

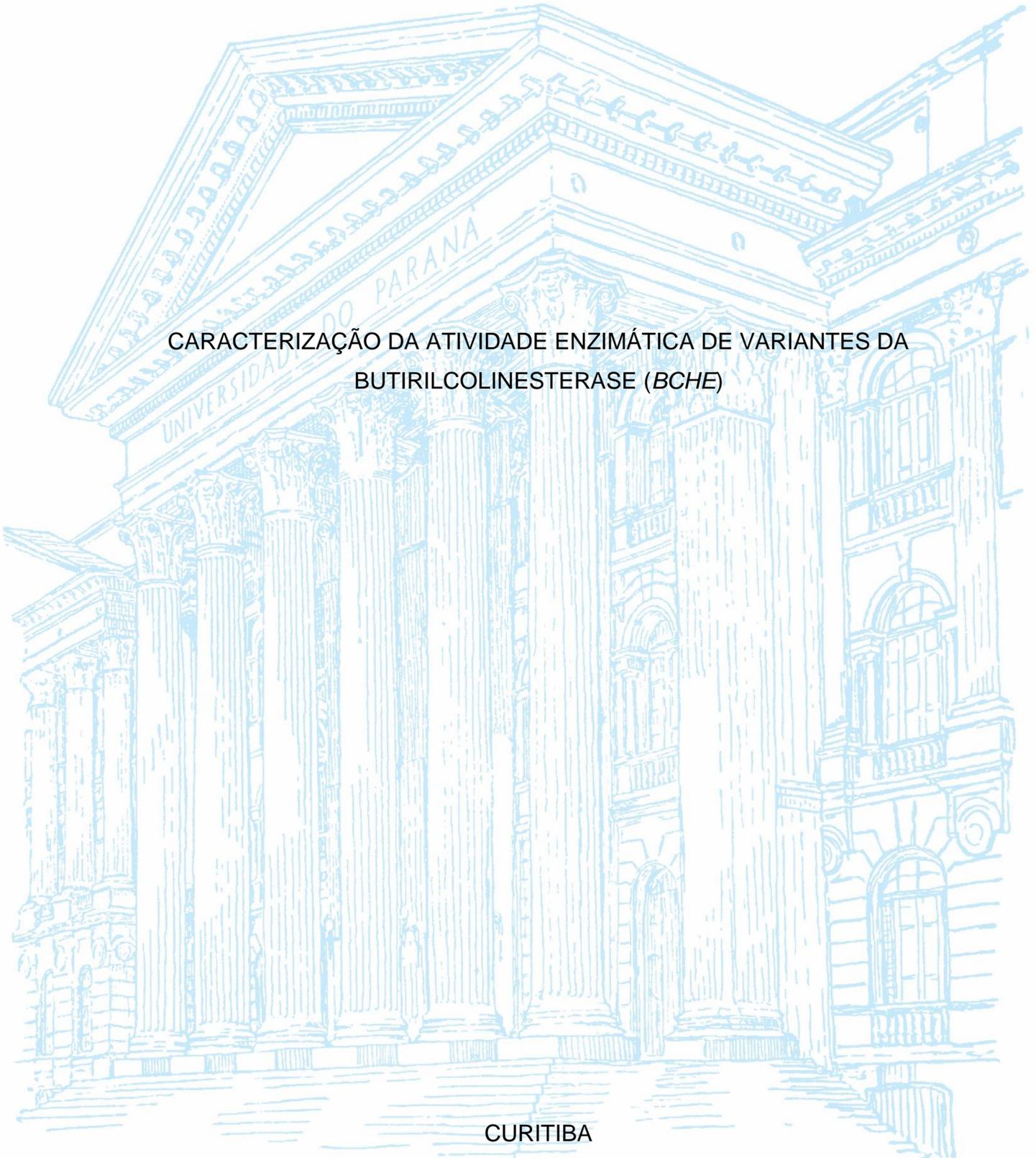
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARCOS PAULO NAPOLEÃO DOS SANTOS

CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE VARIANTES DA
BUTIRILCOLINESTERASE (BCHE)

CURITIBA

2022



MARCOS PAULO NAPOLEÃO DOS SANTOS

CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE VARIANTES DA
BUTIRILCOLINESTERASE (BCHE)

Monografia apresentada ao curso de Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza

CURITIBA

2022

TERMO DE APROVAÇÃO

MARCOS PAULO NAPOLEÃO DOS SANTOS

CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE VARIANTES DA BUTIRILCOLINESTERASE (BCHE)

Monografia apresentada ao curso de graduação em Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Prof. Dr. _____

Orientador – Departamento de Genética, UFPR

Prof(a). Dr(a) _____

Departamento de Genética, UFPR

Msc. _____

Departamento de Genética, UFPR

Curitiba, de Setembro de 2022.

A todos os cientistas e pesquisadores do Brasil, que lutam com toda garra e suor, e que, contra todas as dificuldades, conseguem fazer ciência de qualidade em um país que se esforça para desmerecê-los.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe, Sandra, e meu pai, Paulo, por toda a dedicação em todos os anos de minha criação, pelo incentivo que me deram e por terem feito da educação de seus filhos uma prioridade. Agradeço a meu irmão Pedro, por compartilhar comigo muito mais que o próprio nome.

Agradeço aos amigos que fiz durante os anos de graduação, Jhonathan, Felipe, Pedro, Luis e Luiz, que trilharam lado a lado essa jornada na biologia. Agradeço a meu grande amigo Steffano, e minhas amigas de longa data Vitória, Ellen e Nathali, que, embora à distância, tiveram presença significativa em minha caminhada na graduação.

Agradeço a meu tio Nilton e minha tia Eliane, que me acolheram como filho, e a meus primos Nilton e Emanuele, meus irmãos de diferentes pais.

Agradeço aos bons professores, que, mais que ensinar, me inspiraram.

Agradeço aos meus orientadores e orientadoras, que me deram oportunidades e me ensinaram muito.

Agradeço a minha companheira da vida Luani, que fez muito mais por mim do que eu posso agradecer e retribuir.

“The greater their ignorance, the stronger their opinions”.

Ken Follet

RESUMO

A acetilcolinesterase (AChE) e a butirilcolinesterase (BChE) são duas enzimas importantes no metabolismo de moléculas de colina. A AChE é particularmente importante no mecanismo de controle da concentração de acetilcolina no encéfalo. A BChE também é chamada de pseudo-colinesterase, devido a sua natureza menos específica. Além do metabolismo colinérgico a BChE tem papel importante também no metabolismo de ésteres de substâncias exógenas, tendo função de desintoxicação. Fármacos como a succinilcolina e o mivacúrio, anestésitos bastante utilizados na prática clínica apresentam interações peculiares quando administrados em indivíduos portadores de certos polimorfismos da BChE. Alguns desses polimorfismos podem causar quadros de efeito prolongado após a utilização do anestésico. Dessa maneira, a identificação de polimorfismos deve ser ferramenta útil para mapear indivíduos potencialmente suscetíveis a efeitos mais agudos de medicamentos anestésicos específicos. Para a realização do trabalho foram utilizados conjuntos de primer alelo específicos em reações de PCR-SSP com a finalidade de identificar genótipos da variante rs1799807, conhecida como mutação A, frequentemente associada a quadros de susceptibilidade aos efeitos de succinilcolina. Foi realizado também a avaliação da atividade enzimática plasmática da BChE nos mesmos indivíduos através da mensuração da absorvância de substâncias formadas pela ação indireta da BChE em leituras sequenciais em espectrofotômetro. Foram identificados apenas três indivíduos portadores do alelo A. Não foi constatado diferença estatística da atividade enzimática relacionada aos alelos. Não foi possível fazer inferências em relação à atividade enzimática e suas associações com os genótipos devido ao baixo número de amostras utilizadas.

Palavras-chave: BChE. PCR-SSP. SNPs. Tipagem. Atividade.

ABSTRACT

Acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) are important enzymes in choline molecules metabolism. The AChE is particularly relevant on concentration control mechanism of acetylcholine on brain tissue. BChE is also known as pseudo-cholinesterase, for its less specific nature. In addition to its role on colinergic methabolism, the BChE has an important role on exogenous substances catalysis, acting as a detox agent. Drugs such succiylcholine and mivacurium are widely used on clinical routines. When administrated on individuals with certain polimorfisms of BChE, those drugs may present peculiar activity. Some of those BChE polimorfisms are able to induce prolonged periods of anesthesia effects. On this matter, screening of polimorfisms should be an usefull tool for mapping potentially susceptible individuals for acute effects caused by anesthetic drugs. PCR-SSP reactions were used for genotyping a group of samples for the rs1799807 variant, the A variant. For evaluating BChE plasmatic activity, a procolot for measuring absorbances of sub products of BChE methabolism was used. Those results were obtaing on TECAN plate spectrephotometre. Three individual samples were identified as heterozygotes on A variant. The low number of samples made difficult to make any assumptions regarding the association with polimorphismd with enzyme activity. It wasn't possible to make any inferences on enzyme activity and polimorfisms relation.

Keywords: BChE. PCR-SSP. Genotype, enzyme activity. polimorfim. anesthesia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Bandas dos produtos de PCR de reação para identificação alélica da mutação A.....	24
Figura 2 – Resultado das corridas eletroforéticas em gel de agarose 2%	26
Figura 3 – Resultado das corridas eletroforéticas das repetições em gel de agarose 2%.....	26

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Estimativa da atividade enzimática das amostras através da leitura das absorbâncias.....	27
Gráfico 2 – Boxplot da atividade enzimática em dois grupos, categorizado por seus genótipos.	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Conjunto de primers utilizados para amplificação e identificação dos alelos da mutação A da BChE	24
Tabela 2 – Tabela dos genótipos encontrados para as 31 amostras analisadas	25
Tabela 3 – Resultado da leitura de absorbância relacionada à atividade enzimática de cada amostra	25

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

AChE	- Acetilcolinesterase
BChE	- Butirilcolinesterase
ChE	- Colinesterase
ACh	- Acetilcolina
DA	- Doença de Alzheimer
SSP	- <i>Single Specific Primer</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

® - marca registrada

μ - micro

M - Molar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 JUSTIFICATIVA	18
1.2 OBJETIVOS	18
1.2.1 Objetivo geral	18
1.2.2 Objetivos específicos.....	18
1.3 METODOLOGIA.....	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1.1 A ORIGEM DA <i>BCHE</i> E <i>ACHE</i>	20
2.1.2 ESTRUTURA E FUNÇÃO	20
2.2 VARIANTES	21
3 MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	23
3.2 GENOTIPAGENS.....	23
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	29
REFERÊNCIAS	30

1 INTRODUÇÃO

As duas principais enzimas que compõem o grupo das colinesterases são a acetilcolinesterase (AChE) e a butirilcolinesterase (BChE). O principal substrato da AChE é a acetilcolina (ACh), um dos principais neurotransmissores do sistema nervoso central. A degradação da ACh nos terminais sinápticos ocorre de maneira bastante rápida, em função, principalmente, da hidrólise dessa molécula pela AChE (NIROGI et al, 2010). A BChE possui funcionalidade análoga à AChE, estando presente principalmente no plasma, soro, fígado, pele e em tecidos musculares, de maneira mais abundante que a AChE (LOCKRIDGE, 2015). Além do metabolismo colinérgico, que caracteriza ambas as enzimas, a BChE tem papel importante também no metabolismo de ésteres de substâncias exógenas, em medicamentos como anestésicos e drogas como a cocaína (PATOČKA; KUČA; JUN, 2004). Fármacos como a succinilcolina e o Mivacúrio, utilizados em protocolos de anestesia, apresentam interações importantes com a BChE, cuja função está associada principalmente à degradação dessas moléculas. Alguns dos principais indicativos dessa interação reside no fato de que indivíduos com algum tipo de deficiência na produção ou funcionalidade da enzima podem apresentar efeito prolongado, em resposta a administrações dessas drogas, durante o processo de anestesia (ANDERSSON; MØLLER; WILDGAARD, 2019).

Com a aparente presença de mecanismo redundante, gerado pela sobreposição de funcionalidade das colinesterases, deficiências envolvendo a BChE podem passar despercebidas e só serem notadas justamente na realização de procedimentos cirúrgicos que envolvem o uso de succinilcolina (KAUFMAN; DONNELL; AIKEN; MAGEE, 2011). Apesar disso, é interessante notar que casos patológicos de deficiência em AChE aparentam ter efeitos mais agudos quando comparados aos efeitos de BChE deficitárias, especialmente efeitos em tecidos musculares, como no caso de síndromes miastênicas congênitas (LEGAY, 2018). Outro aspecto notório da BChE é sua constatada correlação com a doença de Alzheimer (DA). Sua associação em potencial com a doença desperta interesse em seu estudo como ferramenta diagnóstica, terapêutica e instrumento potencialmente importante para esclarecer mecanismos patológicos da DA (HA; MATHEW; YEONG, 2020). Uma das evidências do papel da BChE na doença de Alzheimer é a mudança de perfil na atividade das colinesterases: perda funcional da AChE e aumento da

atividade enzimática da BChE em algumas regiões do encéfalo de pacientes com a DA (DAS, 2007). Dessa maneira, polimorfismos genéticos no gene da BChE podem ser úteis como marcadores associados à ocorrência da DA (TASKER; PERRY; BALLARD, 2005).

Outros distúrbios fisiológicos podem, ainda, ter relação com a atividade e variabilidade genética do gene da *BChE*. Estudos com modelos animais apontam impacto da variação de funcionalidade da BChE no metabolismo lipídico e consequente influência em fatores que podem acarretar maior predisposição dos animais a apresentar obesidade (DUYSEN; LI; LOCKRIDGE, 2009). Esses ensaios relatam que camundongos BChE suprimidos apresentam ganho de peso em relação a animais normais e, não somente isso, indicam um papel significativo da enzima no metabolismo lipídico que influencia diretamente no ganho de peso e no perfil metabólico dos indivíduos (LI; DUYSEN; LOCKRIDGE, 2008). Polimorfismos gênicos parecem nesse caso estar fortemente associados ao metabolismo lipídico ligado à BChE, como em variantes associadas aos níveis de triglicerídeos em indivíduos obesos e associadas a diferentes níveis de atividade enzimática da BChE (OLIVEIRA et al., 2017; LIMA, et al., 2013).

O gene da *BChE* encontra-se no cromossomo 3 entre as posições 165,772,904 – 165,837,462 (ENSEMBL, 2022). Em algumas variantes bastante estudadas, como a variante K (rs1803274), foram apresentadas associações com diversos fenótipos, como risco de doenças cardiovasculares (PLEVA et al., 2015), variações metabólicas relacionadas justamente com a atividade da enzima (BENYAMIN et al., 2011) e, de forma não tão consistente, à DA (LU et al., 2020). Outras variantes podem ter influência na atividade enzimática e no perfil lipídico de indivíduos portadores, como é o caso da variante -116 (rs1126680) (OLIVEIRA et al., 2017).

À vista da eminente influência de polimorfismos do gene da *BChE* em diferentes vias do metabolismo, especialmente aqueles relacionados ao metabolismo de fármacos, práticas moleculares, como PCR-SSP (single specific primer), para identificação e estudo das variantes podem se tornar ferramentas interessantes aplicadas na prática clínica na predição dos efeitos de anestésicos em pacientes individuais (JHUN; APFELBAUM; DICKERSON; SHAHUL; KNOEBEL; DANAHEY; RATAIN; O'DONNELL, 2019). Dados genotípicos podem ser úteis em decisões médicas no momento pré-operatório na escolha do fármaco anestésico

levando em conta aspectos genéticos na balança de risco. A mutação A (rs1799807) possui ampla relação com o metabolismo deficitário da molécula de BChE, levando a quadros de maior susceptibilidade a efeitos da succinilcolina em doses fisiológicas ((JHUN; APFELBAUM; DICKERSON; SHAHUL; KNOEBEL; DANAHEY; RATAIN; O'DONNELL, 2019). Dessa forma, o presente estudo busca utilizar de técnica de SSP-PCR para genotipagem do polimorfismo do gene da *BChE* rs1799807 e aferir a atividade enzimática da BChE em amostras de plasma.

1.1 JUSTIFICATIVA

Decisões clínicas associadas ao uso de anestésicos em contexto operatório deve ser realizado com cuidado pelo profissional responsável. Como evidenciado de maneira prolixa por diversos trabalhos, a atividade da BChE possui relação direta com o comportamento fisiológico dos indivíduos expostos a fármacos anestésicos como a succinilcolina, aumentando, por exemplo, o tempo de recuperação de um protocolo de anestesia (ACHARYA; BHATTARAI; SHRIMANKER; GUPTA, 2022; (AL-EMAM, 2021).

Dessa maneira, é bastante importante o uso de ferramentas de diagnóstico molecular para identificar potenciais polimorfismos desse tipo, e auxiliar na tomada de decisão de maneira mais informada. Assim é justificado o desenvolvimento dessas ferramentas e consolidação do conhecimento associativo entre genótipo e fenótipo.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Dada a influência do alelo mutante da mutação A na atividade enzimática da BChE, buscou-se conferir a associação da variante, através da identificação de genótipos para o polimorfismo rs1799807 da BChE, com o perfil de atividade enzimática nesses indivíduos.

1.2.2 Objetivos específicos

- Padronizar o uso de um conjunto de primers para realização de PCR-SSP
- Realizar a aferência da atividade enzimática da BChE utilizando espectofotometria
- Genotipar amostras para a mutação utilizando a técnica de SSP.

1.3 METODOLOGIA

Para a realização do trabalho foi utilizado conjuntos de primers específicos para o polimorfismo rs1799807, e amplificação de fragmentos de DNA através de PCR-SSP. Os produtos foram verificados através de eletroforese em gel de agarose. A atividade enzimática foi mensurada através da medição de absorbância de produtos intermediários do metabolismo da BChE, lida no espectofotômetro Tecan® Infinite M200.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1.1 A ORIGEM DA *BChE* E *AChE*

A *AChE* e a *BChE* estão presentes na maioria dos vertebrados Gnathostomados. Além da evidente relação estrutural e funcional das duas enzimas, a relação evolutiva entre elas é flagrante. As características parelhas da *BChE* e da *AChE* é resultado de evento de duplicação gênica em ramos basais da história evolutiva dos vertebrados (PEZZEMENTI; NACHON; CHATONNET, 2011). Embora alguns animais invertebrados possuam enzimas semelhantes às colinesterases de vertebrados, é possível que essas analogias não possuam caráter homólogo, tendo as colinesterases verdadeiras surgido em uma linhagem bastante ancestral dos cordados (PEZZEMENTI; CHATONNET, 2010). As colinesterases atípicas, de não vertebrados, são conhecidamente presentes em grupos de moluscos, crustáceos e nematelmintos, com atividade enzimática semelhante à apresentada pela *AChE*, e com características moleculares divergentes das colinesterases típicas. Sob o aspecto evolutivo, esses fatores provavelmente caracterizam convergência evolutiva de suas funções e estruturas (JOHNSON; MOORE, 2012). Mesmo entre vertebrados, existe a possibilidade de que mais de um evento de duplicação gênica tenha dado origem, a partir da *AChE*, a outras *ChE*: à *BChE* e a versões atípicas dessa enzima em alguns grupos de animais (PEZZEMENTI; NACHON; CHATONNET, 2011).

2.1.2 ESTRUTURA E FUNÇÃO

A *BChE* tem ação principal na hidrólise de compostos com ésteres orgânicos, como a butirilcolina e a succinilcolina além de compostos exógenos, tóxicos ou terapêuticos, como o medicamento micovarium e as drogas cocaína e heroína (UNO; UEHARA; MAHADHI; OHURA; HOSOKAWA; IMAI, 2018). Para a hidrólise desses compostos, essa esterase possui um sítio ativo com resíduos de serina, histidina e glutamina, além de um buraco de oxiânion que promove a catálise dos compostos estéricos que acessam seu sítio enzimático (AMITAY; SHURKI, 2009). A semelhança em estrutura e função da *AChE* e da *BChE*, explicada pela relação filogenética entre as enzimas, embora fundamentalmente relevantes, são

limitadas por sutilezas em sua estrutura de aminoácidos nas cadeias peptídicas dos sítios ativos das enzimas. Essas diferenças possibilitam que, por exemplo, a BChE seja cataliticamente acessível e funcional para um número maior de substratos em relação à AChE, o que também é evidência de maior inespecificidade em relação à sua contraparte (BOER; NGUYEN; MAO; MOORE; SORIN, 2021).

2.2 VARIANTES

A atividade da BChE associada a alguns polimorfismos gênicos podem estar relacionados a características fisiológicas relevantes. A redução de atividade enzimática da molécula, associada a algumas mutações, por exemplo, pode se manifestar na resposta fisiológica do organismo do indivíduo portador de uma dessas variantes a algumas substâncias exógenas. Algumas mutações que acarretam justamente a uma atividade reduzida da enzima podem levar seus portadores a experimentar efeitos prolongados à exposição aos anestésicos succinilcolina e mivacurium (WICHMANN; FÆRK; BUNDGAARD; GÄTKE, 2016).

Uma variante conhecida da BChE, rs1799807, a mutação A, trata-se de uma mutação missense no segundo exon do gene da BChE, em um único sítio, um SNP, de uma substituição de T por C que resulta na troca de um ácido aspártico para uma glicina. Essa troca acarreta atividade enzimática atípica, especialmente relacionada ao metabolismo de succinilcolina e mivacurium em pessoas que apresentam a variante (JHUN; APFELBAUM; DICKERSON; SHAHUL; KNOEBEL; DANAHEY; RATAIN; O'DONNELL, 2019). Essa mutação apresenta-se em menos de 2% da população mundial e frequências semelhantes são encontradas entre latino-americanos (ALPHA, 2022). O comportamento atípico da variante em relação a sua afinidade pela succinilcolina, leva a quadros de anestesia prolongada em portadores quando expostos ao fármaco, manifestados principalmente em um maior tempo para recuperação de respiração espontânea (LOCKRIDGE; NORGREN; JOHNSON; BLAKE, 2016). Essa característica é evidente quando comparado a portadores do alelo usual: nesses indivíduos, o tempo de recuperação de apneia causada por administração de succinilcolina ocorre geralmente de 3 a 5 minutos, contrastando

com um tempo de até 20 minutos em indivíduos homocigotos do alelo A e até 2 horas em portadores homocigotos do alelo mutante (AL-EMAM, 2021).

A mutação K, o SNP rs1803274, trata-se de outro polimorfismo do gene da BChE. A variante, com o alelo C ancestral e T mutante, possui frequência populacional global de 80% do alelo ancestral e aproximadamente a mesma frequência dentre latino-americanos (ALFA, 2022). As primeiras associações talvez a dar notoriedade a essa mutação foi sua relação com a ocorrência da DA. (WIEBUSCH; POIRIER; SÉVIGNY; SCHAPPERT, 1999). Essa associação tornou-se evidente com o crescimento do número de trabalhos relacionando o fenótipo da DA ao SNP mutante (WANG et al., 2015). Embora essa presumida ligação entre patologia e genótipo tenha sido consonante dentre os trabalhos publicados no tema, alguns deles limitam-se a associá-las a grupos de polimorfismos de diferentes genes (LEHMANN; WILLIAMS; MCBROOM; SMITH, 2001; SCACCHI; GAMBINA; MORETTO; CORBO, 2009; GABRIEL; ALMEIDA; RIBEIRO; CARNEIRO; VALÉRIO; PINHEIRO; PASCOAL; SANTANA; BALDEIRAS, 2018). Uma hipótese sobre o papel do alelo K em sua associação com a DA é a de que a interação da molécula de BChE com fibrilas de β -amiloide, devido a sua menor estabilidade, ocorre com menor assiduidade em relação à mesma interação de amiloide com a proteína comum (alelo ancestral), o que, no último caso, pode representar um efeito protetivo (PODOLY; SHALEV; SHENHAR-TSARFATY; BENNETT; ASSAYAG; WILGUS; LIVNAH; SOREQ, 2009; REID; DARVESH, 2021). Em relação ao metabolismo de succinilcolina, o alelo mutante da mutação K também aumenta o tempo de duração dos anestésicos, de maneira mais branda que o alelo mutante da mutação A (BRET LAU; SØRENSEN; VEDERSOE; RASMUSSEN; GÄTKE, 2013).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas 31 amostras de sangue (plasma e sangue total), coletadas pelo Laboratório de Polimorfismos e Ligação. Com as amostras de plasma, foi possível aferir a atividade enzimática da BChE através de espectrofotometria. Com o DNA extraído das amostras de sangue, foi realizado a tipagem molecular do alelo A de todas as amostras.

3.1 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade enzimática da BChE plasmática foi aferida através do método descrito por Dietz, Rubinstein e Lubrano (1973) e modificado por Evans e Wroe (1978). Esse protocolo baseia-se nas diferentes absorvâncias entre DTNB (5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzoico)) e 5-thio-2-nitrobenzoate, na hidrólise da propioniltiocolina pela BChE e na reação desse produto com o DTNB, sendo avaliado esse parâmetro para inferência da atividade enzimática. Para a leitura da absorvância, foi utilizado espectrofotômetro com leitor de placas Tecan® Infinite M200. As amostras foram lidas em triplicatas, e as leituras foram realizadas em 16 poços por vez. As curvas de absorvância foram obtidas em 4 ciclos intervalados por 1 minuto entre si, à temperatura de 25°. Os valores obtidos foram ajustados, subtraindo-se o valor do branco da leitura das amostras.

3.2 GENOTIPAGENS

As tipagens para a mutação A foram realizadas com técnica de PCR-SSP utilizando quatro primers (tabela 1). Dois primers externos foram utilizados nos flancos da sequência da BChE, e outros dois primers foram utilizados no sítio da mutação, cada um, combinado a outro externo, foi utilizado para identificar especificamente o alelo da amostra. O produto da reação dos dois primers externos possui tamanho de 281pb, o produto da reação do alelo T possui 147 pb e o produto da reação do alelo C possui 198pb (figura 1)

Tabela 1 – Conjunto de primers utilizados para amplificação e identificação dos alelos da mutação A da BChE

Primer	Sequência	Tm
Outer F	3'-AGTGGCATT TTTTGGTTTAGGTGCTGGA	63°C
Outer R	3'-GGATGAACTTGACAGTTTTTGGTGGCAC	62°C
Inner F	3'-CTCTGATCCATGGAAGCCTGGAAAAC TTTTAC	59°C
Inner R	3'-AAATATGCAAATTCTTGCTGTCAGAACATCGA	63°C

Figura 1 – Bandas dos produtos de PCR de reação para identificação alélica da mutação A.



Legenda – O = produto da reação dos primers externos (281pb); C = produto da reação alelo específica do alelo C (198pb). T = produto da reação alelo específica do alelo T (147pb). 50pb = marcador de peso molecular de 50pb. A seta indica a altura da banda de tamanho 250pb. Fonte: O Autor, 2022.

As reações ocorreram com concentrações de 0.2mM de dNTPs, 2.5mM de MgCl₂, 0.2μM de cada primer, e Taq polimerase a 0.5U. A amplificação ocorreu em 27 ciclos de desnaturação em 94°C por 45s, anelamento em 59°C por 30s e extensão em 72°C por 45s.

Para a visualização do DNA amplificado foi realizado eletroforese em gel de agarose 2%, utilizando peso molecular de 50pb, loading buffer azul de bromofenol em glicerol e intercalante de DNA GelRed®.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi possível genotipar todas as 31 amostras de DNA disponíveis. Os genótipos de cada indivíduo estão apresentados na Tabela 2. Do total, constatou-se a presença de alelos mutantes em três indivíduos, todos heterozigotos. Algumas amplificações apresentaram resultados ambíguos, com falta de bandas ou inespecificidade de reação. Após repetição da amplificação dessas amostras todas as ambiguidades foram resolvidas. É possível visualizar os resultados das genotipagens nas figuras 2 e 3. A frequência genotípica de heterozigotos encontrada foi de 0.09677, e de homozigotos com o alelo típico (T) de 0,90323%. A frequência alélica dos alelos C e T foram, respectivamente 0.04838 e 0.951613.

Tabela 2 – Tabela dos genótipos encontrados para as 31 amostras analisadas

AMOSTRA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
GENÓTIPO	T/T										
AMOSTRA	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
GENÓTIPO	T/T	C/T	T/T	T/T							
AMOSTRA	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
GENÓTIPO	T/T	C/T	C/T								

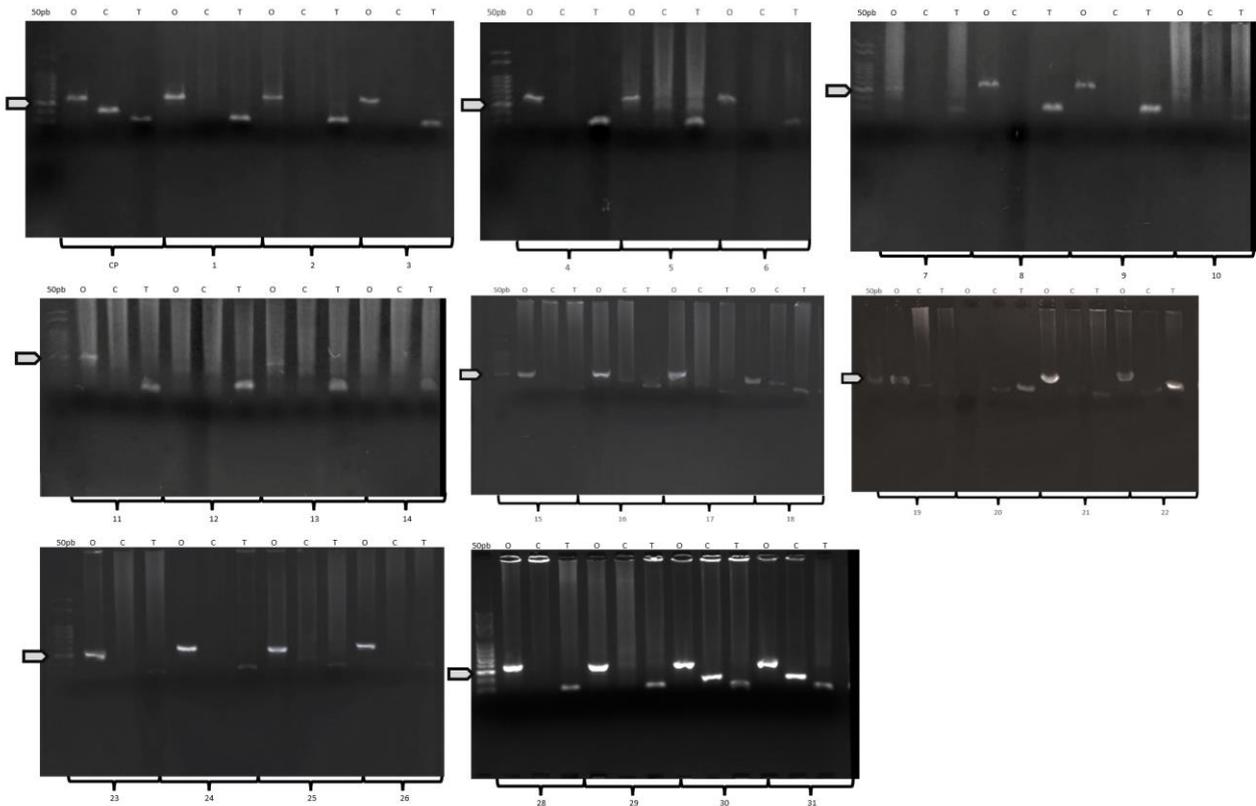
As aferições da atividade enzimática das amostras estão apresentadas na Tabela 3. Estão exibidas as médias das leituras triplicadas, além da média da diferença entre cada leitura. O valor de branco foi subtraído de cada leitura para ajuste do valor. O gráfico 1 indica o comportamento das leituras de cada amostra.

Tabela 3 – Resultado da leitura de absorbância relacionada à atividade enzimática de cada amostra

AMOSTRA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ATIVIDADE	0.060178	0.074	0.074844	0.092144	0.112667	0.046889	0.064878	0.064878	0.031244	0.058478
AMOSTRA	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
ATIVIDADE	0.068689	0.0603	0.074533	0.062133	0.086078	0.058456	0.095389	0.070178	0.056011	0.093611
AMOSTRA	21	22	23	24	25	26	27	29	30	31
ATIVIDADE	0.050756	0.003356	0.052911	0.085133	0.075567	0.0522	0.058278	0.056011	0.084122	0.015767

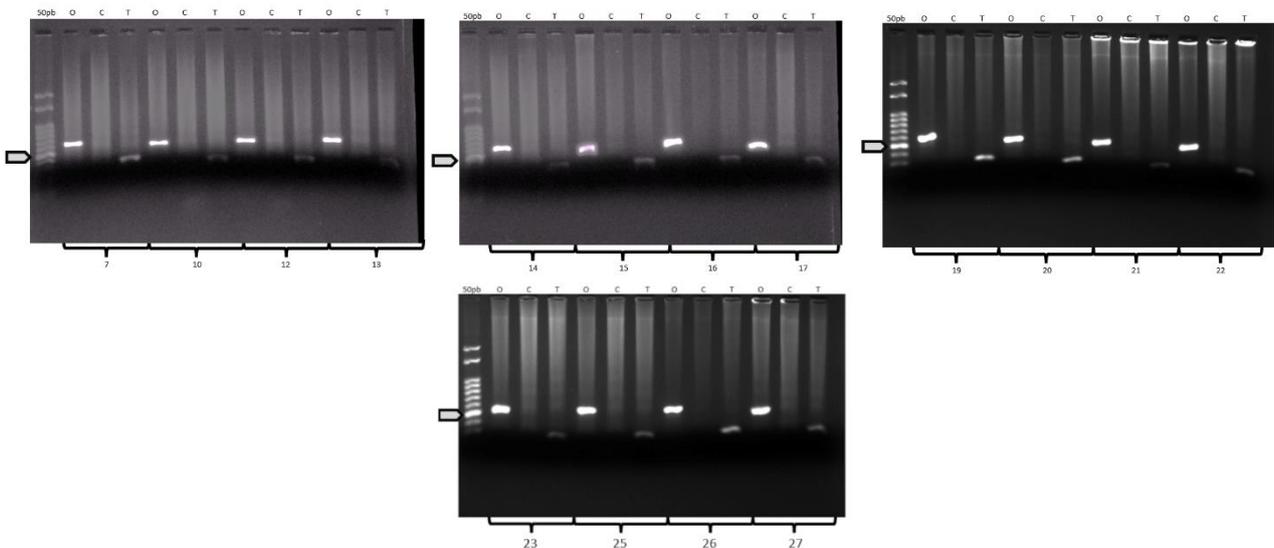
Legenda – Média = 0.064655924. Desvio padrão = 0.022692589

Figura 2 – Resultado das corridas eletroforéticas em gel de agarose 2%



Legenda – O = poço com aplicados da região externa, nos flancos do sítio alvo. C = poço com amplificações com primers para detecção do alelo C. T = poço com amplificações com primers para detecção do alelo T. 50pb = poço com marcador de peso molecular com tamanho de 50 pb. A seta branca indica a banda do marcador com tamanho de 250pb. As bandas esperadas para o alelo C é 198pb Para o alelo T, é esperado banda de 147pb.

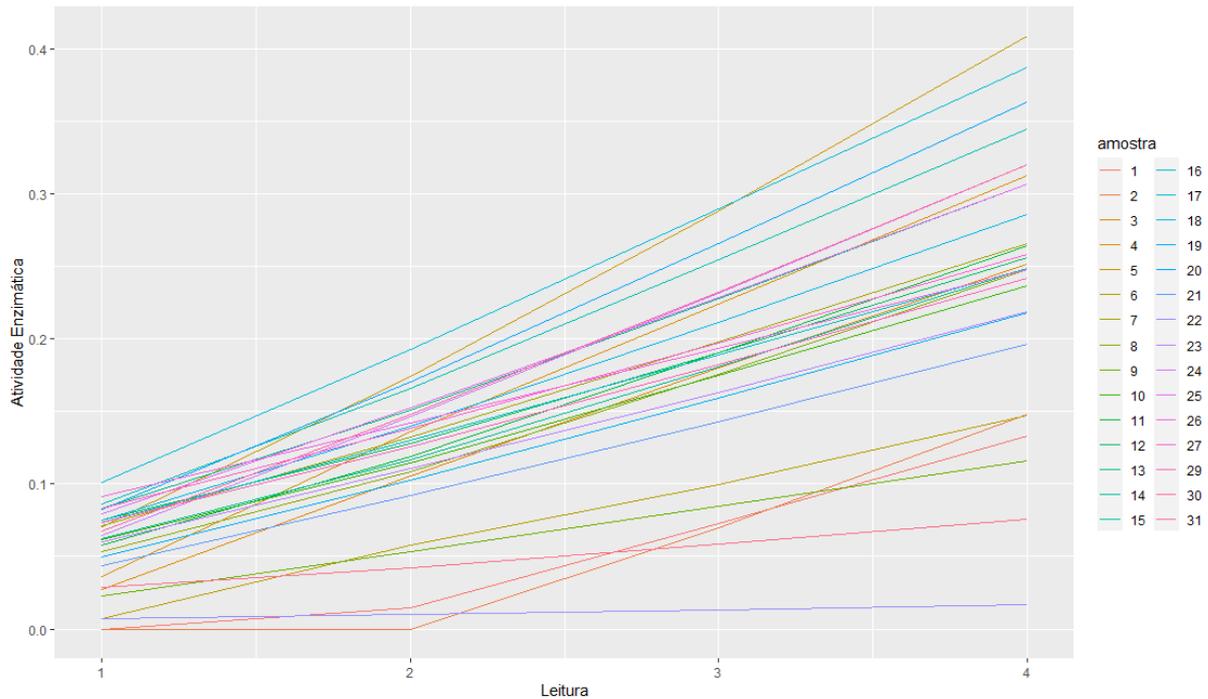
Figura 3 – Resultado das corridas eletroforéticas das repetições em gel de agarose 2%



Legenda – O = poço com amplificadas da região externa, nos flancos do sítio alvo. C = poço com amplificações com primers para detecção do alelo C. T = poço com amplificações com primers para

deteccção do alelo T. 50pb = poço com marcador de peso molecular com tamanho de 50 pb. A seta branca indica a banda do marcador com tamanho de 250pb. As bandas esperadas para o alelo C é 198pb Para o alelo T, é esperado banda de 147pb.

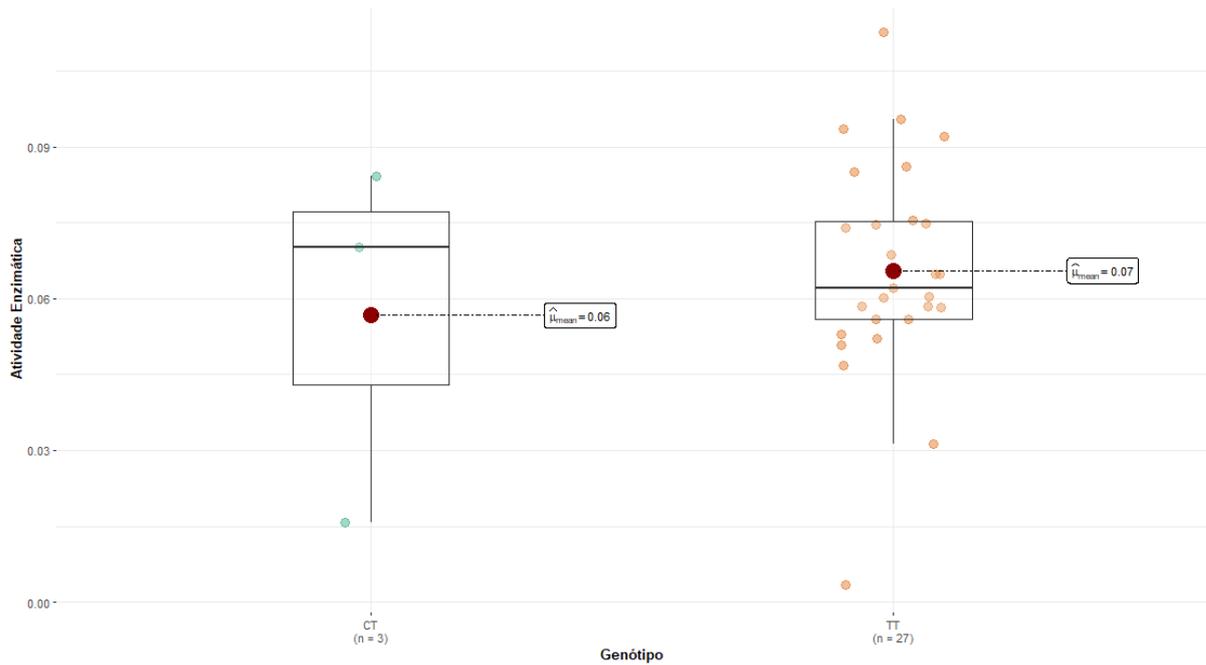
Gráfico 1 – Estimativa da atividade enzimática das amostras através da leitura das absorbâncias



Legenda – Fonte: O Autor. 2022.

Considerando a variação de atividade enzimática entre os grupos de genótipos, observaríamos o seguinte aspecto (gráfico 2):

Gráfico 2 – Boxplot da atividade enzimática em dois grupos, categorizado por seus genótipos.



Legenda – Dois grupos categorizados por genótipo. Eixo x = genótipo. Eixo y = inferências de atividade enzimática.

Lamentavelmente, um número pequeno de amostras com o genótipo mutante impede com que inferências precisas sejam realizadas. Seria necessário grupos amostrais maiores para análises mais sofisticadas. Devido à baixa frequência populacional do alelo mutante dessa variante, para realizar trabalhos com o mesmo escopo é necessário que o número de amostras disponíveis seja bem maior. É interessante notar que a técnica usada para genotipar as amostras, teve sucesso em todas elas. A utilização de uma técnica simples para detecção de alelos da mutação permite que experimentos sejam realizados com certa rapidez e de forma bastante barata.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A consolidação da associação de variantes da BChE com fenótipos nocivos relacionados ao uso de anestésicos, pode fazer com que a detecção de alelos mutantes tenha utilidade na prática clínica, especialmente nas decisões médicas para a escolha do anestésico. Nesse contexto, o desenvolvimento de técnicas simples e baratas para a detecção desses polimorfismos pode ser um caminho interessante a ser seguido. Estudos populacionais com alelos em baixa frequência devem ocorrer com número amostral alto. Dessa forma recomenda-se que novos estudos sejam feitos levando isso em consideração.

Análises moleculares através predição de interações entre moléculas vêm se tornando cada vez mais populares, especialmente no campo da farmacogenômica. Modelos de docagem molecular, por exemplo, permitem a predição da interação de sítios proteicos com outras estruturas orgânicas, podendo ser usadas como preditor de inibição ou ativação de certas estruturas enzimáticas, por exemplo. Dessa forma, espera-se que modelos preditivos, aliados a análises moleculares, com identificação de alelos e expressão gênica sejam usados para estudos de interação de fármacos para o tratamento de deficiências da atividade enzimática ou ainda para a melhor compreensão de como polimorfismos genéticos na BChE podem afetar a interação de sua molécula com outras estruturas endógenas ou exógenas. A utilização de modelos preditivos da estrutura peptídica de proteínas, ou mesmo modelos 3d dessas estruturas, aliadas a análises bioinformáticas, podem trazer uma luz a essas interações e, da mesma forma, serem úteis na prática clínica (CHOUDHURY; CHENG; PHAN; BRYANT; WANG, 2017). Esses estudos podem ser utilizados diretamente para inferência da atividade de um polimorfismo da BChE quando relacionada a um fármaco como a succinilcolina.

REFERÊNCIAS

ACHARYA, S; BHATTARAI, S; SHRIMANKER, I; GUPTA, S s. A prolonged paralysis with succinylcholine in pseudocholinesterase deficiency: an undesired effect. *Qjm* (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/qj>: **An International Journal of Medicine**, [S.L.], v. 115, n. 8, p. 547-548, 15 abr. 2022. Oxford University Press med/hcac103.

AL-EMAM, Ahmed. Butyryl-cholinesterase deficiency: a case report of delayed recovery after general anaesthesia. **Toxicology Reports**, [S.L.], v. 8, p. 1226-1228, 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxrep.2021.06.016>.

ALFA: Allele Frequency Aggregator. **National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine**, www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/docs/gsr/alfa/.

ANDERSSON, M. L.; MØLLER, A. M.; WILDGAARD, K.. Butyrylcholinesterase deficiency and its clinical importance in anaesthesia: a systematic review. **Anaesthesia**, [S.L.], v. 74, n. 4, p. 518-528, 1 jan. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/anae.14545>.

AMITAY, Moshe; SHURKI, Avital. The structure of G117H mutant of butyrylcholinesterase: nerve agents scavenger. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, [S.L.], v. 77, n. 2, p. 370-377, 1 nov. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/prot.22442>.

BENYAMIN, Beben; MIDDELBERG, Rita P.; LIND, Penelope A.; VALLE, Anne M.; GORDON, Scott; NYHOLT, Dale R.; MEDLAND, Sarah E.; HENDERS, Anjali K.; HEATH, Andrew C.; MADDEN, Pamela A.F.. GWAS of butyrylcholinesterase activity identifies four novel loci, independent effects within BCHE and secondary associations with metabolic risk factors. **Human Molecular Genetics**, [S.L.], v. 20, n. 22, p. 4504-4514, 23 ago. 2011. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddr375>.

BOER, Danna de; NGUYEN, Nguyet; MAO, Jia; MOORE, Jessica; SORIN, Eric J.. A Comprehensive Review of Cholinesterase Modeling and Simulation. **Biomolecules**, [S.L.], v. 11, n. 4, p. 580, 15 abr. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/biom11040580>.

BRETLAU, Claus; SØRENSEN, Martin Kryspin; VEDERSOE, Anne-Lise Zimling; RASMUSSEN, Lars Simon; GÄTKE, Mona Ring. Response to Succinylcholine in Patients Carrying the K-Variant of the Butyrylcholinesterase Gene. **Anesthesia & Analgesia**, [S.L.], v. 116, n. 3, p. 596-601, mar. 2013. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1213/ane.0b013e318280a3f3>.

CHOUDHURY, Amrita Roy; CHENG, Tiejun; PHAN, Lon; BRYANT, Stephen H; WANG, Yanli. Supporting precision medicine by data mining across multi-disciplines: an integrative approach for generating comprehensive linkages between single nucleotide variants (snvs) and drug-binding sites. **Bioinformatics**, [S.L.], v. 33, n. 11, p. 1621-1629, 31 jan. 2017. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btx031>.

DAS, Undurti N. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as possible markers of low-grade systemic inflammation. **Medical Science Monitor**, [s. l.], v. 12, n. 13, p. 214-221, dez. 2007.

DIETZ, Albert; RUBINSTEIN, Herbert M; LUBRANO, Tina. Colorimetric Determination of Serum Cholinesterase and Its Genetic Variants by the Propionylthiocholine— Dithiobis(nitrobenzoic Acid) Procedure. **Clinical Chemistry**, [S.L.], v. 19, n. 11, p. 1309-1313, 1 nov. 1973. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/clinchem/19.11.1309>.

DUYSEN, Ellen G; LI, Bin; LOCKRIDGE, Oksana. The butyrylcholinesterase knockout mouse a research tool in the study of drug sensitivity, bio-distribution, obesity and Alzheimer's disease. **Expert Opinion On Drug Metabolism & Toxicology**, [S.L.], v. 5, n. 5, p. 523-528, maio 2009. Informa Healthcare. <http://dx.doi.org/10.1517/17425250902915555>.

ENSEMBL. **Gene: BCHE ENSG00000114200**. Disponível em: http://dec2021.archive.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000114200;r=3:165772904-165837462. Acesso em: 05 jun. 2022.

EVANS, R T; WROE, J. Is serum cholinesterase activity a predictor of succinyl choline sensitivity? An assessment of four methods. **Clinical Chemistry**, [S.L.], v. 24, n. 10, p. 1762-1766, 1 out. 1978. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/clinchem/24.10.1762>.

GABRIEL, António José; ALMEIDA, Maria Rosário; RIBEIRO, Maria Helena; CARNEIRO, Diogo; VALÉRIO, Daniela; PINHEIRO, Ana Cristina; PASCOAL, Rui;

SANTANA, Isabel; BALDEIRAS, Inês. Influence of Butyrylcholinesterase in Progression of Mild Cognitive Impairment to Alzheimer's Disease. **Journal Of Alzheimer'S Disease**, [S.L.], v. 61, n. 3, p. 1097-1105, 9 jan. 2018. IOS Press. <http://dx.doi.org/10.3233/jad-170695>.

HA, Zhe Ying; MATHEW, Shintu; YEONG, Keng Yoon. Butyrylcholinesterase: a multifaceted pharmacological target and tool. *Current Protein & Peptide Science*, [S.L.], v. 21, n. 1, p. 99-109, 27 jan. 2020. **Bentham Science Publishers Ltd.**. <http://dx.doi.org/10.2174/1389203720666191107094949>.

JOHNSON, Glynis; MOORE, Samuel W.. Why has butyrylcholinesterase been retained? Structural and functional diversification in a duplicated gene. **Neurochemistry International**, [S.L.], v. 61, n. 5, p. 783-797, out. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2012.06.016>.

JHUN, Ellie H; APFELBAUM, Jeffrey L; DICKERSON, David M; SHAHUL, Sajid; KNOEBEL, Randall; DANAHEY, Keith; RATAIN, Mark J; O'DONNELL, Peter H. Pharmacogenomic considerations for medications in the perioperative setting. **Pharmacogenomics**, [S.L.], v. 20, n. 11, p. 813-827, jul. 2019. Future Medicine Ltd. <http://dx.doi.org/10.2217/pgs-2019-0040>.

KAUFMAN, Scott e; DONNELL, Robert W; AIKEN, David C; MAGEE, Caleb. Prolonged Neuromuscular Paralysis Following Rapid-Sequence Intubation with Succinylcholine. **Annals Of Pharmacotherapy**, [S.L.], v. 45, n. 4, p. 540-540, 22 mar. 2011. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1345/aph.1p753>.

LEGAY, Claire. Congenital myasthenic syndromes with acetylcholinesterase deficiency, the pathophysiological mechanisms. **Annals Of The New York Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 1413, n. 1, p. 104-110, fev. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/nyas.13595>.

LEHMANN, D.J; WILLIAMS, J; MCBROOM, J; SMITH, A.D. Using meta-analysis to explain the diversity of results in genetic studies of late-onset Alzheimer's disease and to identify high-risk subgroups. **Neuroscience**, [S.L.], v. 108, n. 4, p. 541-554, dez. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0306-4522\(01\)00464-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0306-4522(01)00464-x).

LI, Bin; DUYSSEN, Ellen G.; LOCKRIDGE, Oksana. The butyrylcholinesterase knockout mouse is obese on a high-fat diet. **Chemico-Biological Interactions**, [S.L.], v. 175, n. 1-3, p. 88-91, set. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2008.03.009>.

LOCKRIDGE, Oksana. Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses.

Pharmacology & Therapeutics, [S.L.], v. 148, p. 34-46, abr. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.11.011>.

LOCKRIDGE, Oksana; NORGREN, Robert B.; JOHNSON, Rudolph C.; BLAKE, Thomas A.. Naturally Occurring Genetic Variants of Human Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase and Their Potential Impact on the Risk of Toxicity from Cholinesterase Inhibitors. **Chemical Research In Toxicology**, [S.L.], v. 29, n. 9, p. 1381-1392, 31 ago. 2016. American Chemical Society (ACS).

<http://dx.doi.org/10.1021/acs.chemrestox.6b00228>.

LU, Jin; WANG, Xiuzhe; WAN, Lili; FU, Jianliang; HUO, Yan; ZHAO, Yuwu; GUO, Cheng. Gene Polymorphisms Affecting the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Donepezil Efficacy. **Frontiers In Pharmacology**, [S.L.], v. 11, 19 jun. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2020.00934>.

NIROGI, Ramakrishna; MUDIGONDA, Koteswara; KANDIKERE, Vishwottam; PONNAMANENI, Ranjithkumar. Quantification of acetylcholine, an essential neurotransmitter, in brain microdialysis samples by liquid chromatography mass spectrometry. **Biomedical Chromatography**, [S.L.], v. 24, n. 1, p. 39-48, jan. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/bmc.1347>.

OLIVEIRA, Jéssica de; TURECK, Luciane Viater; SANTOS, Willian dos; SALIBA, Louise Farah; SCHENKNECHT, Caroline Schovanz; SCARABOTO, Débora; SOUZA, Ricardo Lehtonen R.; FURTADO-ALLE, Lupe. Effect of BCHE single nucleotide polymorphisms on lipid metabolism markers in women. **Genetics And Molecular Biology**, [S.L.], v. 40, n. 2, p. 408-414, 11 maio 2017. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2016-0123>.

PATOČKA, Jiří; KUČA, Kamil; JUN, Daniel. Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase – Important Enzymes of Human Body. **Acta Medica** (Hradec Kralove, Czech Republic), [S.L.], v. 47, n. 4, p. 215-228, 2004. Charles University in Prague, Karolinum Press. <http://dx.doi.org/10.14712/18059694.2018.95>.

PEZZEMENTI, Leo; CHATONNET, Arnaud. Evolution of cholinesterases in the animal kingdom. **Chemico-Biological Interactions**, [S.L.], v. 187, n. 1-3, p. 27-33, set. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2010.03.043>.

PEZZEMENTI, Leo; NACHON, Florian; CHATONNET, Arnaud. Evolution of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase in the Vertebrates: an atypical butyrylcholinesterase from the medaka *oryzias latipes*. *Plos One*, [S.L.], v. 6, n. 2, 25 fev. 2011. **Public Library of Science** (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0017396>.

PLEVA, L.; KOVAROVA, P.; FALDYNOVA, L.; PLEVOVA, P.; HILSCHEROVA, S.; ZAPLETALOVA, J.; KUSNIEROVA, P.; KUKLA, P.. The rs1803274 polymorphism of the BCHE gene is associated with an increased risk of coronary in-stent restenosis. **Bmc Cardiovascular Disorders**, [S.L.], v. 15, n. 1, p. 1-9, 24 out. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12872-015-0128-8>.

PODOLY, Erez; SHALEV, Deborah E.; SHENHAR-TSARFATY, Shani; BENNETT, Estelle R.; ASSAYAG, Einor Ben; WILGUS, Harvey; LIVNAH, Oded; SOREQ, Hermona. The Butyrylcholinesterase K Variant Confers Structurally Derived Risks for Alzheimer Pathology. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 284, n. 25, p. 17170-17179, jun. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m109.004952>.

REID, G.A.; DARVESH, S.. Interaction of Exogenous Butyrylcholinesterase with β -Amyloid Plaques in 5XFAD/Butyrylcholinesterase-Knockout Mouse Brain. **Current Alzheimer Research**, [S.L.], v. 18, n. 6, p. 470-481, maio 2021. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/1567205018666210827122704>.

SCACCHI, Renato; GAMBINA, Giuseppe; MORETTO, Giuseppe; CORBO, Rosa Maria. Variability of AChE, BChE, and ChAT genes in the late-onset form of Alzheimer's disease and relationships with response to treatment with Donepezil and Rivastigmine. **American Journal Of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics**, [S.L.], v. 150, n. 4, p. 502-507, 5 jun. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.b.30846>.

TASKER, Andrea; PERRY, Elaine K; BALLARD, Clive G. Butyrylcholinesterase: impact on symptoms and progression of cognitive impairment. **Expert Review Of Neurotherapeutics**, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 101-106, jan. 2005. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1586/14737175.5.1.101>.

UNO, Yasuhiro; UEHARA, Shotaro; MAHADHI, Hassan M.D.; OHURA, Kayoko; HOSOKAWA, Masakiyo; IMAI, Teruko. Molecular characterization and polymorphisms of butyrylcholinesterase in cynomolgus macaques. *Journal Of Medical Primatology*, [S.L.], v. 47, n. 3, p. 185-191, 24 mar. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jmp.12342>.

WANG, Zongcheng; JIANG, Yuren; WANG, Xi; DU, Yangsen; XIAO, Dandan; DENG, Youchao; WANG, Jinlian. Butyrylcholinesterase K Variant and Alzheimer's Disease Risk: a meta-analysis. **Medical Science Monitor**, [S.L.], v. 21, p. 1408-1413, 2015. International Scientific Information, Inc.

Yuren JiangABCDEF, Xi WangBCD, Yangsen DuBCD, Dandan XiaoCF, Youchao DengC, Jinlian WangD

WIEBUSCH, H.; POIRIER, Judes; SÁVIGNY, Pierre; SCHAPPERT, Keith. Further evidence for a synergistic association between APOE ?4 and BCHE -K in confirmed Alzheimer's disease. **Human Genetics**, [S.L.], v. 104, n. 2, p. 158-163, 10 mar. 1999. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1007/s004390050929>.

WICHMANN, Sine; FÆRK, Gitte; BUNDGAARD, Jens R.; GÄTKE, Mona R.. Patients with prolonged effect of succinylcholine or mivacurium had novel mutations in the butyrylcholinesterase gene. **Pharmacogenetics And Genomics**, [S.L.], v. 26, n. 7, p. 351-356, jul. 2016. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health).
<http://dx.doi.org/10.1097/fpc.0000000000000221>.