

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUANI KLUTCHCOUSKI ANTUNES

PADRONIZAÇÃO DE UMA TÉCNICA DE PCR-SSP PARA IDENTIFICAÇÃO DE
GENÓTIPOS DO GENE DA *BCHE*.

CURITIBA

2022

LUANI KLUTCHCOUSKI ANTUNES

PADRONIZAÇÃO DE UMA TÉCNICA DE PCR-SSP PARA IDENTIFICAÇÃO DE
GENÓTIPOS DO GENE DA *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

LUANI KLUTCHCOUSKI ANTUNES

PADRONIZAÇÃO DE UMA TÉCNICA DE PCR-SSP PARA IDENTIFICAÇÃO DE
GENÓTIPOS DO GENE DA *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(a). Dr(a)./Msc. _____

Orientador(a) – Departamento _____, INSTITUIÇÃO

Prof(a). Dr(a)./Msc. _____

Departamento _____, INSTITUIÇÃO

Prof(a). Dr(a)./Msc. _____

Departamento _____, INSTITUIÇÃO

Cidade, __ de _____ de 2022.

Dedico este trabalho a toda bicharada que fez parte de minha vida e que, de alguma forma, me carregaram para os trilhos do estudo da vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente às políticas de inclusão e democratização do acesso ao ensino superior, pois sem o Sisu, não estaria aqui hoje. Sou grata a Universidade Federal do Paraná, por todos os auxílios fornecidos quando mais precisei, sem eles não seria possível realizar projetos de pesquisa e extensão que participei durante minha jornada acadêmica e científica na instituição.

Sou grata também a todos que acreditaram e incentivaram minha trajetória até aqui, em especial minha mãe Luciana, meu irmão Rafael, madrinha e padrinho Angela e Antonio e vó Ruth, vocês foram essenciais para minha formação, mesmo que de longe.

Agradeço ao melhor presente que a faculdade poderia me dar, meu amado companheiro Marcos, parceiro de graduação, experimentos, iniciação científica, trabalho e vida. Seu apoio e incentivo foram fundamentais para que eu pudesse chegar ao final da graduação. Sua determinação, calma e inteligência me inspiram.

Agradeço também aos amigos que fiz ao longo destes anos na universidade, em especial Bárbara, Jhonathan, Felipe e Luis Phelipe. Não podendo deixar de citar as amizades que fiz fora da universidade, mas que também serviram de apoio para minha formação, agradeço às minhas amigas Luciana, Thainá e Louise, por todas as risadas e conselhos compartilhados. Agradeço também toda a equipe do Laboratório de Imunogenética e Imunologia dos Transplantes do Hospital Universitário Cajuru, local que me acolheu como estagiária e permitiu meu crescimento profissional e pessoal, em especial minhas amigas Katia, Driely, Ethiene, Vânia, Juliana, Josemere, Márcia e Karime, por todas as coberturas em plantões, cafés repletos de alegria e conselhos, vocês são incríveis!

Por fim, agradeço ao Laboratório de Polimorfismos e Ligação, do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná, especialmente ao Professor Ricardo Lehtonen por aceitar orientar um projeto com prazos tão curtos, por fim, não podendo deixar de agradecer imensamente também ao mestrando João, técnico Maicon e doutoranda Isadora por todos os auxílios, bolos, conselhos e amostras fornecidas.

A ignorância gera mais frequentemente confiança do que o conhecimento:
são os que sabem pouco, não os que sabem muito, que afirmam tão positivamente
que este ou aquele problema nunca será resolvido pela ciência.

(Charles Darwin, 1871)

RESUMO

As colinesterases, acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE) são enzimas que realizam a hidrólise de ésteres de colina, sendo o principal substrato para tais enzimas o neurotransmissor acetilcolina (ACh). A BChE realiza igualmente a hidrólise de outros ésteres como a butirilcolina (BuCh). Alguns indivíduos podem apresentar mutações em porções específicas do gene da *BCHE*, manifestando uma alta sensibilidade quando expostos a determinados fármacos, como a succinilcolina, fazendo com que baixas administrações de tal medicamento sejam suficientes para entrada em estado de apnéia por algumas horas. Tendo em vista a importância farmacogenética da identificação prévia de indivíduos com variações na expressão da BChE, o presente estudo desenvolveu a padronização da técnica de PCR-SSP, por meio do desenho de quatro primers para cada um dos genótipos mutantes A, K e -116. Foi possível padronizar efetivamente a técnica para as mutações A e -116, sendo necessários maiores estudos acerca da aplicação da técnica para a mutação K.

Palavras-chave: Butirilcolinesterase. Butirilcolina. PCR-SSP. Padronização. BChE.

ABSTRACT

The cholinesterases, acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) are enzymes responsible for the hydrolysis of choline esters. Their main substrate is the neurotransmitter acetylcholine (ACh). BChE also performs the hydrolysis of other esters such as butyrylcholine (BuCh). Some individuals may have mutations in specific portions of the *BCHE* gene, manifesting a high sensitivity when exposed to certain drugs, such as succinylcholine, low administrations of this drug in those cases are sufficient to enter a state of apnea for a few hours. Considering the pharmacogenetic importance of the prior identification of individuals with variations in BChE expression, the present study developed the standardization of the PCR-SSP technique, through the design of four primers for each of the mutant genotypes A, K and -116. It was possible to effectively standardize the technique for the A and -116 mutations, requiring further studies on the application of the technique for the K mutation.

Keywords: Butyrylcholinesterase. Butyrylcholine. PCR-SSP. standardization. BChE

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Pontos de inserção dos primers dentro do gene da BChE.....	20
Figura 2 - Pontos de inserção dos primers para a mutação A.....	20
Figura 3 - Pontos de inserção dos primers para a mutação A com destaque para a região polimórfica.....	21
Figura 4 - Pontos de inserção dos primers para a mutação K.....	21
Figura 5 - Pontos de inserção dos primers para a mutação K com destaque para a região polimórfica.....	21
Figura 6 - Pontos de inserção dos primers para a mutação -116.....	21
Figura 7 - Pontos de inserção dos primers para a mutação -116 com destaque para a região polimórfica.....	22
Figura 8 - Simulação de gel de agarose esperado para cada uma das mutações de acordo com seus tamanhos de produto de PCR.....	24
Figura 9 - Gel de agarose 2% com o produto de PCR para mutação A.	25
Figura 10 - Gel de agarose 2% com o produto de PCR para mutação -116.	26
Figura 11 - Gel de agarose 2% com o produto de PCR para mutação -116.	26
Figura 12 - Gel de agarose 2% com o produto de PCR para mutação K.	27
Figura 13 Gel de agarose 2% com o produto de PCR para mutação K.	28
Figura 14 - Gel de agarose 2% com o produto de PCR para mutação K	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequências dos primers utilizados para as três mutações avaliadas no presente trabalho	19
Tabela 2 - Tamanho esperado como produto da PCR para cada uma das combinações de primers utilizadas	23

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

UFPR – Universidade Federal do Paraná

MgCl – Cloreto de Magnésio

BCHE – Gene da Butirilcolinesterase

AChE – Enzima Acetilcolinesterase

BChE - Enzima Butirilcolinesterase

ACh – Acetilcolina

BuCh – Butirilcolina

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

SSP – *Sequence-specific Primer*

SNP – Snip

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

RFLP-PCR – *Restriction Fragment Length Polymorphism–Polymerase Chain Reaction*

T_m – Temperatura de *melting*

U – Unidades

dNTPs – Desoxirribonucleotídeos

μM – Micro Molar

mM – Mili Molar

V – Volts

mA – Mili Amperes

pb – Pares de Base

ng – Nanogramas

μL – Microlitro

SNC – Sistema Nervoso Central

LISTA DE SÍMBOLOS

® - marca registrada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 JUSTIFICATIVA	17
1.2 OBJETIVOS	17
1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 O GENE <i>BCHE</i>	18
2.2 <i>PCR-SSP</i>	18
3 MATERIAL E MÉTODOS	19
4 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	29
5.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	29
REFERÊNCIAS.....	30

1 INTRODUÇÃO

As colinesterases, acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE) são enzimas do tipo serina hidrolases, e, portanto, catalisam a hidrólise de ésteres de colina, sendo o principal substrato para tais enzimas o neurotransmissor acetilcolina (ACh) (MASSOULIÉ; PEZZEMENTI; BON; KREJCI; VALLETTE, 1993). Ambas atuam diminuindo os níveis de ACh impedindo assim a comunicação entre as células do sistema nervoso. A AChE possui alta especificidade pela acetilcolina, e portanto, é a maior responsável pela hidrólise de tal molécula no sistema nervoso central (SNC) humano (GIACOBINI, 2004).

A BChE, é inespecífica, apesar de realizar a hidrólise da acetilcolina em taxas menores que AChE, realiza igualmente a hidrólise de outros ésteres como a butirilcolina (BuCh) (MENDEL; RUDNEY, 1943). Embora sintetizada no fígado e amplamente encontrada no plasma (cerca de 3mg/L), está presente em outros órgãos, tais como pulmões, coração e principalmente no sistema nervoso central e periférico. Tal enzima desempenha também importantes funções fármaco-toxicológicas, principalmente no metabolismo de lipoproteínas e fármacos. (GREIG; UTSUKI; INGRAM; WANG; PEPEU; SCALI; YU; MAMCZARZ; HOLLOWAY; GIORDANO, 2005).

O gene que codifica a *BCHE* possui 4 éxons e se encontra no terceiro cromossomo humano, na posição 3q26.1 (NCBI, 2022). As mutações A, K e -116 são do tipo SNP (do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*), com alteração em um único nucleotídeo, que acarreta a mudança do códon e por consequência mudança conformacional na enzima gerada (JASIECKI; WASĄG, 2019). Alguns indivíduos podem apresentar mutações em porções específicas do gene da *BCHE*, manifestando uma alta sensibilidade à algumas toxinas. Indivíduos com a presença da mutação K, ou variantes da enzima com capacidades alteradas de catálise podem desenvolver quadros de efeito prolongado e até overdose por não realizarem a degradação ideal do fármaco durante a passagem pelo fígado, tais como bambuterol, pró-fármaco da terbutalina com ação broncodilatadora, a succinilcolina, relaxante da musculatura esquelética utilizado para intubações e cirurgias e o mivacúrio, bloqueador neuromuscular (LOCKRIDGE, 1990). A elevada importância clínica e farmacológica da identificação prévia de indivíduos que apresentam as variações na expressão da BChE, pode facilitar na tomada de decisões por parte da equipe médica durante a decisão da realização ou não de procedimentos de administração para tais

medicamentos (JHUN; APFELBAUM; DICKERSON; SHAHUL; KNOEBEL; DANAHEY; RATAIN; O'DONNELL, 2019)

A metodologia de PCR- SSP (reação em cadeia da polimerase - *Sequence-specific Primer*) é amplamente utilizada no âmbito de diagnose genética rápida (OLIVEIRA, 2012), sendo possível a realização através da amplificação de um conjunto de quatro primers, dois para a região externa (*outers*) e dois para a região interna (*inners*) e específica para o nucleotídeo mutante (FRANCESCHI; VIEL; SELL; TSUNETO; VISENTAINER, 2009). Para as três mutações a serem avaliadas no presente estudo, A, K e -116, foram desenvolvidos um total de doze primers, com o auxílio da ferramenta *Tetra ARMS - PCR Primer Design Tool*, sendo eles quatro para cada mutação (dois *outers* e dois *inners*), a fim de se complementarem e, após amplificação, apresentarem a presença de bandas visualizáveis em gel de agarose.

1.1 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista a importância farmacogenética da identificação prévia de indivíduos com variações na expressão da butirilcolinesterase, o presente estudo servirá como guia para futuros trabalhos de padronização da técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase) pela metodologia SSP (*Sequence-specific Primer*) e identificação de genótipos A, K e -116 mutantes da *BCHE*.

1.2 OBJETIVOS

O presente trabalho busca padronizar a técnica de PCR pela metodologia SSP para detecção específica das mutações A, K e -116, responsáveis pelas alterações morfológicas na enzima BChE.

1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver um conjunto de quatro primers para a mutação A;
- Validar o conjunto de primers e a técnica desenvolvida para a mutação A, por meio de amostras conhecidamente positivas para o SNP;
- Desenvolver um conjunto de quatro primers para a mutação K
- Validar o conjunto de primers e a técnica desenvolvida para a mutação K, por meio de amostras conhecidamente positivas para o SNP;

- Desenvolver um conjunto de quatro primers para a mutação -116;
- Validar o conjunto de primers e a técnica desenvolvida para a mutação -116, por meio de amostras conhecidamente positivas para o SNP;

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O GENE *BCHE*

O gene para butirilcolinesterase (*BCHE*) possui 73kb, está presente no cromossomo 3 humano e possui quatro éxons (ARPAGAUŠ; KOTT; VATSIS; BARTELS; LA DU; LOCKRIDGE, 1990). As mutações da BChE são responsáveis pelo fenômeno da apneia prolongada após administração de relaxantes musculares compostos por succinilcolina e mivacúrio. (KALOW; STARON, 1957). Existem relatos de indivíduos que, em homozigose para a mutação A (rs1799807), apresentaram incapacidade respiratória por aproximadamente duas horas após uma dose de succinilcolina capaz de paralisar pessoas sem a mutação por apenas três minutos (LUSHCHEKINA; NEMUKHIN; VARFOLOMEEV; MASSON, 2016). Indivíduos que apresentam a variante K (rs1803274), têm a atividade plasmática da BChE reduzida em 33% (ALTAMIRANO; BARTELS; LOCKRIDGE, 2001).

A mutação K apresenta uma frequência de 14,33% na população latino americana (alelo C=0,8567 e T=0,1433) (NCBI, 2022) e 18,4% na população brasileira (SOUZA; CASTRO; PEREIRA; FREUND; CULPI; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, 1998). Já a mutação -116 apresenta frequência populacional de 3,54% (alelo C=0,9646 e T=0,0354) (NCBI, 2022) nos povos sul-americanos. Para mutação A, é observado um valor de 1,29% (alelo T=0,9871 e alelo C=0,0129) de indivíduos com o SNP na América latina (NCBI, 2022).

2.2 PCR-SSP

As diferentes tecnologias no campo da biologia molecular têm avançado de forma a permitir um diagnóstico rápido e eficiente para um vasto número de doenças. A PCR (reação em cadeia da polimerase) é uma técnica amplamente utilizada para análises moleculares, principalmente por sua especificidade, sensibilidade e rapidez que pode ser feita (OLIVEIRA, 2012). A técnica de PCR-SSP (reação em cadeia da

polimerase - *Sequence-specific Primer*) é amplamente utilizada como forma de diagnose rápida para genotipagens e consiste na amplificação de um conjunto de quatro primers. Os primers na região *inner* são estrategicamente desenhados para que, em caso da presença dos polimorfismos nos SNPs, amplifiquem e gerem um resultado visualizável em gel de agarose da existência do nucleotídeo desejado. (LARA-ARMI; VISENTAINER; ALVES; ROCHA-LOURES; NEVES; COLLI; LIMA; MOLITERNO; SELL, 2020), (FRANCESCHI; VIEL; SELL; TSUNETO; VISENTAINER, 2009).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Para a padronização da metodologia *Sequence Specific Primer - Polymerase Chain Reaction* (PCR-SSP), foram utilizadas amostras de DNA como controle, previamente extraídas e armazenadas no Laboratório de Polimorfismos e Ligação, do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná (UFPR). As amostras controle, foram genotipadas através da técnica *Restriction Fragment Length Polymorphism–Polymerase Chain Reaction* (PCR-RFLP). Foram utilizados controles positivos e negativos para as mutações A, K e –116 do gene da *BCHE*. Para a mutação A, foi utilizado uma amostra previamente genotipada como U/A, para mutação K, foi utilizado um controle genotipado como K/K e para mutação -116, foi utilizado um controle genotipado como U/-116, e para todas as reações foi utilizado o controle negativo, genotipado por PCR-RFLP como U/U para todas as mutações.

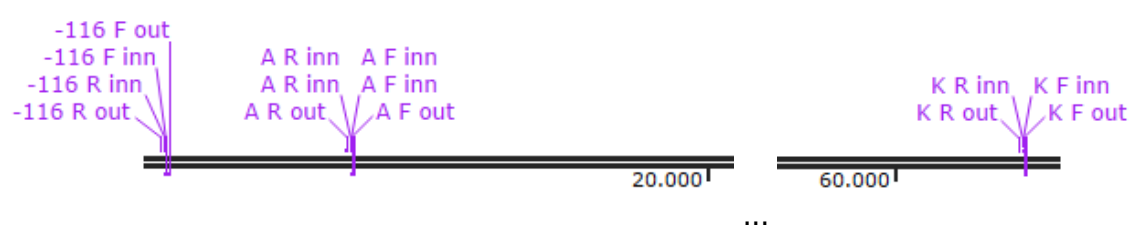
O desenho dos primers foi realizado utilizando a ferramenta *Tetra ARMS - PCR Primer Design Tool*, do qual obteve-se as seguintes sequências, observadas na Tabela 1 e que se inserem no gene conforme apresentado na Figura 1, abaixo:

Tabela 1 - Sequências dos primers utilizados para as três mutações avaliadas no presente trabalho

Mutação	Primer	Sequência
A	<i>Foward outer</i>	5' - AGTGGCATT TTTTGGTTTAGGTGCTGGA - 3'
	<i>Reverse outer</i>	5' - GGATGAACTTGACAGTT TTTTGGTGGCAC - 3'
	<i>Foward inner</i>	5' - CTCTGATCCATGGAAGCCTGGAAAAC TTTTAC - 3'
	<i>Reverse inner</i>	5' - AAATATGCAAATTCTTGCTGTCAGAACATCGA - 3'
K	<i>Foward outer</i>	5' - GACCCACACAAC TTTCTTTCTTGCTAGTG - 3'
	<i>Reverse outer</i>	5' - CTTTTCAGGCAAAGCGAGCTAATAACAA - 3'

-116	<i>Foward inner</i>	5' - AATCCTGCTTTCCACTCCCATTTCGGT - 3'
	<i>Reverse inner</i>	5' - TTCCATATTTTACAGGAAATATTGATGCAG - 3'
	<i>Foward outer</i>	5' - GTCCCATTTTGCAAGCTTCAGTAACTGTT - 3
	<i>Reverse outer</i>	5' - AACTCTCGCGAGCTTTGTCTAGTAACAGT - 3
	<i>Foward inner</i>	5' - TTACCCGATTCTCTGCAACAAAGATTGT - 3'
	<i>Reverse inner</i>	5' - ACATGATTTTCACTCCTTGCAAAGTGTG - 3'
Fonte: A autora (2022).		

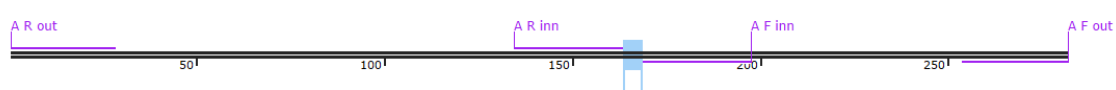
Figura 1 - Pontos de inserção dos primers dentro do gene da *BCHE*.



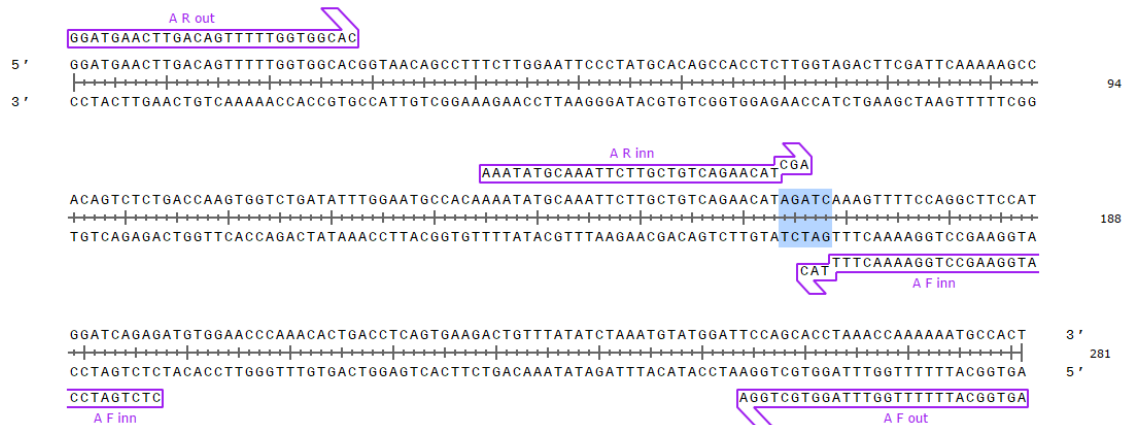
Fonte: A autora através do Software SnapGene® (2022).

Foram definidos três mixes possíveis entre os primers de cada mutação. O primeiro mix (mix 1) é composto pelos *primers foward outer + reverse outer*, o segundo (mix 2) composto pelos *primers foward inner + reverse outer* e o terceiro (mix 3) composto pelos *primers foward outer + reverse inner*. Os sítios de inserção dos primers para a mutação A estão apresentados na Figura 2, sendo possível observar na Figura 3 a posição específica do SNP. Para a mutação K na Figura 4 é possível visualizar os pontos de inserção dos primers, e na Figura 5 especificamente a região do SNP mutante. Para o SNP da mutação -116, é possível observar na Figura 6 os pontos de inserção dos primers e na Figura 7 a região específica com o nucleotídeo mutante.

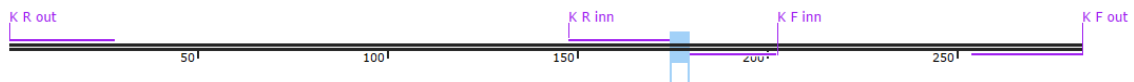
Figura 2 - Pontos de inserção dos primers para a mutação A.



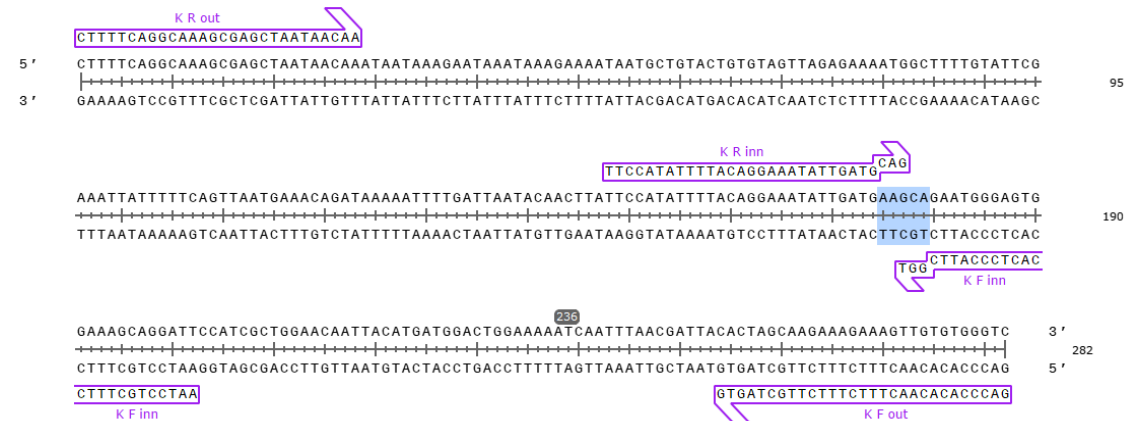
Fonte: A autora através do Software SnapGene® (2022).

Figura 3 - Pontos de inserção dos primers para a mutação A com destaque para a região polimórfica.

Fonte: A autora através do Software SnapGene® (2022).

Figura 4 - Pontos de inserção dos primers para a mutação K.

Fonte: A autora através do Software SnapGene® (2022).

Figura 5 - Pontos de inserção dos primers para a mutação K com destaque para a região polimórfica.

Fonte: A autora através do Software SnapGene® (2022).

Figura 6 - Pontos de inserção dos primers para a mutação -116.

Fonte: A autora através do Software SnapGene® (2022).

Figura 7 - Pontos de inserção dos primers para a mutação -116 com destaque para a região polimórfica.



Fonte: A autora através do Software SnapGene® (2022).

Para a mutação A foi realizado o protocolo de ciclagem com desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos, seguida por uma série de 30 ciclos, com extensão de 94°C por 1 minuto, anelamento de 57°C por 45 segundos e extensão de 72°C por 1 minuto, finalizando com um ciclo de extensão a 72°C por 5 minutos. As reações foram realizadas com 0,2mM de dNTPs, 2,5mM de MgCl, 0,2µM de cada primer, e 0,5U de Taq polimerase. O protocolo de detecção para o polimorfismo A foi otimizado posteriormente, sendo assim, alterado para desnaturação inicial a 94°C, seguida por uma série de 27 ciclos, com extensão a 94°C por 45 segundos, anelamento a 59°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos, finalizando com um ciclo de extensão a 72°C por 5 minutos.

Para a mutação K, foi realizado inicialmente o protocolo em termociclador de desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos, seguida por 30 ciclos de extensão de 94°C por 1 minuto, anelamento de 57°C por 45 segundos e extensão de 72°C por 1 minuto, finalizando com um ciclo de extensão a 72°C por 5 minutos, nas concentrações dos reagentes de 0,2mM de dNTPs, 5mM de MgCl, 0,2µM de cada primer e 0,5U de Taq polimerase. O protocolo foi alterado duas vezes, sendo a primeira com mudança na temperatura de anelamento para 59°C e a segunda com alteração tanto na concentração de MgCl, para 1,25mM, quanto mudança na temperatura de anelamento para 54°C.

O protocolo para a mutação -116 foi realizado com desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos, 30 ciclos de extensão de 94°C por 1 minuto, anelamento de 57°C

por 45 segundos e extensão de 72°C por 1 minuto nas condições de 0,2mM de dNTPs, 5mM de MgCl, 0,2µM de cada primer e 0,5U de Taq polimerase. Posteriormente, o protocolo foi otimizado com desnaturação inicial a 94°C, seguida por uma série de 27 ciclos, com extensão a 94°C por 45 segundos, anelamento a 64°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos e extensão final a 72°C por 5 minutos.

Todas as amplificações foram realizadas no termociclador da marca BioRad®, modelo T100 e para a visualização dos produtos das amplificações, foram realizadas corridas de eletroforese em gel de agarose 2%, com os parâmetros de 100V, 80mA por 40 minutos, com as amostras previamente coradas com o marcador de ácidos nucleicos GelRed®.

4 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS E DISCUSSÃO

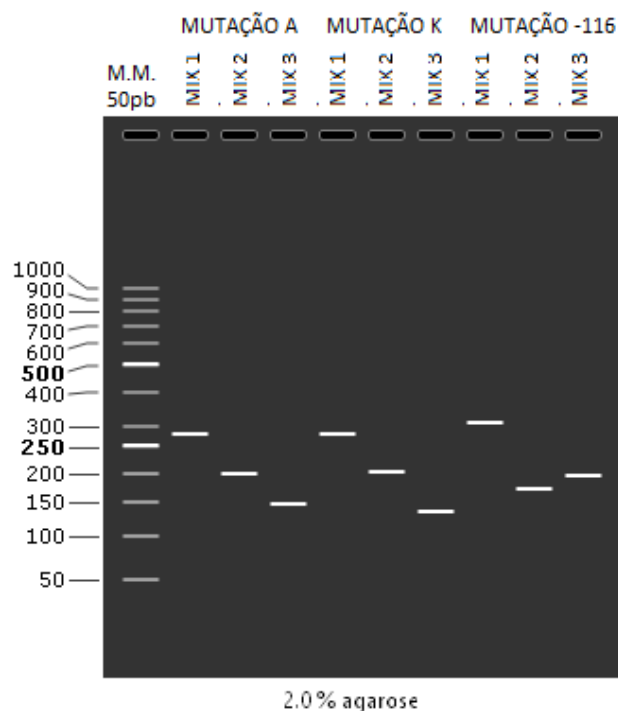
Para cada um dos mixes realizados (1, 2 e 3), o tamanho do produto amplificado apresentou variações de acordo com a mutação, conforme apresentados na Tabela 2 e Figura 8. Para mutação A, esperava-se um tamanho de amplificação para o Mix 1 de 281pb (pares de base), assim como para o Mix 2 de 198pb e para o Mix 3 de 147pb. Para a mutação K, esperava-se produtos de amplificação no tamanho de 282pb para o Mix 1, 203pb para o Mix 2 e 135pb para o Mix 3. Já para a mutação -116, o esperado é de 313pb para o Mix 1, para o Mix 2 de 173pb e para o Mix 3 esperava-se 196pb.

Tabela 2 - Tamanho esperado como produto da PCR para cada uma das combinações de primers utilizadas

Mutação	Mix	Tamanho de banda esperado (pares de base)
A	1	281pb
	2 (Alelo C)	198pb
	3 (Alelo T)	147pb
K	1	282pb
	2 (Alelo T)	203pb
	3 (Alelo C)	135pb
-116	1	313pb
	2 (Alelo T)	173pb
	3 (Alelo C)	196pb

Fonte: A autora (2022).

Figura 8 - Simulação de gel de agarose esperado para cada uma das mutações de acordo com seus tamanhos de produto de PCR.



Fonte: A autora através do Software SnapGene® (2022).

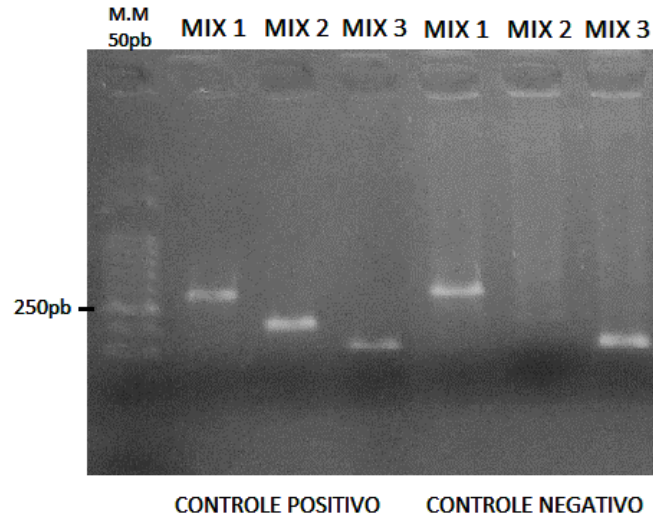
A temperatura de *melting* (T_m) determina o ponto onde metade das moléculas de DNA estarão desnaturadas e a outra metade está pareada com o *primer*. Em geral, a temperatura de anelamento difere entre 5°C a 3°C menos que a temperatura de *melting* do *primer*.

Originalmente, os quatro *primers* para mutação A apresentaram T_m recomendada de 70°C, sendo assim os *primers* deveriam anelar em uma temperatura média de 65°C. Já para a mutação -116, a T_m indicada é de 67°C e por consequência, o anelamento deveria ocorrer em 62°C. Para a mutação K, apenas os *primers foward* e *reverse outer* apresentaram T_m semelhantes, com o valor de 67°C, já o *primer foward inner* apresentou T_m igual a 71°C e o *reverse inner* T_m de 64°C, sendo então, as temperaturas de anelamento para os *primers foward* e *reverse outer* iguais a 62°C, para o *primer foward inner* igual a 66°C e para o *primer reverse inner* um anelamento recomendado de 59°C.

As temperaturas de anelamento recomendadas para cada *primer* apresentaram diferenças e precisaram de adequação para o correto funcionamento da reação. Para mutação A, o alelo responsável pela mutação e menos frequente é o

C. Como é possível visualizar na Figura 9, a temperatura de anelamento de 59°C foi efetiva para a amplificação e visualização da presença do SNP mutante para tal alelo.

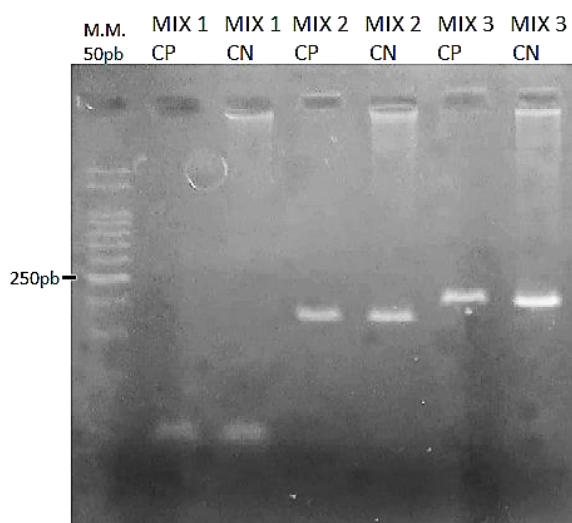
Figura 9 - Gel de agarose 2% com o produto de PCR para mutação A.



Legenda: Gel de agarose 2% para o SNP da mutação A, nas condições de anelamento à 59°C, com bandas para os primers *outer* na altura de 281pb, *foward inner/reverse outer* em 198pb e *foward outer/reverse inner* em 147pb. Fonte: A autora (2022).

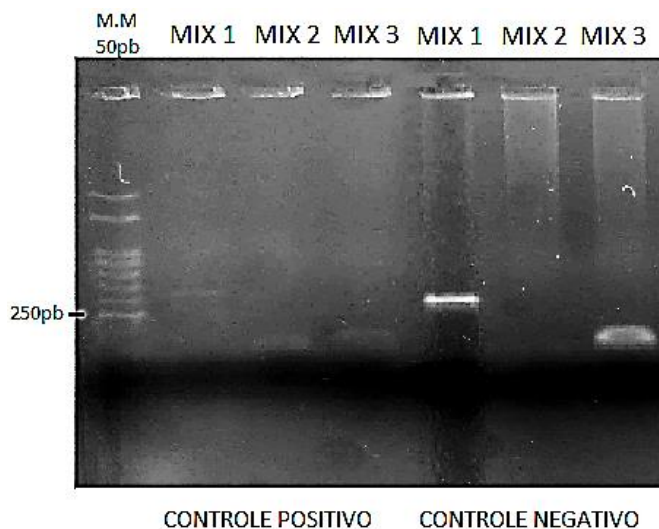
Para a mutação -116, foi realizada uma amplificação inicial com a temperatura de anelamento de 57°C, a qual resultou em uma falha na amplificação do par de primers *outers*, como demonstrado na Figura 10. O protocolo foi readequado com alteração na temperatura de anelamento para 64°C, a qual apresentou melhor resultado para a amplificação do alelo T, menos frequente e responsável pela mutação, conforme a Figura 11. Pode-se observar o aspecto fraco das bandas, isso em decorrência da baixa concentração do DNA em estoque, que estava em aproximadamente 50ng/μL, indicando assim, a necessidade de maiores concentrações de material ou um *imput* maior de DNA na amplificação.

Figura 10 - Gel de agarose 2% com o produto de PCR para mutação -116.



Legenda: Gel de agarose 2% para o SNP da mutação -116, nas condições de anelamento à 57°C, sem amplificação para os primers *outer* mas com bandas para *foward inner/reverse outer* em 173pb e *foward outer/reverse inner* em 196pb. Fonte: A autora (2022).

Figura 11 - Gel de agarose 2% com o produto de PCR para mutação -116.

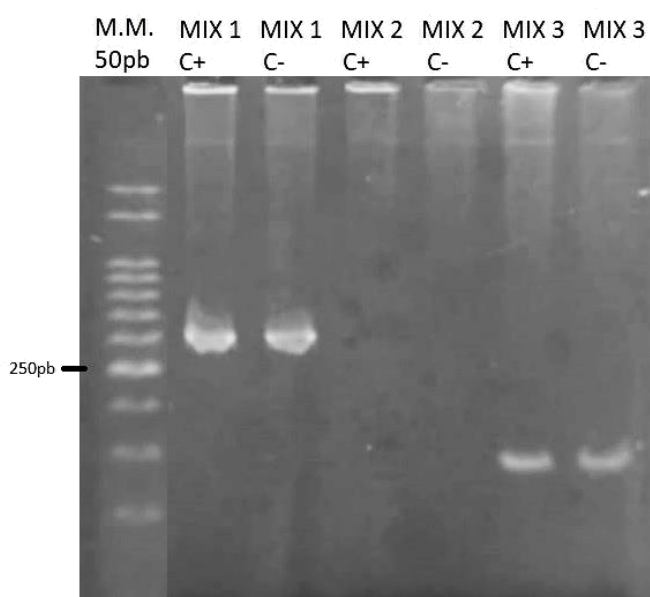


Legenda: Gel de agarose 2% para o SNP da mutação -116, nas condições de anelamento à 64°C, com amplificação para os primers *outer* no tamanho de 313pb, para *foward inner/reverse outer* em 173pb e *foward outer/reverse inner* em 196pb. Fonte: A autora (2022).

Para a mutação K, no entanto, não foi possível chegar em uma temperatura ideal de funcionamento em comum para quatro *primers*. Quando utilizada a temperatura de 57°C, os primers *foward inner/reverse outer* apresentaram falha na atividade e não amplificaram, conforme a Figura 12. Foi realizada a alteração do protocolo com mudança da temperatura de anelamento para 59°C, porém os primers

foward inner/reverse outer e *foward outer/reverse inner* não apresentaram amplificações, conforme Figura 13. Como última tentativa de obtenção de resultados, foram realizadas modificações no protocolo, reduzindo a temperatura de anelamento para 54°C e alterando a concentração de MgCl para 1,25mM, porém, o conjunto de *primers foward inner/reverse outer* se comportou de forma inespecífica e apresentou amplificação no controle negativo também, conforme Figura 14.

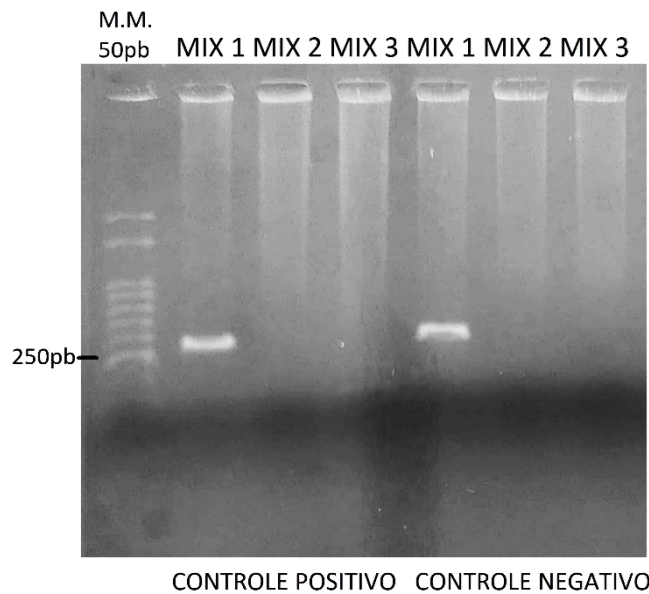
Figura 12 - Gel de agarose 2% com o produto de PCR para mutação K.



Legenda: Gel de agarose 2% para o SNP da mutação K, nas condições de anelamento à 54°C, com amplificação para os primers *outer* no tamanho de 282pb, sem amplificação para o conjunto *foward inner/reverse outer* e amplificação de 135pb no conjunto *foward outer/reverse inner*.

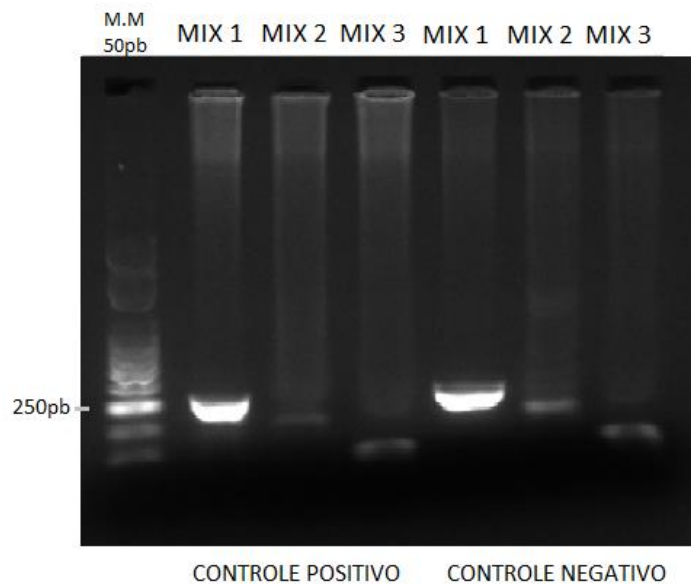
Fonte: A autora (2022).

Figura 13 - Gel de agarose 2% com o produto de PCR para mutação K.



Legenda: Gel de agarose 2% para o SNP da mutação K, nas condições de anelamento à 59°C, com amplificação para os primers *outer* no tamanho de 282pb, sem amplificação para o conjunto *foward inner/reverse* e *outer foward outer/reverse inner*. Fonte: A autora (2022).

Figura 14 - Gel de agarose 2% com o produto de PCR para mutação K



Legenda: Gel de agarose 2% para o SNP da mutação K, nas condições de anelamento à 54°C e redução na concentração de MgCl para 1,25mM, com amplificação para os primers *outer* no tamanho de 282pb, amplificação para o conjunto *foward inner/reverse outer* com 203pb e *foward outer/reverse inner* com 135pb. Fonte: A autora (2022).

A dificuldade em realizar a amplificação de tais primers para a mutação K podem ser em decorrência de diversos fatores, tanto da reação quanto da qualidade da amostra ou do desenho dos primers. O protocolo foi otimizado, com concentrações reduzidas e MgCL para aumentar a especificidade e utilizando a Taq polimerase *Platinum*, porém manteve-se o padrão de inespecificidade ou falha. Assume-se que o problema está no desenho dos primers, devido à sua discrepância nas temperaturas de *melting* e por consequência de anelamento, que não torna possível a amplificação dos quatro na mesma corrida do termociclador, tornando o protocolo de PCR-SSP, realizado no presente estudo, inviável com tais *primers* e parâmetros de concentração. Uma boa alternativa seria repetir a técnica, com os mesmos padrões de reagentes, porém, aumentando a temperatura de anelamento, para diminuir a inespecificidade e permitir um pareamento eficiente dos primers para a região *foward inner/reverse outer*.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o presente estudo, pode-se concluir que o desenvolvimento e padronização de técnicas de biologia molecular para a identificação rápida de variantes genéticas é de extrema importância no âmbito hospitalar. A técnica de PCR-SSP apresenta grande vantagem para utilização como diagnose para as mutações do gene *BCHE*, por ser uma técnica rápida e de baixo custo, podendo ser replicada com facilidade em situações semelhantes. Para as mutações A e -116, a técnica padronizada e validada no presente estudo se mostrou bastante eficaz, assim como o protocolo para a mutação K pode sofrer alterações e vir a apresentar resultados promissores futuramente. O conhecimento prévio acerca da genotipagem de pacientes com polimorfismos da BChE auxilia no preparo da equipe médica durante a administração de succinilcolina e mivacúrio.

5.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Recomenda-se novas tentativas de desenvolvimento de novos *primers* para a mutação K, tendo em vista sua frequência alélica de 14,33% na população sul-americana, de forma que o conjunto de *primers* apresentem temperaturas de *melting* similares e possam então amplificar para todos os primers em uma única reação.

REFERÊNCIAS

ALTAMIRANO, Cibby Varkey; BARTELS, Cynthia F.; LOCKRIDGE, Oksana. The Butyrylcholinesterase K-Variant Shows Similar Cellular Protein Turnover and Quaternary Interaction to the Wild-Type Enzyme. **Journal Of Neurochemistry**, v. 74, n. 2, p. 869-877, 25 dez. 2001. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.740869.x>.

ARPAGAUS, Martine; KOTT, Matthew; VATSIS, Kostas P.; BARTELS, Cynthia F.; LADU, Bert N.; LOCKRIDGE, Oksana. Structure of the gene for human butyrylcholinesterase. Evidence for a single copy. **Biochemistry**, v. 29, n. 1, p. 124-131, 9 jan. 1990. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/bi00453a015>.

ARRUDA JÚNIOR, Reginaldo Gomes de. **Temperatura de Melting: um estudo comparativo**. 2010. 55 f. Monografia (Especialização) - Curso de Bacharelado em Ciência da Computação, Faculdade de Computação, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2010. Disponível em: <http://www.facom.ufms.br/wp-content/uploads/2015/11/Temperatura-de-Melting.pdf>. Acesso em: 15 set. 2022.

FRANCESCHI, Danilo A. S.; VIEL, Dangelo O.; SELL, Ana Maria; TSUNETO, Luiza T.; VISENTAINER, Jeane E. L.. Otimização de metodologia PCR-SSP para identificação de polimorfismos genéticos de TNF e IL2. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n. 4, p. 241-246, ago. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-84842009005000055>.

GIACOBINI, E. Cholinesterase inhibitors: new roles and therapeutic alternatives. **Pharmacological Research**, v. 50, n. 4, p. 433-440, out. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2003.11.017>.

GREIG, Nigel H.; UTSUKI, Tadanobu; INGRAM, Donald K.; WANG, Yue; PEPEU, Giancarlo; SCALI, Carla; YU, Qian-Sheng; MAMCZARZ, Jacek; HOLLOWAY, Harold W.; GIORDANO, Tony. Selective butyrylcholinesterase inhibition elevates brain acetylcholine, augments learning and lowers Alzheimer β -amyloid peptide in rodent. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 102, n. 47, p. 17213-17218, 7 nov. 2005. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0508575102>.

JASIECKI, Jacek; WASĄG, Bartosz. Butyrylcholinesterase Protein Ends in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease—Could *BCHE* Genotyping Be Helpful in Alzheimer's Therapy? **Biomolecules**, [S.L.], v. 9, n. 10, p. 592, 9 out. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/biom9100592>.

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>.

KALOW, W.; STARON, N.. ON DISTRIBUTION AND INHERITANCE OF ATYPICAL FORMS OF HUMAN SERUM CHOLINESTERASE, AS INDICATED BY DIBUCAINE NUMBERS. **Canadian Journal Of Biochemistry And Physiology**, v. 35, n. 1, p. 1305-1320, 1 jan. 1957. Canadian Science Publishing. <http://dx.doi.org/10.1139/y57-148>.

LARA-ARMI, Fernanda Formaggi; VISENTAINER, Jeane Eliete Laguila; ALVES, Hugo Vicentin; ROCHA-LOURES, Marco Antônio; NEVES, Janisleya Silva Ferreira; COLLI, Cristiane Maria; LIMA, Quirino Alves de; MOLITERNO, Ricardo Alberto; SELL, Ana Maria. Optimization of HLA-B*27 ALLELE Genotyping by PCR-SSP. **Clinics**, [S.L.], v. 75, p. 1-7, 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.6061/clinics/2020/e1840>.

LOCKRIDGE, Oksana. Genetic variants of human serum cholinesterase influence metabolism of the muscle relaxant succinylcholine. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 47, n. 1, p. 35-60, jan. 1990. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0163-7258\(90\)90044-3](http://dx.doi.org/10.1016/0163-7258(90)90044-3).

LUSHCHEKINA, Sofya; NEMUKHIN, Alexander; VARFOLOMEEV, Sergei; MASSON, Patrick. Understanding the non-catalytic behavior of human butyrylcholinesterase silent variants: comparison of wild-type enzyme, catalytically active ala328cys mutant, and silent ala328asp variant. **Chemico-Biological Interactions**, v. 259, p. 223-232, nov. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2016.04.007>.

MASSOULIÉ, Jean; PEZZEMENTI, Leo; BON, Suzanne; KREJCI, Eric; VALLETTE, François-Marie. Molecular and cellular biology of cholinesterases. **Progress In Neurobiology**, v. 41, n. 1, p. 31-91, jul. 1993. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0301-0082\(93\)90040-y](http://dx.doi.org/10.1016/0301-0082(93)90040-y).

MENDEL, B.; RUDNEY, H.. Studies on cholinesterase. **Biochemical Journal**, v. 37, n. 1, p. 59-63, 1 abr. 1943. Portland Press Ltd. <http://dx.doi.org/10.1042/bj0370059>.

NCBI. NIH. **BCHE butyrylcholinesterase [Homo sapiens (human)]**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/590>. Acesso em: 06 jun. 2022.

OLIVEIRA, Tatiana Flávia Pinheiro de. **PADRONIZAÇÃO E APLICAÇÃO DA PCR PARA DETECÇÃO DE CONTAMINANTES EM CULTIVOS CELULARES, SOROS E TRIPSINAS**. 2012. 79 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012. Disponível em: https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/BUOS-97BJED/1/disserta_ao_tatiana_oliveira.pdf. Acesso em: 15 set. 2022.

SOUZA, R. L. R.; CASTRO, R. M. V.; PEREIRA, L.; FREUND, A. A.; CULPI, L.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A.. Frequencies of the Butyrylcholinesterase K Mutation in Southern Brazilian Population Samples of European and African Origin. **Structure And Function Of Cholinesterases And Related Proteins**, p. 601-602, 1998. Springer US. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4899-1540-5_163.