

UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS

BC/4334
IB/80619

MESTRADO

INSTITUTO DE BIOLOGIA

1981

LUIS ALBERTO MAGNA

8061A

**A DISCRIMINAÇÃO DOS FENÓTIPOS INTERMEDIÁRIO
E ATÍPICO DE PSEUDOCOLINESTERASE PELO
METILSULFATO DE NEOSTIGMINE**

90 M

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas para a
obtenção do título de Mestre.

Orientador:
Prof. Dr. BERNARDO BEIGUELMAN

**CAMPINAS - SP
1981**

T/UNICAMP

M274_d

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL**

LUÍS ALBERTO MAGNA

A DISCRIMINAÇÃO DOS FENÓTIPOS INTERMEDIÁRIO
E ATÍPICO DE PSEUDOCOLINESTERASE PELO
METILSULFATO DE NEOSTIGMINE

Tese apresentada ao Ins-
tituto de Biologia da U-
niversidade Estadual de
Campinas para a obtenção
do Título de Mestre.

Orientador:

Prof. Dr. BERNARDO BEIGUELMAN

Campinas - SP

1981

**BIBLIOTECA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
UNICAMP**

Classif	T
Autor	M274d
V	Ex.
Ex.	
Tombo, BC/	4334
IB/	A73

IB/ 80619
BC/ 4334

AGRADECIMENTOS

Quero expressar minha sincera gratidão àquelas pessoas que, desinteressadamente, contribuíram de modo decisivo para a realização do presente trabalho:

Prof. Dr. Bernardo Beiguelman, Departamento de Genética Médica, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP;

Prof. Dr. Walter Pinto Junior, Departamento de Genética Médica, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP;

Dr. Ronald Kunzmann, Biochemistry and Drug Metabolism Department, Hoffmann-La Roche Lab., Inc., New Jersey, USA;

Prof. Dr. Erney Plessmann de Camargo, Departamento de Parasitologia, Escola Paulista de Medicina;

Dr. Urbano Morato Ferraz Meirelles, Departamento de Farmacologia, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP;

Dra. Nilce Correa Meirelles, Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, UNICAMP;

Prof. Dr. William José da Silva, Departamento de Genética e Evolução, Instituto de Biologia, UNICAMP;

Dr. Tarcísio José de Almeida Moura, Departamento de Tocoginecologia, Faculdade de Medicina, UFRN;

Bióloga Srta. Rosana Celestina Morandin, Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP;

Prof. Dr. Aldo Focesi Junior, Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, UNICAMP;

Dr. Hiroshi Aoyama, Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, UNICAMP;

Dr. Luiz Carlos Tocalino Netto, Departamento de Anestesiologia, Hospital e Maternidade Santo Antônio, Campinas;

Ao pessoal técnico e administrativo do Departamento de Genética Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas:

Sr. Luis Celso de Freitas

Sra. Sônia Aparecida Alipio dos Santos

Sra. Geralda Luzia Alves.

Aos meus pais

ÍNDICE

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

I.1 - A succinilcolina	1
I.2 - A pseudocolinesterase	3
I.3 - Hidrólise enzimática da succinilcolina	5
I.4 - Apnéia prolongada e baixos níveis de pseudocolinesterase	6
I.5 - Determinação genética da deficiência de pseudocolinesterase	8
I.6 - As variantes usual e atípica de pseudocolinesterase	8
I.7 - A variante fluoreto de pseudocolinesterase	11
I.8 - Ausência de pseudocolinesterase	12
I.9 - Notações genotípica e fenotípica	14
I.10 - O sistema alélico E_2	14
I.11 - Sensibilidade à succinilcolina e variação fenotípica	15
I.12 - Variação populacional do alelo E_1^a	17
I.13 - Deficiência de pseudocolinesterase e rotina pré-anestésica	19

CAPÍTULO II - OBJETIVO

22

CAPÍTULO III - MATERIAL, CASUÍSTICA E MÉTODO

III.1 - Obtenção das amostras de soro	24
III.2 - Reagentes empregados	24
III.3 - Determinação das variantes de pseudocolinesterase	25
III.4 - Obtenção das soluções-estoque de pseudocolinesterase	26
III.5 - Determinação do tempo de incubação com o substrato e diluição do soro	26
III.6 - Determinação do tempo de pré-incubação com neostigmine	27
III.7 - Curva de inibição da pseudocolinesterase por diferentes concentrações de neostigmine	27
III.8 - Estudos sobre o mecanismo de inibição da pseudocolinesterase pela neostigmine	28
III.9 - Estudo da validade da técnica	28
III.10 - Análise estatística	29

CAPÍTULO IV - RESULTADOS

31

CAPÍTULO V - DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

53

RESUMO	60
SUMMARY	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

I.1 - A sucinilcolina

Muitos medicamentos apresentam, como ação principal, o bloqueio do impulso nervoso na junção mioneural e, conseqüentemente, um efeito miorrelaxante. Dependendo do mecanismo pelo qual esse efeito é produzido, tais fármacos podem ser classificados como miorrelaxantes competitivos (estabilizadores) e despolarizantes. A d-tubocurarina é o exemplo clássico do primeiro grupo enquanto o decametônio (C 10) representa o segundo.

Dentre os agentes despolarizantes conhecidos, a sucinilcolina (sucinildicolina ou éster dicolínico do ácido sucínico, figura I.1) passou a ser amplamente empregada pelos anesthesiologistas logo após o seu efeito miorrelaxante ter sido descrito, em 1949, simultânea e independentemente, por pesquisadores italianos, ingleses e norte-americanos. Os primeiros estudos farmacológicos com essa substância, entretanto, datam de 1906, muito embora seu efeito miorrelaxante não ter sido observado nessa época, devido ao fato de tais pesquisas terem sido feitas em animais curarizados (LEHMANN e LIDDELL, 1969; LITWILLER, 1969; KOELLE, 1970_b).

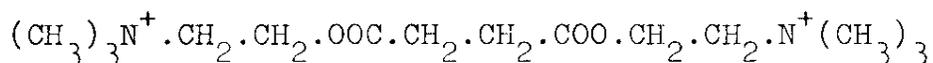


Figura I.1 - Fórmula estrutural da succinilcolina.

Devido a seus dois átomos de nitrogênio quaternário, a succinilcolina forma sais halogenados, sendo empregada, usualmente, sob a forma de cloreto (L E H M A N N e LIDDELL, 1969). Comercialmente é apresentada sob a forma de pó branco estéril bastante solúvel em água, em quantidades de 0,5 e 1,0 g, ou como solução estéril, contendo 20, 50 ou 100 mg/ml (KOELLE, 1970_b). Seu ponto de fusão é 157°C e, quando em solução, é estável em meio ácido, sofrendo hidrólise espontânea e rápida quando em meio alcalino (BOURNE et al., 1952).

A principal característica da succinilcolina é seu efeito de curta duração, notado já nos primeiros ensaios clínicos. Realmente, BOURNE et al. (1952), em uma série de 546 pacientes, observaram que uma dose de 1,1 mg/kg de peso corporal provocava paralisia muscular após um período de 15 a 20 segundos de fasciculações. Essa paralisia perdurava de 2 a 6 minutos na grande maioria dos casos.

O efeito transitório da succinilcolina é fundamental na indicação do seu uso, sendo ela empregada em procedimentos que requerem relaxamento muscular por tempo relativamente curto, quais sejam, intubação, laringoscopia, broncoscopia, esofagoscopia, na prevenção de trauma na terapia eletroconvulsiva, tétano e outros estados convulsivos e manipulações ortopédicas (BOURNE et al., 1952; KOELLE, 1970_b)

As doses normalmente utilizadas nos procedimentos citados variam de 10 a 30 mg, administrados endovenosamente. Após um período curto de fasciculações musculares, o relaxamento estabelece-se no primeiro minuto que segue a administração, tornando-se máximo no segundo minuto e desaparecendo, regra geral, nos três minutos seguintes. Obviamente, pode-se conseguir um relaxamento muscular de maior duração mediante repetidas injeções de succinilcolina, a intervalos apropriados, ou por infusão contínua (KOELLE, 1970_b).

Dentre os efeitos colaterais observados com o uso desse fármaco, merece especial atenção a apnéia prolongada que aparece durante o efeito máximo da succinilcolina e é, quase sempre, transitória. Outros efeitos colaterais que podem ocorrer derivam da ação da succinilcolina sobre o sistema nervoso autônomo. Assim é que a administração intermitente de

sucinilcolina pode provocar, em alguns indivíduos, bradicardia acompanhada de hipotensão arterial em consequência da eventual ação bloqueadora dessa substância sobre os gânglios simpáticos. Quando a administração da sucinilcolina é prolongada, pode ocorrer o oposto em alguns pacientes, isto é, ela pode ter efeito estimulante sobre os gânglios simpáticos, provocando, assim, taquicardia e hipertensão arterial (KOELLE, 1970). De qualquer modo, considerando que os efeitos autônomos são passíveis de ocorrer somente com doses muito superiores àquelas necessárias à produção de miorelaxamento, aceita-se que a apnéia prolongada é o principal efeito adverso decorrente do emprego da sucinilcolina.

BOURNE et al. (1952) estão entre os primeiros a observar a ocorrência de apnéia prolongada por sucinilcolina. Assim, entre os 546 pacientes por eles estudados, cinco apresentaram apnéia que se prolongou além de oito minutos. EVANS et al. (1952) citaram casos relatados na literatura, nos quais o efeito miorelaxante da sucinilcolina perdurou por 10 minutos a três horas. Em sua própria casuística de mais de 400 pacientes, encontraram dois que apresentaram apnéia de 20 e 21 minutos.

A inativação in vitro da sucinilcolina pela pseudocolinesterase e a observação de que a neostigmine e outros inibidores dessa enzima prolongavam seu efeito miorelaxante (BOURNE et al., 1952; LITWILLER, 1969) melhoraram a compreensão de sua farmacodinâmica e conseguiram explicar a apnéia prolongada que ocorria em determinados pacientes.

I.2 - A pseudocolinesterase

As colinesterase são enzimas que hidrolisam ésteres de colina e tiveram sua nomenclatura regulamentada pela Comissão de Enzimas da União Internacional de Bioquímica em 1961 (LEHMANN e LIDDELL, 1969). Nessa ocasião foram reconhecidas duas colinesterases diferentes, a acetilcolinesterase (acetil-hidrolase de acetilcolina, EC 3.1.1.7), também chamada colinesterase verdadeira e a colinesterase (acil-hidrolase de acilcolina, EC 3.1.1.8), conhecida principalmente como pseudocolinesterase, mas também chamada de colinesterase sérica, colinesterase plasmática, butirilcolinesterase e colinesterase inespecífica.

A acetilcolinesterase é uma enzima relativamente específica de grande afinidade pela acetilcolina, sendo

encontrada em vários tecidos, principalmente no tecido nervoso e nos eritrócitos. Ela é responsável pela inativação da acetilcolina nas sinapses neuronais durante o processo de transmissão nervosa. Essa enzima não hidrolisa a sucinilcolina, sendo, ao contrário, inibida por ela. A colinesterase é uma enzima responsável pela hidrólise de vários ésteres de colina, incluindo a sucinilcolina, tendo sido descrita no tecido glial, músculo cardíaco, intestino, pele, pâncreas e plasma sanguíneo (para referências vide KALOW, 1959 e LITWILLER, 1969).

A pseudocolinesterase presente no plasma, doravante referida somente como pseudocolinesterase, apresenta meia vida de dez dias (GIBLETT, 1969) e uma ação fisiológica não definida. Supõe-se que seu papel metabólico principal seja a hidrólise de ésteres de colina que podem inibir a acetilcolinesterase, como a propionilcolina e a butirilcolina. Essas substâncias são produzidas in vitro pelos sistemas enzimáticos responsáveis pela síntese de acetilcolina, mas também podem ser originadas pela ação da flora bacteriana intestinal (LEHMANN e LIDDELL, 1969). Outra função metabólica atribuída a ela é a regulação dos níveis plasmáticos de colina (GIBLETT, 1969).

Do mesmo modo que a acetilcolinesterase, a pseudocolinesterase apresenta dois sítios ativos. Um deles, chamado sítio aniônico, é uma região da molécula enzimática, possivelmente um grupo carboxila dissociado, carregada negativamente e que se liga eletrostaticamente ao átomo de nitrogênio quaternário do substrato, carregado positivamente. O outro, chamado sítio esterático, é um resíduo com radical básico e um grupo ácido protonado. Esse sítio combina-se covalentemente com o átomo de carbono eletrofílico do radical carboxila do éster. A fração colina é então eliminada, restando a enzima com seu sítio ativo acetilado, que por sua vez reage rapidamente com água, produzindo ácido acético e a enzima com o sítio ativo regenerado (LEHMANN e LIDDELL, 1969; KOELLE, 1970_b).

Com relação às suas características físico-químicas, a enzima apresenta um peso molecular de 300.000 e é uma glicoproteína contendo vários resíduos de ácido siálico, os quais podem ser removidos sem perda da atividade (LITWILLER, 1969; GIBLETT, 1969).

O local de síntese da pseudocolinesterase é o fígado. Submetendo-se extrato de tecido hepático a processos cromatográficos e de filtração em gel, obtiveram-se três fra

ções com propriedades idênticas à pseudocolinesterase. Uma delas, exatamente idêntica à enzima, e duas outras, que diferiam da enzima propriamente dita pelo fato de não apresentarem resíduos de ácido siálico na molécula. Considerou-se a primeira fração como o produto final de síntese, isto é, a pseudocolinesterase, da qual as duas últimas seriam os precursores (para referências vide LITWILLER, 1969). Por outro lado, estudos histoquímicos evidenciaram a presença de pseudocolinesterase no citoplasma dos hepatócitos. Além disso, em portadores de insuficiência hepática, o número de hepatócitos contendo a enzima mostra-se diminuído, fato que se reflete na diminuição da concentração plasmática da enzima (GIBLETT, 1969).

Do ponto de vista eletroforético, a pseudocolinesterase migra na fração globulina alfa₂ quando a eletroforese do soro sangüíneo é rotineira. A eletroforese do soro em gel de amido evidencia, porém, quatro bandas de pseudocolinesterase, denominadas C₁ a C₄, no sentido decrescente de mobilidade em relação ao ânodo⁴. A fração C₄, mais lenta, é responsável por cerca de 90% da atividade enzimática presente no soro. Uma banda adicional, ainda mais lenta que C₄, denominada C₅, foi observada em 5% a 10% dos indivíduos e é responsável por um acréscimo médio da atividade enzimática da ordem de 30% (GIBLETT, 1969; LEHMANN e LIDDELL, 1969; LITWILLER, 1969). Mais recentemente evidenciaram-se outras bandas acessórias (LUBIN et al., 1971).

I.3 - Hidrólise enzimática da succinilcolina

A curta duração do efeito miorelaxante que se segue à administração de uma dose única de succinilcolina deve-se à sua rápida hidrólise pela pseudocolinesterase, de modo que somente 2% a 10% da dose injetada é excretada in natura na urina (KALOW, 1959; KOELLE, 1970_b). Portanto, a pseudocolinesterase age sobre a succinilcolina somente enquanto essa substância se encontra no plasma, devendo a quantidade remanescente deixar a circulação para atingir seu sítio de ação, ou seja, a placa mioneural, que é por ela despolarizada.

A hidrólise da succinilcolina por ação da pseudocolinesterase faz-se em dois estágios (figura I.2). No primeiro, que ocorre com uma velocidade relativamente alta, são liberados, como produtos de reação, a colina e a succinilmonocolina. Essa última é, por sua vez, hidrolisada muito lenta-

mente, produzindo colina e ácido succínico, que são componentes normais do organismo (KALOW, 1959; LITWILLER, 1969 ; KOELLE, 1970_b).

O fígado possui uma esterase aparentemente específica para a succinilmonocolina, o que leva a supor que o segundo estágio da hidrólise da succinilcolina não depende somente da ação da pseudocolinesterase (KALOW, 1959). A succinilmonocolina, por sua vez, exerce uma ação bloqueadora na junção mioneural muito mais fraca que a exercida pela succinildicolina e, ao contrário dessa última, o bloqueio é predominantemente do tipo competitivo (KOELLE, 1970_b). Assim, o primeiro estágio da hidrólise enzimática é o principal processo de inativação da succinilcolina. O término do efeito miorelaxante decorre de um processo de diluição do fármaco, isto é, sua difusão a partir da placa mioneural, para o fluido intersticial (KALOW, 1959) e posterior excreção urinária.

I.4 - Apnéia prolongada e baixos níveis de pseudocolinesterase

Tendo em vista o exposto, impõe-se a conclusão de que os indivíduos nos quais o efeito miorelaxante que segue a administração de uma dose única de succinilcolina é prolongado anormalmente, devem apresentar baixa atividade de pseudocolinesterase.

BOURNE et al. (1952) determinaram a atividade da pseudocolinesterase entre os indivíduos de sua casuística (546 indivíduos) e verificaram que em cinco (0,9%) que apresentaram apnéia prolongada, os níveis plasmáticos da enzima eram significativamente menores que os demais. Ficou demonstrado que a atividade enzimática presente nos indivíduos anormais, medida por meio da taxa de hidrólise da acetilcolina, corresponde a cerca de um décimo daquela presente nos indivíduos normais (EVANS et al., 1952).

A explicação para essas observações torna-se fácil quando a deficiência de pseudocolinesterase pode ser considerada como adquirida. Na realidade, certas condições tais como envenenamento por alguns inseticidas organofosforados, insuficiência hepática, desnutrição e outros estados morbidos determinantes da diminuição da síntese protéica provocam a queda da atividade da pseudocolinesterase (BOURNE et al., 1952; KALOW, 1959; GIBLETT, 1969 ; KOELLE, 1970_b).

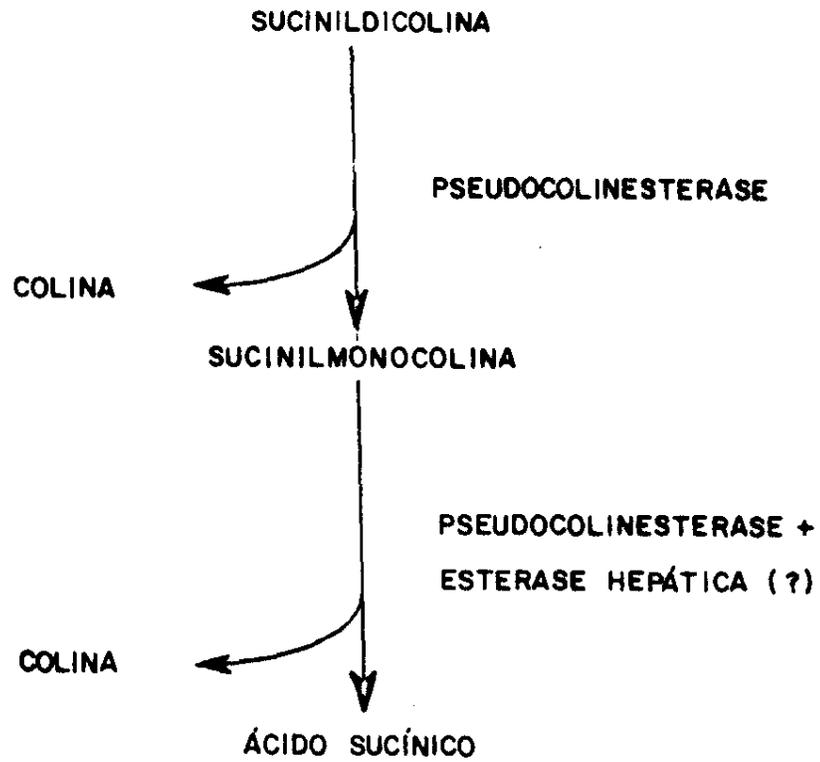


Figura I.2 - Hidrólise da succinildicolina pela ação da pseudocolinesterase.

I.5 - Determinação genética da deficiência de pseudocolinesterase

A maioria dos indivíduos com resposta anormal à succinilcolina, entretanto, é isenta de antecedentes que possam ser responsabilizados pela diminuição da atividade da pseudocolinesterase neles observada (LEHMANN e LIDDELL, 1969). Considerou-se, então, a hipótese de deficiência congênita de pseudocolinesterase como a explicação mais provável para esses casos, principalmente após o reconhecimento de que eles mostravam recorrência familiar (ALLOT e THOMPSON, 1956; LEHMANN e SIMMONS, 1958; LEHMANN e RYAN, 1956),

A etiologia genética, que explicaria essa segunda possibilidade, bem como seu provável mecanismo de herança, foram demonstrados por KAUFMAN et al. (1960) por intermédio do estudo de três gerações da família de um propósito que apresentou apnéia de mais de 45 minutos após a administração de uma dose única de 20 mg de succinilcolina. Com base na determinação da atividade da pseudocolinesterase, esses autores verificaram a existência de três tipos de indivíduos, quais sejam, os que apresentavam atividade bastante reduzida dessa enzima, os que apresentavam atividade considerada normal, e um terceiro grupo, o daqueles cuja atividade da pseudocolinesterase era intermediária à dos dois grupos extremos. Além disso, a análise da distribuição familiar desses indivíduos permitiu supor uma determinação monogênica e autossômica para a deficiência congênita de pseudocolinesterase, com a existência de dois alelos: um, responsável pela determinação da pseudocolinesterase com atividade normal e o outro pela enzima deficiente. Conseqüentemente, três genótipos e seus respectivos fenótipos foram postulados, quais sejam, o homozigoto do alelo normal, com atividade enzimática normal, o homozigoto do alelo deficiente, com baixa atividade da enzima, e o heterozigoto, com atividade intermediária.

I.6 - As variantes usual e atípica de pseudocolinesterase

Visto que a enzima deficiente não determina um estado mórbido, designou-se a variante enzimática com atividade normal por pseudocolinesterase usual (fenótipo U), enquanto a enzima deficiente foi denominada pseudocolinesterase atípica (fenótipo A). A enzima presente no heterozigoto (pseudocolinesterase intermediária, fenótipo I), na realidade, é uma mistura das variantes usual e atípica, participan-

do essa última com cerca de 30% a 40% do total (KALOW e DAVIES, 1958; LIDDELL et al., 1962). Esse fato, aliás, atesta a relação de codominância entre os alelos citados.

A variante usual de pseudocolinesterase apresenta maior afinidade pela succinilcolina do que a forma atípica da enzima e também hidrolisa a succinilcolina com uma velocidade maior que a segunda. Em consequência, nos indivíduos com a variante atípica a succinilcolina permanece na circulação sanguínea por mais tempo. Desse modo, a sua ação prolonga-se nos indivíduos do fenótipo A, uma vez que uma maior quantidade do fármaco alcança a junção mioneural, aumentando-lhes a duração do tempo de apnéia (KALOW, 1959; LEHMANN e LIDDELL, 1969).

A determinação da atividade da pseudocolinesterase não permite classificar, com segurança, todos os indivíduos estudados, pois existe grande interpenetração das distribuições da atividade enzimática correspondente aos três fenótipos (KAUFMANN et al., 1960; WHITTAKER, 1970). Por outro lado, a verificação de que as duas variantes diferem entre si no que respeita a outras propriedades cinéticas permitiu a caracterização da enzima atípica e o desenvolvimento de técnicas que conduzem a uma discriminação maior entre ela e a variante usual, como se verá adiante.

KALOW e DAVIES (1958), estudando o comportamento das variantes usual e atípica frente a vários inibidores de esterase, obtiveram dados que permitiram supor localizar-se a principal diferença entre elas no sítio aniônico, não se tendo observado diferenças significativas quanto ao peso molecular. De fato, tanto a enzima usual quanto a atípica eram inibidas na mesma intensidade quando esses autores utilizaram inibidores que se ligam somente ao sítio esterático, quais sejam, o fluorofosfato de di-isopropila (DFP) e o pirofosfato de tetra-etila (TEPP). O mesmo não ocorreu quando os inibidores estudados apresentavam nitrogênio quaternário na molécula, como a dibucaína, entre outros, sendo a variante usual marcadamente mais inibida por eles.

Observaram-se resultados semelhantes em estudos de afinidade enzimática para substratos de diferente natureza. A variante atípica mostrou maiores valores de K_m e menores de V frente a ésteres de colina (DAVIES et al., 1960; BAMFORD e HARRIS, 1964). O mesmo, entretanto, não foi verdadeiro frente ao acetato de alfa-naftila (BAMFORD e HARRIS, 1964). Esse último substrato liga-se à enzima no sítio esterático, enquanto os primeiros ligam-se a ambos os sítios ati

vos, isto é, aniônico e esterático. As diferenças de comportamento observadas, portanto, só podem ser atribuídas a diferenças relativas ao sítio aniônico.

Uma vez que a pseudocolinesterase atípica apresentava menor afinidade por inibidores e substratos que se ligam ao sítio aniônico, era de se supor que seu comportamento eletroforético também fosse diferente da usual, isto é, que ela apresentasse menor carga negativa líquida que a usual. A eletroforese vertical em papel, do soro sanguíneo, em pH 9,7, demonstrou a mobilidade mais lenta da variante atípica, que migra entre as frações beta e gamaglobulina, enquanto a variante usual migra na fração betaglobulina (LIDDELL et al., 1962).

O conhecimento desses fatores propiciou o desenvolvimento de numerosas técnicas que permitem identificar os fenótipos usual, intermediário e atípico de pseudocolinesterase de modo muito mais preciso que a determinação dos níveis plasmáticos da enzima. Baseiam-se essas técnicas na taxa de inibição enzimática frente a inibidores com nitrogênio quaternário na molécula, a qual é bastante diferente para cada uma das variantes (KALOW e DAVIES, 1958). Uma das substâncias que mais marcantemente exerce essa inibição discriminatória, sendo, por sinal, uma das primeiras a ser utilizadas com esse propósito, é a dibucaína (LEHMANN e LIDDELL, 1969; WHITTAKER, 1970). Chamou-se à porcentagem de inibição da pseudocolinesterase exercida pela dibucaína na concentração 10^{-5} M de número de dibucaína ou DN*. O portador da pseudocolinesterase usual apresenta número de dibucaína superior a 70 enquanto o homocigoto atípico mostra DN inferiores a 30, ficando o heterocigoto com os valores entre 45 e 69 (LEHMANN e LIDDELL, 1969).

Outra substância com alto poder discriminatório entre as variantes usual e atípica de pseudocolinesterase é o brometo de dimetilcarbamato de 2-hidroxi-5-fenilbenzil trimetilamônio** (KALOW e DAVIES, 1958; BAMFORD e HARRIS, 1964). A utilização desse produto na concentração 10^{-7} M for-

* - Iniciais da expressão inglesa Dibucaine Number.

** - Não disponível no comércio. Recebe o número de código RO2-0683, que lhe é atribuído pelo fabricante Hoffmann-La Roche Laboratories, Nutley, New Jersey, USA.

nece porcentagens de inibição variando de 82% a 96% para a enzima usual e 9% a 30% para a atípica. O heterozigoto mostra inibição variando de 43% a 67% (MORROW e MOTULSKY, 1968). A grande vantagem da utilização dessa técnica ou de variantes dela (HARRIS e ROBSON, 1963) é a de que a sua execução é rápida e fácil, quando comparada com as outras, desde que, é claro, se tenha acesso ao inibidor não comercializado por ela utilizado (brometo de dimetilcarbamato de 2-hidroxi-5-fenilbenzil trimetilamônio ou R02-0683).

I.7 - A variante fluoreto de pseudocolinesterase

A investigação sistemática de substâncias com ação inibidora sobre a pseudocolinesterase levou ao reconhecimento de outra variante enzimática além das duas citadas. HARRIS e WITTAKER (1961) observaram que o fluoreto de sódio inibia, de forma discriminatória semelhante à dibucaína, as variantes usual e atípica da enzima. Tal discriminação, entretanto, não se processava de modo tão evidente quanto a da dibucaína, utilizada com tal propósito (HARRIS e WHITTAKER, 1962). Esses autores definiram, então, o número de fluoreto ou FN*, que corresponde à porcentagem de inibição exercida pela concentração de 5×10^{-5} M de fluoreto.

A investigação da distribuição dos FN numa amostra de indivíduos previamente classificados por meio da determinação dos DN evidenciou, de um modo geral, estreita correlação entre os valores. Uma pequena proporção dos indivíduos mostrou, entretanto, alguma discrepância, a qual ocorreu tanto no fenótipo usual quanto no intermediário. Em ambos, os valores de DN foram sempre maiores que os respectivos FN. Dito de outro modo, os indivíduos discrepantes possuíam uma variante de pseudocolinesterase mais resistente à inibição por fluoreto (HARRIS e WHITTAKER, 1961).

Estudos posteriores demonstraram que essa variante, denominada fluoreto, é determinada por um gene alelo dos dois anteriormente citados. Isso ficou evidenciado por meio da determinação dos DN e FN dos membros de vinte e duas famílias selecionadas a partir de um propósito com o fenótipo intermediário (HARRIS e WHITTAKER, 1962). Dentre os indi-

* - Iniciais da expressão inglesa Fluoride Number.

vídúos classificados como pertencentes ao fenótipo usual pelo número de dibucaína, um subgrupo mostrou valores de FN significativamente mais baixos que os demais. De modo análogo, entre os indivíduos com fenótipo intermediário também foram encontrados casos com valores de FN mais baixos que o restante do grupo ao qual pertenciam. Chamando o subgrupo do fenótipo usual resistente à inibição por fluoreto de U_1 e de I_1 a mesma condição para o fenótipo intermediário, puderam ser analisados dois tipos de casamentos nessa amostra de famílias.

Os casamentos $U \times I$ produziram, na sua prole, somente indivíduos dos fenótipos U e I em proporção não diferente da razão esperada de 1:1. Do mesmo modo, os casamentos $U \times I_1$ produziram indivíduos U_1 e I também na razão 1:1. A interpretação mais simples para esses achados é realmente a suposição da existência de um terceiro alelo. Assim, supondo que os indivíduos I_1 são, na realidade, heterozigotos dos alelos atípico e fluoreto, os indivíduos U_1 que aparecem na prole dos casamentos $U \times I_1$ são heterozigotos dos alelos usual e fluoreto e seu número deve ser teoricamente igual ao dos indivíduos I (figura I.3).

Admite-se que a presença somente da variante resistente à inibição por fluoreto, o que ocorre nos indivíduos com fenótipo F , isto é, no homozigoto para o alelo fluoreto, condiciona sensibilidade moderada à succinilcolina (LEHMANN e LIDDELL, 1969).

I.8 - Ausência de pseudocolinesterase

A investigação de variantes deficientes de pseudocolinesterase geneticamente determinadas em indivíduos que haviam apresentado resposta prolongada à administração de succinilcolina, levou ao reconhecimento de alguns casos nos quais não se detectou nenhuma atividade dessa enzima, isto é, tais indivíduos mostraram ausência de pseudocolinesterase (GIBLETT, 1969; LEHMANN e LIDDELL, 1969; WHITTAKER, 1970). A ocorrência desses casos foi explicada pela admissão da existência de um quarto alelo que, no estado homozigótico, determinaria a ausência da atividade de pseudocolinesterase, uma vez que os mesmos descendiam, em sua maior parte, de pais pertencentes ao fenótipo usual, os quais, por sua vez, seriam heterozigotos desse novo alelo, chamado silencioso.

A eletroforese do soro de indivíduos com au-

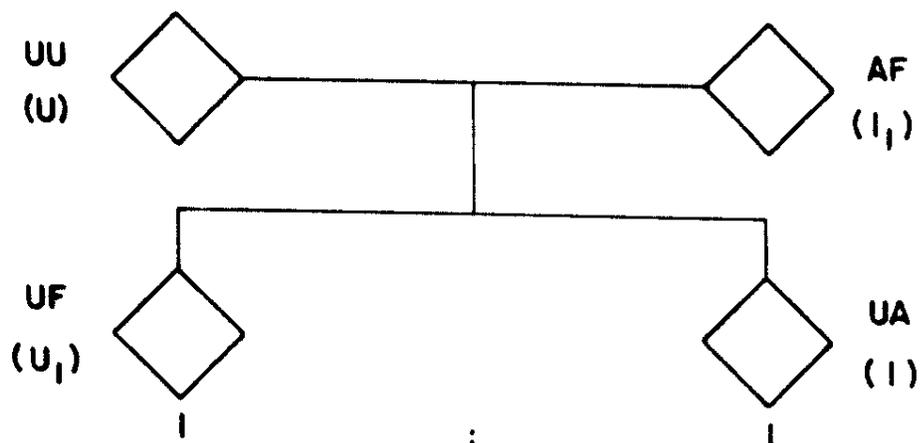


Figura I.3 - Heredograma hipotético de uma família que inclui um genitor com fenótipo usual de pseudocolinesterase (U) e um outro com o fenótipo intermediário resistente à inibição por fluoreto (I_1).

U = alelo da pseudocolinesterase usual
A = alelo da pseudocolinesterase atípica
F = alelo da pseudocolinesterase fluoreto

As notações entre parênteses referem-se aos fenótipos.

sência de pseudocolinesterase não mostrou as quatro principais isoenzimas (GIBLETT, 1969), embora estudos imunológicos tenham demonstrado uma proteína antigenicamente semelhante à pseudocolinesterase usual (SZEINBERG et al., 1966). A atividade enzimática presente no soro desses indivíduos é inferior a 3% dos valores obtidos para a enzima usual e, conseqüentemente, eles apresentam alta sensibilidade à succinilcolina, com períodos de apnéia de duas a três horas após doses usuais desse medicamento (SZEINBERG et al., 1966 ; ALTLAND et al., 1967; LEHMANN e LIDDELL, 1969).

Como o alelo silencioso não produz enzima funcionalmente ativa tem-se que, em relação a ele, os indivíduos heterozigotos do alelo usual, atípico e fluoreto, produzem somente a variante enzimática determinada por esses últimos (WHITTAKER, 1970). Quanto à atividade da pseudocolinesterase, os heterozigotos do gene usual e silencioso mostram-na em taxas variando de 28% a 114% dos valores da enzima usual (LEHMANN e LIDDELL, 1969).

I.9 - Notações genotípica e fenotípica

Apesar de existirem indicações de que o alelo silencioso não é homogêneo, tendo-se demonstrado, pelo menos, três formas diferentes do mesmo (ALTLAND et al., 1967) , podem-se considerar as variantes de pseudocolinesterase usual, atípica e fluoreto, bem como a ausência de atividade dessa enzima como determinadas por um sistema de alelos os quais são representados, respectivamente, pelos símbolos E_1^u , E_1^a , E_1^f e E_1^s (ALTLAND et al., 1967; KALOW, 1972).

O alelo E_1^s , como mostrado anteriormente, é incapaz de expressar-se no estado heterozigótico, o que não é verdade em relação aos demais, pertencentes ao assim chamado sistema E_1 . Desse modo, sete fenótipos de pseudocolinesterase são distinguíveis nas populações humanas, quais sejam, usual ou U ($E_1^u E_1^u$ ou $E_1^u E_1^s$), atípico ou A ($E_1^a E_1^a$ ou $E_1^a E_1^s$), fluoreto ou F ($E_1^f E_1^f$ ou $E_1^f E_1^s$), intermediário ou I ($E_1^u E_1^a$), usual-fluoreto ou UF ($E_1^u E_1^f$), intermediário-fluoreto ou IF ($E_1^a E_1^f$) e silencioso ou S ($E_1^s E_1^s$).

I.10 - O sistema alélico E_2

A utilização da notação E_1 prende-se ao fato de existir um outro sistema gênico autossômico, menos importante do ponto de vista prático e que influencia os níveis plasmáticos de pseudocolinesterase. Esse sistema é identificado pela notação E_2 . As relações funcionais entre ambos não são conhecidas e também não existe ligação entre eles (SIMPSON, 1966; LEHMANN e LIDDELL, 1969).

Conhecem-se dois alelos desse segundo sistema, E_2^- e E_2^+ . O último é responsável pela presença da já mencionada banda C_5 (fenótipo C_5^+) na eletroforese em gel de amido do soro de alguns indivíduos. Essa banda adicional determina um acréscimo de cerca de 30% da atividade enzimática presente no soro de indivíduos do fenótipo usual (SIMPSON, 1966; LEHMANN e LIDDELL, 1969). O fenótipo C_5^+ também determina um acréscimo de atividade enzimática em indivíduos pertencentes aos fenótipos I e A, fato que sugere ser a ação do locus E_2 independente da variante enzimática determinada pelo locus E_1 (SIMPSON, 1966).

I.11 - Sensibilidade à succinilcolina e variação fenotípica

A falta de importância prática despertada pelos fenótipos determinados pelo sistema E_2 deve-se à ausência de relação entre eles e os episódios de apnéia prolongada desencadeada pela administração de succinilcolina. Em relação ao sistema E_1 , entretanto, a hipersensibilidade à succinilcolina ocorre de modo variável em alguns dos fenótipos, como já se assinalou anteriormente e se indica de modo resumido na tabela I.1.

O fenótipo I, considerado por alguns autores como apresentando sensibilidade normal à succinilcolina (SZEINBERG et al., 1966; WHITTAKER, 1970), enquadra-se, de modo mais preciso, no grupo de indivíduos moderadamente sensíveis a esse produto. De fato, a frequência com que a apnéia prolongada ocorre entre os indivíduos com esse fenótipo é cerca de sete vezes maior do que a constatada entre os indivíduos do fenótipo U (LEHMANN e LIDDELL, 1969).

Permanece ainda sem uma explicação adequada a observação de que cerca de 30% dos pacientes que mostram apnéia prolongada pertencem ao fenótipo usual. Esse fato talvez se relacione com algumas evidências que sugerem a existência de outras variantes de pseudocolinesterase ainda não

GENÓTIPO	FENÓTIPO	SENSIBILIDADE À SUCINILCOLINA
$E_1^u E_1^u$	U	0
$E_1^u E_1^s$		Provavelmente 0
$E_1^u E_1^a$	I	+
$E_1^u E_1^f$	UF	Provavelmente 0
$E_1^f E_1^f$	F	+
$E_1^f E_1^s$		Provavelmente +
$E_1^a E_1^f$	IF	+
$E_1^a E_1^a$	A	++
$E_1^a E_1^s$		++
$E_1^s E_1^s$	S	++

0 = normal; + = aumentada; ++ = muito aumentada

Tabela I.1 - Sensibilidade dos diferentes fenótipos de pseudocolinesterase à sucinilcolina (modificada de SZEINBERG et al., 1966).

definitivamente caracterizadas (LEHMANN e LIDDELL, 1969; WHITTAKER, 1970; GOEDDE e ALTLAND, 1971).

I.12 - Variação populacional do alelo E₁^a

Os estudos relativos à frequência com que as diferentes variantes de pseudocolinesterase ocorrem nas populações enfocaram, principalmente, a variante atípica, visto que os indivíduos apresentando a variante fluoreto são muito mais raros e menos sensíveis à ação da succinilcolina. Tais estudos evidenciaram a prevalência apreciável do alelo E₁^a nas populações caucasóides, entre as quais ela varia de 1,57% entre os gregos até 5,12% entre os judeus provenientes do Iraque e Irã (tabela I.2).

Esse alelo está ausente ou é extremamente raro entre os negróides. Assim, estimou-se a sua frequência entre os congolezes em torno de 0,09% (MORROW e MOTULSKY, 1965) e entre negróides norte-americanos ela variou de zero a 0,53% (MORROW e MOTULSKY, 1965; LUBIN et al., 1971). Não foram observados indivíduos portadores do gene E₁^a entre negróides provenientes da Rodésia (WHITTAKER et al., 1976).

As populações mongolóides mostraram resultados semelhantes aos negróides. De fato, entre japoneses e tailandeses, a frequência do alelo E₁^a foi nula (MORROW e MOTULSKY, 1965; OMOTO e GOEDDE, 1965; ALTLAND et al., 1967) e igual a 0,15% entre chineses provenientes de Formosa e 0,24% entre filipinos (MORROW e MOTULSKY, 1965). Não se detectou a presença do alelo atípico entre indígenas da América do Norte e do Sul e em esquimós (MORROW e MOTULSKY, 1965; GUTSCHE et al., 1967; ARENDS et al., 1967; LUBIN et al., 1971). LISKER et al. (1964) estimaram a frequência do alelo E₁^a em 0,93% em grupos indígenas mexicanos, mas a análise da distribuição dos grupos sanguíneos evidenciou-lhes fluxo gênico caucasóide de corrente de miscigenação.

Em relação a populações brasileiras, o primeiro estudo foi realizado por SIMPSON e KALOW (1965). Esses autores examinaram amostras de soro de 2138 indivíduos originários da região Nordeste. A frequência do alelo E₁^a na amostra dessa população tri-híbrida (índios x negróides x mongolóides) foi de 1,49%, semelhante à observada nas populações caucasóides de origem européia. Esse resultado é, de certa forma, inesperado, uma vez que esse alelo, como foi acima ressaltado, é praticamente ausente nas populações negróides e

POPULAÇÃO	n	FREQÜÊNCIA (%)	SD	REFERÊNCIA
Judeus do Iraque e Irã	381	5,12	0,80	SZEINBERG <u>et al.</u> . (1966)
Checoslovacos	180	3,33	0,95	GOEDDE <u>et al.</u> . (1967)
Brasileiros	406	2,59	0,56	MAGNA <u>et al.</u> . (1980)
Inglêses	703	1,92	0,37	KATTAMIS <u>et al.</u> . (1962)
Canadenses	2017	1,88	0,21	KALOW e GUNN (1959)
Norte-americanos	1882	1,84	0,22	Dados conjuntos de MORROW e MOTULSKY (1965) e LUBIN <u>et al.</u> . (1971)
Árabes (Israel)	110	1,82	0,90	SZEINBERG <u>et al.</u> . (1966)
Portugueses	179	1,68	0,68	KATTAMIS <u>et al.</u> . (1962)
Judeus europeus	923	1,68	0,30	SZEINBERG <u>et al.</u> . (1966)
Líbaneses	1315	1,67	0,25	IOISELET e SROUJI (1968)
Alemães	8314	1,62	0,10	AITLAND <u>et al.</u> . (1967)
Gregos	921	1,57	0,29	Dados conjuntos de KATTAMIS <u>et al.</u> . (1962) e MORROW e MOTULSKY (1965)

Tabela I.2 - Freqüência do alelo E_1^a nas populações caucasóides.

mongolóides. Assim sendo, a frequência teoricamente esperada na população estudada por SIMPSON e KALOW deveria ser menor que a encontrada entre os caucasóides, a menos que o componente desse grupo que participou da formação da população nordestina mostrasse, originariamente, altas frequências do alelo E_1^a (BEIGUELMAN, 1979).

Os dados de MAGNA et al. (1980) sugerem a viabilidade dessa última hipótese, tendo em vista que esses autores estimaram a frequência do alelo E_1^a , entre caucasóides, brasileiros da região Sudeste, em 2,59%, uma das mais altas encontradas em populações caucasóides, como se pode observar na tabela I.2.

De qualquer forma, os dados relativos à frequência do alelo E_1^a nas populações brasileiras são ainda muito escassos e, conseqüentemente, não se tem uma avaliação da sua distribuição no Brasil. Fica, assim, evidenciada a necessidade da realização desses estudos em outras áreas do território brasileiro.

I.13 - Deficiência de pseudocolinesterase e rotina pré-anestésica

Com relação às implicações clínicas decorrentes do uso da succinilcolina, parece supérfluo assinalar que essa substância não deve ser administrada a pacientes supostamente portadores de deficiência de pseudocolinesterase, quer seja ela adquirida ou congênita.

O diagnóstico presumível dos primeiros pode ser estabelecido, com relativa segurança, através dos dados anamnéticos e/ou de exame físico indicadores da existência de condições patológicas determinantes de baixos níveis séricos de pseudocolinesterase.

Uma vez que a deficiência congênita de pseudocolinesterase não está associada a nenhum estado mórbido, seu diagnóstico só poderá ser estabelecido através da inclusão, na rotina de exames pré-operatórios ou pré-anestésicos, de testes de triagem específicos que identifiquem a presença das variantes enzimáticas deficientes, principalmente a atípica, e também a ausência de atividade de pseudocolinesterase.

A investigação rotineira do fenótipo A justifica-se pela alta sensibilidade à succinilcolina que ele de-

termina, o mesmo não ocorrendo em relação ao fenótipo F (tabela I.1). Além disso, a ocorrência desse último é muito pouco provável, uma vez que sua frequência é muito menor que a do primeiro.

Esse procedimento pode ser realizado por meio do uso de técnicas relativamente simples, que têm como princípio a inibição diferencial das variantes usual e atípica, mediante o concurso de certas substâncias (GIBLETT, 1969). Os fenótipos I e S também são facilmente identificados por quaisquer dessas técnicas, apesar de esse último ser extremamente raro.

Acrescente-se, ainda, que, predominantemente, os pacientes caucasóides devem merecer esse cuidado especial, uma vez que, como ficou demonstrado, constituem o grupo racial no qual a frequência do alelo E_1^a é significativa, já que entre os negróides e mongolóides a frequência desse alelo é praticamente nula.

O enfoque profilático sugerido parece ser a conduta mais acertada e isenta de riscos em relação ao uso da succinilcolina. Aliás, desde o início do seu emprego clínico, os autores já chamavam a atenção para o fato de que ela não deveria ser administrada a pacientes provavelmente portadores de baixos níveis plasmáticos de pseudocolinesterase, a menos que se pudesse mantê-los sob respiração artificial por tempo prolongado (EVANS et al., 1952). Mesmo assim, sabe-se que a respiração artificial envolve riscos decorrentes, principalmente, da mobilização inadequada de secreções produzidas na árvore respiratória. Essa conduta, portanto, deve ser reservada aos casos esporádicos, cuja deficiência enzimática foi impossível de ser presumida ou detectada previamente.

Outra possibilidade terapêutica surgiu após terem sido descritos alguns casos de pacientes que apresentaram apnéia prolongada após a administração de succinilcolina, mas que, estranhamente, já haviam recebido essa substância anteriormente, sem apresentar qualquer reação adversa. A explicação para esses casos prendeu-se ao fato de que tais pacientes haviam recebido transfusão sanguínea pré-operatória na primeira vez. Tendo em conta que a pseudocolinesterase é bastante estável em condições normais de estocagem de plasma, sugeriu-se, então, a administração pré-operatória de plasma aos pacientes sujeitos a reação adversa à succinilcolina, bem como o tratamento daqueles nos quais já se tivesse instalada a apnéia com esse mesmo procedimento (LEHMANN e LIDDELL, 1969).

Apesar dessas evidências e da explicação simples e lógica que a justificasse, essa conduta não se mostrou, na prática, suficientemente convincente. Conseguiram-se resultados concretos com a administração de pseudocolinesterase usual purificada antes e após a injeção de sucinilcolina (GOEDDE e ALTLAND, 1971). Essa conduta claramente presupõe a existência de uma rotina pré-operatória que inclua a determinação das variantes deficientes de pseudocolinesterase, uma vez que a enzima purificada deve ser administrada antes da injeção da sucinilcolina. Por outro lado, por ser essa uma medida dispendiosa, não pode, evidentemente, ser indicada como medida rotineira profilática independente do conhecimento da deficiência enzimática.

CAPÍTULO II

OBJETIVO

Na introdução foram enfatizados dois aspectos distintos relativos à problemática da pseudocolinesterase. O primeiro, de grande importância clínica e de aplicação imediata refere-se à necessidade da implantação, nos hospitais gerais, de exames rotineiros visando à identificação das variantes deficientes geneticamente determinadas de pseudocolinesterase. Tais exames deveriam ser incluídos na rotina pré-anestésica e visariam, basicamente, à identificação dos indivíduos portadores da variante atípica de pseudocolinesterase, tanto nos estados homozigótico quanto heterozigótico. Esse procedimento está indicado para todos os pacientes caucásicos candidatos a receber succinilcolina, visto que em nosso meio 5,12% deles pertencem ao fenótipo intermediário de pseudocolinesterase (MAGNA et al., 1980).

O segundo aspecto, relativo à genética de populações, refere-se à quase total falta de conhecimentos acerca da distribuição do alelo E_1^a nas diferentes populações brasileiras. Essa lacuna só poderá ser preenchida pela pesquisa desse alelo em diferentes áreas do território nacional.

Essas medidas não foram, até o momento, adotadas no Brasil. Provavelmente isso se prende ao fato de que as

diferentes técnicas atualmente descritas e que discriminam a variante atípica de pseudocolinesterase ou são de execução trabalhosa, como a que emprega a dibucaína como inibidor enzimático, ou requerem o concurso de substâncias de difícil aquisição no mercado brasileiro ou mesmo internacional, como é o caso do brometo de dimetilcarbamato de 2-hidroxi-5-fenil benzil trimetilamônio (RO-20683, Hoffmann-La Roche, Nutley, N. J., USA).

Em vista disso, pareceu importante a padronização de uma técnica que fosse de fácil execução e que empregasse produtos químicos usualmente encontrados no comércio especializado. O presente trabalho descreve um procedimento original nesse sentido, criado pelo autor, e que utiliza a neostigmine (metilsulfato de 3-dimetilcarbamocefenil trimetilamônio, Prostigmine, Roche) como inibidor de pseudocolinesterase e o acetato de alfa-naftila como substrato dessa enzima.

CAPÍTULO III

MATERIAL, CASUÍSTICA E MÉTODOS

III.1 - Obtenção das amostras de soro

As amostras de soro utilizadas para o presente trabalho foram obtidas a partir de sangue colhido por punção venosa de 406 brasileiros caucasóides adultos (282 homens e 124 mulheres) procedentes da região Sudeste do País. Todas as punções foram feitas com seringas e agulhas descartáveis, colhendo-se de cada indivíduo 5 ml de sangue que eram transferidos, em seguida, para tubos de ensaio sem anti-coagulante e deixados em repouso à temperatura ambiente até que se completasse a coagulação.

Procedeu-se, em seguida, à centrifugação das amostras a 2000 rpm durante 10 minutos, também à temperatura ambiente, em centrifugador FANEM modelo Excelsa-3, sendo o soro sem sinais visíveis de hemólise transferido para frascos com tampa. As amostras de soro assim obtidas foram guardadas em congelador a -20°C até posterior utilização.

III.2 - Reagentes empregados

O acetato de alfa-naftila (Alpha-Naphtyl Acetate, Sigma), utilizado como substrato de pseudocolinesterase, foi preparado em soluções contendo 30 mM em água-acetona a 50% ou 150 mM em acetona. Essas soluções-estoque foram guardadas em geladeira por um período máximo de 30 dias. No momento do uso elas eram convenientemente diluídas em tampão de fosfato 200 mM, pH 7,1.

O brometo de dimetilcarbamato de 2-hidroxi-5-fenilbenzil trimetilamônio (RO-20683, Hoffmann-La Roche, Nutley, N. J., USA), inibidor de pseudocolinesterase, foi preparado em solução 10^{-6} M em tampão de fosfato 200 mM, pH 7,1, e guardada em geladeira.

As soluções de metilsulfato de neostigmine (metilsulfato de 3-dimetilcarbamocefenil trimetilamônio, Prostigmine, Roche) foram preparadas em tampão de fosfato 200 mM e pH 7,1, a partir de diluições apropriadas de uma solução-estoque contendo 0,5 mg/ml da substância. Essas soluções também foram mantidas em geladeira.

A solução de 5-cloro-o-toluidina (Fast Red TR Salt, Sigma) foi preparada no momento do uso nas concentrações de 2 mg/ml ou 4 mg/ml em laurilsulfato de sódio (duponal, Sodium Lauryl Sulfate, Sigma). Essa última era diluída a 3% e mantida à temperatura ambiente, sendo novamente diluída a 1,2% no momento da dissolução da 5-cloro-o-toluidina.

III.3 - Determinação das variantes de pseudocolinesterase

A variante de pseudocolinesterase presente em cada amostra de soro foi determinada por meio do método de triagem descrito por MORROW e MOTULSKY (1968). Essa técnica utiliza como substrato o acetato de alfa-naftila e emprega o brometo de dimetilcarbamato de 2-hidroxi-5-fenilbenzil trimetilamônio como o inibidor que discrimina a variante atípica da enzima. As outras substâncias utilizadas são a 5-cloro-o-toluidina, que se combina com o alfa-naftol liberado da hidrólise enzimática do substrato, produzindo um composto de cor púrpura, e o laurilsulfato de sódio, inibidor irreversível de pseudocolinesterase, utilizado para interromper a reação.

Cada amostra de soro foi testada em dois tubos. Um deles continha o soro na diluição 1:900, tampão de

fosfato 76 mM e pH 7,1 e acetato de alfa-naftila 0,24 mM. O outro tinha, além disso, $1,1 \times 10^{-7}M$ de brometo de dimetil-carbamato de 2-hidroxi-5-fenilbenzil trimetilamônio. Um tubo branco, contendo tampão de fosfato 76 mM e pH 7,1, acetato de alfa-naftila 0,24 mM e brometo de dimetilcarbamato de 2-hidroxi-5-fenilbenzil trimetilamônio $1,1 \times 10^{-7}M$ foi preparado para cada série de soros testados.

Após incubação durante 60 minutos a $37^{\circ}C$, adicionaram-se aos tubos 0,2 mg/ml de 5-cloro-o-toluidina e 0,12% de laurilsulfato de sódio. Os tubos foram então deixados em repouso à temperatura ambiente durante 15 minutos, sendo a intensidade da cor púrpura medida em fotocolorímetro. O fotocolorímetro utilizado foi da marca CARL-ZEISS, modelo PL-4, com filtro para 546 nm, sendo a porcentagem de inibição calculada pela fórmula $(1 - \frac{A_{546} \text{ tubo com inibidor}}{A_{546} \text{ tubo sem inibidor}}) \times 100$.

Todas as determinações foram feitas em duplicata.

III.4 - Obtenção das soluções-estoque de pseudocolinesterase

Escolheram-se, aleatoriamente, 30 amostras de soro entre as 385 que mostraram porcentagem de inibição variando de 82% a 94%. Pipetou-se, então, para um mesmo frasco, 0,1 ml de cada uma das 30 amostras escolhidas, obtendo-se, assim, uma mistura de soros contendo a variante usual de pseudocolinesterase. De modo análogo, obteve-se uma mistura de soros do fenótipo intermediário a partir de 14 amostras de soro que apresentaram porcentagem de inibição variando de 48% a 67%.

O soro contendo a variante atípica de pseudocolinesterase foi colhido de uma paciente que havia entrado em apnéia por cerca de duas horas após a administração de succinilcolina. Esse soro mostrou 14% de inibição da pseudocolinesterase com o emprego da técnica de MORROW e MOTULSKY (1968).

As três amostras de soro assim obtidas foram utilizadas em todos os experimentos realizados.

III.5 - Determinação do tempo de incubação com o substrato e diluição do soro

As diluições das amostras de soro em tampão de fosfato 200 mM, pH 7,1, nas proporções de 1:600, 1:1200 e 1:2400 foram incubadas com 2,5 mM de acetato de alfa-naftila a 37°C. A intensidade da cor púrpura produzida pela adição de 0,3 mg/ml de 5-cloro-o-toluidina e 0,1% de laurilsulfato de sódio a intervalos apropriados de até 60 minutos foi medida em fotocolorímetro CARL-ZEISS modelo PL-4 com filtro para 546 nm. Preparou-se um tubo branco para cada tempo correspondente à tomada de medida da reação.

As três variantes de pseudocolinesterase mostraram um incremento linear da absorvância em função do tempo de até 60 minutos, nas diluições de soro empregadas. Além disso, a constante de velocidade calculada para cada variante enzimática, definida como a variação da absorvância por minuto, aumentou linearmente em função do aumento da concentração do soro.

Escolheu-se, então, a diluição a 1:1200 e tempo de incubação com o substrato de 30 minutos, pois, nessas condições, os valores de absorvância obtidos mostraram-se mais apropriados.

III.6 - Determinação do tempo de pré-incubação com neostigmine

As amostras de soro diluídas a 1:1200 em tampão de fosfato 200 mM e pH 7,1, foram incubadas com $3,7 \times 10^{-7}$ M de neostigmine à temperatura ambiente e a 37°C. A intervalos apropriados de até 60 minutos foram adicionados 2 mM de acetato de alfa-naftila, seguindo-se um período de 30 minutos de incubação a 37°C. O intervalo de tempo durante o qual o soro foi incubado com neostigmine antes da adição do substrato foi chamado de pré-incubação. Um tubo controle e um tubo branco foram preparados para cada tempo, por meio da substituição do inibidor ou do soro por igual volume de tampão de fosfato 200 mM e pH 7,1.

Após a interrupção da reação seguida do desenvolvimento da cor púrpura pela adição de 0,3 mg/ml de 5-cloro-o-toluidina e 0,1% de laurilsulfato de sódio, determinou-se a porcentagem de inibição conforme descrito em III.3.

III.7 - Curva de inibição da pseudocolinesterase por diferentes concentrações de neostigmine

As amostras de soro diluídas a 1:1200 em tampão de fosfato 200 mM e pH 7,1 foram pré-incubadas durante 15 minutos, a 37°C, com concentrações de neostigmine variando logaritmicamente de $9,2 \times 10^{-9}M$ a $9,2 \times 10^{-5}M$. Cada tubo recebeu, então, 2 mM de acetato de alfa-naftila e foi incubado durante 30 minutos a 37°C. Para cada concentração de neostigmine preparou-se um tubo controle e um branco.

A interrupção da reação e a determinação da porcentagem de inibição enzimática em cada tubo foram realizadas da maneira usual.

III.8 - Estudos sobre o mecanismo de inibição da pseudocolinesterase pela neostigmine

Determinou-se a atividade enzimática presente no soro diluído a 1:1200 em tampão de fosfato 200 mM e pH 7,1 da forma usual, após pré-incubação com neostigmine durante 15 minutos à temperatura de 37°C.

As concentrações do substrato variaram de 0,031 mM a 2 mM e as concentrações de neostigmine foram escolhidas em função da variante de pseudocolinesterase a ser ensaiada. A variante usual foi testada na presença de neostigmine a $3,7 \times 10^{-8}M$, $9,2 \times 10^{-8}M$ e $3,7 \times 10^{-7}M$. No ensaio da variante atípica utilizou-se inibidor a $3,7 \times 10^{-7}M$, $9,2 \times 10^{-7}M$ e $3,7 \times 10^{-6}M$, enquanto que, para o soro correspondente ao fenótipo intermediário, as concentrações de neostigmine utilizadas foram $3,7 \times 10^{-8}M$, $3,7 \times 10^{-7}M$ e $3,7 \times 10^{-6}M$.

Preparou-se um tubo controle e um tubo branco para cada concentração de substrato utilizada.

III.9 - Estudo da validade da técnica

Foram selecionadas 80 amostras de soro, previamente classificadas quanto ao fenótipo de pseudocolinesterase por meio da técnica de MORROW e MOTULSKY (1968). Obtiveram-se 58 amostras com porcentagens de inibição variando de 86% a 93% (fenótipo U) e 22 com inibição de 49% a 69% (fenótipo I).

Cada uma dessas 80 amostras foi examinada em

dois tubos. No tubo teste, o soro diluído a 1:1200 em tampão de fosfato 200 mM e pH 7,1 foi pré-incubado durante 15 minutos a 37°C com $3,7 \times 10^{-7}M$ de neostigmine. Em seguida, adicionou-se 0,5 mM de acetato de alfa-naftila ao tubo teste e ao tubo controle, que continha somente o soro diluído a 1:1200 em tampão de fosfato 200 mM, pH 7,1. Após incubação de 30 minutos a 37°C a reação foi interrompida da forma usual e a porcentagem de inibição foi calculada por intermédio da fórmula citada em III.3. Para cada série de testes preparou-se um tubo branco, isento de inibidor e de soro.

III.10 - Análise estatística

Os dados relativos à inibição da pseudocoli-nesterase em diferentes concentrações de substrato foram colocados em gráfico de v em função de v/s , sendo v a velocidade de da reação medida e s a concentração de substrato a ela associada. O gráfico assim obtido fornece uma linha reta cuja equação é $v = -K_m \frac{V}{s} + V$ (cf. LEHNINGER, 1975), onde K_m é a constante de Michaelis e V a velocidade máxima.

A comparação dos coeficientes angulares ($-K_m$) e lineares (V) das retas de regressão obtidas, na ausência e na presença do inibidor para cada variante de pseudocolinesterase, foi feita por meio da análise de covariância (SNEDECOR e COCHRAN, 1967).

As estimativas de K_i (constante do inibidor) para as variantes usual e atípica foram obtidas de acordo com o método gráfico de Dixon (DIXON e WEBB, 1964) nas concentrações de substrato 0,5 mM e 2,0 mM. As concentrações de neostigmine utilizadas foram as citadas em III.8. Segundo esse método, a construção de um gráfico de $1/v$ em função de i (concentração do inibidor) fornece uma linha reta cuja equação, para o caso de inibição não-competitiva, é definida como $\frac{1}{v} = \frac{s + K_m}{VsK_i} i + \frac{K_m + s}{Vs}$ onde v é a velocidade da reação, s a concentração do substrato, V a velocidade máxima, K_m a constante de Michaelis, K_i a constante do inibidor e i a concentração do inibidor. Nessa equação, quando $1/v$ é igual a zero o valor de i obtido corresponde a $-K_i$.

As equações de regressão de v sobre v/s e de $1/v$ sobre i , bem como as estimativas da média e desvio-padrão das porcentagens de inibição obtidas em III.9 foram calculadas da maneira usual (BEIGUELMAN, 1977).

No presente trabalho, a velocidade da reação enzimática foi diretamente expressa em termos de absorbância medida a 546 nm. Com relação à concentração do inibidor, tendo em vista que durante o tempo de pré-incubação a enzima e o inibidor estavam contidos num volume de 0,1 ml de tampão e que a adição do substrato aumentava esse volume para 0,6 ml, as concentrações mencionadas referem-se às concentrações finais, isto é, as concentrações do inibidor presentes durante a hidrólise do acetato de alfa-naftila.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

A figura IV.1 mostra a velocidade de inibição da pseudocolinesterase, medida em porcentagem, em função do tempo de pré-incubação com $3,7 \times 10^{-7}$ M de neostigmine à temperatura ambiente.

Nessa figura pode-se constatar que a maior velocidade é a da variante usual, que assume valor constante de 84% acima de 45 minutos de pré-incubação, quando sua variação oscila em torno de 0,1%/min. A variante atípica mostra a menor velocidade de inibição e sua variação é linear até 60 minutos de pré-incubação, com constante de 0,62%/min. A velocidade de inibição da variante de pseudocolinesterase do sorro de indivíduos pertencentes ao fenótipo intermediário varia de modo semelhante à da variante usual, porém com valores menores que essa. Aos 25 minutos de pré-incubação nota-se um ponto de inflexão, quando a constante de velocidade passa de 1,50%/min para 0,31%/min, valor que se mantém até 60 minutos.

A figura IV.2, construída a partir dos dados da figura IV.1, mostra a variação da diferença das porcentagens de inibição entre os fenótipos de pseudocolinesterase, tomados dois a dois, em função do tempo de pré-incubação do

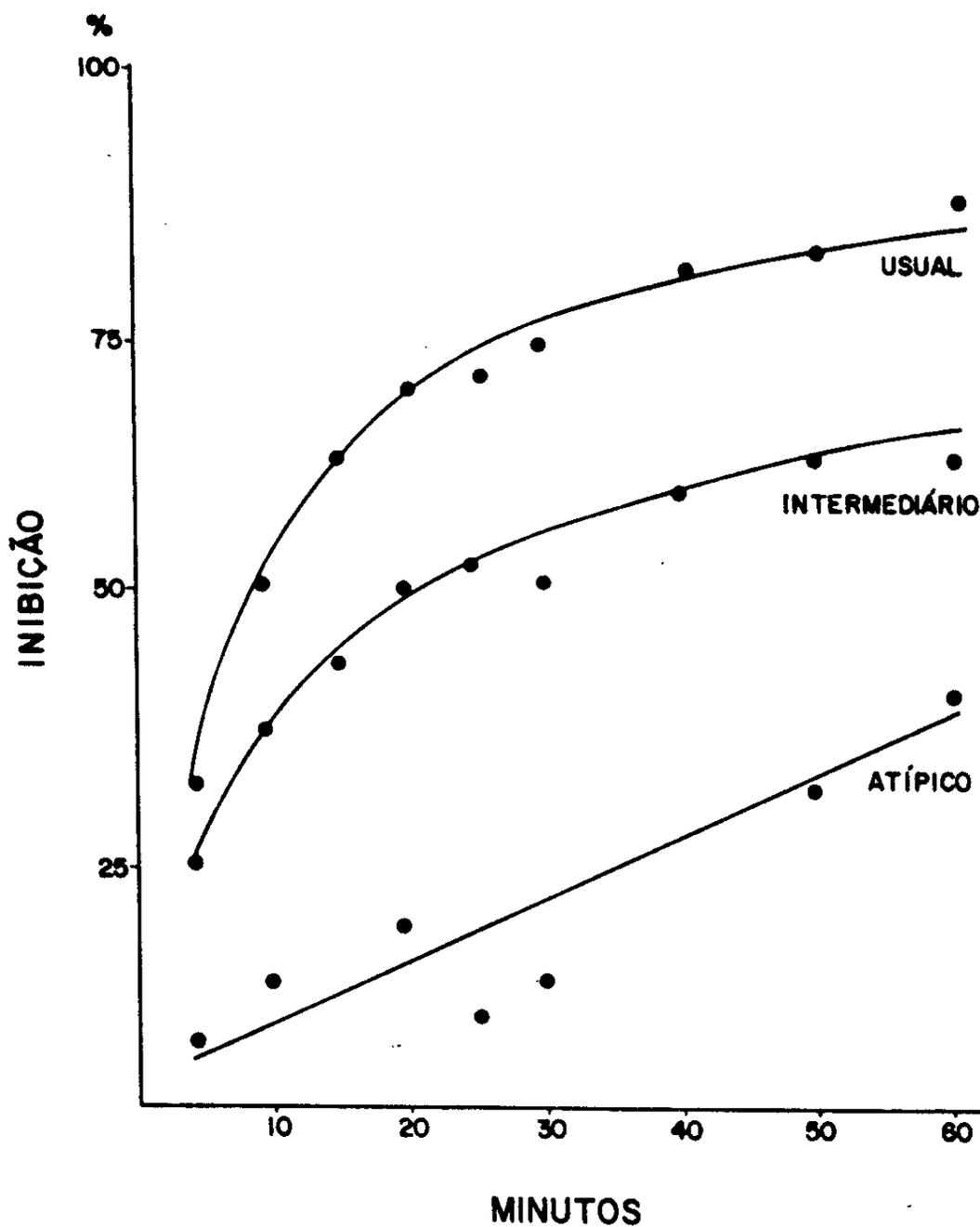


Figura IV.1 - Velocidade de inibição da pseudocolinesterase em função do tempo de pré-incubação com neostigmine $3,7 \times 10^{-7}$ M à temperatura ambiente.

soro com $3,7 \times 10^{-7}$ M de neostigmine à temperatura ambiente. Os maiores valores diferenciais encontram-se na curva representativa de U-A em 59%, em torno de 30 minutos de pré-incubação com neostigmine. A maior diferença I-A situa-se no intervalo de 20 a 30 minutos e é de 37%, enquanto que a maior diferença U-I é de 23%, em torno de 40 minutos de pré-incubação.

A figura IV.3 mostra a velocidade de inibição da pseudocolinesterase, medida em porcentagem, em função do tempo de pré-incubação com $3,7 \times 10^{-7}$ M de neostigmine a 37°C . A maior velocidade é a da variante usual, que se mantém em 80% acima de 20 minutos de pré-incubação, com constante de velocidade de 0,13%/min. Antes do vigésimo minuto, quando ocorre a inflexão da curva, a constante de velocidade é de 1,2%/min. A variante atípica mostra a menor velocidade de inibição e sua variação é linear até 60 minutos de pré-incubação, com constante de 0,89%/min. A velocidade de inibição da pseudocolinesterase presente no soro de indivíduos com fenótipo intermediário varia de modo semelhante à da variante usual, porém com valores menores que essa última. O ponto de inflexão da curva situa-se em torno de 20 minutos de pré-incubação, quando a constante de velocidade passa de 1,47%/min para 0,25%/min, valor que se mantém até 60 minutos.

A figura IV.4, construída a partir dos dados da figura IV.3, mostra a variação da diferença das porcentagens de inibição entre os fenótipos de pseudocolinesterase, tomados dois a dois, em função do tempo de pré-incubação com $3,7 \times 10^{-7}$ M de neostigmine a 37°C . Os valores das diferenças U-A e I-A são máximos em 15 minutos de pré-incubação, quando atingem valores de 60% e 40% respectivamente, decrescendo, em seguida, de modo linear até 60 minutos. A curva das diferenças U-I não mostra ascensão inicial, decrescendo linearmente em função do tempo de pré-incubação até 60 minutos.

As curvas de inibição das variantes de pseudocolinesterase em função de concentrações crescentes de neostigmine, expressas sob a forma logarítmica, são mostradas na figura IV.5. Nas concentrações de neostigmine utilizadas, as porcentagens de inibição das variantes enzimáticas correspondentes aos fenótipos usual, intermediário e atípico situam-se entre zero ($9,2 \times 10^{-9}$ M do inibidor) e 94% ($9,2 \times 10^{-5}$ M de neostigmine). As curvas de inibição da pseudocolinesterase usual e atípica são de conformação sigmóide, situando-se entre elas a curva de inibição da enzima presente no soro de indivíduos pertencentes ao fenótipo intermediário.

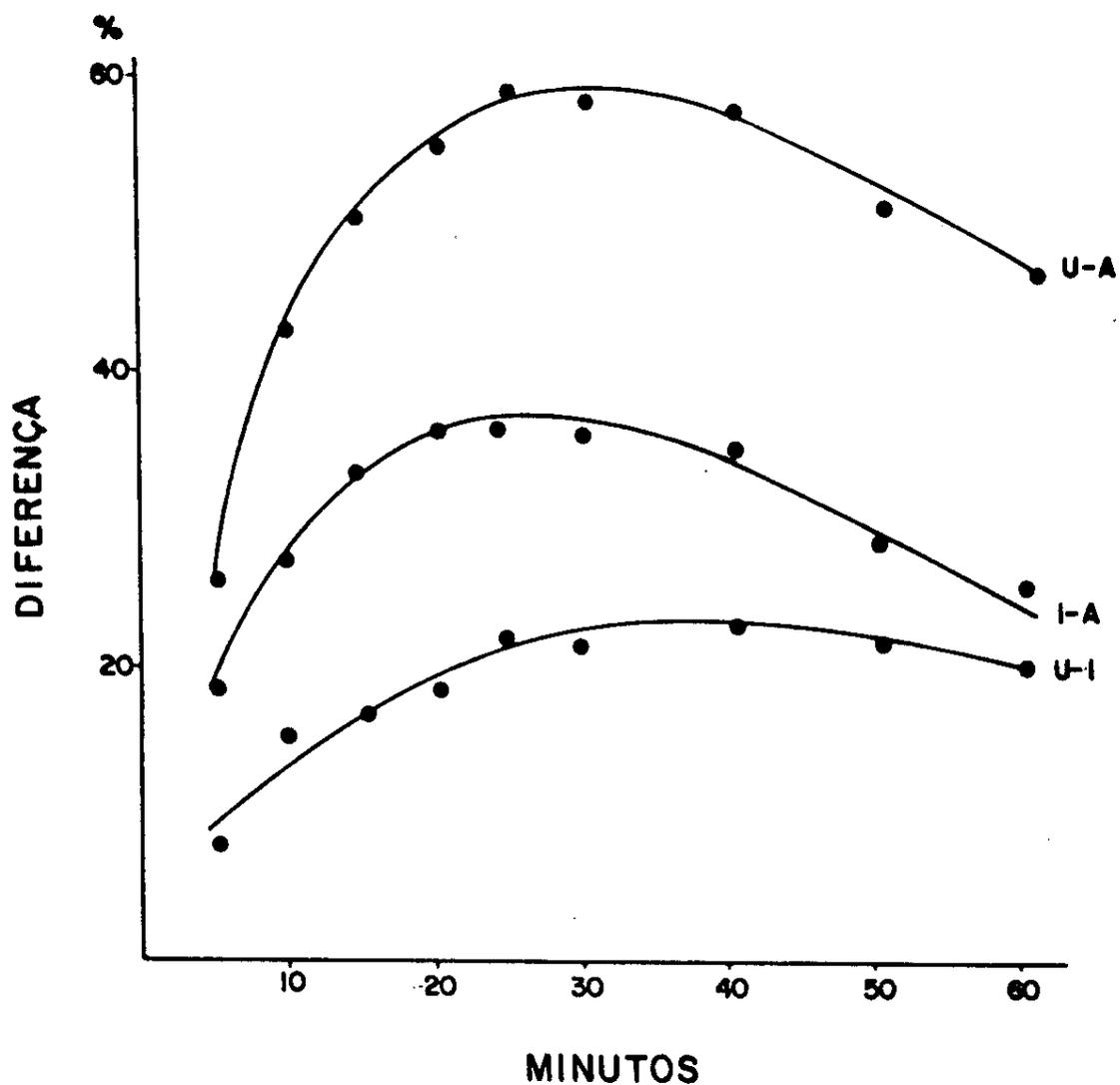


Figura IV.2 - Variação das diferenças de inibição entre as variantes de pseudocolinesterase em função do tempo de pré-incubação com neostigmine $3,7 \times 10^{-7}$ M à temperatura ambiente.

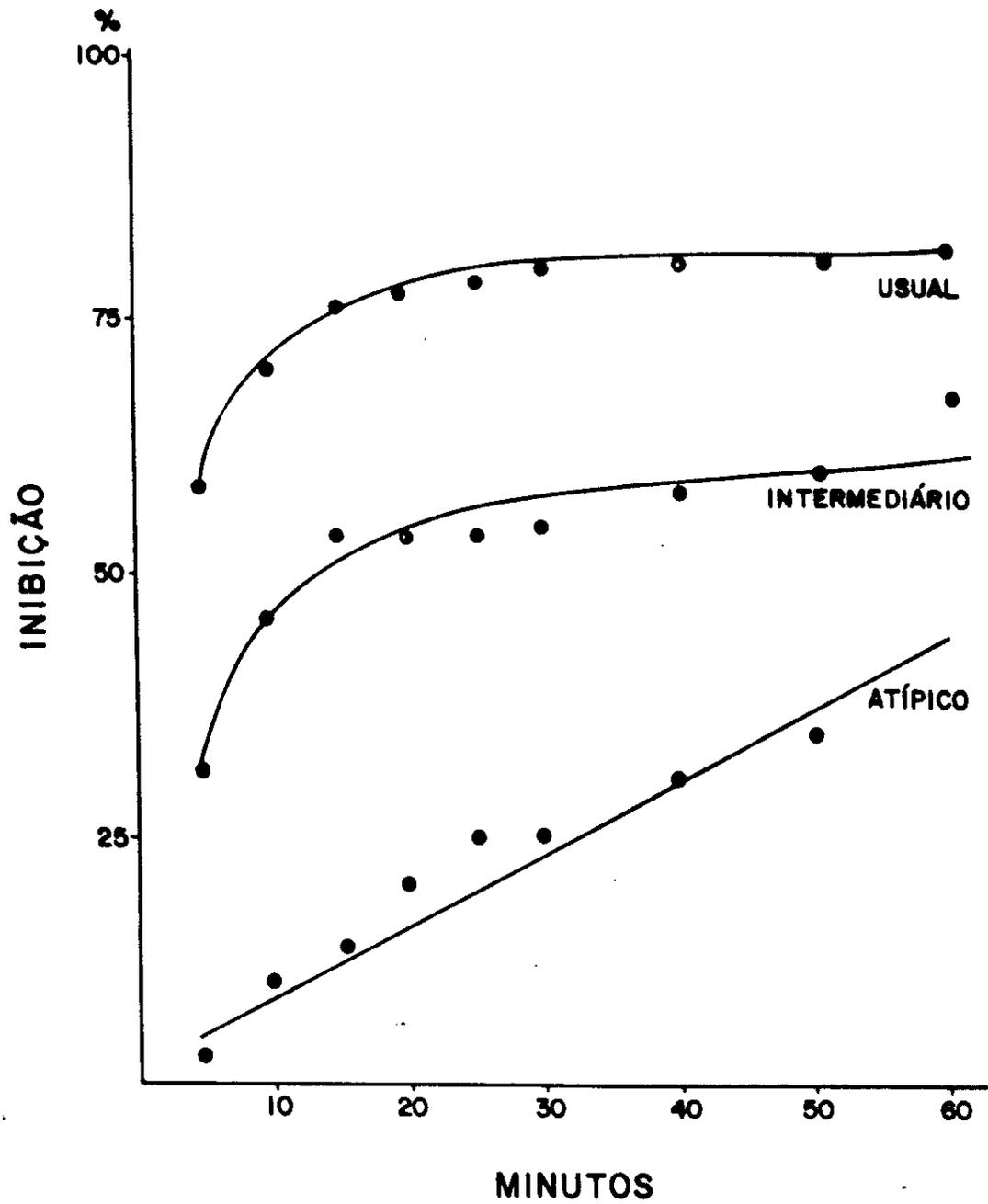


Figura IV.3 - Velocidade de inibição da pseudocolinesterase em função do tempo de pré-incubação com neostigmine $3,7 \times 10^{-7} M$ a $37^{\circ}C$.

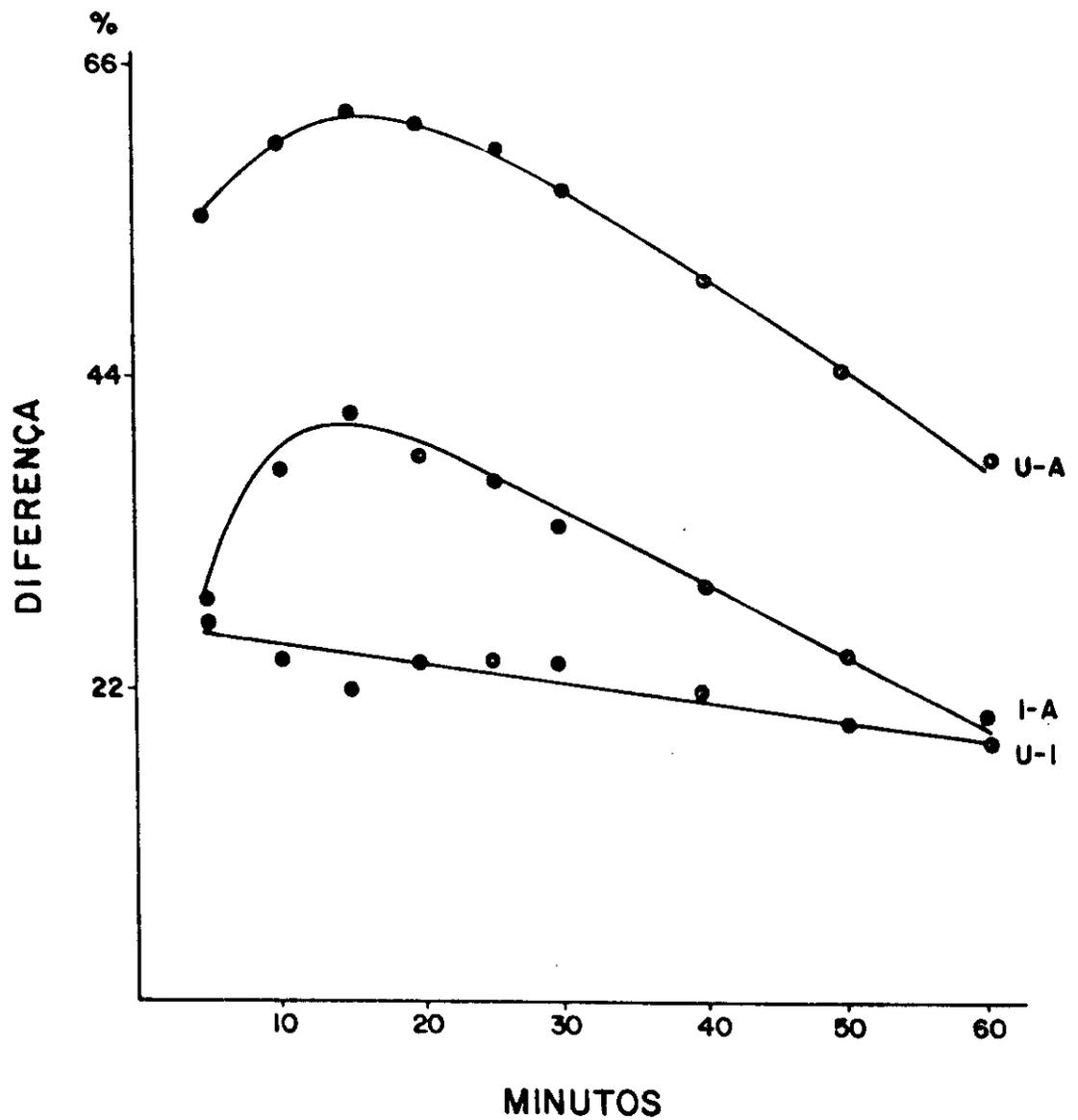


Figura IV.4 - Variação das diferenças de inibição entre as variantes de pseudocolinesterase em função do tempo de pré-incubação com neostigmine $3,7 \times 10^{-7}$ M a 37°C .

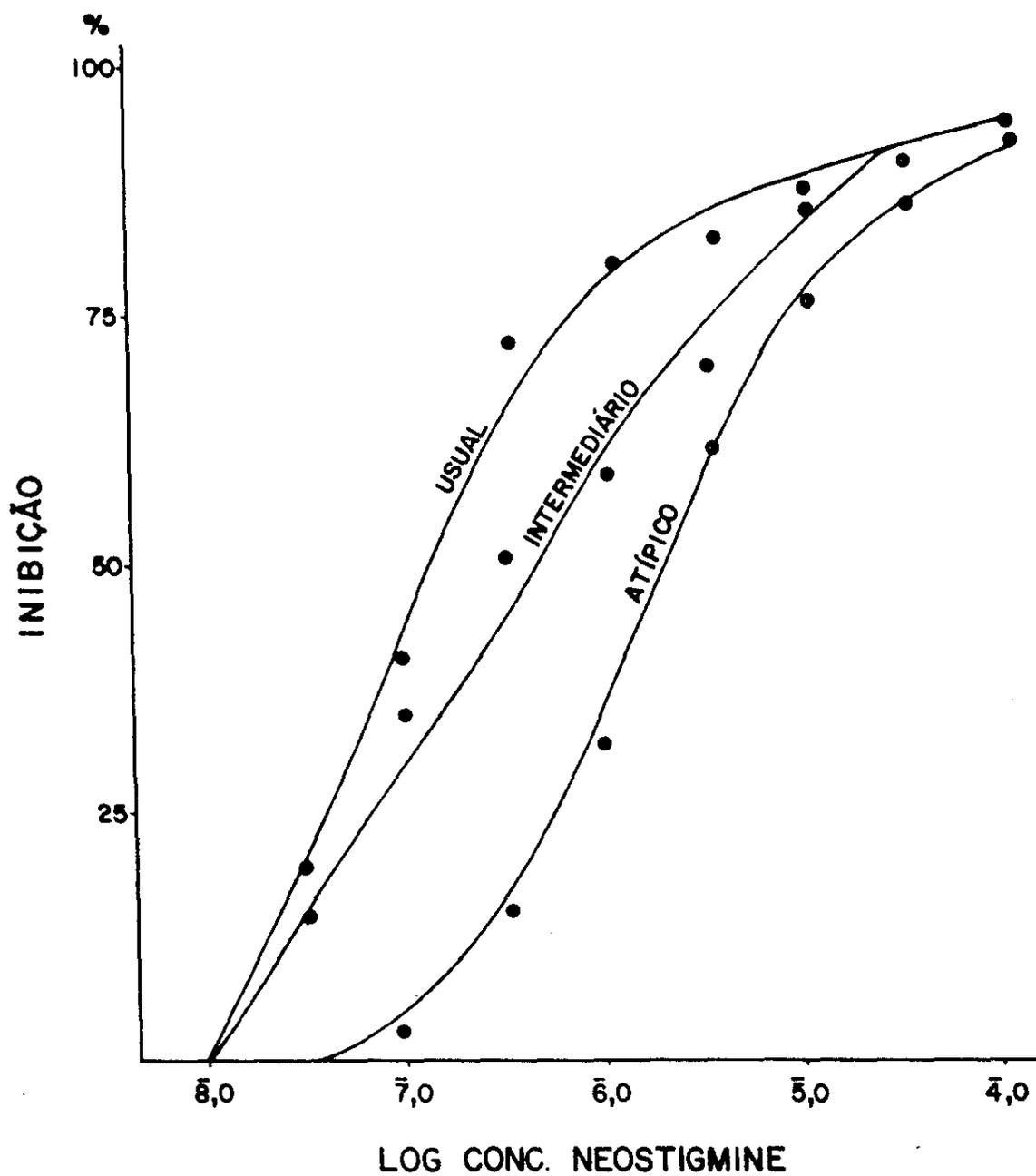


Figura IV.5 - Curva de inibição da pseudocolinesterase em função de concentrações crescentes de neostigmine.

As concentrações de neostigmine que determinam 50% de inibição (I_{50}) das variantes usual e atípica, estimadas a partir dos valores de pI_{50} obtidos na figura IV.5, estão contidas na tabela IV.1. Essa tabela mostra que o valor de I_{50} para a variante atípica é cerca de 16 vezes maior que o correspondente para a variante usual.

A figura IV.6, construída a partir dos dados da figura IV.5, mostra a variação da diferença das porcentagens de inibição entre os fenótipos de pseudocolinesterase, tomados dois a dois, em função de concentrações crescentes de neostigmine, expressas sob a forma logarítmica. As diferenças U-A, I-A e U-I distribuem-se analogamente. As maiores diferenças de porcentagens de inibição situam-se entre os logaritmos da concentração de neostigmine 7,0 e 6,0 para U-A (55%) e I-A (34%). A maior diferença U-I (20%) corresponde ao logaritmo 6,4 da concentração $3,7 \times 10^{-7} M$ de neostigmine.

A tabela IV.2 mostra as estimativas de K_m do acetato de alfa-naftila e de \underline{V} para a pseudocolinesterase correspondente aos fenótipos usual, intermediário e atípico. As diferenças observadas nos valores de K_m , conforme mostra o valor de \underline{F} na tabela, prendem-se ao fato de que o K_m do acetato de alfa-naftila para a variante atípica é significativamente maior que os demais. De fato, os valores de K_m para as duas outras variantes não mostraram diferenças significativas ($F = 4,5$; G.L. = 1;12; $p > 0,10$). A variante atípica, portanto, tem menor afinidade pelo substrato. Com relação à velocidade da reação, observa-se que a variante usual hidrolisa o substrato a uma velocidade máxima correspondente ao dobro da velocidade máxima da variante atípica. Entre essas duas velocidades situa-se a da pseudocolinesterase do soro de indivíduos com fenótipo intermediário. As diferenças entre os valores de \underline{V} são significativas, conforme mostra o valor de \underline{F} na tabela IV.2.

As estimativas de K_m e de \underline{V} contidas na tabela IV.2 foram obtidas por meio das regressões de \underline{v} sobre $\underline{v/s}$, para cada variante enzimática, como mostra a figura IV.7. Nessa figura, portanto, as retas correspondentes à pseudocolinesterase usual e ao fenótipo intermediário podem ser consideradas paralelas.

A tabela IV.3 mostra as estimativas de K_m do acetato de alfa-naftila e de \underline{V} para a pseudocolinesterase usual na ausência de neostigmine e na presença de concentrações dessa substância responsáveis por diferentes porcentagens de inibição dessa variante, quais sejam, $3,7 \times 10^{-8} M$ (19%

VARIANTE ENZIMÁTICA	pI_{50}	I_{50}	$\frac{I_{50} \text{ ATÍPICA}}{I_{50} \text{ USUAL}}$
Usual	6,85	$1,41 \times 10^{-7} \text{ M}$	
Atípica	5,65	$2,24 \times 10^{-6} \text{ M}$	15,88

pI_{50} = cologaritmo de I_{50}

I_{50} = concentração do inibidor responsável por 50%
de inibição enzimática

Tabela IV.1 - Estimativas dos valores de I_{50} da neostigmine para as variantes usual e atípica de pseudocolinesterase.

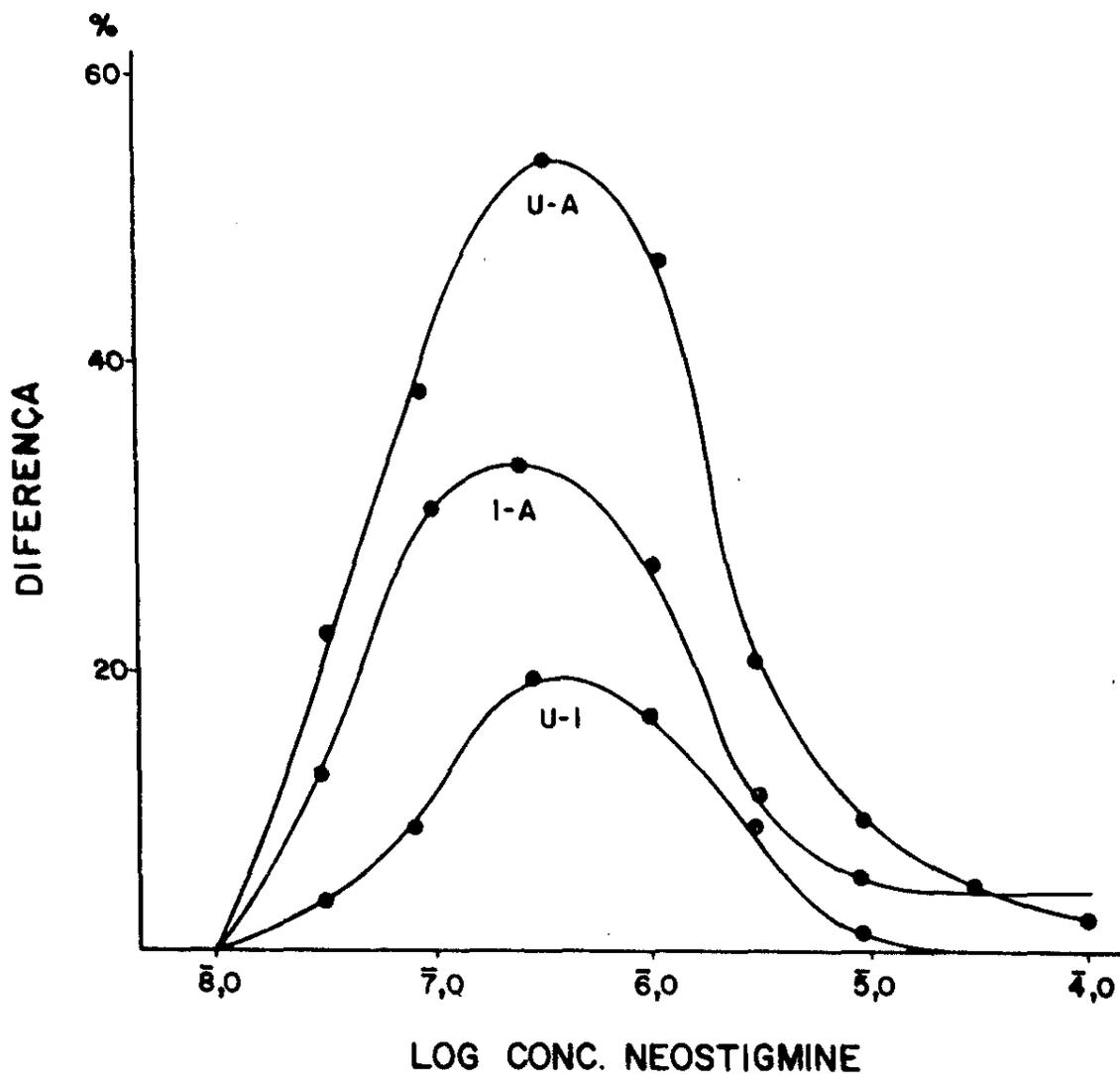


Figura IV.6 - Variação das diferenças de inibição entre as variantes de pseudocolinesterase em função de concentrações crescentes de neostigmine.

FENÓTIPO	Km	V
Usual	0,237 mM	0,701
Atípico	0,441 mM	0,348
Intermediário	0,282 mM	0,549
F	10,0	207,367
G.L.	2;18	2;20
P	<0,01	<0,01

Km = constante de Michaelis

V = velocidade máxima

Tabela IV.2 - Comparação entre os valores de Km do acetato de alfa-naftila e de V para as variantes de pseudocolinesterase presentes no soro de indivíduos com os fenótipos usual, atípico e intermediário.

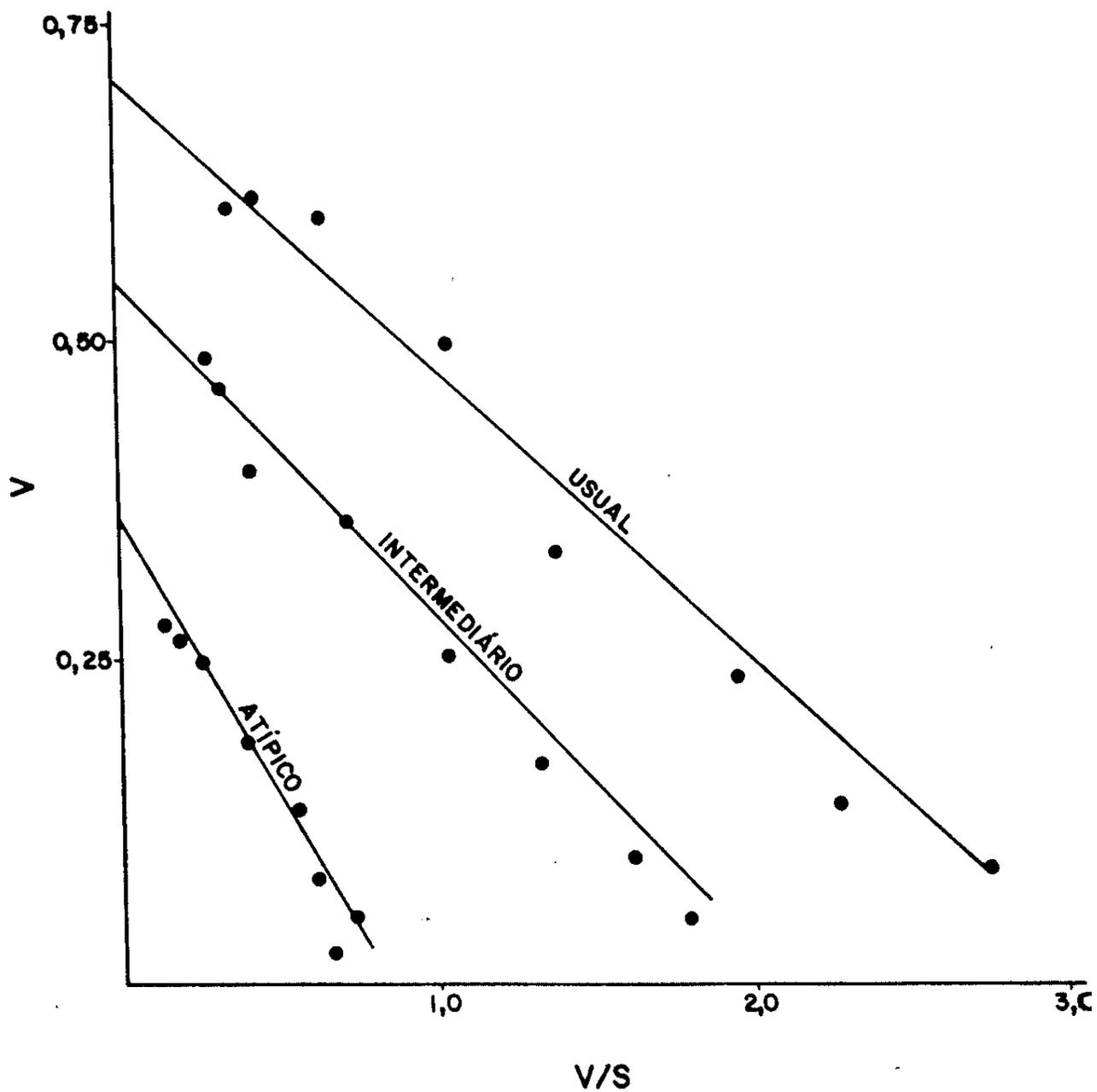


Figura IV.7 - Variação de v em função de v/s para as variantes de pse docolinesterase.

de inibição), $9,2 \times 10^{-8} \text{M}$ (40%) e $3,7 \times 10^{-7} \text{M}$ (83%). Como se pode observar nessa tabela, os valores de \underline{F} obtidos indicam não haver diferenças significativas entre os valores de $\underline{K_m}$, ao passo que os valores de \underline{V} diminuem significativamente à medida que aumenta a concentração do inibidor.

As estimativas de $\underline{K_m}$ e de \underline{V} contidas na tabela IV.3 foram obtidas por meio das regressões de \underline{v} sobre $\underline{v/s}$ mostradas na figura IV.8. As retas assim obtidas podem ser, portanto, consideradas paralelas e, desse modo, a inibição exercida pela neostigmine sobre a pseudocolinesterase usual, utilizando-se o acetato de alfa-naftila como substrato, pode ser considerada não-competitiva pura.

A tabela IV.4 mostra as estimativas de $\underline{K_m}$ do acetato de alfa-naftila e de \underline{V} para a pseudocolinesterase atípica, na ausência de neostigmine, bem como na presença de diferentes concentrações dessa substância, quais sejam, $3,7 \times 10^{-7} \text{M}$ (15% de inibição), $9,2 \times 10^{-7} \text{M}$ (32%) e $3,7 \times 10^{-6} \text{M}$ (62%). Como se observa na tabela IV.4, os valores de \underline{F} obtidos indicam não haver diferenças significativas entre os valores de $\underline{K_m}$. Por outro lado, os valores de \underline{V} diminuem significativamente à medida que aumenta a concentração do inibidor.

As estimativas de $\underline{K_m}$ e de \underline{V} contidas na tabela IV.4 foram obtidas por meio das regressões de \underline{v} sobre $\underline{v/s}$ mostradas na figura IV.9. Essas retas podem, portanto, serem consideradas paralelas. Conseqüentemente, a inibição exercida pela neostigmine sobre a pseudocolinesterase atípica, utilizando-se o acetato de alfa-naftila como substrato, também pode ser tida como não-competitiva pura.

A tabela IV.5 relaciona os valores de $\underline{K_m}$ do acetato de alfa-naftila e de \underline{V} para a pseudocolinesterase encontrada no soro de indivíduos pertencentes ao fenótipo intermediário, na ausência de neostigmine e na presença de concentrações dessa substância que determinam diferentes porcentagens de inibição da enzima correspondente a esse fenótipo, quais sejam, $3,7 \times 10^{-8} \text{M}$ (14% de inibição), $3,7 \times 10^{-7} \text{M}$ (50%) e $3,7 \times 10^{-6} \text{M}$ (70%). O teste \underline{F} aplicado aos dados da tabela IV.5 indica não haver diferenças significativas entre os valores de $\underline{K_m}$, enquanto que os valores de \underline{V} diminuem significativamente à medida que aumenta a concentração do inibidor.

As estimativas de $\underline{K_m}$ e de \underline{V} apresentadas na tabela IV.5 foram obtidas por meio das regressões de \underline{v} sobre

CONCENTRAÇÃO DE NEOSTIGMINE	K_m	V
-	0,237 mM	0,701
$3,7 \times 10^{-8}$ M	0,224 mM	0,387
$9,2 \times 10^{-8}$ M	0,227 mM	0,267
$3,7 \times 10^{-8}$ M	0,180 mM	0,157
F	0,714	840,714
G.L.	3;24	3;27
P	>0,50	<0,01

K_m = constante de Michaelis

V = velocidade máxima

Tabela IV.3 - Estimativas dos valores de K_m do acetato de alfa-naftila e de V para a pseudocolinesterase usual, na presença de diferentes concentrações de neostigmine.

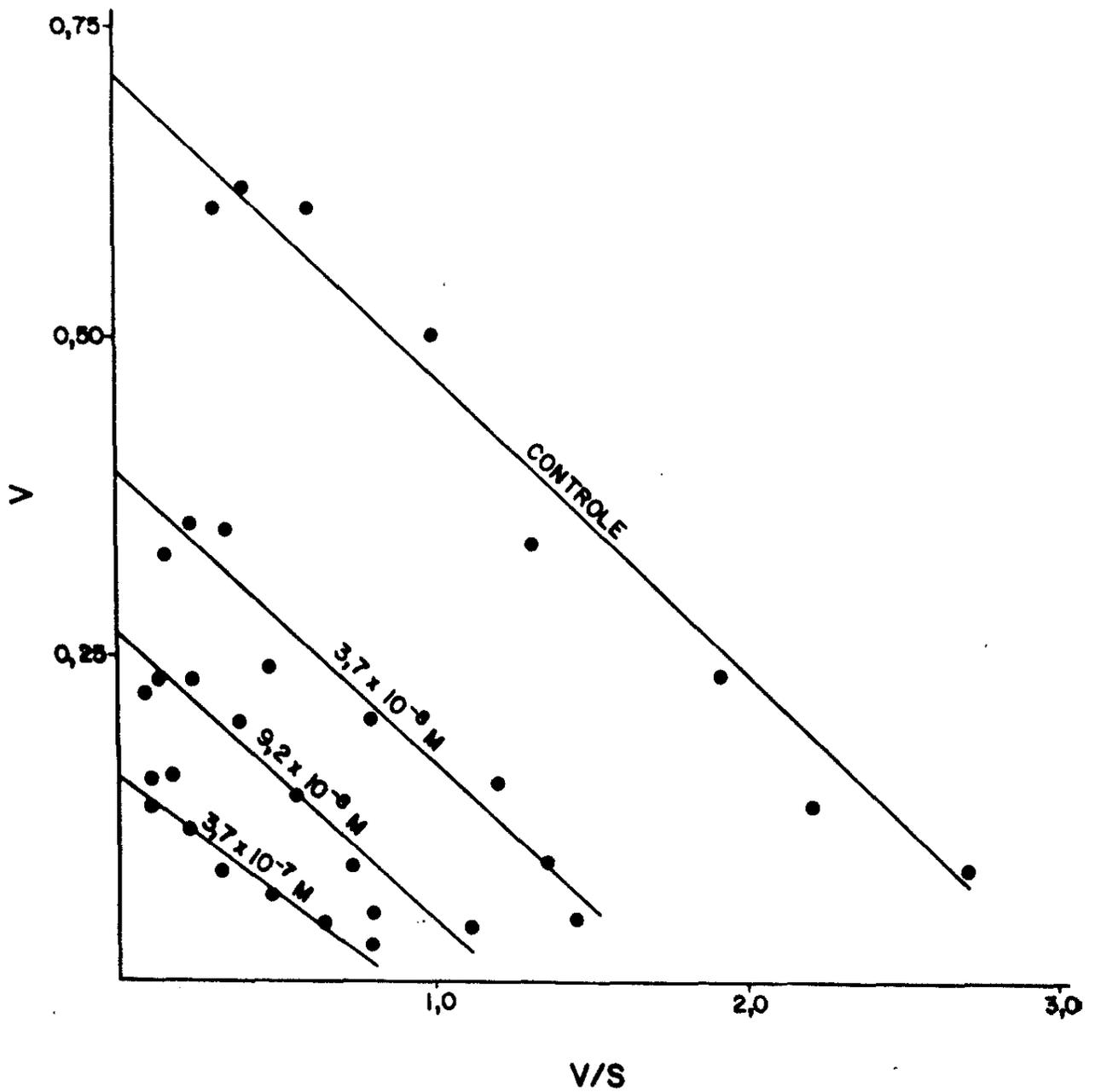


Figura IV.8 - Variação de v em função de v/s para a variante usual de pseudocolinesterase em diferentes concentrações de neostigmine.

CONCENTRAÇÃO DE NEOSTIGMINE	K _m	V
-	0,441 mM	0,348
3,7 x 10 ⁻⁷ M	0,361 mM	0,265
9,2 x 10 ⁻⁷ M	0,355 mM	0,218
3,7 x 10 ⁻⁶ M	0,365 mM	0,121
F	1,0	88,80
G.L.	3;24	3;27
P	>0,50	< 0,01

K_m = constante de Michaelis

V = velocidade máxima

Tabela IV.4 - Estimativas dos valores de K_m do acetato de alfa-naftila e de V para a pseudocolinesterase atípica, na presença de diferentes concentrações de neostigmine.

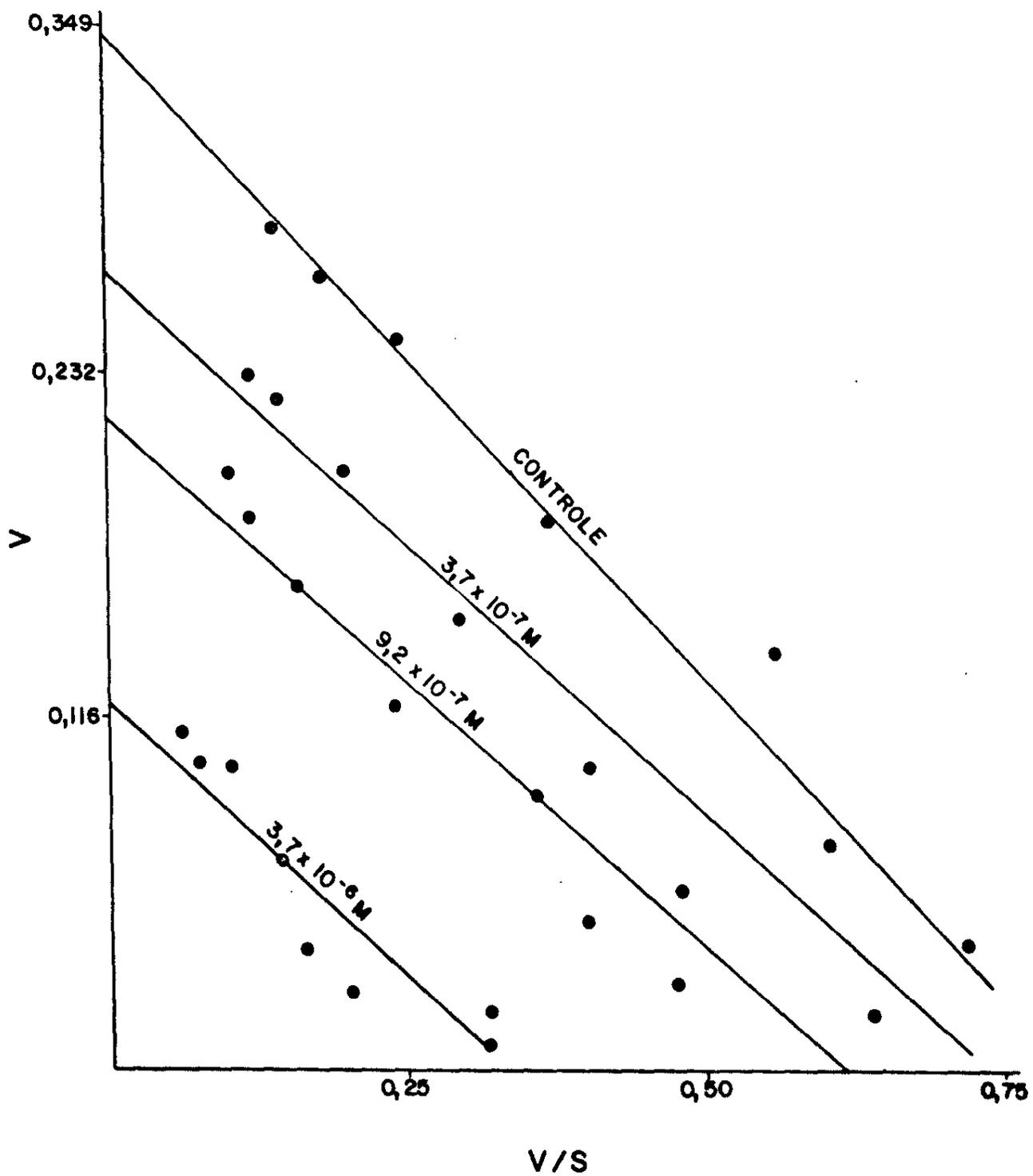


Figura IV.9 - Variação de v em função de v/s para a variante atípica de pseudocolinesterase em diferentes concentrações de neostigmine.

CONCENTRAÇÃO DE NEOSTIGMINE	K _m	V
-	0,282 mM	0,549
3,7 x 10 ⁻⁸ M	0,248 mM	0,401
3,7 x 10 ⁻⁷ M	0,261 mM	0,291
3,7 x 10 ⁻⁶ M	0,227 mM	0,141
F	0,75	223,524
G.L.	3;24	3;27
P	>0,50	<0,01

K_m = constante de Michaelis

V = velocidade máxima

Tabela IV.5 - Estimativas dos valores de K_m do acetato de alfa-naftila e de V para a pseudocolinesterase presente no soro de indivíduos com fenótipo intermediário, em diferentes concentrações de neostigmine.

v/s mostradas na figura IV.10. As retas contidas nessa figura podem ser consideradas paralelas, seguindo-se a conclusão de que o mecanismo de inibição da pseudocolinesterase correspondente ao fenótipo intermediário, utilizando-se o acetato de alfa-naftila como substrato, igualmente pode ser tido como não-competitivo puro.

As estimativas de K_i da neostigmine para as variantes usual e atípica de pseudocolinesterase são mostradas na tabela IV.6. A menor afinidade da variante atípica pelo inibidor é evidenciada por um K_i cerca de 11 vezes maior que o apresentado pela variante usual para a mesma substância.

O histograma da distribuição das porcentagens de inibição da pseudocolinesterase obtidas segundo a técnica de MORROW e MOTULSKY (1968), de 80 amostras de soro, é mostrado na figura IV.11-A. A figura IV.11-B mostra o histograma da distribuição das porcentagens de inibição da pseudocolinesterase nas mesmas amostras de soro, obtidas segundo o procedimento descrito em III.9. Pode-se observar não haver interpenetração entre as distribuições dos dois grupos amostrais (58 indivíduos do fenótipo usual e 22 do fenótipo intermediário). A média de inibição para o fenótipo intermediário foi de 51% com desvio padrão de 5%, enquanto que para o fenótipo usual a média de inibição foi de 75% com desvio padrão de 3%.

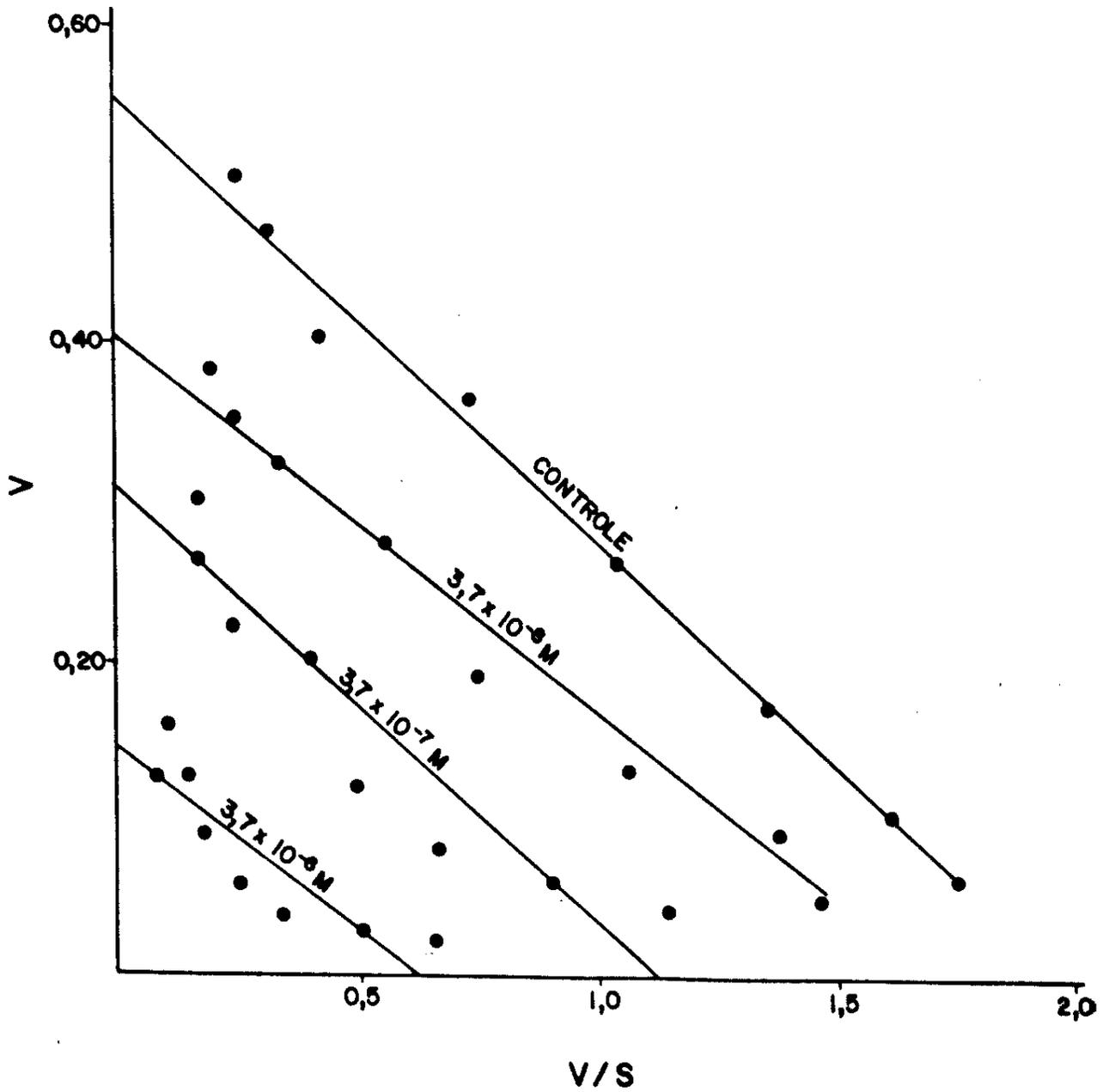


Figura IV.10 - Variação de v em função de v/s para a variante de pseudocolinesterase presente no soro de indivíduos do fenótipo intermediário em diferentes concentrações de neostigmine.

VARIANTE ENZIMÁTICA	Ki	<u>Ki ATÍPICA</u> Ki USUAL
Usual	$2,41 \times 10^{-7}$ M	10,83
Atípica	$2,61 \times 10^{-6}$ M	

Ki = constante do inibidor

Tabela IV.6 - Estimativas dos valores de Ki da neostigmine para as variantes usual e atípica de pseudocolinesterase.

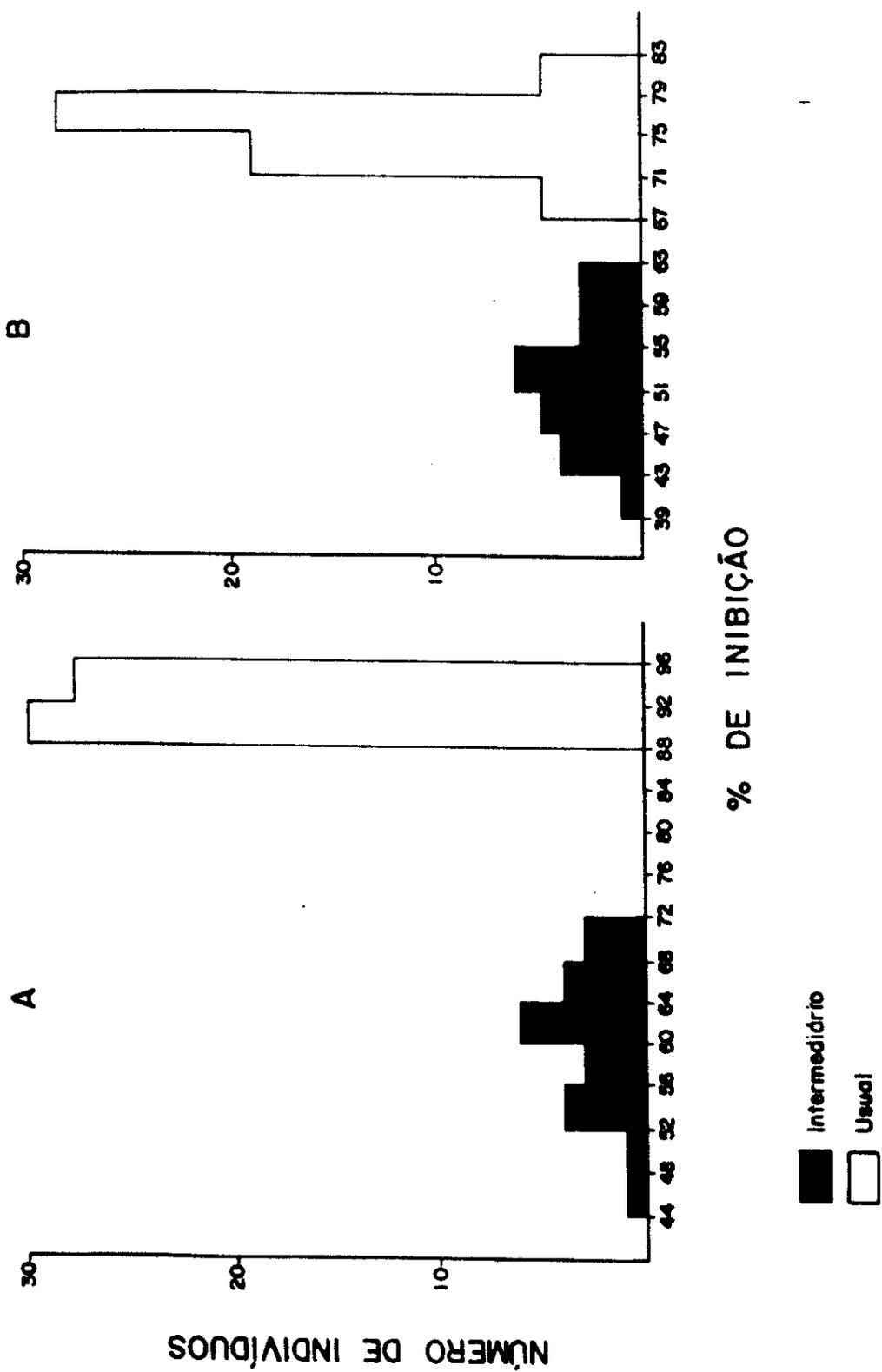


Figura IV.11 - Histogramas da distribuição das porcentagens de inibição da pseudocolinesterase presente no soro de 80 indivíduos (58 com fenótipo usual e 22 com fenótipo intermediário) obtidas segundo a técnica de MORROW e MOTULSKY (1968) (A) e o procedimento citado em III.9 (B).

CAPÍTULO V

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O emprego clínico da neostigmine (3-dimetilcarbamoxifenil trimetilamônio) foi iniciado em 1931, devido à sua ação estimulante do trato gastrointestinal. Essa substância, de grande estabilidade, possui um éster de ácido carbâmico associado a um nitrogênio quaternário (grupo amônio) na molécula (figura V.1). É apresentada comercialmente sob a forma de brometo ou metilsulfato, sendo esse último comercializado para uso parenteral em ampolas contendo soluções de 0,25, 0,5 ou 1 mg/ml (Prostigmine, Roche).

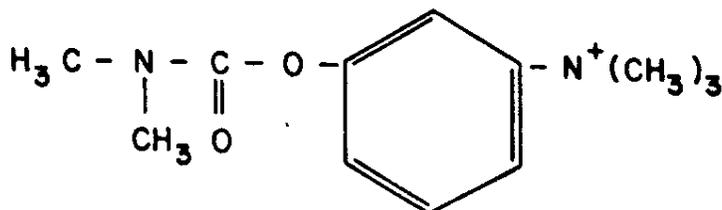


Figura V.1 - Fórmula estrutural da neostigmine.

Considerada um inibidor reversível de colines-

terase, a neostigmine é, na realidade, um substrato dessa enzima, cuja velocidade de hidrólise é extremamente baixa. Desse modo, a neostigmine liga-se aos sítios aniônico e esteréotípico da enzima, seguindo-se a liberação de 3-hidroxifenil trimetilamônio. A enzima carbamilada reage então com água, restando a enzima regenerada e ácido carbâmico. A taxa de combinação da neostigmine com a enzima pode ser considerada grande quando comparada com os passos seguintes da hidrólise, que são extremamente lentos. A inibição exercida sobre a colinesterase por essa substância deve-se, portanto, ao fato de ela ser um substrato competitivo da enzima, cuja hidrólise se processa muito lentamente (GOLDSTEIN, 1951; KOELLE, 1970).

A curva de inibição da pseudocolinesterase em função do logaritmo da concentração de neostigmine mostra haver relação equimolar entre a enzima e o inibidor, situando-se o valor de PI_{50} da variante usual em torno de 7,0, enquanto que no caso da variante atípica esse valor é de aproximadamente 5,5 (GOLDSTEIN, 1951; KALOW e DAVIES, 1958).

Apesar de a neostigmine ser, do ponto de vista molecular, um substrato competitivo da pseudocolinesterase, o mecanismo de inibição enzimática por essa substância está diretamente relacionado a uma pré-incubação com a enzima. Quando essa ocorre, a inibição é predominantemente não-competitiva. Por outro lado, quando substrato e inibidor são simultaneamente misturados à enzima, a inibição faz-se de modo competitivo e é menos intensa do que a obtida quando a enzima é pré-incubada com o inibidor. A inibição não-competitiva da pseudocolinesterase pela neostigmine pode ser explicada por meio de uma constante de dissociação do complexo enzima-inibidor extremamente baixa. Em outras palavras, o complexo enzima-inibidor, uma vez formado, é extremamente estável, residindo, nesse fato, a capacidade inibitória da neostigmine (GOLDSTEIN, 1951).

Os primeiros estudos comparativos da inibição exercida pela neostigmine sobre as variantes usual e atípica de pseudocolinesterase mostraram a importância da pré-incubação da enzima com essa substância, que foi, então, incluída entre os inibidores de ação lenta (KALOW e DAVIES, 1958). Tal fato tornou necessária a avaliação da velocidade de inibição das variantes de pseudocolinesterase em função do tempo de pré-incubação com essa substância. Os experimentos realizados à temperatura ambiente e a 37°C, cujos resultados são ilustrados nas figuras IV.1 e IV.3, mostraram que a inibição enzimática aumenta com o tempo de pré-incubação, com tendência a atingir um valor constante de acordo com a concentra -

ção do inibidor utilizada, como se pode observar pela curva de inibição da variante usual em ambos os casos. Essa tendência torna-se evidente quando se faz a pré-incubação a 37°C , ocasião em que a inibição da variante usual torna-se constante em 20 minutos. À temperatura ambiente, entretanto, essa constância só é atingida no quadragésimo minuto. Durante o intervalo de tempo no qual foi realizado o experimento, a variante atípica mostrou aumento linear da inibição, porém com maior inclinação da curva a 37°C , enquanto que a curva intermediária, em ambos os casos, foi bastante semelhante.

A variação das diferenças das porcentagens de inibição de pseudocolinesterase, tomados dois a dois, em função do tempo de pré-incubação com neostigmine, à temperatura ambiente e a 37°C , é semelhante nos dois casos, uma vez que tais diferenças aumentam até um determinado ponto, a partir do qual decrescem, exceto as diferenças U-I a 37°C . Esse máximo valor diferencial corresponde, obviamente, ao tempo de pré-incubação associado à maior discriminação entre os fenótipos de pseudocolinesterase considerados. A máxima diferença U-I, mais importante por relacionar os dois fenótipos mais frequentes, requer pré-incubação de 40 minutos à temperatura ambiente para a sua obtenção. Esse tempo está distante do necessário à obtenção da melhor discriminação U-A e I-A, situadas no intervalo de 20 a 30 minutos. Por outro lado, as maiores diferenças U-A e I-A a 37°C são coincidentes para um tempo de pré-incubação de 15 minutos e, nesse tempo, a diferença U-I é igual à obtida com 40 minutos de pré-incubação à temperatura ambiente. Desse modo, a fixação do tempo de pré-incubação de 15 minutos a 37°C é a medida mais indicada tendo em vista a discriminação simultânea dos fenótipos usual, intermediário e atípico de pseudocolinesterase (figuras IV.2 e IV.4).

A variação da inibição da pseudocolinesterase em função de concentrações crescentes de neostigmine, com pré-incubação de 15 minutos a 37°C , permitiu avaliar os valores de pI_{50} para as variantes usual e atípica em 6,85 e 5,65 respectivamente (figura IV.5 e tabela IV.1). Com relação à pseudocolinesterase presente no soro de indivíduos do fenótipo intermediário, sabe-se que ela é, na realidade, uma mistura das variantes usual e atípica, participando essa última com cerca de 30% a 44% do total (KALOW e DAVIES, 1958; LIDDELL et al., 1962). Com base nos dados da figura IV.5, pode-se estimar em 40% o componente da pseudocolinesterase atípica presente no soro intermediário. Levando-se em conta esse dado, a estimativa do pI_{50} para a pseudocolinesterase do soro de indivíduos do fenótipo intermediário, a partir dos valores de

pI_{50} para as variantes usual e atípica, fornece um valor igual a 6,37, muito próximo do valor 6,40, encontrado graficamente.

Uma vez que as curvas de inibição da pseudocolinesterase usual e atípica, mostradas na figura IV.5, são de conformação sigmóide, situando-se entre elas a curva de inibição da enzima presente no soro de indivíduos do fenótipo intermediário, o pI_{50} dessa última deve corresponder ao ponto de seu maior afastamento das outras curvas. De fato, a variação das diferenças das porcentagens de inibição U-A, I-A e U-I, em função de concentrações crescentes de neostigmine, atingem valor máximo, nos três casos, na concentração $3,7 \times 10^{-7}M$ do inibidor, correspondente ao pI_{50} da pseudocolinesterase do fenótipo intermediário (figura IV.6). Essa concentração de neostigmine mostrou-se, então, como a melhor discriminadora dos fenótipos usual, intermediário e atípico de pseudocolinesterase, sendo, assim, escolhida com esse propósito.

A escolha do acetato de alfa-naftila como substrato de pseudocolinesterase prendeu-se ao fato de essa substância, ao sofrer hidrólise por ação da enzima, produzir, como produto da reação, o composto alfa-naftol. A concentração desse último, por sua vez, é facilmente determinada por intermédio de método colorimétrico, uma vez que ele se acopla à 5-cloro-o-toluidina produzindo um composto de cor púrpura, cujo pico de absorção máxima encontra-se em 555 nm (GOMORI, 1953; BAMFORD e HARRIS, 1964; MORROW e MOTULSKY, 1968).

A cinética da hidrólise do acetato de alfa-naftila pela variante usual é significativamente diferente daquela mostrada pela variante atípica. Essa última mostra uma velocidade máxima de hidrólise do substrato igual à metade da velocidade máxima da reação catalisada pela variante usual. Por outro lado, o K_m do acetato de alfa-naftila para a variante atípica é praticamente o dobro do K_m para a variante usual. Já o K_m para a pseudocolinesterase presente no soro de indivíduos com fenótipo intermediário pode ser considerado igual ao da variante usual, embora a velocidade máxima seja menor que a dessa última. Além disso, o valor de V estimado para a pseudocolinesterase do soro intermediário confirma o fato de que esse fenótipo é constituído por 60% de pseudocolinesterase usual e 40% de atípica (tabela IV.2 e figura IV.7).

Parece importante assinalar que, apesar de os valores estimados de K_m do acetato de alfa-naftila para as variantes usual e atípica de pseudocolinesterase serem dife-

rentes dos relatados por BAMFORD e HARRIS (1964), os dados do presente trabalho são consistentes com a hipótese de que as diferenças principais entre essas variantes dizem respeito ao sítio aniônico. De fato, o acetato de alfa-naftila liga-se ao sítio esterático e a afinidade da enzima usual por esse substrato é cerca de duas vezes maior que a afinidade da enzima atípica. A neostigmine, por sua vez, prende-se a ambos os sítios ativos, isto é, aos sítios aniônico e esterático, e seu efeito inibidor deve-se, basicamente, à ligação do nitrogênio quaternário ao sítio aniônico (KOELLE, 1970). Como se pode observar na tabela IV.6, a estimativa do K_i da neostigmine para a enzima atípica é cerca de onze vezes maior que o K_i estimado para a variante usual, isto é, a pseudocolinesterase usual mostra uma afinidade pela neostigmine cerca de onze vezes maior que a revelada pela variante atípica. Essa diferença de afinidade é muito maior que a observada em relação ao acetato de alfa-naftila e ressalta a maior importância do papel do sítio aniônico na determinação das diferenças existentes entre essas duas variantes.

O mecanismo de inibição da pseudocolinesterase pela neostigmine, usando-se o acetato de alfa-naftila como substrato, após pré-incubação de 15 minutos a 37°C com o inibidor, é não-competitivo puro, tanto para a variante usual quanto para a atípica. A pseudocolinesterase presente no soro de indivíduos do fenótipo intermediário também é inibida da mesma forma nessas condições, uma vez que é uma mistura das outras duas (tabelas IV.3, IV.4 e IV.5 e figuras IV.8, IV.9 e IV.10). Desse modo, a porcentagem de inibição exercida por uma determinada concentração do inibidor independe da concentração do substrato utilizada.

A determinação dos fenótipos usual, intermediário e atípico de pseudocolinesterase, usando a neostigmine como inibidor para a discriminação da variante atípica da enzima, pode ser feita, portanto, de acordo com o procedimento descrito em III.9. O esquema seguinte pode ser usado como protocolo:

Reagentes

1. Tampão de fosfato 200 mM, pH 7,1.
2. Substrato (solução-estoque): acetato de alfa-naftila 30 mM em acetona, guardado em geladeira, que deve ser diluído em tampão de fosfato 200 mM e pH 7,1, no momento do uso, para fornecer uma solução contendo 0,6 mM de acetato de

alfa-naftila.

3. Inibidor: neostigmine $4,4 \times 10^{-6}$ M em tampão de fosfato 200 mM e pH 7,1.
4. Duponal (laurilsulfato de sódio) a 1,2%.
5. 5-cloro-o-toluidina 4 mg/ml em duponal a 1,2%, preparada no momento do uso.

Procedimento

	TUBO		
	CONTROLE	TESTE	BRANCO
Soro ou plasma a 1% em tampão de fosfato 200 mM e pH 7,1	0,05 ml	0,05 ml	-
Tampão de fosfato 200 mm e pH 7,1	0,05 ml	-	0,1 ml
Neostigmine $4,4 \times 10^{-6}$ M	-	0,05 ml	-
Incubar durante 15 minutos a 37°C			
Acetato de alfa-naftila 0,6 mM	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml
Incubar durante 30 minutos a 37°C			
5-cloro-o-toluidina 4 mg/ml em duponal a 1,2%	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml
Aguardar 15 minutos antes de proceder à medida da absorbância em 555 nm, para que se permita o completo desenvolvimento da cor.			

A porcentagem de inibição é calculada de acordo com a fórmula $(1 - \frac{\text{Absorbância do tubo teste}}{\text{Absorbância do tubo controle}}) \times 100$.

O histograma das porcentagens de inibição da pseudocolinesterase de 80 amostras de soro (58 do fenótipo usual e 22 do fenótipo intermediário), obtidas segundo o protocolo acima, está apresentado na figura IV.11-B. A figura

IV.11-A mostra o histograma da distribuição das porcentagens de inibição da pseudocolinesterase nas mesmas amostras de soro, obtidas segundo a técnica de MORROW e MOTULSKY (1968). Como se pode observar, a discriminação dos fenótipos usual e intermediário de pseudocolinesterase é completa e idêntica à discriminação conseguida com o uso da técnica de MORROW e MOTULSKY (1968), exceto que essa última técnica permite um maior afastamento entre os valores das porcentagens de inibição representativos de cada um desses dois fenótipos. De qualquer modo, a partir das estimativas da média e desvio padrão da inibição, pela neostigmine, da pseudocolinesterase usual e do fenótipo intermediário, pode-se considerar, ao nível de 5%, o intervalo de 69% a 81% de inibição enzimática para o primeiro e 41% a 61% para o segundo. Mesmo ao nível de 1%, as distribuições não mostram interpenetração, ficando as porcentagens de inibição da variante usual entre 67% e 83% e de 37% a 65% as porcentagens de inibição da enzima presente no soro de indivíduos do fenótipo intermediário.

A determinação dos fenótipos de pseudocolinesterase, segundo a técnica descrita no presente trabalho, fornece, portanto, os seguintes resultados: as porcentagens de inibição inferiores a 37% são representativas do fenótipo atípico (genótipo mais provável $E_1^a E_1^a$), as porcentagens de inibição maiores que 37% e menores que 65% indicam o fenótipo intermediário (genótipo mais provável $E_1^u E_1^a$), enquanto que valores acima de 67% indicam o fenótipo usual (genótipo mais provável $E_1^u E_1^u$). O único soro atípico disponível para os estudos realizados neste trabalho, dada a raridade de sua ocorrência na população, mostrou inibição de 15% pela neostigmine nas condições mencionadas.

Parece importante assinalar, ainda, que a discriminação dos fenótipos usual, intermediário e atípico pode também ser obtida sem o uso de espectrofotômetro para o cálculo da porcentagem de inibição, uma vez que a intensidade da cor produzida reflete a quantidade de substrato hidrolisado pela ação enzimática. Assim, segundo a técnica descrita, o tubo teste mostra cor púrpura fraca, discretamente mais intensa que a presente no tubo branco, e nitidamente menor que a do tubo controle, se o soro examinado é do fenótipo usual. Quando o soro é do fenótipo atípico, a intensidade da cor púrpura produzida é igual nos tubos teste e controle, e nitidamente mais intensa que a do tubo branco. Os soros do fenótipo intermediário, por sua vez, mostram a cor do tubo teste com intensidade intermediária em relação aos tubos controle e branco.

RESUMO

O autor descreve uma técnica simples e nova para a discriminação dos fenótipos usual, intermediário e atípico de pseudocolinesterase que utiliza a neostigmine a $3,7 \times 10^{-7}M$ como inibidor dessa enzima e o acetato de alfa-naftila a 0,5 mM como substrato. A pseudocolinesterase atípica mostra porcentagens de inibição menores que 37%, o fenótipo intermediário é caracterizado por porcentagens de inibição entre 37% e 65%, enquanto que valores superiores a 67% de inibição correspondem à variante usual. Essa mesma técnica permite, também, a discriminação dos três fenótipos citados à vista desarmada.

SUMMARY

The author describes a simple and new technique for discriminating the usual, intermediate and atypical pseudocholinesterase phenotypes. Such technique requires the use of $3.7 \times 10^{-7}M$ neostigmine for inhibiting pseudocholinesterase, and 0.5 mM alpha-naphtyl acetate as the substrate. Inhibition percentages lower than 37% indicate the atypical phenotype, values ranging from 37% to 65% characterize the intermediate phenotype, while percentages higher than 67% determine the usual phenotype. The discrimination of those phenotypes can also be performed without the use of a spectrophotometer.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLOTT, E. N. e THOMPSON, J. C. (1956). The familial incidence of low pseudocholinesterase level. Lancet, 2: 517.
- ALTLAND, K., EPPLE, F. e GOEDDE, H. W. (1967). Pseudocholinesterase variants in Thailand and Japan. Humangenetik, 4: 127 - 129.
- ARENDS, T., DAVIES, D. A. e LEHMANN, H. (1967). Absence of variants of usual serum pseudocholinesterase (acylcholine acylhydrolase) in South American Indians. Acta Genet., 17: 13 - 16.
- BAMFORD, K. F. e HARRIS, H. (1964). Studies on "usual" and "atypical" serum cholinesterase using alpha-naphtyl acetate as substrate. Ann. Hum. Genet. (London), 27:417:425.
- BEIGUELMAN, B. (1977). Genética Médica, vol. 2, Edart Livraria Editora Ltda. e Editora Universidade de São Paulo, São Paulo.
- BEIGUELMAN, B. (1979). Genética Médica, vol. 3, Edart Livraria Editora Ltda. e Editora Universidade de São Paulo, São Paulo.
- BOURNE, J. G., COLLIER, H. O. J. e SOMERS, G. F. (1952). Succinylcholine (succinoylcholine): muscle relaxant of short action. Lancet, 1: 1225 - 1229.
- DAVIES, R. O., MARTON, A. V. e KALOW, W. (1960). The action of normal and atypical cholinesterase of human serum upon a series of esters of choline. Can. J. Biochem. Physiol., 38: 545 - 551.
- DIXON, M. e WEBB, E. C. (1964). Enzymes, 2a. Ed., Longmans Green, and Co. Ltd., London.
- EVANS, F. T., GRAY, P. W. S., LEHMANN, H. e SILK, E. (1952). Sensitivity to succinylcholine in relation to serum cholinesterase. Lancet, 1: 1229 - 1230.
- GIBLETT, E. R. (1969). Genetic markers in human blood. Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edimburgh.
- GOEDDE, H. W. e ALTLAND, K. (1971). Suxamethonium sensitivity. Ann. N. Y. Acad. Sci., 179: 695 - 703.
- GOEDDE, H. W., ALTLAND, K. e BROSS, K. (1963). Genetik und biochemie der pseudocholinesterasen. Dtsch. Med. Wschr., 88: 2510 - 2522.
- GOLDSTEIN, A. (1951). Properties and behavior of purified human plasma cholinesterase. III. Competitive inhibition by

- prostigmine and other alkaloids with special reference to differences in kinetic behavior. Arch. Biochem. Biophys., 34: 169 - 188.
- GOMORI, G. (1953). Human esterases. J. Lab. & Clin. Med., 42: 445 - 453.
- GUTSCHE, B. B., SCOTT, E. M. e WRIGHT, R. C. (1967). Hereditary deficiency of pseudocholinesterase in Eskimos. Nature, 215: 322 - 323.
- HARRIS, H. e WHITTAKER, M. (1961). Differential inhibition of serum cholinesterase with fluoride: recognition of two new phenotypes. Nature, 191: 496 - 498.
- HARRIS, H. e WHITTAKER, M. (1962). The serum cholinesterase variants. A study of twenty-two families selected via the "intermediate" phenotype. Ann. Hum. Genet. (London), 26 : 59 - 72.
- HARRIS, H. e ROBSON, E. B. (1963). Screening tests for the "atypical" and "intermediate" serum cholinesterase types. Lancet, 2: 218 - 221.
- KALOW, W. (1959). The distribution, destruction and elimination of muscle relaxants. Anesthesiology, 20: 505 - 518.
- KALOW, W. (1972). Pharmacogenetics of drugs used in anesthesia. In: Proc. 4th Int. Cong. Hum. Genet. Excerpta Medica, Amsterdam, pp. 415 - 427.
- KALOW, W. e DAVIES, R. C. (1958). The activity of various esterase inhibitors towards atypical human serum cholinesterase. Biochem. Pharmacol., 1: 183 - 192.
- KALOW, W. e GUNN, D. R. (1959). Some statistical data on atypical serum cholinesterase of human serum. Ann. Hum. Genet., 23 : 239 - 250.
- KATTAMIS, C. ZANNOS-MARIOLEA, L., FRANCO, A. P., LIDDELL, J.; LEHMANN, H. e DAVIES, D. (1962). Frequency of the atypical pseudocholinesterase in British and Mediterranean populations. Nature, 96: 599 - 600.
- KAUFMAN, L., LEHMANN, H. e SILK, E. (1960). Suxamethonium apnoea in an infant: expression of familial pseudocholinesterase deficiency in three generations. Brit. Med. J., 1: 166 - 167.
- KOELLE, G. B. (1970). Anticholinesterase agents. In: The pharmacological basis of therapeutics (Goodman, L. S. e Gilman, A., eds.), 4a. Ed., The MacMillan Co., New York , pp. 442 - 465.
- KOELLE, G. B. (1970). Neuromuscular blocking agents. In: The pharmacological basis of therapeutics (Goodman, L. S. e

- Gilman, A., eds.), 4a. Ed., The MacMillan Co., New York , pp. 601 - 619.
- LEHMANN, H. e LIDDELL, J. (1969). Human cholinesterase (pseudocholinesterase): genetic variants and their recognition. Brit. H. Anaesth., 41: 235 - 244.
- LEHMANN, H. e RYAN, E. (1956). The familial incidence of low pseudocholinesterase level. Lancet, 2: 124.
- LEHMANN, H. e SIMMONS, P. H. (1958). Sensitivity to suxame - thonium: apnoea in two brothers. Lancet., 2: 981 - 982.
- LEHNINGER, A. (1975). Biochemistry, 2a. Ed., Worth Publi - shers, Inc., New York.
- LIDDELL, J. LEHMANN, H., DAVIES, D. e SHARIH, A. (1962). Phys - ical separation of pseudocholinesterase variants in hu - man serum. Lancet., 1: 463 - 464.
- LISKER, R., DEL MORAL, C. e LORIA, A. (1964). Frequency of atypical pseudocholinesterase in four Indian (Mexican) tri - bes. Nature, 202: 815.
- LITWILLER, R. W. (1969). Succinylcholine hydrolysis: a review. Anesthesiology, 31: 356 - 360.
- LOISELET, J. e SROUJI, G. (1968). Répartition de la cholines - terase mutante parmi les communautés libanaises. Comparai - son avec la répartition d'autres gènes. Ann. Génét., 11: 152 - 156.
- LUBIN, A. H., GARRU, P. J. e OWEN, G. M. (1971). Sex and pop - ulation differences in the incidence of a plasma cholin - esterase variant. Science, 173: 161 - 163.
- MAGNA, L. A., MORANDIN, R. C., PINTO JUNIOR, W. e BEIGUELMAN, B. (1980). Frequency of the atypical serum cholinesterase in Southeastern Brazilian Caucasoids. Rev. Brasil. Genet., 3: 329 - 337.
- MORROW, A. C. e MOTULSKY, A. G. (1965). Population genetics of pseudocholinesterase variants studied with a rapid screening test. Clin. Res., 13: 226.
- MORROW, A. C. e MOTULSKY, A. G. (1968). Rapid screening meth - od for the common atypical pseudocholinesterase variant. J. Lab. & Clin. Med., 71: 350 - 356.
- OMOTO, K. e GOEDDE, H. W. (1965). Pseudocholinesterase vari - ants in Japan. Nature, 205: 725.
- SIMPSON, N. E. (1966). Factors influencing cholinesterase ac - tivity in a Brazilian population. Amer. J. Hum. Genet. 18: 243 - 252.

- SIMPSON, N. E. e KALOW, W. (1965). Comparison of two methods for typing serum cholinesterase and prevalence of its variants in a Brazilian population. Amer. J. Hum. Genet., 17 : 156 - 162.
- SNEDECOR, G. W. e COCHRAN, W. G. (1967). Statistical methods, 6a. Ed., The Iowa State University Press, Ames.
- SZEINBERG, A., PIPANO, S. e OSTFELD, E. (1966). Frequency of atypical pseudocholinesterase in different population groups in Israel. Acta Anaesth. Scand., Supp. 24:196-205.
- WHITTAKER, M. (1970). Genetic aspects of succinylcholine sensitivity. Anesthesiology, 32: 143 - 150.
- WHITTAKER, M., LOEW, R. F. e ELLIS, B. P. B. (1976). Serum cholinesterase variants in African leprosy patients resident in Rhodesia. Hum. Hered., 26: 372 - 279.