INIBIÇÃO DO FENÓTIPO BCHE UF CLASSIFICADO EM QUATRO GRUPOS COM BASE NOS RESULTADOS DO MÉTODO DE MORROW E MOTULSKY MODIFICADO SEGUNDO PICHETH e cols (1990).

Grupos	N	Métodos *					
		Kalow e Genest				Morrow e Motulsky	
		DN	FN	RON	PN	PN	RON
1	14	72,4	47,6	89,5	71,9	62,0	81,8
2	1	68,0	51,4	82,8	64,2	55,0	84,3
3	5	74,6	58,4	91,5	77,5	67,9	80,7
4	2	70,9	45,5	---	76,9	64,2	86,8

3.1.6 Distribuições das porcentagens de inibição obtidas com diferentes inibidores.

As figuras de números 05 a 11 apresentam as distribuições de seis fenótipos, considerando-se dois eixos, cada um referindo-se à porcentagem de inibição obtida com um determinado inibidor. A figura 05 apresenta dados obtidos com a utilização do método de Morrow e Motulsky (1968), como modificado por Picheth e cols. (1990). As seis figuras seguintes se referem a resultados obtidos com o método de Kalow e Genest (1957), que utiliza a benzoilcolina como substrato.

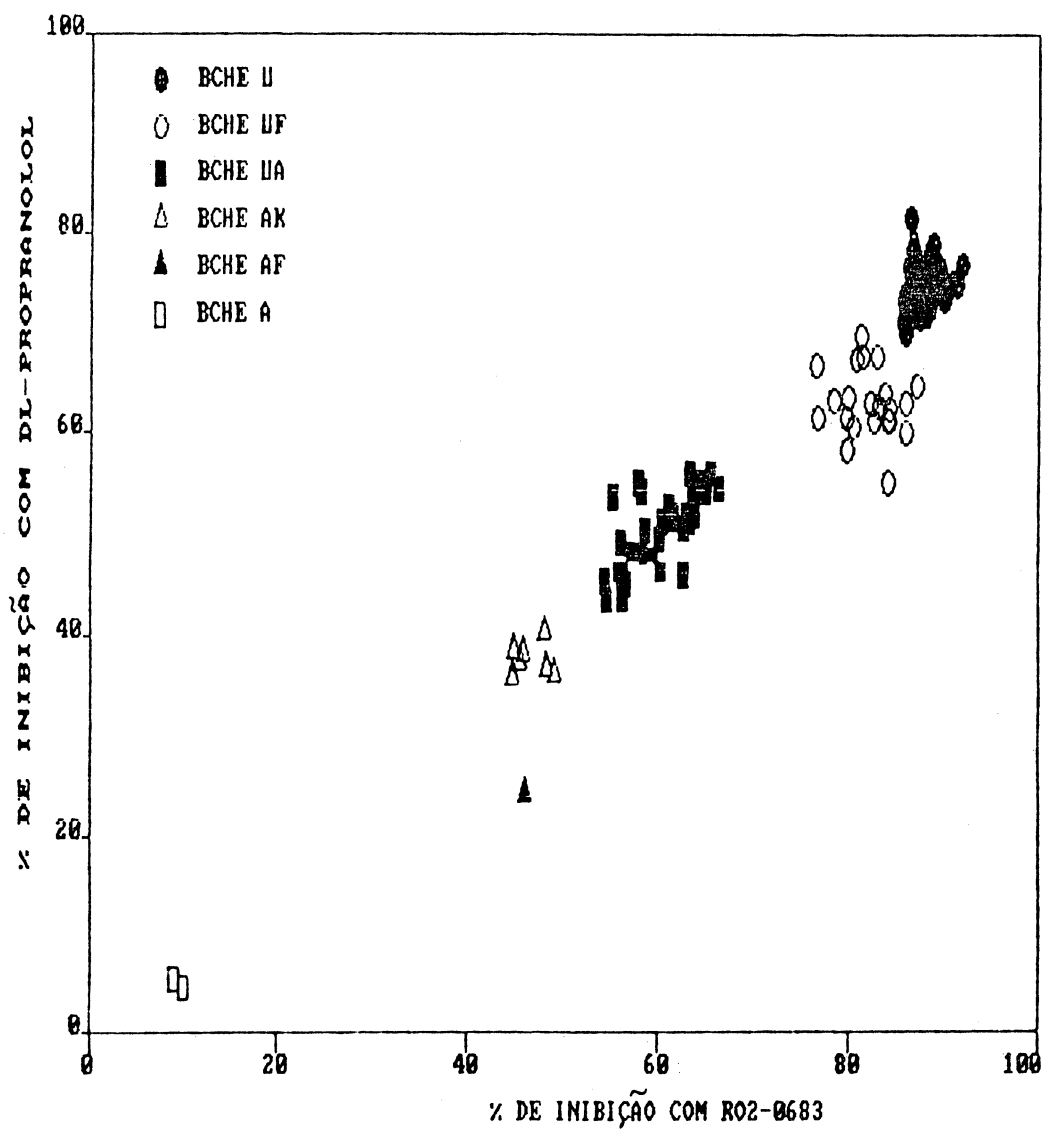


FIGURA 05. DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS DE ACORDO COM AS PORCENTAGENS DE INIBIÇÃO COM RO2-0683 e DL-PROPRANOLOL, UTILIZANDO ALFA-NAFTILACETATO COMO SUBSTRATO, CONFORME MÉTODO DE MORROW E MOTULSKY MODIFICADO.

Foram examinados 81 indivíduos, sendo 16 BCHE U, 22 BCHE UF, 33 BCHE UA, 7 BCHE AK, 1 BCHE AF e 2 BCHE A. As determinações foram realizadas conforme item 2.2.1 de Materiais e Métodos.

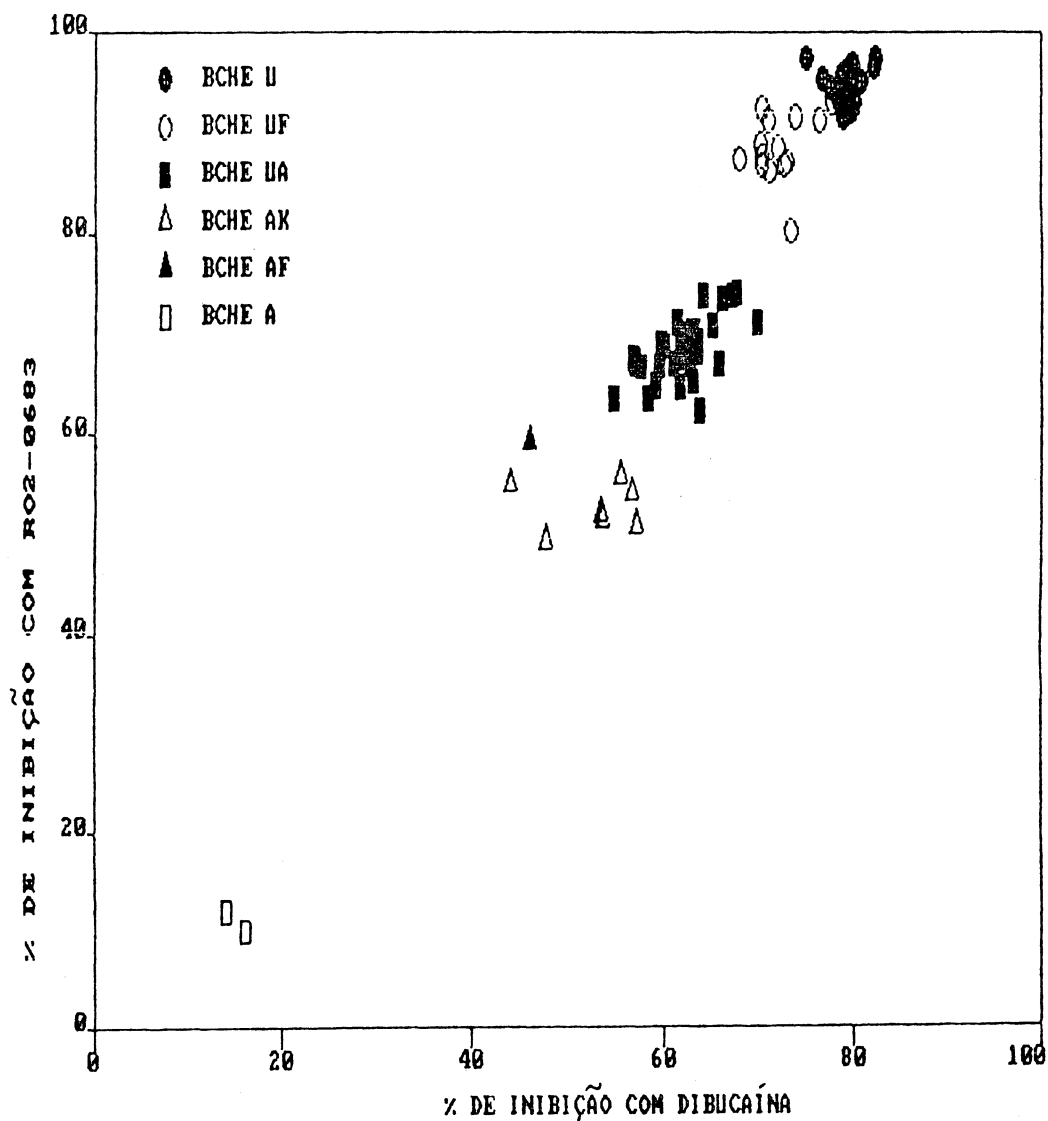


FIGURA 06. DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS DE ACORDO COM AS PORCENTAGENS DE INIBIÇÃO COM Ro2-0683 e DIBUCAÍNA, UTILIZANDO BENZOILCOLINA COMO SUBSTRATO CONFORME MÉTODO DE KALOW E GENEST.

Foram examinados 75 indivíduos, sendo 16 BCHE U, 16 BCHE UF, 33 BCHE UA, 7 BCHE AK, 1 BCHE AF e 2 BCHE A. As determinações foram realizadas conforme item 2.2.2 de Materiais e Métodos.

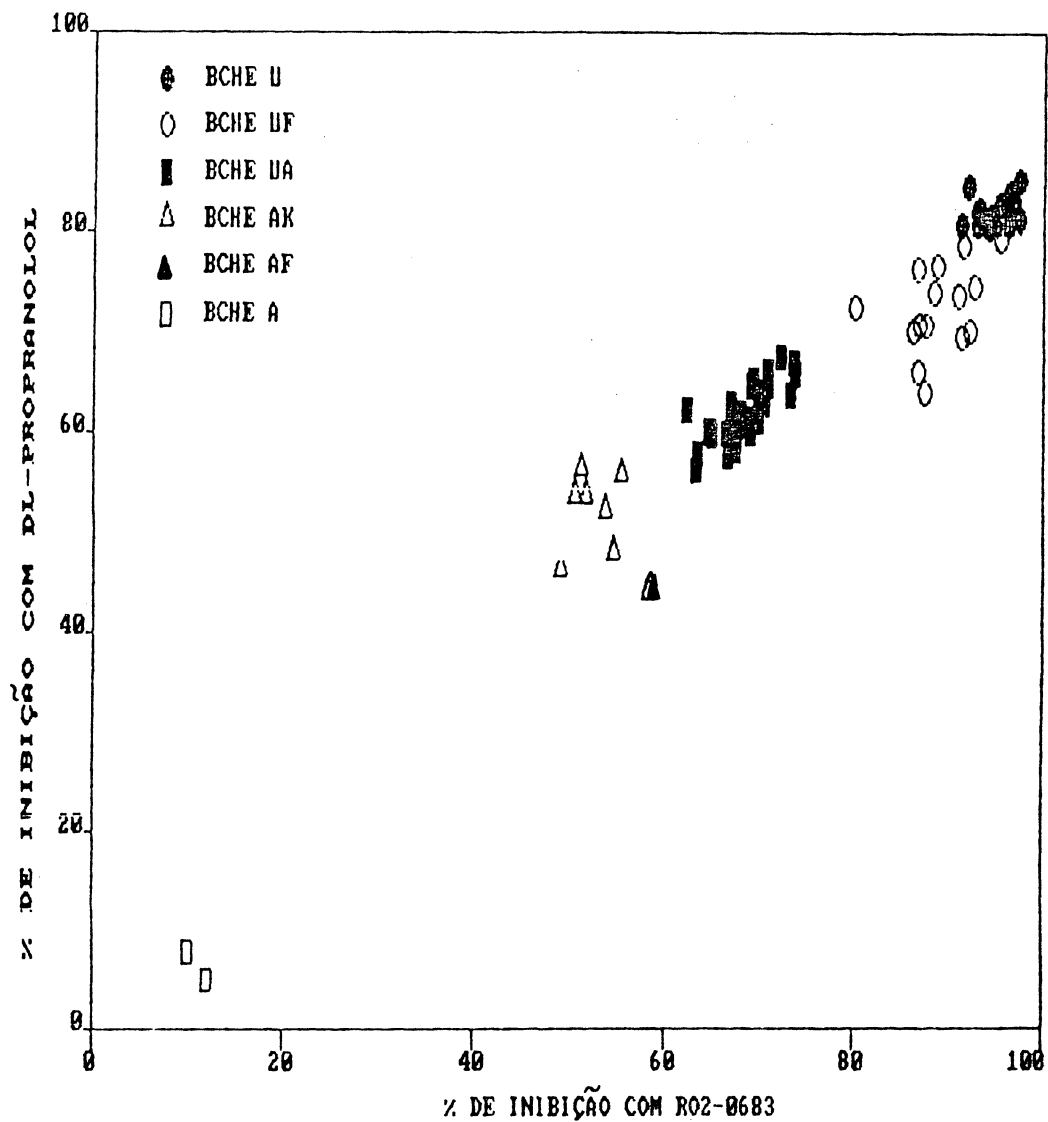


FIGURA 07. DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS DE ACORDO COM AS PORCENTAGENS DE INIBIÇÃO COM R02-0683 e DL-PROPRANOLOL, UTILIZANDO BENZOILCOLINA COMO SUBSTRATO CONFORME MÉTODO KALOW E GENEST.

Foram examinados 75 indivíduos, sendo 16 BCHE U, 16 BCHE UF, 33 BCHE UA, 7 BCHE AK, 1 BCHE AF e 2 BCHE A. As determinações foram realizadas conforme item 2.2.2 de Materiais e Métodos.

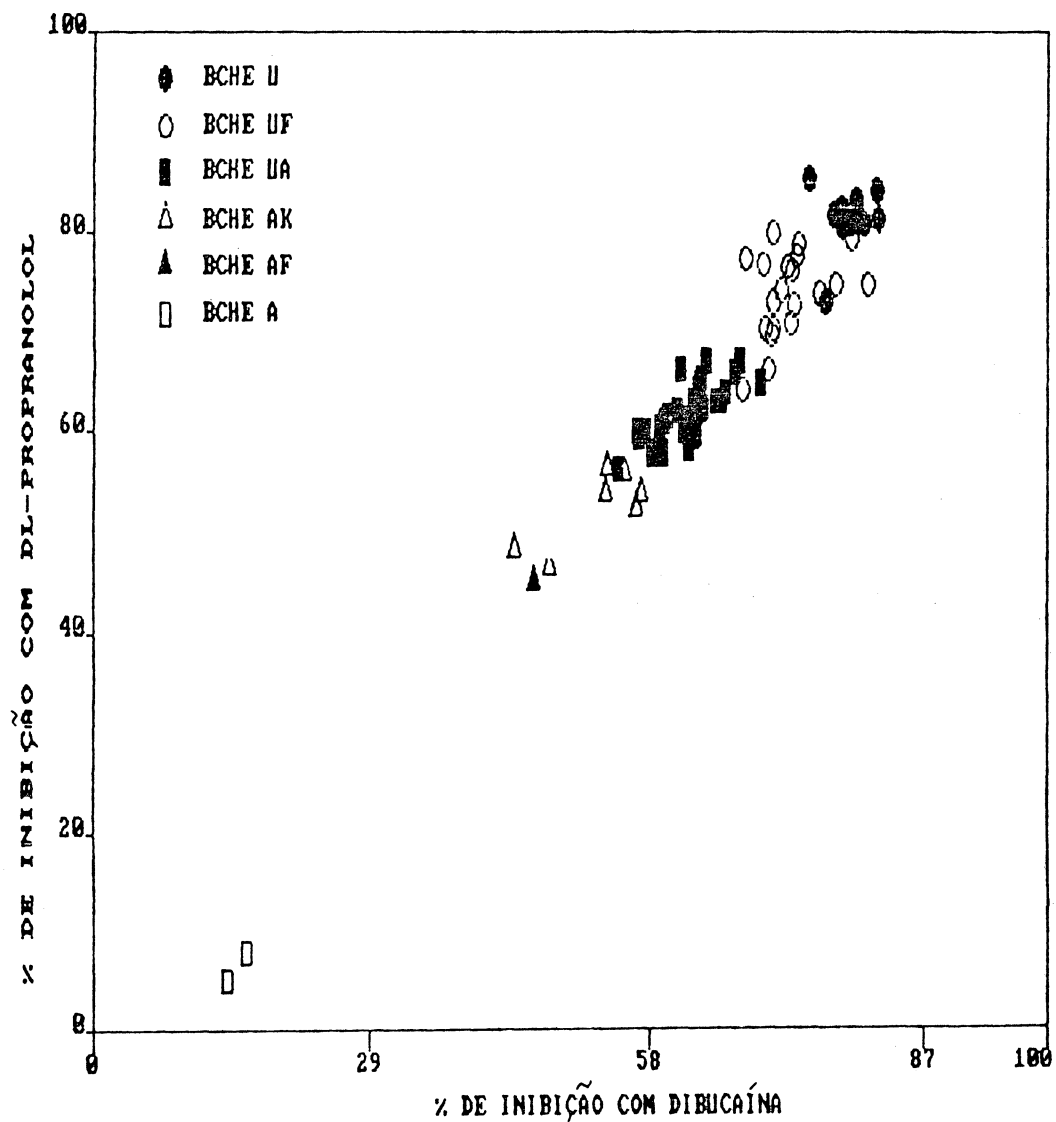


FIGURA 08. DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS DE ACORDO COM AS PORCENTAGENS DE INIBIÇÃO COM DIBUCAÍNA e DL-PROPRANOLOL, UTILIZANDO BENZOILCOLINA COMO SUBSTRATO CONFORME MÉTODO DE KALOW E GENEST.

Foram examinados 80 indivíduos, sendo 16 BCHE U, 21 BCHE UF, 33 BCHE UA, 7 BCHE AK, 1 BCHE AF e 2 BCHE A. As determinações foram realizadas conforme item 2.2.2 de Materiais e Métodos.

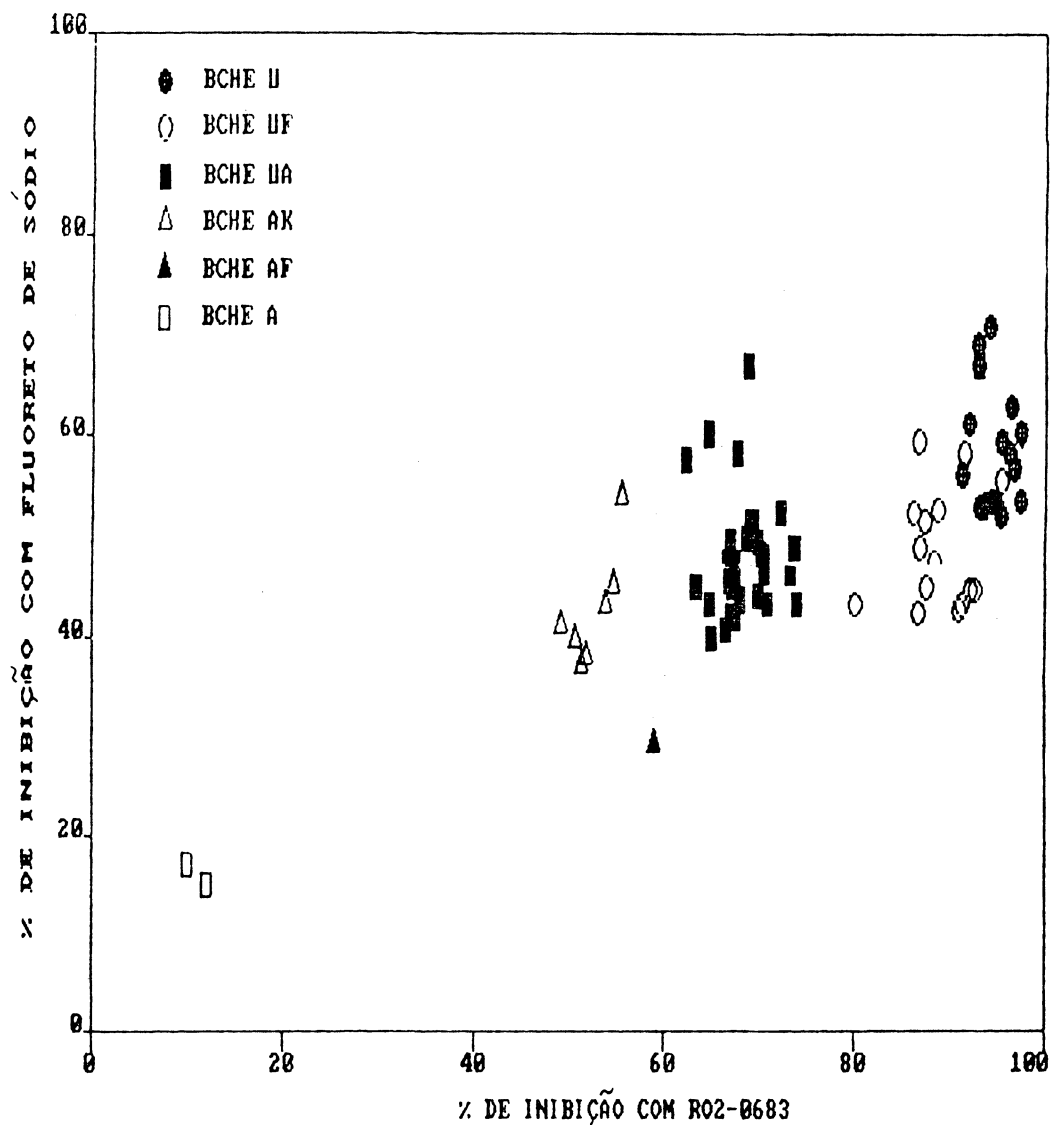


FIGURA 09. DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS DE ACORDO COM AS PORCENTAGENS DE INIBIÇÃO COM R02-0683 e FLUORETO DE SÓDIO, UTILIZANDO BENZOILCOLINA COMO SUBSTRATO CONFORME MÉTODO DE KALOW E GENEST.

Foram examinados 75 indivíduos, sendo 16 BCHE U, 16 BCHE UF, 33 BCHE UA, 7 BCHE AK, 1 BCHE AF e 2 BCHE A. As determinações foram realizadas conforme item 2.2.2 de Materiais e Métodos.

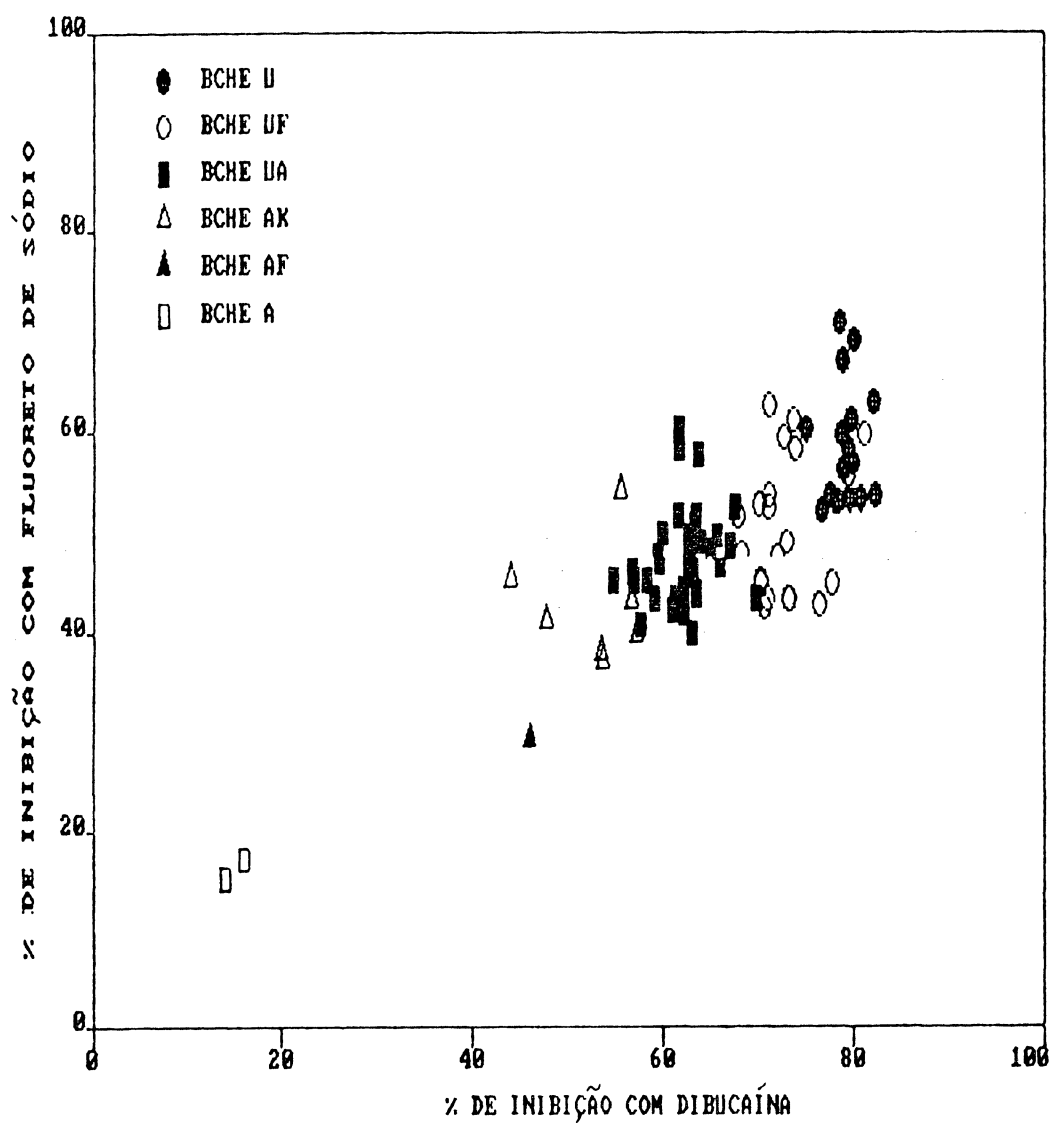


FIGURA 10. DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS DE ACORDO COM AS PORCENTAGENS DE INIBIÇÃO COM DIBUCAÍNA e FLUORETO DE SÓDIO, UTILIZANDO BENZOILCOLINA COMO SUBSTRATO CONFORME MÉTODO DE KALOW E GENEST.

Foram examinados 80 indivíduos, sendo 16 BCHE U, 20 BCHE UF, 33 BCHE UA, 7 BCHE AK, 1 BCHE AF e 2 BCHE A. As determinações foram realizadas conforme item 2.2.2 de Materiais e Métodos.

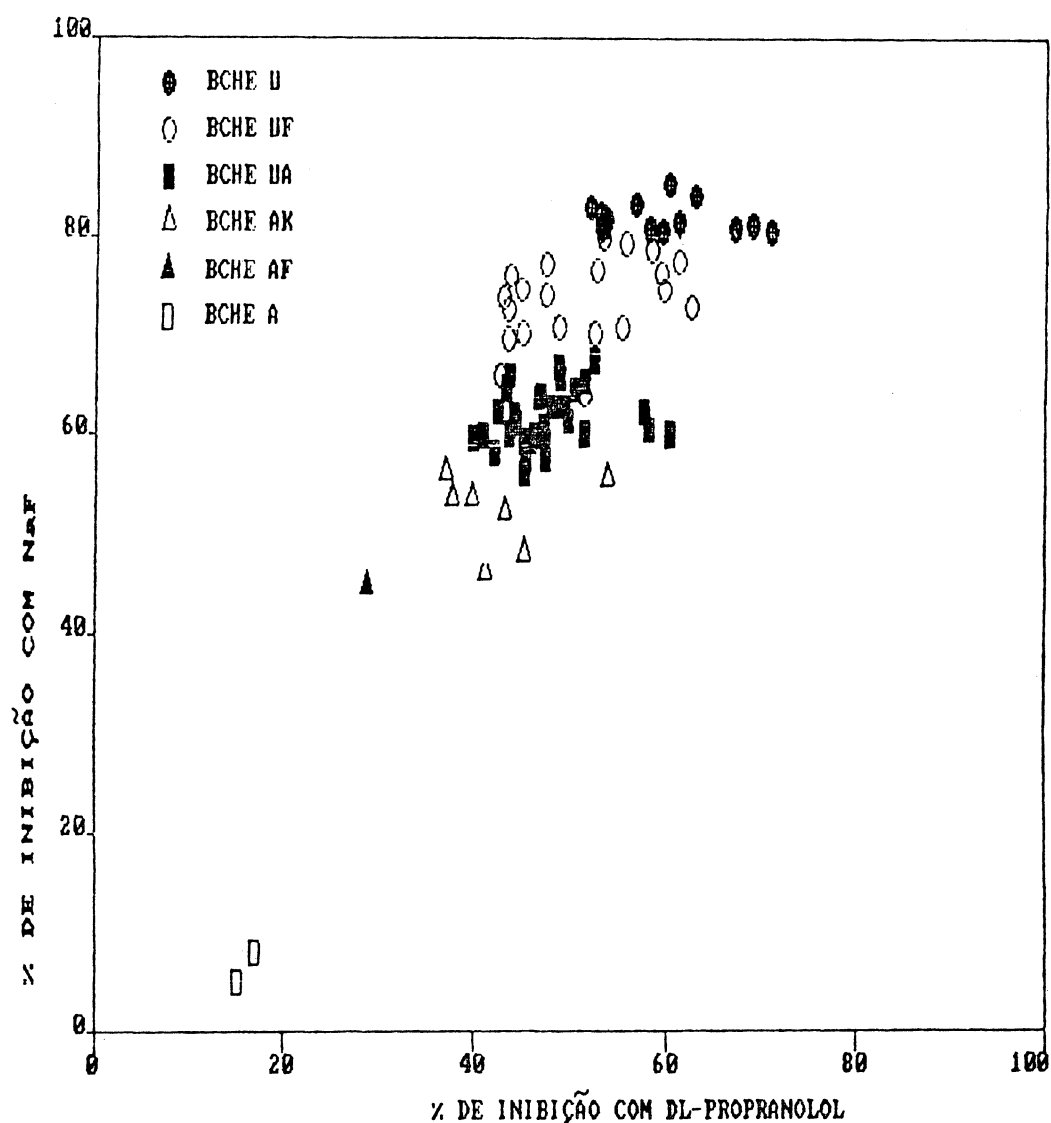


FIGURA 11. DISTRIBUIÇÃO DOS FENÓTIPOS DE ACORDO COM AS PORCENTAGENS DE INIBIÇÃO COM DL-PROPRANOLOL e FLUORETO DE SÓDIO, UTILIZANDO BENZOILCOLINA COMO SUBSTRATO CONFORME MÉTODO DE KALOW E GENEST.

Foram examinados 80 indivíduos, sendo 16 BCHE U, 21 BCHE UF, 33 BCHE UA, 7 BCHE AK, 1 BCHE AF e 2 BCHE A. As determinações foram realizadas conforme item 2.2.2 de Materiais e Métodos.

3.1.7 ATIVIDADE NAS AMOSTRAS CLASSIFICADAS POR FENÓTIPO E DATA DE COLETA.

A amostra de soros de fenótipos usuais, coletada em 1988, apresentou atividade média de 4,29 KU/l e não diferiu significativamente ($t= 1,38$, $p>40\%$) daquela de plasmas, coletada em 1990, que mostrou atividade média de 4,60 KU/l. A atividade na amostra de fenótipos usuais variou de 1,79 a 7,52 KU/l.

A atividade média dos soros de fenótipos BCHE UA + BCHE AK, coletados em 1988, foi de 2,76 KU/l e os mesmos fenótipos na amostra de 1990 apresentaram atividade média de 3,15 KU/l, não diferindo essas duas amostras entre si ($t=1,79$, $p>8\%$). Neste grupo a atividade variou de 1,03 a 4,12 KU/l.

As amostras de fenótipo BCHE UF coletadas em 1988 e 1990 apresentaram atividades médias de 2,78 KU/l e 4,69 KU/l, respectivamente. Como apenas dois indivíduos na amostra de 1990 apresentaram este fenótipo, não aplicamos teste para verificação da significância estatística. A variação apresentada na atividade, pelo fenótipo BCHE UF, foi de 1,08 a 5,58 KU/l.

3.2 FREQUÊNCIAS FENOTÍPICAS E ALELICAS.

3.2.1 Frequências fenotípicas.

Os dados relativos às frequências dos fenótipos da BChE (\pm E.P.) determinados na presente amostra da população de Curitiba, encontram-se na tabela 13.

TABELA 13. FREQUÊNCIAS DOS FENÓTIPOS DA BChE (\pm E.P.)

<u>Fenótipo</u>	<u>N</u>	<u>Frequência \pm E.P.%</u>
BCHE U	1.738	96,56 \pm 0,43
BCHE UA	33	1,83 \pm 0,31
BCHE UF	22	1,22 \pm 0,26
BCHE AK	7	0,39 \pm 0,14
<u>TOTAL</u>	<u>1.800</u>	<u>100,00</u>

3.2.2 Frequência do fenótipo BCHE AK entre portadores do alelo BCHE*A.

A frequência do fenótipo BCHE AK entre os portadores do alelo BCHE*A é 17,5% \pm 6,01%.

3.2.3 Frequências alélicas

A tabela 14 contém as frequências (\pm E.P.) referentes aos alelos BCHE*U, BCHE*F, BCHE*A e BCHE*K, determinadas na presente amostra da população de Curitiba.

TABELA 14. FREQUÊNCIAS ALÉLICAS (\pm E.P.) DETERMINADAS EM AMOSTRA DA POPULAÇÃO DE CURITIBA (N=1800).

<u>Alelo</u>	<u>Frequência \pm E.P.</u>
BCHE*U	89,94 \pm 4,76%
BCHE*F	0,61 \pm 0,13%
BCHE*A	1,11 \pm 0,17%
BCHE*K	8,34 \pm 4,37%
TOTAL	100,00

3.3 PESO E FENÓTIPOS DO LOCO BCHE

3.3.1 Correlações entre as variáveis peso e Atividade.

A tabela 15 mostra os coeficientes de correlação entre as variáveis peso e atividade, referentes aos fenótipos da BChE encontrados na presente análise.

TABELA 15. COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS PESO E ATIVIDADE, CLASSIFICADOS PELOS FENÓTIPOS DA BChE.

<u>Fenótipo</u>	<u>N</u>	<u>r</u>	<u>p.</u>
BCHE U	124	0,42	< 0,01%
BCHE UA + BCHE AK	40	0,35	2,8%
BCHE UF	22	0,11	62,0%

3.3.2 Distribuição do peso em indivíduos de fenótipos não usuais e respectivos controles.

Não houve diferença significativa na distribuição do peso nos grupos de fenótipos não usuais, quando comparados com os respectivos controles de fenótipo usual. A média do peso nos indivíduos de fenótipo BCHE UA e BCHE AK, 68,18 kg, não diferiu da média do peso dos seus controles de fenótipo de BCHE U, 68,49 kg ($t= 0,17$, $p > 85\%$). A amplitude de variação apresentada pelos indivíduos de fenótipo BCHE UA + BCHE AK foi de 55 a 85 kg enquanto a dos seus controles foi de 52 a 99 kg, e estes grupos não diferiram entre si quanto à variância do peso ($F= 1,52$; $p > 10\%$). Nos indivíduos de fenótipo BCHE UF a média do peso foi de 69,82 kg e não diferiu do peso médio dos seus controles, 73,57 kg ($t= 1,45$, $p > 15\%$). Nos indivíduos BCHE UF o peso variou de 54 a 87 kg e nos seus controles de 50 a 96 kg, não havendo diferenças entre esses dois grupos quanto à variância ($F= 1,34$; $p > 40\%$).

3.3.3 Análise de Regressão Múltipla Escalonada (R.M.E.) para avaliação do comportamento do peso em relação à variabilidade genética do loco BCHE.

Nestas análises o peso foi considerado como variável dependente. As variáveis independentes foram: altura, idade, sexo, atividade da BChE, fenótipo do loco BCHE e conteúdo lipídico do soro. Foram realizadas nove análises de regressão

múltipla escalonada. Em três análises, com inclusão da variável atividade, foram consideradas as seguintes amostras: total, BCHE UA + BCHE AK e respectivos controles e BCHE UF e respectivos controles. Em outras três análises essas mesmas amostras foram examinadas sem a inclusão da variável atividade. Essas análises visaram verificar se ocorre ou não influência do loco BCHE sobre o peso. Cada uma das três outras análises considerou os fenótipos da BChE isoladamente, para analisar a relação entre essas variáveis e o peso, em cada fenótipo.

A. Análises de R.M.E. realizadas para avaliar o efeito do loco BCHE sobre o peso, levando-se em consideração a atividade.

Nestas análises foram considerados os indivíduos com variantes da BChE de fenótipo não usual e seus respectivos controles usuais, como descrito na tabela 16, onde são mostrados os coeficientes de correlação padronizados e os valores de r^2 , provenientes dos modelos mais econômicos.

TABELA 16. COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO PADRONIZADOS (β) E VALORES DE r^2 , OBTIDOS DOS MODELOS MAIS ECONÔMICOS DAS ANÁLISES DE R.M.E., QUE LEVARAM EM CONTA A ATIVIDADE; O PESO FOI CONSIDERADO VARIÁVEL DEPENDENTE.

Amostra	N	Valores de β					r^2
		Altura	Atividade	Idade	BCHE	sexo	
Total	184	0,58	0,40	0,28	-0,16	---	0,41
BCHE UA + BCHE AK e controles	119	0,52	0,51	0,24	-0,29	0,17	0,38
BCHE UF e controles	65	0,67	0,34	0,32	---	---	0,48

BCHE= loco BCHE

--- = Variável não significativa

B. Análise de R.M.E. realizada para avaliar o efeito do loco BCHE sobre o peso, sem se considerar a variável atividade.

Foram consideradas as variantes da BChE de fenótipo não usual e respectivos controles de fenótipo usual. A variável atividade foi excluída da análise para se verificar melhor o efeito do loco BCHE. Os resultados encontram-se na tabela 17.

TABELA 17. COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO PADRONIZADOS (β) E VALORES DE r^2 , OBTIDOS DOS MODELOS MAIS ECONÔMICOS DAS ANÁLISES DE R.M.E., QUE NÃO LEVARAM EM CONTA A ATIVIDADE.

Amostra	N	Valores de β		
		Altura	Idade	r^2
Total	184	0,60	0,30	0,30
BCHE UA + BCHE AK e controles	119	0,51	0,29	0,23
BCHE UF e controles	65	0,67	0,33	0,37

C. Análises de R.M.E. realizadas para avaliar o comportamento da variável dependente peso em relação aos fenótipos da BChE encontrados na amostra da população de Curitiba.

Na tabela 18 encontram-se os valores de coeficientes de correlação determinados na R.M.E. que levou em conta os fenótipos BCHE U, BCHE UA + BCHE AK e BCHE UF, separadamente. A variável atividade foi incluída na análise.

TABELA 18. COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO PADRONIZADOS (β) E VALORES DE r^2 , OBTIDOS DOS MODELOS MAIS ECONÔMICOS DAS ANÁLISES DE R.M.E., REFERENTES A DETERMINADOS FENÓTIPOS.

Fenótipo	N	Valores de β			r^2
		Altura	Atividade	Idade	
BCHE U	124	0,56	0,38	0,29	0,43
BCHE UA+ BCHE AK	39	0,44	---	---	0,20
BCHE UF	21	0,66	---	---	0,44

--- = Variável não significativa

3.3.4 Análise da altura entre os fenótipos BCHE UA + BCHE AK e BCHE UF

A altura média dos indivíduos de fenótipo BCHE UF foi de 173,04 cm, e a dos indivíduos BCHE UA + BCHE AK, 168,78 cm. Ao compararmos as duas médias, encontramos o valor de $t=2,10$ e $p<4\%$. A mediana da altura para os indivíduos BCHE UF é 174,5 cm e para os indivíduos BCHE UA + BCHE AK é 170,3 cm. Entre os indivíduos de fenótipo BCHE UA + BCHE AK apenas 25% têm altura superior a 174 cm. A altura dos indivíduos de fenótipo BCHE UF varia de 152 a 186 cm, enquanto para os de fenótipo BCHE UA + BCHE AK varia de 153 a 178 cm.

4 DISCUSSÃO

4.1 Metodologia

Com a finalidade de fenotipar a BChE, utilizamos um procedimento baseado no método de Morrow e Motulsky (1968). O método original utiliza como inibidor o Ro2-0683 e é capaz de separar os fenótipos BCHE U, BCHE UA e BCHE A. Alcântara (1989) introduziu o DL-propranolol nesta metodologia e conseguiu discriminar o fenótipo BCHE UF apenas com a utilização deste inibidor.

A otimização deste método em nosso laboratório (Picheth e cols., 1990) resultou em metodologia mais rápida, na qual ambos os inibidores, Ro2-0683 e DL-propranolol, exercem efeito discriminatório entre as variantes. Na tabela 08 encontram-se os números de inibição obtidos no presente trabalho. Estes são semelhantes aos números de inibição descritos por Picheth e cols. (1990) e citados na tabela 06. Encontram-se também, na tabela 08, porcentagens de inibição de variantes que não haviam sido caracterizadas anteriormente por esta metodologia. O método também se mostrou eficiente na separação dos fenótipos BCHE AK e BCHE AF. No entanto, os fenótipos BCHE UK e BCHE K, com freqüências estimadas em 22% e 1%, respectivamente em dados de amostras britânicas e

norte-americanas (Evans e Wardell, 1984; La Du e cols., 1990), não puderam ser discriminados, sendo classificados como de fenótipo usual. Tal fato era esperado, uma vez que os alelos de variação quantitativa (BCHE*K, BCHE*J e BCHE*H) só foram identificados, por inibição enzimática, quando em heterozigose com os alelos não usuais (Rubinstein e cols., 1978; Evans e Wardell, 1984 e Whittaker e cols., 1985 e 1987). O alelo BCHE*K em homozigose ou quando em heterozigose com o alelo BCHE*U só tem sido identificado por estudos familiares (Whittaker e Britten, 1990a) ou análise de ADN (La Du e cols., 1990).

As amostras caracterizadas como BCHE AK/K e BCHE U/AK através da análise de ADN foram classificadas como BCHE AK e BCHE UA, respectivamente.

Consideramos que a maior amplitude de variação nos números de inibição, observada nas amostras de fenótipo BCHE UF (tab. 08), em relação ao trabalho de PICETH e cols (1990), (tab. 06), seja devida ao maior número de variantes ensaiadas.

Observamos que a amplitude de variação apresentada por PICETH e cols (1990), para o fenótipo BCHE UA (tab. 06) mostra valores de PN que incluem os valores citados no presente trabalho para o fenótipo BCHE AK (tab. 08). Sugerimos que os autores tivessem amostras de fenótipo BCHE AK entre as classificadas como BCHE UA, hipótese reforçada por outros dados, discutidos no item 4.2.

Para a triagem dos fenótipos não usuais, que utilizamos neste trabalho, empregamos apenas um dos inibidores, o DL-propranolol. Tal escolha foi motivada pela característica do DL-propranolol em promover um perfil de inibição imediato e estável ao longo do ensaio, enquanto o Ro2-0683 promove inibição progressiva da amostra com o tempo de ensaio (Picheth, 1989). Esta característica torna o inibidor DL-propranolol preferível por dispensar rígido controle sobre o tempo de ensaio, facilitando a fenotipagem de amostras populacionais. Os dados obtidos por Alcântara e cols. (1991) substanciam a escolha deste inibidor para triagem, pois os dados apresentados revelam que apenas com a utilização do DL-propranolol pode-se discriminar entre as variantes BCHE U, BCHE A e BCHE UF. Os resultados de Picheth e cols. (1990) reforçam que o inibidor DL-propranolol empregado isoladamente é capaz de discriminar as variantes da BChE, devendo o Ro2-0683 ser utilizado para melhor caracterizar os fenótipos.

Consideramos que a perda de variantes da BChE passíveis de discriminação por inibição enzimática seja negligível, uma vez que todas as amostras que apresentaram valores de PN limítrofes com aquele apresentado pelo fenótipo usual foram ensaiados posteriormente com Ro2-0683 e benzoilcolina. Além disso, Alcântara (1989) utilizando o mesmo inibidor para separar as variantes da BChE, mas associado ao Ro2-0683 apenas para melhor definir entre os

fenótipos BCHE UA e BCHE UF, encontrou frequências compatíveis com as do presente trabalho e com as citadas na literatura.

O coeficiente de correlação encontrado entre os números de inibição obtidos pelos dois inibidores foi 0,93 (tab. 11) e reflete que ambos discriminaram as variantes no mesmo sentido (fig. 05).

Como controle de qualidade para o método, utilizou-se um "pool" de soros que mostrou comportamento de fenótipo usual. Os dados estatísticos da fenotipagem do "pool" frente aos inibidores DL-propranolol e Ro2-0683, citados na tabela 09, mostram a reprodutibilidade do método quanto aos perfis de inibição. Observamos que quando encontrávamos números de inibição situados fora dos limites estabelecidos, havia perda da discriminação das variantes. Isto foi observado quando detectamos problemas relacionados à estabilidade do substrato ou do cromógeno Fast Red TR.

Como na literatura internacional são raros os trabalhos que utilizam o substrato alfa-naftilacetato na caracterização dos fenótipos da BChE, decidimos comparar nossos achados com os dos procedimentos mais utilizados, onde a benzoilcolina é o substrato de preferência.

Comparando nossos resultados com os procedimentos que utilizam benzoilcolina, e dispendo de variantes caracterizadas por análise de ADN, compusemos a tabela 10, que contém os perfis de inibição para as variantes da BChE

obtidos em nosso laboratório. Os valores de inibição obtidos com DL-propranolol para os fenótipos BCHE AK, BCHE UK e BCHE K ainda não tinham sido descritos na literatura.

Nossos dados (tab. 10) diferem daqueles citados na literatura, e atribuímos tais diferenças às nossas condições de trabalho. Os números de inibição por fenótipo, descritos por outros autores, apresentam também estas diferenças (Evans e Wardell, 1984; Whittaker, 1983).

O procedimento com benzoilcolina requer que o ensaio seja realizado a 25°C em cubetas termostatizadas, sendo a visualização da reação feita em 240 nm. As amostras devem ser ensaiadas individualmente, o que reduz drasticamente o número de amostras que podem ser fenotipadas em um dia de trabalho e torna o método pouco prático para estudos populacionais.

Nos ensaios com benzoilcolina os números de inibição obtidos pelos inibidores Ro2-0683 e dibucaína e Ro2-0683 e DL-propranolol mostraram separação das variantes (figs. 06 e 07) e apresentaram coeficientes de correlação de 0,92 e 0,93, respectivamente. Com dibucaína e DL-propranolol, a separação não foi clara (fig. 08). Sempre que o fluoreto de sódio foi utilizado, houve redução nos coeficientes de correlação e não houve boa discriminação dos fenótipos (tab. 11, figs. 09, 10 e 11)

Ao analisarmos isoladamente o desempenho dos inibidores Ro2-0683, dibucaína e DL-propranolol, ensaiados com benzoilcolina, notamos que apenas o Ro2-0683 mostrou-se

claramente eficiente na separação dos fenótipos, à exceção dos fenótipos nos quais o alelo BCHE*F está presente.

Quando analisamos separadamente as correlações dos inibidores nas amostras coletadas em 1988 e 1990, observamos que as que incluíam FN diminuíam na amostra mais antiga. Portanto, alterações produzidas pelo tempo de estocagem poderiam ser um fator a mais na falta de discriminação obtida com fluoreto de sódio, um inibidor cuja aplicação já demonstrou dificuldades (King e Morgan, 1970; King e Dixon, 1970). Em nossas condições, o uso de fluoreto de sódio foi útil apenas na caracterização do fenótipo BCHE AF.

Em todos os ensaios de inibição que realizamos, aqueles nos quais a benzoilcolina foi o substrato apresentaram resultados inferiores, em termos de resolução entre as variantes, aos que usaram alfa-naftilacetato (fig. 05 e 06 a 11). Este dado reforça a indicação do alfa-naftilacetato como substrato para a caracterização de variantes da BChE, como já descrito por Evans (1986).

Houve concordância entre os dois métodos na fenotipagem das amostras, embora uma das amostras tenha apresentado comportamento anômalo. Verificamos que as amostras de fenótipo BCHE UF poderiam ser agrupadas em quatro classes que designamos conforme a tabela 12. A maioria das amostras (grupo 1) comportou-se como esperado nas duas metodologias. As amostras dos grupos 3 e 4 comportaram-se como esperado na metodologia que utiliza benzoilcolina como

substrato. No entanto, na metodologia de Morrow e Motulsky modificada, apresentaram números de inibição elevados com DL-propranolol (grupo 3) ou Ro2-0683 (grupo 4), em relação à maioria das amostras do mesmo fenótipo. Isto pode ser devido à heterogeneidade descrita para as variantes resistentes ao fluoreto (Bartels e cols., 1990). Não podemos, entretanto, excluir a possibilidade de que esses indivíduos estejam em contato com, ou utilizando alguma substância que poderia interferir na fenotipagem quando alfa-naftilacetato é o substrato do ensaio.

Uma amostra apresentou comportamento discordante nos dois métodos (grupo 2). Foi claramente classificada como de fenótipo BCHE UF pelo método de Morrow e Motulsky modificado, embora tenha apresentado valor de PN considerado como limite inferior de fenótipo BCHE UF e superior com o do fenótipo BCHE UA. Na metodologia de Kalow e Genest esta amostra apresentou comportamento intermediário entre os fenótipos BCHE UA e BCHE UF com os inibidores dibucaína, fluoreto de sódio e Ro2-0683. Com o inibidor DL-propranolol apresentou comportamento de fenótipo BCHE UA. Não excluimos a possibilidade de que esta amostra possua o fenótipo BCHE FK, que até o momento só foi identificado através de estudos familiares (Whittaker e cols., 1987b). Como a presença do alelo BCHE*K ocasiona uma redução de aproximadamente 33% no número de moléculas circulantes, esperar-se-ia que o fenótipo BCHE FK apresentasse menor inibição que BCHE UF. As

frequências determinadas em nossa amostra para os alelos BCHE*F e BCHE*K são compatíveis com a presença de até dois indivíduos com esse fenótipo. Como não dispomos de amostras de referência com este fenótipo não pudemos caracterizá-lo. Sugerimos que sejam realizados estudos da família para possível futura caracterização.

A fenotipagem do loco CHE2 foi realizada pelo método de Van Ros e Vervoort (1973) com modificações introduzidas anteriormente em nosso laboratório (Chautard-Freire-Maia e cols., 1984a) e também neste trabalho. As modificações que introduzimos permitem o ensaio de maior número de amostras por dia de trabalho, uma vez que reduzem o tempo de corrida eletroforética de 12 para 3 horas. Outro ponto positivo é a utilização de menor volume de amostra, apresentando a mesma resolução obtida no processo original. Como controle de qualidade utilizamos, em cada corrida eletroforética, soro CHE2 C5+ puro e diluído na proporção que originasse bandas C5 fracas, mas com boa resolução, o que nos assegurava a possibilidade de evidenciar fenótipos CHE2 C5+ fracos. Como controle negativo empregou-se soro CHE2 C5- para verificar a ocorrência de falsos positivos. Estes cuidados foram úteis, pois em algumas corridas eletroforéticas as amostras apresentaram uma faixa de arraste no local da migração da fração C5. Este artefato prejudica a caracterização da banda C5 justificando a utilização de um sistema de controle de qualidade. As modificações introduzidas tornam o método mais

prático e econômico, adequado para uso em estudos populacionais.

A atividade da BChE foi determinada através da metodologia de Dietz e cols. (1973) modificada por Evans e Wroe (1978). Analisando a variação apresentada na atividade dentro de cada grupo de fenótipos, percebemos que somente a apresentada pelos fenótipos BCHE UA + BCHE AK estava dentro dos valores esperados. Os indivíduos de fenótipos BCHE UF e BCHE U apresentaram limite inferior de atividade menor que o esperado. Entre os indivíduos BCHE U poderíamos encontrar alguns de fenótipo BCHE K, que não são separados dos primeiros por testes de inibição e são relativamente frequentes. Espera-se que estes possuam menor atividade que os primeiros. Observamos que, entre os indivíduos BCHE UF, aqueles que possuem baixa atividade se concentram no grupo 3 (tab.12), indicando que possam constituir um grupo diferente ou então que estes estejam em contato com inibidores da BChE. Como a média da atividade não diferiu entre as amostras coletadas em 1988 e 1990 (item 3.1.7 de Resultados), estas foram consideradas como uma única amostra para o estudo sobre peso e variabilidade genética do loco BChE.

4.2 Freqüências fenotípicas e alélicas

A freqüência do fenótipo BCHE UA determinada no presente trabalho (tab. 13), foi 1,83% \pm 0,31%, enquanto que

aquela citada na literatura como média para caucasóides é cerca de 3%. Entretanto, essa média foi calculada com a inclusão de indivíduos BCHE AK, que anteriormente não eram discriminados.

A frequência do alelo BCHE*A (tab. 14) não diferiu da citada por Chautard-Freire-Maia e cols. (1984b) para caucasóides da população de Curitiba (1,5% ; $\chi^2=1,59$, $p>20\%$).

Sabe-se que a frequência deste alelo varia entre as diversas populações, e que entre negros é raro (Whittaker, 1980). Para a população negróide de Curitiba, que apresenta cerca de 51% de componente africano (Culpi e Salzano, 1984), a frequência deste alelo foi estimada em 0,8% (Chautard-Freire-Maia e cols., 1984b). As frequências alélica e fenotípica apresentadas nesse trabalho são intermediárias entre aquelas descritas para caucasóides e negróides da população de Curitiba, significando que na amostra que estudamos, provavelmente há uma parcela de indivíduos de origem negróide. Admitindo-se que o alelo BCHE*A fosse inexistente nos africanos que vieram ao Brasil e de frequência igual a 1,68% em portugueses (Kattamis e cols., 1962), nossa amostra apresentaria cerca de 34% de componente negróide, segundo aplicação da fórmula de Bernstein (1931, Apud Cavalli-Sforza e Bodmer, 1971).

Das amostras ensaiadas nesse trabalho, $1,22\% \pm 0,26\%$ possuíam o fenótipo BCHE UF, sendo a frequência do alelo BCHE*F calculada em $0,61\% \pm 0,13\%$ (tabs. 13 e 14). Em

amostra de Curitiba a frequência deste alelo não diferiu entre brancos e negros e sua frequência foi estimada em 0,51% ± 0,15% (Alcântara e cols., 1991). Este valor não diferiu daquele encontrado no presente trabalho ($X^2=0,22$, $p>50\%$).

A frequência do fenótipo BCHE AK entre os portadores do alelo BCHE*A (item 3.2.2 de Resultados) foi estimada em 17,5% + 6,01 % , e é semelhante às frequências descritas por Evans e Wardell (1984), ($X^2=1,08$; $p>20\%$) e Whittaker e Britten (1985) ($X^2=0,45$; $p>50\%$) respectivamente. Entretanto, esta frequência difere significativamente ($X^2=4,67$; $p<5\%$) daquela encontrada por Alcântara e cols. (1990), em uma amostra da população de Curitiba (2,04% + 2,02%).

Souza e cols. (1991) fizeram um estudo comparativo entre os resultados obtidos com soros provenientes de mesmos indivíduos fenotipados como BCHE AK e BCHE UA, estocados a -20°C por cerca de 1 ano e 6 anos, analisados através das metodologias modificadas por Alcântara (1989) e Picheth e cols. (1990). Esses autores observaram que na amostra estocada há 6 anos houve tendência de aumento de número de inibição, quando comparada com aquela de estocagem mais recente. Esse fenômeno pode levar o fenótipo BCHE AK a produzir resultado compatível com BCHE UA, na dependência do tempo de estocagem.

Como Alcântara e cols. (1990) utilizaram em seu trabalho amostras estocadas a -20°C por cerca de 10 anos, os achados de Souza e cols. (1991) justificam a discrepância

entre as frequências do fenótipo BCHE AK encontradas no presente trabalho e no de Alcântara e cols (1990).

A frequência do alelo BCHE*K foi calculada em $8,34\% \pm 4,37\%$, a partir de indivíduos portadores do alelo BCHE*A e admitindo-se os achados de La Du e cols. (1991).

4.3 Peso e fenótipos do loco BCHE

A atividade da BChE está positivamente correlacionada com peso (Berry e cols., 1954; Stueber-Odebrecht e cols., 1985; Brock e Brock, 1990). Esta enzima é codificada pelo loco BCHE, sendo sua atividade dele dependente e também influenciada pelo loco CHE2. Chautard-Freire-Maia e cols. (1991a) demonstraram que a correlação entre peso e atividade só existe em amostras de indivíduos de fenótipos CHE2 C5- e CHE2 C5+ fraco, enquanto que nos indivíduos de fenótipo CHE2 C5+ forte, peso e atividade da BChE não são correlacionados.

Ao analisarmos o comportamento do peso frente à variabilidade genética do loco BCHE, verificamos que nos indivíduos de fenótipos BCHE U e BCHE UA + BCHE AK existe correlação positiva entre peso e atividade (tab. 15), e que esta correlação não aparece nos indivíduos de fenótipo BCHE UF. Observamos também que a amplitude de variação do peso nos indivíduos de fenótipo BCHE UA + BCHE AK e BCHE UF é menor que a apresentada pelos seus controles de fenótipo usual (item 3.3.2 de Resultados), o que pode ser devido ao menor

número de indivíduos de fenótipo não usual. Note-se que não há diferença significativa entre as variâncias. Quando comparamos a média do peso dos indivíduos de fenótipo não usual com a dos seus controles de fenótipo usual, verificamos não haver diferença significativa entre elas (item 3.3.2 de Resultados). Entretanto, a diferença não significativa de cerca de 3,75 kg a menos no grupo de fenótipo BCHE UF quando comparado com seus controles usuais, talvez pudesse se revelar significativa numa amostra maior. É interessante ressaltar que, no modelo mais econômico apresentado na tabela 17, referente a BCHE UF e seus controles, a próxima variável independente a ser incluída no modelo seria o loco BCHE ($\beta = 0,17$).

Embora não tenhamos detectado diferença entre as médias de peso dos fenótipos usual e não usual e sendo o peso um caráter quantitativo, decidimos analisar seu comportamento frente às variáveis de que dispúnhamos em nossa amostra (item 3.3.3 de Resultados), através de análises de regressão múltipla escalonada. Foram realizadas análises considerando-se a amostra total ou os grupos de fenótipo não usual com respectivos controles e também cada fenótipo isoladamente. Três das regressões foram realizadas para verificar o efeito do loco BCHE, quando a atividade é considerada na análise. Verificamos que nos três grupos considerados (amostra total, BCHE UA + BCHE AK com respectivos controles e BCHE UF com respectivos controles), o peso mostrou correlações positivas

com as variáveis altura, atividade e idade (tab. 16). A correlação entre peso e atividade no grupo de fenótipo BCHE UF + controles é devida à presença dos controles de fenótipo usual, uma vez que quando consideramos os indivíduos de fenótipo BCHE UF isoladamente (tab. 15), o peso não mostrou correlação com esta variável. Verificamos também que a correlação entre essas mesmas variáveis no grupo de indivíduos de fenótipos BCHE UA + BCHE AK (tab. 15) desaparece na análise apresentada na tabela 18, sendo possivelmente concomitante com a da altura.

A correlação negativa encontrada entre peso e loco BCHE, nos dois primeiros grupos poderia ser explicada pela diferença de atividade entre as amostras não usuais e controles, e mostra apenas que, em média, em indivíduos com baixa atividade enzimática, o peso nem sempre será relativamente baixo, devendo levar-se em conta o fenótipo do loco BCHE. Isto significa que, em média, indivíduos de fenótipos usuais, quando comparados com os não usuais (BCHE UA + BCHE AK), ambos com igual atividade enzimática, espera-se que os usuais apresentem menor peso. Isto não implica em correlação entre o loco BCHE e o peso, que foi excluída nos dados da tabela 17. Esta correlação não foi observada no grupo de fenótipo BCHE UF + controles usuais, possivelmente em virtude do pequeno número de indivíduos.

Observamos também uma correlação positiva entre peso e sexo no grupo de fenótipos BCHE UA + BCHE AK e controles

(tab. 16), indicando que, nesta amostra, as mulheres teriam maior peso. Este é o grupo que contém o maior número de indivíduos do sexo feminino (N=18), e provavelmente este efeito não foi percebido nos outros grupos devido ao pequeno número de mulheres presentes.

Quando fizemos análises de regressão múltipla escalonada nas quais a atividade foi excluída da lista das variáveis independentes (tab. 17), verificamos que em todos os grupos considerados o peso correlacionou-se positivamente com altura e idade, e não houve correlação entre aquela variável e o loco BCHE. Isto indica que atividade e loco BCHE estão relacionados, e que apenas a variabilidade apresentada pelo loco BCHE (característica estrutural da enzima) não influi no peso.

Em outras análises realizadas (tab.18), nas quais se separaram os fenótipos do loco BCHE e se considerou a atividade da BChE como variável independente, observamos que nos indivíduos de fenótipo BCHE U o peso correlacionou-se positivamente com a altura, atividade e idade, indicando que aquela característica varia concomitantemente com estas. Nos grupos de indivíduos de fenótipo não usual, o peso correlacionou-se apenas com a altura, o que significa que neles a variável peso parece independe da atividade da BChE e das variantes do loco BCHE detectáveis pelos métodos de inibição enzimática. O comportamento do peso nos fenótipos BCHE UA + BCHE AK e BCHE UF, foi semelhante ao descrito para

os indivíduos de fenótipo CHE2 C5+ forte no que se refere à independência da atividade da BChE (Chautard-Freire-Maia e cols., 1991a). Os dados de Chautard-Freire-Maia e cols. (1991a) que mostram correlação entre peso e atividade da BChE nos indivíduos de fenótipo CHE2 C5- foram reforçados no presente trabalho, que mostrou correlação positiva entre as mesmas variáveis nos indivíduos de fenótipo BCHE U CHE2 C5-. Entretanto outros resultados obtidos não reforçam a hipótese da influência do loco BCHE sobre o peso, sugerida por Chautard-Freire-Maia e cols. (1991a). Não demonstramos relação entre a variabilidade do loco BCHE e a distribuição de peso, o que pode sugerir que os achados de Chautard-Freire-Maia e cols. (1991a) sejam determinados pela proteína X (Masson e cols., 1990), que se liga à BChE nos indivíduos de fenótipo CHE2 C5+, e não devidos à BChE propriamente dita.

Ao analisarmos o peso médio de cada fenótipo, observamos que os controles usuais dos indivíduos de fenótipo BCHE UF apresentavam maior peso que os controles usuais dos indivíduos de fenótipo BCHE UA + BCHE AK. Isto nos levou a comparar a altura entre os grupos de fenótipos BCHE UA + BCHE AK e BCHE UF. Estes grupos diferiram entre si quanto à altura ($t=2,10$; $p=4\%$; item 3.3.4 de Resultados), e apenas 25% dos indivíduos de fenótipo BCHE UA + BCHE AK possuíam altura superior à considerada como mediana dos indivíduos BCHE UF. Estes dados podem indicar uma relação entre variabilidade genética da BChE e altura, e na literatura já foram descritas

relações entre esta variável e atividade da BChE (Chautard-Freire-Maia, 1989; Brock e Brock, 1990). Outra possibilidade é que estejamos cometendo erro tipo I ao rejeitarmos a hipótese nula , sendo ela verdadeira.

CONCLUSÕES

1. A análise do comportamento do peso em amostras de adultos de fenótipos CHE2 C5-, em relação à variabilidade genética do loco BCHE examinada no presente trabalho, indica que esta não parece influenciar o peso. Nos indivíduos de fenótipo BCHE U o peso está correlacionado, positivamente, com a atividade da BChE. Nos fenótipos não usuais não existe tal correlação, e nestes, o peso é influenciado somente pela altura.
2. Na presente amostra os indivíduos de fenótipos BCHE UF e BCHE UA + BCHE AK diferem entre si quanto à altura, possuindo, o grupo de fenótipo BCHE UF maior média de altura.
3. As frequências dos alelos BCHE*A ($1,11 \pm 0,17\%$) e BCHE*F ($0,61 \pm 0,13\%$), determinadas no presente trabalho são semelhantes àquelas descritas na literatura para amostras de Curitiba. A frequência do fenótipo BCHE AK determinada nesta amostra é semelhante à descrita por Evans e Wardell (1984) e Whittaker e Britten (1985) para outras

populações, e difere da encontrada por Alcântara e cols. (1990), em amostra de Curitiba.

4. A metodologia de Morrow e Motulsky (1968) com as modificações introduzidas por Alcântara (1989) e Picheth e cols. (1990), forneceu resultados compatíveis com aqueles obtidos através da metodologia de Kalow e Genest (1957). O método de Morrow e Motulsky modificado apresentou, em nossas condições de trabalho, melhor discriminação entre as variantes da BChE que o método de Kalow e Genest.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- 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.
- ALCANTARA, V. M. Determinação dos fenótipos CHE1 UF e CHE1 AK em amostras de brancos e negróides de Curitiba. Curitiba, 1989. 97p. Tese. Mestrado. Universidade Federal do Paraná.
- ALCANTARA, V. M.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.; PICHETH, G. e VIEIRA, M.M. Frequency of the CHE1*K allele of serum cholinesterase in a sample from Southern Brazil. Hum.Hered., 40:386-390, 1990.
- ALCANTARA, V.M.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. e CULPI, L. CHE1 UF serum cholinesterase phenotype in whites and non-whites from Southern Brazil as determined by a new method. Hum. Hered., 41:103-106, 1991.
- ALDRIDGE, W.N. The differentiation of true and pseudo cholinesterase by organo-phosphorus compounds. Biochem. J., 53:62-67, 1953.
- ALLES, G.A. e HAWES, R.C. Cholinesterases in the blood of man. J. Biol. Chem., 133:375-390, 1940.
- ARPAGAU, M.; KOTT, M.; VATSIS, K.P.; BARTELS, C.F.; LA DU, B.N. e LOCKRIDGE, O. Structure of the gene for human butyrylcholinesterase. Evidence for a single copy. Biochem., 29:124-131, 1990.
- ASHTON, G.C. e SIMPSON, N.E. C5 types of serum cholinesterase in a Brazilian population. Am. J. Hum. Genet., 8:438-447, 1966.
- AUGUSTINSSON, K.B. Cholinesterase and anticholinesterase agents. IN: KOELLE, G.B. ed. Handbook of experimental pharmacology. Berlin, Springer-Verlag, 1963. p.89-128.
- BANG, V.; VIBY-MOGENSEN, J. e WIREN, J.E. The effect of bambuterol on plasma cholinesterase activity and suxamethonium-induced neuromuscular blockade in subjects heterozygotes for abnormal plasma cholinesterase. Acta Anaesthesiol. Scand., 34:600-604, 1990 a.

- BANG, V.; VIBY-MOGENSEN, J.; WIREN, J.E. e SKOVGAARD, L.T. The effect of bambuterol (carbamylated terbutaline) on plasma cholinesterase activity and suxamethonium-induced neuromuscular blockade in genotypically normal patients. Acta Anaesthesiol. Scand., 34:596-599, 1990 b.
- BARTELS, C.F.; NOGUEIRA, C.P.; MCGUIRE, M.C.; ADKINS, S.; RUBINSTEIN, H.M.; LUBRANO, T.; VAN DER SPEK, A.F.L.; LIGHTSTONE, H.; LOCKRIDGE, O. e LA DU, B.N. Identification of two different mutations associated with human butyrylcholinesterase fluoride resistance in serum. Third International Meeting on Cholinesterase. França, 1990, p.103. Resumo.
- BERRY, W.T.C. e COWIN, P.J. A relationship between body fat and plasma pseudo-cholinesterase. Brit. J. Nutr., 8:79-82, 1954.
- BRIMIJOIN, S.; MINTZ, K.P. e ALLEY, M.C. Production and characterization of separate monoclonal antibodies to human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. Mol. Pharmacol., 24:513-520, 1983.
- BROCK, A. e BROCK, V. Plasma cholinesterase activity in a healthy population group with no occupational exposure to known cholinesterase inhibitors: relative influence of some factors related to normal inter- and intra-individual variations. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 50:401-408, 1990.
- BROWN, S.S.; KALOW, W.; WHITTAKER, M. e WORONICK, C.L. The plasma cholinesterase: a new perspective. Adv. Clin. Chem., 22:1-122, 1981.
- CAVALLI-SFORZA, L.L. e BODMER, W.F. The genetics of human populations. Freeman, San Francisco, 1971. p.491-492.
- CESTARIC, E.S. Cholinesterase. IN: HENRY, J.B. ed. American Society of Clinical Pathologists Commission on Continuing Education Pre workshop manual. Chicago, 1964. p.71-88.
- CHATONNET, A. e LOCKRIDGE, O. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. Biochem. J., 260:625-634, 1989.

- 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
- 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. Brasil. Genet., 7:709-715, 1984 a.
- CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.; PRIMO-PARMO, S.L.; LOURENÇO, M.A.C. e CULPI, L. Frequencies of atypical serum cholinesterase among Caucasians and Negroes from Southern Brazil. Hum. Hered., 34:388-392, 1984 b.
- CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.; STUEBER-ODEBRECHT, N.; JUNGE, C.; LOURENÇO, M.A.C.; PRIMO-PARMO, S.L. e CARRENHO, J.M.X. Phenotypes of the CHE2 locus of serum cholinesterase and adult weight in a sample from Blumenau, Santa Catarina, Brazil. Rev. Brasil. Genet., 13:371-376, 1990.
- CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.; PRIMO-PARMO, S.L.; PICHETH, G.; LOURENÇO, M.A.C. e VIEIRA, M.M. The C5 isozyme of serum cholinesterase and adult weight. Hum. Hered., 1991a, no prelo.
- CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.; VIEIRA, M.M. e PRIMO-PARMO, S.L.; A expressividade do fenótipo CHE2 C5+, da butirilcolinesterase, em relação a sexo e peso. Rev. Brasil. Genet., (suppl.)14:149, 1991b.
- CHECLER, F.; GRASSI, J.; MASSON, P. e VICENT, J.P. Monoclonal antibodies allow precipitation of esterase but not peptidase activities associated with butyrylcholinesterase. J. Neurochem., 55:750-755, 1990.
- CHU, S. Depression of serum cholinesterase activity as an indicator for insecticide exposure - consideration of the analytical and biological variation. Clin. Biochem., 18:323-326, 1985.
- CHU, M.I.; FONTAINE, P.; KUTTY, K.M.; MURPHY, D. e REDHEENDRAN, R. Cholinesterase in serum and low density lipoprotein of hyperlipidemic patients. Clin. Chim. Acta, 85:55-59, 1978.
- CLITHEROW, J.W.; MITCHARD, M. e HARPER, N.J. The possible biological function of pseudocholinesterase. Nature, 199:1000-1001, 1963.
- CUCUIANU, M.; POPESCU, T.A. e HARAGUS, S.T. Pseudocholinesterase in obese and hyperlipemic subjects. Clin. Chim. Acta, 22:151-155, 1968.

- CUCUIANU, M.; OPINCARU, A. e TAPALAGĂ, D. Similar behavior of lecitin: cholesterol acyltransferase and pseudocholinesterase in liver disease and hyperlipoproteinemia. Clin. Chim. Acta, 85:73-79, 1978.
- CULPI, L. e SALZANO, F.M. Migration, genetic markers and race admixture in Curitiba. Brazil. J. Biosoc.Sci, 16:127-135, 1984.
- DELBRUCK, A. e HENKEL, E. A rare genetically determined variant of pseudocholinesterase in two German families with high plasma enzyme activity. Eur. J. Biochem., 99:65-69, 1979.
- DESHMUKH, M.B. Changes in serum cholinesterase activity and lipoprotein cholesterol levels in rats during diabetes. IRCS Med. Sci., 14:234, 1986.
- 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.
- ECKERSON, H.W.; OSEROFF, A.; LOCKRIDGE, O. e LA DU, B.N. Immunological comparison of the usual and atypical human serum cholinesterase phenotypes. Biochem. Genet., 21:93-108, 1983.
- ECOBICHON, D.J. e KALOW, W. The effects of sialidase on pseudocholinesterase types. Can. J. Biochem. Physiol., 41:969-974, 1963.
- EIBERG, H.; NIELSEN, L.S.; KLAUSEN, J.; DAHLÉN, M.; KRISTENSEN; M. BISGGARD, M.L.; MOLLER, N. e MOHR, J. Linkage between serum cholinesterase 2 (CHE2) and -crystallin gene cluster (CRYG): assignment to chromosome 2. Clin. Genet., 35:313-321, 1989.
- 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.
- EVANS, R.T. Cholinesterase phenotyping: clinical aspects and laboratory applications. Crit. Rev. Clin. Lab. Sci., 23:35-64, 1986
- EVANS, R.T. e WARDELL, J. On the identification and frequency of the J and K cholinesterase phenotypes in a Caucasian population J. Med. Genet., 21:99-102, 1984.

- 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.
- GARRY, J.P.; 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.
- GIBLETT, E.R. Genetic markers in human blood. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1969. p.192-225.
- GOEDDE, H.W. e AGARWAL, D.P. Pseudocholinesterase variation. Hum. Genet. (suppl), 1:45-55, 1978.
- 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.
- GUERREIRO, J.F. e CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Studies on serum cholinesterase (CHE1 locus) in a sample from Northern Brazil. Rev. Brasil Genet., 7:717-725, 1984.
- GUTSCHE, B.B.; SCOTT, E.M. e WRIGHT, R. Hereditary deficiency of pseudocholinesterase in Eskimos. Nature, 215:322-323, 1967.
- HARRIS, H.; HOPKINSON, D.A. e ROBSON, E.B. Two-dimensional electrophoresis of pseudocholinesterase components in human serum. Nature, 196:1296-1298, 1962.
- HARRIS, H.; HOPKINSON, D.A.; ROBSON, E.B. e WHITTAKER, M. Genetical studies on a new variant of serum cholinesterase detected by electrophoresis. Ann. Hum. Genet., 26:359-373, 1963a.
- HARRIS, H.; ROBSON, E.B.; GLEN-BOTT, A.M. e THORNTON, J.A. Evidence for non-allelism between genes affecting human serum cholinesterase. Nature, 200:1185-1187, 1963 b.
- HARRIS, H. e WHITTAKER, M. Differential inhibition of human serum cholinesterase with fluoride: recognition of two new phenotypes. Nature, 191:496-498, 1961.
- JENSEN, F.S.; BARTELS, C.F. e LA DU, B.N. A DNA mutation associated with the H-variant of human butyrylcholinesterase. Third International Meeting on Cholinesterase. França, 1990. p. 101. Resumo
- JOSHI, H.; SIVARAM, S. e DUA, R.D. Persistence of typable activity of pseudocholinesterase (E2 locus)- C5 component polymorphism in human bloodstains under Indian climatic conditions. Ind. J. Exp. Biol., 17:258-261, 1979.
- JUUL, P. Human plasma cholinesterase isoenzymes. Clin. Chem. Acta, 19:205-208, 1968.

- KALOW, W. Familial incidence of low pseudocholinesterase levels. Lancet, 2:576-577, 1956.
- KALOW, W. e DAVIES, R.O. The activity of various esterase inhibitors towards atypical human serum cholinesterase. Biochem. Pharmacol., 1:183-192, 1958.
- 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.
- KALOW, W. e STARON, N. On distribution and inheritance of atypical forms of human serum cholinesterase, as indicated by dibucaine numbers. Can. J. Biochem. Physiol., 35:1315-1317, 1957.
- KATTAMIS, C.H.; DAVIES, D. e LEHMANN, H. The silent serum cholinesterase gene. Acta Genet., 17:299-303, 1967.
- KATTAMIS, C.H.; ZANNOS-MARIOLEA, L.; FRANCO, A.P.; LIDDELL, J.; LEHMANN, H. e DAVIES, D. Frequency of atypical pseudocholinesterase in British and Mediterranean populations. Nature, 196:599-600, 1962.
- KING, J. e DIXON, R.I. A source of error in the determination of inhibitor constants of serum cholinesterase. Brit. J. Anaesth., 42:693-701, 1970.
- KING, J. e MORGAN, H.G. The temperature activity relationships of serum cholinesterase. J. Clin. Path., 23:730-732, 1970.
- KING, M.E. Cholinesterase. IN: PESCE, A.J. e KAPLAN, L.A., ed. Methods in clinical chemistry. St. Louis, C.V. Mosby, 1987. p.161-168.
- KRAUSE, A.; LANE, A.B. e JENKINGS, T. A new high activity plasma cholinesterase variant. J. Med. Genet., 25:677-681, 1988.
- KUTTY, K.M. Biological function of cholinesterase. Clin. Biochem., 13:239-243, 1980.
- KUTTY, K.M. e ACHARYA, C.D. Serum cholinesterase and lipoproteins: a possible relationship. Scand. J. Clin. Lab. Invest. (supl. 126), 29; resumo 3.28, 1972.

- KUTTY, K.M.; ROWDEN, G. e COX, A.R. Interrelationship between serum β -lipoprotein and cholinesterase. Can. J. Biochem., 51:883-887, 1973.
- KUTTY, K.M.; JACOB, J.C.; HUTTON, C.J.; DAVIS, P.J. e PETERSON, S.C. Serum beta-lipoproteins: studies in a patient and in Guinea pigs after the ingestion of organophosphorus compounds. Clin. Biochem., 8:379-383, 1975.
- KUTTY, K.M.; REDHEENDRAN, R. e MURPHY, D. Serum cholinesterase: function in lipoprotein metabolism. Experientia, 33:420-421, 1977.
- KUTTY, K.M.; HUANG, S.N. e KEAN, K. Pseudocholinesterase in obesity: hypercaloric diet induced changes in experimental obese mice. Experientia, 37:1141-1142, 1981.
- LA DU, B.N.; BARTELS, C.F.; NOGUEIRA, C.P.; HAJRA, A.; LIGHTSTONE, H.; VAN DER SPEK, A.F.L. e LOCKRIDGE, O. Phenotypic and molecular biological analysis of human butyrylcholinesterase variants. Clin. Biochem., 23:423-431. 1990.
- LA DU, B.N.; BARTELS, C.F.; NOGUEIRA, C.P.; ARPAGAU, M. e LOCKRIDGE, O. Proposed nomenclature for human butyrylcholinesterase genetic variants identified by DNA sequencing. Cell. Mol. Neurobiol., 11:79-90, 1991.
- LA MOTTA, R.V.; McCOMB, R.B.; NOLL, C.R.Jr; WETSTONE, H.J. e REINFRANK, R.F. Multiple forms of serum cholinesterase. Arch. Biochem. Biophys., 124:299-308, 1968.
- LA MOTTA, R.V. e WORONICK, C. Molecular heterogeneity of human serum cholinesterase. Clin. Chem., 17:135-144, 1971.
- LARINI, L. Toxicologia dos Inseticidas. São Paulo, Sarvier, 1979. p.51-71.
- LAYER, P.G. e SPORNS, O. Spatiotemporal relationship of embryonic cholinesterase with cell proliferation in chicken brain and eye. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84:284-288, 1987.
- LEE, S.L. e TAYLOR, P. Structural characterization of the asymmetric (17+13)S species of acetylcholinesterase from Torpedo. J. Biol. Chem., 257:12292-12301, 1982.
- LEHMANN, H. e LIDDELL, J. Genetical variants of human serum cholinesterase. IN: STEINBERG, A.G e BEARN, A.G. (ed.) Progress in medical genetics. Grune e Stratton, 1964, v.3, p.75-105.
- LIDDELL, J.; LEHMANN, H. e SILK, E. A "silent" pseudocholinesterase gene. Nature, 193: 561-562, 1962.

- LIDDELL, J.; NEWMAN, G.E. e BROWN, D.F. A pseudocholinesterase variant in human tissues. Nature, 198:1090-1091, 1963.
- LOCKRIDGE, O. Substance P hydrolysis by human serum cholinesterase. J. Neurochem., 39:106-110, 1982.
- LOCKRIDGE, O. Genetic variants of human serum cholinesterase influence metabolism of the muscle relaxant succinylcholine. Pharmac. Ther., 47:35-60, 1990 a.
- LOCKRIDGE, O. Structure of human butyrylcholinesterase gene and expression in mammalian cells. Third International Meeting on Cholinesterase. França, 1990b, p.25. Resumo.
- LOCKRIDGE, O.; ECKERSON, H.W. e LA DU, B.N. Interchain disulfide bonds and subunit organization in human serum cholinesterase. J. Biol. Chem., 254:8324-8330, 1979.
- LOCKRIDGE, O. e LA DU, B.N. Loss of the interchain disulfide peptide and dissociation of the tetramer following limited proteolysis of native human serum cholinesterase. J. Biol. Chem., 257:12012-12018, 1982.
- LOCKRIDGE, O.; ADKINS, S.e LA DU, B.N. Location of disulfide bonds within the sequence of human serum cholinesterase. J. Biol. Chem., 262:12945-12952, 1987 a.
- LOCKRIDGE, O.; BARTELS, C.F.; VAUGHAN, T.A.; WONG, C.K.; NORTON, S.E. e JOHNSON, L.J. Complete amino acid sequence of human serum cholinesterase. J. Biol. Chem., 262:549-557, 1987 b.
- LONG, K.R. Cholinesterase activity as a biological indicator of exposure to pesticides. Int. Arch. Occup. Environ. Heth., 36:75-86, 1975.
- LOVRIEN, E.W.; MAGENIS, R.E.; RIVAS, M.L.; RAVE, S.; WOOD, J. e HEMMERLING, J. Serum cholinesterase (E₂) linkage analysis: possible evidence for localization to chromosome 16. Cytogenet. Cell. Genet., 22: 324-326, 1978.
- MAGNA, L.A.; MORANDIN, R.C.; PINTO Jr., W. e BEIGUELMAN, B. Frequency of the atypical serum cholinesterase in Southeastern Brazilian Caucasoids. Rev. Brasil. Genet., 3:329-337, 1980.

- MAGNA, L.A.; MOURA, T.J.A.; PINTO Jr, W. e BEIGUELMAN, B. Atypical pseudochoolinesterase in Northeastern Brazilian Caucasoids. Rev. Brasil. Genet., 6:381-384, 1983.
- MARAZITA, M.L.; KEATS, B.J.B.; SPENCE, M.A.; SPARKES, R.S.; FIELD L.L.; SPARKES, M.C. e CRIST, M. Mapping studies of the serum cholinesterase-2 locus (CHE2). Hum. Genet., 83:139-144, 1989.
- MASSON, P. Formes moleculaires multiples de la butyrylcholinesterase du plasma humain. Biochim. Biophys. Acta, 578:493-504, 1979.
- MASSON, P. A naturally occurring molecular form of human plasma cholinesterase is an albumin conjugate. Biochim. Biophys. Acta, 988:258-266, 1989.
- MASSON, P. Molecular heterogeneity of human plasma cholinesterase. 1991 (no prelo).
- MASSON, P.; CHATONNET, A. e LOCKRIDGE, O. Evidence for a single butyrylcholinesterase gene in individuals carrying the C5 plasma cholinesterase variant (CHE2). FEBS Lett., 262:115-118, 1990.
- MASSOULIÉ, J. The polymorphism of cholinesterases and its physiological significance. TIBS, 10:160-163, 1980.
- MASSOULIÉ, J. e BON, S. The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates. Ann. Rev. Neurosci., 5:57-106, 1982.
- MCGUIRE, M.C.; NOGUEIRA, C.P.; BARTELS, C.F.; LIGHTSTONE, H.; HAJRA, A.; VAN DER SPEK, 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. USA, 86:953-957, 1989.
- MCTIERNAN, C.; ADKINS, S.; CHATONNET, A.; VAUGHAN, T.A.; BARTELS, C.F.; KOTT, M.; ROSENBERRY, T.L.; LA DU, B.N. e LOCKRIDGE, O. Brain cDNA clone for human cholinesterase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:6682-6686, 1987.
- MENDEL, B. e RUDNEY, H. Cholinesterase and pseudochoolinesterase. Biochem. J., 37:59-63, 1943.
- MORROW, A.C. e MOTULSKY, A.G. Rapid screening method for the common atypical pseudochoolinesterase variant. J. Lab Clin. Med., 71:350-356, 1968.

- MUENSCH, H.; GOEDDE, 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.
- NEITLICH, H.W. Increased plasma cholinesterase activity and succinylcholine resistance: a genetic variant. J. Clin. Invest., 45:380-387, 1966.
- NEVILLE, L.F.; GNATT, A.; PADAN, R.; SEIDMAN, S. e SOREQ, H. Anionic site interactions in human butyrylcholinesterase disrupted by two single point mutations. J. Biol. Chem., 256:20735-20738, 1990.
- NOGUEIRA, C.P.; McGUIRE, M.C.; GRAESER, C.; BARTELS, C.F.; ARPAGAU, M.; VAN DER SPEK, A.F.L.; LIGHTSTONE, O. e LA DU, B.N. Identification of a frameshift mutation responsible for the silent phenotype of human serum cholinesterase, Gly 117. Am. J. Hum. Genet., 46:934-942, 1990.
- OHKAWA, J.; FURUYA, I.; TABATA, S.; SAEKI, S.; OIMONI, T. e BABA, S. Chemical characterization of C5 cholinesterase isoenzyme. Enzyme (suppl. 1), 40:37-38, 1988.
- OSADA, J.; AYLAGAS, H.; CAO, G.; MIRÓ-OBRAIDORS, M.J. e PALACIOS-ALAIZ, E. Changes in serum cholinesterase (EC 3.1.1.8) activity in rats consuming a high-fat diet. Brit. J. Nutr., 62:343-348, 1989.
- PICHETH, G. Colinesterase sérica humana: contribuição ao estudo da metodologia para a determinação da atividade e dos fenótipos. Curitiba, 1989. 124 p. Tese. Mestrado. Universidade Federal do Paraná.
- PICHETH, G.; PRIMO-PARMO, S.L.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. e VIEIRA, M.M. Improved method for serum cholinesterase phenotyping. Third International Meeting on Cholinesterase. França, 1990, p. 174. resumo.
- PRIMO-PARMO, S.L.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.; LOURENÇO, M.A.C.; SALZANO, F.M. e MELO E FREITAS, M.J. Studies on serum cholinesterase (CHE1 and CHE2) in Brazilian Indian and admixed populations. Rev. Brasil. Genet., 9:467-478, 1986.
- PRODY, C.A.; ZEVI-SONKIN, D.; GNATT, A.; GOLDBERG, O. e SOREQ, H. Isolation and characterization of full-length cDNA clones coding for cholinesterase from fetal human tissues. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:3555-3559, 1987.

- RAO, R.V e BALASUBRAMANIAN, A.S. Identification of domains responsible for the aryl acylamidase and peptidase activities in human serum butyrylcholinesterase. Third International Meeting on Cholinesterase. França, 1990 p. 50. Resumo.
- ROBINSON, A.R.; ROBSON, M.; HARRISON, A.P. e ZUELZER, W.W. A new technique for differentiation of hemoglobin. J. Lab. Clin. Med., 50:745-752, 1957.
- ROBSON, E. B. e HARRIS, H. Further data on the incidence and genetics of the serum cholinesterase phenotype C5+. Ann. Hum. Genet., 29:403-408, 1966.
- ROBSON, E. B.; SUTHERLAND, I. e HARRIS, H. Evidence for linkage between the transferrin locus (Tf) and the serum cholinesterase locus (E₁) in man. Ann. Hum. Genet., 29:325-336, 1966.
- RUBINSTEIN, H.M.; DIETZ, A.A.; HODGES, L.K.; LUBRANO, T. e CZEBOTAR, V. Silent cholinesterase gene: variations in the properties of serum enzyme in apparent homozygotes. J. Clin. Invest., 49:479-486, 1970.
- RUBINSTEIN, H.M.; DIETZ, A.A.; LUBRANO, T. e GARRY, P. E₁J, a quantitative variant at cholinesterase locus 1: immunological evidence. J. Med. Genet., 13:43-45, 1976.
- RUBINSTEIN, H.M.; DIETZ, A.A. e LUBRANO, T. E₁K, another quantitative variant at cholinesterase locus 1. J. Med. Genet., 15:27-29, 1978.
- 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.
- SCOTT, E.M. e WRIGHT, R. A third type of serum cholinesterase deficiency in Eskimos. Am. J. Hum. Genet., 28:253-256, 1976.
- SIDELL, F.R. e KAMINSKIS, A. Temporal intrapersonal physiological variability of cholinesterase activity in human plasma and erythrocytes. Clin. Chem., 21: 1961-1963, 1975.
- SIMPSON, N.E. Factors influencing cholinesterase activity in a Brazilian population. Am. J. Hum. Genet., 18:243-252, 1966.
- SIMPSON, N.E. e ELLIOTT, C.R. Cholinesterase Newfoundland a new succinylcholine-sensitive variant of cholinesterase at locus 1. Am. J. Hum. Genet., 33:366-374, 1981.
- SIMPSON, N.E. e KALOW, W. Comparisons of two methods for typing of serum cholinesterase and prevalence of its variants in a Brazilian population. Am. J. Hum. Genet., 17:156-162, 1965.

- SMITH, R.L. The estimation of serum cholinesterase in the presence of anti-cholinesterase insecticides. Clin. Chim. Acta, 52:315-319, 1974.
- SOREQ, H.; ZAMIR, R.; ZEVIN-SONKIN, D. e ZAKUT, H. Human cholinesterase genes localized by hybridization to chromosomes 3 and 16. Hum. Genet., 77:325-328, 1987.
- SOUZA, I.R.; ALCANTARA, V.M.; CULPI, L.; PRIMO-PARMO, S.L. e CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Dificuldades relativas à identificação do fenótipo BCHE AK da butirilcolinesterase, por métodos de inibição enzimática. Rev. Brasil. Genet., (suppl.) 14:148, 1991.
- STEDMAN, E. e EASSON, L.H. Cholinesterase. An enzyme present in the blood-serum of the horse. Biochem. J., 26:2056-2065, 1932.
- STRYER, L. Biochemistry. 3ª ed. New York, W.H. Freeman, 1988. p.1023-1024.
- STUEBER-ODEBRECHT, N.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.; PRIMO-PARMO, S.L. e CARRENHO, J.M.X. Studies on the CHE1 locus of serum cholinesterase and surnames in a sample from Santa Catarina (Southern Brazil). Rev. Brasil. Genet., 8:535-546, 1985.
- SUGIMORI, T. Shortened action of succinylcholine in individuals with cholinesterase C5 isozyme. Canad. Anaesth. Soc. J., 33:321-327, 1986.
- TIETZ, N.W. Química Clínica Moderna. Interamericana, 1ª ed., 1972 p.434 .
- TIETZ, N. Guia Clínica de pruebas de laboratorio. Buenos Aires, Panamericana, 1985. p.130.
- TORTOLERO, M. e MEDINA, J.R. Las isoenzimas C4 Y C5 de la pseudocolinesterasa humana. SANGRA, 23:157-162, 1978.
- VAN ROS, G. e DRUET, R. Uncommon electrophoretic patterns of serum cholinesterase (pseudocholinesterase). Nature, 212:543-544, 1966.

- VAN ROS, G. e VERVOORT, T. Frequencies of the "atypical" and C5 variants of serum cholinesterase in Zairians and Belgians. Detection of the C5 variant by agar gel electrophoresis with an acid buffer. Ann. Soc. Belge Med. Trop. 53:633-644, 1973.
- 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.
- WETSTONE, H. e LA MOTTA, R. The clinical stability of serum cholinesterase activity. Clin. Chem., 11:653-662, 1965.
- WHITTAKER, M. Plasma cholinesterase variants and the anaesthetist. Anaesthesia, 35:173-197, 1980.
- WHITTAKER, M. Cholinesterases. IN: BERGMEYER H.U. ed. Methods of enzymatic analysis. 3a ed. Weinheim, Verlag Chemie, 1983. v.1, p.52-74.
- WHITTAKER, M. e BRITTEN, J.J. Plasma cholinesterase variants: family studies of the E₁k gene. Hum. Hered., 35:364-368, 1985.
- WHITTAKER, M. e BRITTEN, J.J. E₁h, a new allele at cholinesterase locus 1. Hum. Hered., 37:54-58, 1987a.
- WHITTAKER, M. e BRITTEN, J.J. Recognition of the E₁KE₁K homozygote for plasma cholinesterase. Hum. Hered., 40:247-249, 1990a.
- WHITTAKER, M.; BRITTEN, J.J. e WICKS, R.J. Inhibition of the plasma cholinesterase variants by propranolol. Br. J. Anaesth., 53:511-516, 1981.
- WHITTAKER, M.; JONES, J. e BRAVEN, J. Heterogeneity of the silent gene for plasma cholinesterase. Hum. Hered., 40:153-158, 1990b.
- WHITTAKER, M.; TAYLOR, F. e BATTERSBY, E.F. Recognition of the E₁KE₁F cholinesterase genotype in a family segregating three rare genes, E₁K, E₁F and E₁A. Hum. Hered., 37:82-85, 1987b.
- WITTER, R.F. Measurement of blood cholinesterase. Arch. Environ. Health, 6:537-562, 1963.
- YAMAMOTO, K.; MORITO, F.; MOTOMURA, M.; KANEOKA, H. e SADAI, T. A case of familial hyper-cholinesterasemia associated with isozyme variant band. Gastroent. Jap., 21:379-384, 1986.
- YAMAMOTO, K.; MORITO, F.; SETOUGUCHI, Y.; FUJII, S. e KARIYA, T. Characterization of serum cholinesterase in

- familial hyper-cholinesterasemia associated with an isozyme variant band. Gastroent. Jap., 22:187-193, 1987.
- YANG, F.; LUM, J.B.; MCGILL, J.R.; MOORE, C.M.; NAYLOR, S.L.; VAN BRAGT, P.H.; BALDWIN, W.D. e BOWMAN, B.H. Human transferrin: cDNA characterization and chromosomal localization. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81:2752-2756, 1984.
- 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.
- YOUNG, D.S.; PESTANER, L.C. e GIBBERMON, V. Effects of drugs on clinical laboratory tests. Clin. Chem., 21:281D, 1975.
- ZIMMERMAN, H.J. e HENRY, J.B. Clinical enzymology. IN: HENRY, J.B. ed. Clinical diagnosis and management by laboratory methods. 16a ed. Philadelphia, W.B. Saunders, 1979. v.1, p. 370-372.