

BC/37232

IB/80782

Paulo Latuf Filho

**Importância da atividade da
pseudocolinesterase em pacientes
portadores de hepatopatias
crônicas.**



UNICAMP

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP,
para obtenção de título de Doutor em Ciências,
área de Genética e Evolução.

Orientador: Prof. Dr. Luís Alberto Magna

T/UNICAMP

L357_i

Paulo Latuf Filho

Importância da atividade da
pseudocolinesterase em pacientes
portadores de hepatopatias crônicas.

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo (a) candidato a)
Paulo Latuf Filho
e aprovada pela Comissão Julgadora
16/12/98

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP,
para obtenção de título de Doutor em
Ciências, área de Genética e Evolução.

Orientador: Prof. Dr. Luís Alberto Magna

Campinas, 16 de dezembro de 1998.

UNIDADE	IB
N.º CHAMADA:	

V.	Ex
T.	3 F 232
PRE.	229 / 99

PRE.	2911,00
DATA	07 / 04 / 99
N.º OFIC.	10022900-0

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

Latuf Filho, Paulo

L358i Importância da atividade pseudocolinesterase em
pacientes portadores de hepatopatias crônicas/Paulo
Latuf Filho. -- Campinas, SP:[s.n.], 1998.
50f.:ilus.

Orientador: Luís Alberto Magna

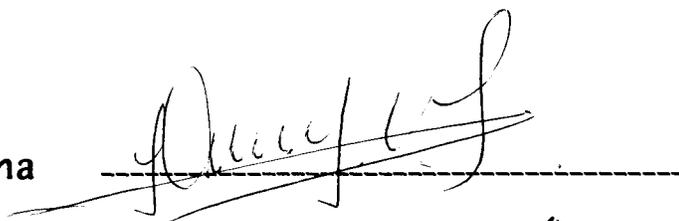
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Colinesterase sérica. 2. Doença sérica. 3. Cirrose hepática.
I. Magna, Luís Alberto. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. III. Título.

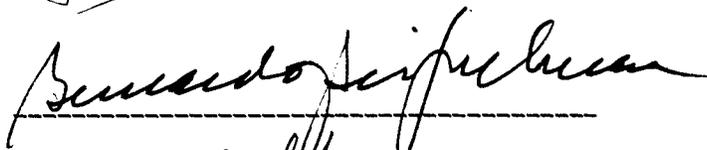
Banca examinadora:

Titulares:

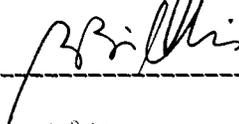
Prof. Dr. Luís Alberto Magna
(Orientador)



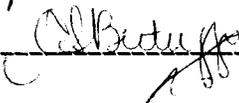
Prof. Dr. Bernardo Beiguelman



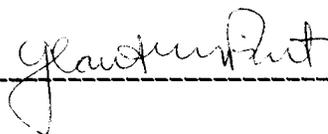
Prof. Dr. Athanase Billis



Prof. Dra. Carmem Sílvia
Bertuzzo



Prof. Dra. Glauce Aparecida
Pinto



Suplentes:

Prof. Dr. Walter Pinto Jr.



Prof. Dr. Júlio Boschinni



*Meu pai sempre me dizia:
"Meu filho tome cuidado,
Quando eu penso no futuro,
Não esqueço meu passado".*

(Este verso foi retirado do samba "Dança da solidão" do Mestre Paulinho da Viola).

AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho às minhas queridas filha e irmã, Júlia e Toce.

Duas pessoas muito especiais que participam de forma muito intensa na minha vida, me proporcionando momentos de profunda alegria e emoção.

A Júlia com sua alegria, companheirismo e o seu carinho tão meigo e a Toce, com sua amizade sincera e incondicional.

À vocês, meu sincero e eterno agradecimento.

Ao grande e verdadeiro Amigo, Professor Bernardo Beiguelman, pessoa inigualável, pela qual tenho enorme e sincera admiração e gratidão, que sempre esteve presente colaborando e enriquecendo o meu desenvolvimento profissional e pessoal. É, enfim, copiando Vinícius, “uma pessoa que eu amo, sem sexo.”

À Carmem, grande amiga (e hoje membro da banca) pela sua constante disponibilidade e principalmente, pelo seu alto astral (talvez uma característica dos nascidos em 1963).

À Glauce, colega de pós-graduação, que fez questão da sua participação na banca, pela sua capacidade e honestidade profissional e, principalmente, pela solidariedade demonstrada num momento “complicado” da minha vida.

Ao Prof. Dr. Athanase Billis, pela participação tão especial nesta banca e pela abertura que me proporcionou dentro do departamento onde trabalha, o que me proporcionou um novo alento.

Ao Diretor da Faculdade de Odontologia da USF, Prof. Dr. Rossine A. Maciel, pelo apoio e pela impressão gráfica deste trabalho.

Aos funcionários e secretárias das Faculdades de Odontologia e Medicina da USF, Rubens, Jurandir, João, Adriano, Robson, Ângela, Ana, Dona Maria, Eliane e Inês, pelo carinho e tratamento especial que sempre me oferecem.

Aos funcionários do Laboratório de Análises Clínicas do HUSF, em especial à Rosana, pela estocagem e cuidado com o material.

À acadêmica Fabiana e à Dra. Débora Cuccino, pela coleta dos dados clínicos e a atenção com os pacientes.

A todos os docentes do Departamento de Anatomia Patológica, em especial ao Prof. Dr. José Vassalo pela confiança e estímulo.

Aos colegas do Departamento de Anatomia Patológica, Beth, “Dona” Sílvia, “Donas Geraldas”, Mariagina, Zezé, Rita, Darci, Flávia, Ivete, Malvina, Luzia, Carlinhos, Marcão (fotógrafo) e Ismael. E em especial às pessoas cujo contato inicial foi mais próximo, ou seja, Sérgio, Luisão, Cido, Cláudia, Léa, Priscila, Divani, Marilúcia, Ana Alzira e Carmo, pelo apoio, amizade e confiança.

Aos amigos da UNICAMP, Toninho, Henry, Jossimar, Sônia Alípio, Nilma, Juliana, Roberto, Claudinha, Sônia e Rosana, pela amizade não modificada à distância.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação e das Bibliotecas do IB e da FCM, Tereza, Cláudia, Lia, Norma, Zilda, Josie e Cristiano (Bart), pela atenção e dedicação.

Ao Emerson do Serviço de Informática, pela sua competência profissional. À você, saudações alvi-verdes.

À psicóloga Gisleine, pela sua conduta profissional no auxílio à busca do meu “eu interior”.

Aos docentes e funcionários do Departamento de Morfologia da PUC-S.P., em especial à Profa. Dra. Lenita Sampaio, pela sua compreensão, e à Marí, pelos favores e atenção.

Ao Prof. Dr. Júlio Boschinni pelo incentivo e consideração.

Ao Deputado Estadual Caldini Crespo, pela disponibilidade, integridade e sinceridade demonstrada, coisa tão rara nos políticos brasileiros.

Aos meus pais, pela eterna dedicação e empenho para minha formação profissional. Pelo carinho e amor sempre presentes em nossa casa e que foram fundamentais para a minha formação pessoal.

Ao Rubens, Lúcia, Ofélia, Lúcia Cristina, Luís Antônio, Sandra, Minás, Anielle, Lucas e “ao que vai chegar”, pela adoção sincera e carinhosa, que é muitíssimo recíproca.

E enfim, ao meu orientador, Luís Alberto Magna, pela confiança, não só profissional e por sua orientação que muito serviu para o meu amadurecimento profissional e pessoal.

Os agradecimentos de uma tese nunca devem ser restritos àquelas pessoas que somente participam diretamente do trabalho desenvolvido. Pois sem o bom humor, carinho, compreensão e amizade das pessoas que nos rodeiam no dia a dia, fica muito difícil se desenvolver qualquer atividade. Por isso reconheço nas pessoas citadas acima uma grande parcela de colaboração neste trabalho.

AGRADECIMENTO ESPECIALÍSSIMO:

À Ana Cristina, “TurKinha”, que deu luz e um colorido todo especial à minha vida, me transformando num verdadeiro “escravo da alegria”.

Meu sincero agradecimento pela sua amizade, companheirismo e, principalmente, pelo amor que nos uniu e serviu de suporte para superarmos a ansiedade e as dificuldades encontradas no caminho. Que ele se multiplique e nunca se acabe.

Te amo muito.

SUMÁRIO

RESUMO	01
INTRODUÇÃO	02
➤ Histórico	02
➤ Colinesterases	04
➤ Acetilcolinesterase (EC 3.1.1.7)	06
➤ Pseudocolinesterase (EC 3.1.1.8)	07
➤ Anticolinesterásicos	10
➤ Variantes genéticas da pseudocolinesterase	11
➤ Variante atípica	11
➤ Variante tipo fluoreto	19
➤ Variante “silenciosa”	20
➤ Variantes K, H e J	21
➤ Outras variantes	23
➤ Outras causas de alteração da atividade da pseudocolinesterase	25
OBJETIVOS	31
METODOLOGIA	32
➤ Casuística	32
➤ Obtenção das amostras de soro	33
➤ Classificação de Child-Pugh	33
➤ Dosagem da atividade da pseudocolinesterase	34
➤ Análise estatística	35
RESULTADOS	37
DISCUSSÃO	42
CONCLUSÃO	44
SUMMARY	45
BIBLIOGRAFIA	46

RESUMO

A pseudocolinesterase (EC 3.1.1.8), também conhecida como colinesterase sérica ou butirilcolinesterase, é uma enzima detectada no soro sangüíneo, no pâncreas, no coração e na substância branca do cérebro mas, é no fígado que ela está presente em maior concentração.

O objetivo deste trabalho foi o de rever a literatura pertinente sobre as causas de diminuição da atividade da pseudocolinesterase, incluindo determinar a atividade dessa enzima em uma amostra de pacientes portadores de hepatopatias crônicas para averiguar a correlação entre o grau de comprometimento hepático e a atividade dessa enzima em comparação com outras variáveis, rotineiramente utilizadas com o mesmo propósito.

Para isso, foram examinados 49 pacientes portadores de hepatopatias crônicas, cujo estágio clínico foi determinado pela classificação de Child-Pugh. Um grupo de 132 indivíduos sadios, doadores de sangue, prestou-se ao fornecimento de amostras de sangue para a determinação da distribuição normal da atividade da pseudocolinesterase.

De acordo com os resultados encontrados, a grande maioria dos pacientes (72%) avaliados como grau A da classificação de Child-Pugh apresentaram atividade da pseudocolinesterase dentro do intervalo de confiança dos valores observados entre indivíduos sadios (0,183 a 0,567 U). Essa proporção diminuiu entre os pacientes com grau B, entre os quais 29,4% mantém sua atividade enzimática dentro do intervalo normal, enquanto que 70,6% mostraram atividade da pseudocolinesterase abaixo do limite inferior da observada entre os indivíduos sadios. Finalmente, os pacientes classificados como grau C apresentaram, em sua grande maioria (71,4%), atividade da pseudocolinesterase abaixo do limite inferior do intervalo normal obtido entre os indivíduos sadios.

Depois de aplicar uma análise de regressão múltipla do tipo escalonado aos dados coletados chegou-se à seguinte fórmula para estimar o estágio clínico do comprometimento hepático de pacientes com hepatopatia crônica:

$$y = 2,995 - 2,0912 [\text{PsChE}] - 0,2650 [\text{Alb}]$$

Onde y é a estimativa do grau de comprometimento hepático, $[\text{PsChE}]$ é a atividade da pseudocolinesterase expressa em U e $[\text{Alb}]$ é a concentração de albumina sérica.

I. INTRODUÇÃO

I₁. Histórico:

A história das colinesterases remonta ao final do século passado e, basicamente, coincide com a história do mecanismo neuro-humoral, quando Lewandowsky (1898) e Langley (1901) verificaram a similaridade entre os efeitos da injeção de extratos de glândulas supra-renais e a estimulação dos nervos simpáticos (Mendel e Rudney, 1943; Rocha e Silva, 1973; Koelle, 1975).

A partir de 1905, um grande impulso foi dado nessa área com a participação dos, assim chamados, “fundadores” da mediação química da transmissão nervosa, dentre os quais destacam-se Elliot (1905), Langley (1905), Dixon (1907), Hunt e Taveaux (1906), Henry Dale (1914) e Otto Loewi (1921) (Rocha e Silva, 1973).

Dessa forma, um estudante de fisiologia da Universidade de Cambridge, Inglaterra, T.R. Elliot, em 1905, postulou que os impulsos nervosos simpáticos liberam uma substância semelhante à adrenalina, em contato com as células efetoras, atribuindo a ela a mediação química da transmissão. Nesse mesmo ano, Langley sugeriu que as células efetoras têm substâncias receptivas inibitórias e excitadoras (Rocha e Silva, 1973; Koelle, 1975).

Dixon, em 1907, observou a correspondência entre os efeitos da muscarina e as respostas à estimulação vagal e, enquanto isso, Reid Hunt anunciou seus estudos sobre a acetilcolina (ACh) e outros ésteres de colina (Koelle, 1975).

Já em 1914, Henry Dale, revendo os estudos farmacológicos da ACh criou as expressões colinérgico e adrenérgico (termos propostos para descrever neurônios que liberavam diferentes mediadores químicos) e, também, parassimpatomimética e simpatomimética (para designar as substâncias que mimetizam as ações dos sistemas parassimpático e simpático, respectivamente). Ao notar a breve duração de ação da ACh, ele propôs a existência de uma esterase tecidual que desdobraria muito rapidamente esta substância em colina e ácido acético (Rocha e Silva, 1973; Koelle, 1975).

Em Viena, no inverno de 1921, o farmacologista Otto Loewi estudando coração de rãs descreveu, em histórico experimento, o papel real da acetilcolina, a qual denominou *vagusstoff*, como mediador químico (Rocha e Silva, 1973; Koelle, 1975).

Na Universidade de Edinburgh em 1932, Ellen e Edgar Stedman, demonstraram a presença da esterase proposta por Dale em eritrócitos de cavalos e denominaram-na *choline-esterase*, denominação que, com ou sem hífen, persiste até hoje (Stedman *et al.*, 1932; Brown *et al.*, 1981; Rocha e Silva, 1973).

Além disso, Stedman e Stedman também detectaram a existência de um outro tipo de colinesterase, dita não específica, presente no soro sangüíneo e no extrato de fígado de gatos e porcos, cuja especificidade e afinidade pelo substrato difere significativamente da enzima eritrocitária (Stedman *et al.*, 1932).

Subseqüentemente, em 1940, Ales e Howes demonstraram, em sangue humano, não só a presença da enzima sérica e eritrocitária, como, também, confirmaram as hipóteses de Stedman e Stedman com relação às suas diferenças qualitativas, principalmente a especificidade a substratos, demonstrando que a enzima sérica hidrolisa mais rapidamente a propionilcolina e a butirilcolina que a acetilcolina, que por sua vez, é hidrolisada mais rapidamente pela enzima eritrocitária (Massoulié e Bom, 1982).

A tabela 1 resume as diferenças de atividade das colinesterases frente a diferentes substratos.

Esta hipótese foi amplamente comprovada por Mendel e Rudney em 1943, que chamaram de colinesterase “não específica” ou pseudocolinesterase a enzima sérica. Augustinsson e Nachmansohn (1949) introduziram o termo acetilcolinesterase para a enzima eritrocitária (Mendel e Rudney, 1943; Massoulié e Bon, 1982).

Atualmente sabe-se que as duas enzimas diferem também com relação a padrões de inativação termal e imuno-reatividade, além de demonstrarem diferenças quanto à sensibilidade a inibidores (Koelle, 1975).

Tabela 1: Atividade das colinesterases pela sua ação sobre substratos específicos.

SUBSTRATOS	ACETILCOLINESTERASE	COLINESTERASE
Acetilcolina	++	+
Mecolil	+	-
Acetil- α -metilcolina	+	+
Butirilcolina	-	++
Benzoilcolina	-	+

I₂. Colinesterases:

As colinesterases estão presentes em todas as classes de vertebrados e pertencem a uma classe de hidrolases da serina que inclui muitas proteases, como, por exemplo, a tripsina (Atack *et al.*, 1986; Massoulié e Bom, 1982).

Quanto à nomenclatura das colinesterases, existe, ainda hoje, um certo desencontro quanto àquela que deva ser utilizada para designar essas enzimas, uma vez que os diferentes autores citados acima, entre outros, sugeriram diversos nomes para elas, ora baseados na especificidade ao substrato, ora baseados na sua localização tecidual. Nos trabalhos mais antigos, a enzima eritrocitária é denominada como “acetil-colinesterase”, “colinesterase específica”, ou ainda, “colinesterase verdadeira”, enquanto a colinesterase plasmática é denominada “butiril-colinesterase”, “colinesterase inespecífica” ou, ainda, “pseudocolinesterase” (Brown, 1981).

Uma vez que ambas as enzimas são, em algum grau, não específicas, esses nomes não são recomendados pela Comissão de Nomenclatura Bioquímica da União Internacional de Bioquímica e, dessa forma, os nomes triviais, “acetilcolinesterase” e “colinesterase” devem ser usados para as enzimas, eritrocitária (E.C. 3.1.1.7) e plasmática (E.C. 3.1.1.8), respectivamente. Mesmo assim, a grande maioria dos trabalhos atuais ainda utilizam a nomenclatura antiga (Rocha e Silva, 1973; Whittaker, 1980; Brown *et al.*, 1981), sendo essa a razão pela qual neste trabalho, também, se utilizará a nomenclatura antiga, principalmente com relação à enzima sérica, que é o cerne central desta pesquisa.

As colinesterases representam complexas associações de sub-unidades catalíticas e estruturais, sendo conhecidas seis possíveis

formas poliméricas dessas enzimas, divididas em duas classes distintas, globular e assimétrica, que podem ser ligadas à membrana ou associadas à matriz extra-celular. Essa classificação se baseia na ausência ou presença de uma “cauda” semelhante a um colágeno (Massoulié e Bon, 1982; Atack *et al.*, 1986; Layer e Willbold, 1995).

A forma globular, predominante em vertebrados, pode ser hidrofílica (solúvel) ou ligada à membrana. Em humanos, pode ser detectada no sangue, fígado, sistema urogenital, trato digestivo e placenta, assim como em algumas glândulas endócrinas e exócrinas (Layer e Willbold, 1995). É formada de sub-unidades globulares catalíticas, que constituem as formas solúveis encontradas no plasma (pseudocolinesterase) e no líquido (acetilcolinestraxe) constituída de 1, 2 ou 4 sub-unidades ativas, designadas, respectivamente, G1, G2 e G4, que foram chamadas por Harris, Hopkinson e Robson, em 1962, de C1, C2 e C4 (Atack *et al.*, 1986; Chatonnet e Lockridge, 1989).

A forma assimétrica das colinesterases é prevalente, particularmente, nas junções neuromusculares, sendo detectada, também, no músculo cardíaco e nos gânglios periféricos. Essa forma consiste de polímeros de 1, 2 ou 3 tetrâmeros (designados, respectivamente, A4, A8 e A12), ligados por pontes dissulfídicas, apresentando-se como “caudas” semelhantes ao colágeno ou a glicolípídios, através das quais são ancoradas à membrana basal (Atack *et al.*, 1986; Chatonnet e Lockridge, 1989).

A ampla e variada distribuição das diferentes formas de colinesterase foi estudada em várias espécies (rato, galinha, macaco, peixes e humanos). Embora o verdadeiro significado funcional dessa variada expressão não seja conhecido, sugere-se que sua distribuição tecidual específica seja um reflexo das diferentes ações fisiológicas desempenhadas por elas nos diferentes tecidos (Atack *et al.*, 1986).

Ficaram muito bem estabelecidas, também, as aplicações do estudo das colinesterases nas áreas toxicológica, farmacológica e médica, haja vista o aparecimento de numerosos fármacos, entre os quais, os chamados anticolinesterásicos, com capacidade de inibição dessas enzimas, produzindo efeitos semelhantes aos da acetilcolina, assim como alguns anestésicos locais e relaxantes musculares que são hidrolisados pela pseudocolinesterase.

I₃. Acetilcolinesterase (EC 3.1.1.7):

Devido ao importante papel desempenhado pela acetilcolinesterase (AChE) na neurotransmissão, tanto no sistema nervoso central quanto no periférico de vertebrados e invertebrados, muitos trabalhos multidisciplinares foram desenvolvidos no decorrer deste século (Clitherow *et al.*, 1963).

A acetilcolinesterase (AChE), cujo peso molecular está próximo de $3,0 \times 10^6$, ocorre em eritrócitos, placenta, veneno de certos ofídios, tecidos de enguia e, principalmente, em tecido nervoso humano, onde está localizada na parte externa da membrana basal, em situação preferencialmente pré-juncional com a função primordial de hidrolisar a acetilcolina (ACh) liberada pelo impulso nervoso, decompondo-a em colina e ácido acético (Watanabe e Katzung, 1994; Zanini e Oga, 1985).

Cada molécula da enzima, que possui dois sítios ativos, um dito aniônico e outro dito esterásico, dispõe de atividade para hidrolisar $2,1 \times 10^7$ moléculas de acetilcolina por minuto, considerada “velocidade relâmpago” por Henry Dale. Essa hidrólise, na verdade, equivale a uma verdadeira inativação, porquanto a colina é cerca de 100.000 vezes menos ativa que a acetilcolina. Tal enzima, no entanto, é inibida quando em presença de excesso de substrato (LaMotta e Waronick, 1971; Rocha e Silva, 1973; Koelle, 1975; Zanini e Oga, 1985).

A hidrólise da acetilcolina é efetuada em três etapas. Na primeira, ocorre a formação reversível de um complexo entre a acetilcolina e a enzima, no qual as ligações principais são formadas com o sítio catiônico da acetilcolina e o átomo carbonil do grupo éster.

A segunda etapa resulta na transferência do grupo acil por intermédio de um ataque nucleofílico sobre o grupamento carbonil do éster por um resíduo de serina da enzima, que libera colina e forma uma enzima acetilada intermediária.

Na terceira e última etapa ocorre a hidrólise da enzima acetilada que produz acetato e íons hidrogênio, regenerando a enzima (Westfall, 1976).

A distribuição da AChE foi, inicialmente, descrita em tecido muscular em 1937 por Marnay e Nachmansohn, que detectaram uma

alta concentração de AChE foi detectada nas junções neuromusculares e nas placas nervosas terminais (Massoulié e Bon, 1982).

A localização celular dessa enzima nos diferentes tecidos e em diferentes espécies foi extensamente investigada e ficou demonstrado que essa localização está intimamente relacionada com o seu papel fisiológico relativamente específico, ou seja, a inativação da ACh. A enzima é facilmente demonstrada por técnicas histoquímicas nas quais a acetilcolina é utilizada como substrato e a tiocolina resultante é empregada para formar um precipitado de sulfeto de cobre (Watanabe e Katzung, 1994).

A forma solúvel da AChE, onde a forma C4 é a mais presente e ativa, pode ser secretada pelas terminações nervosas colinérgicas, onde parece ter um papel na regulação da concentração da acetilcolina livre (Massoulié e Bon, 1982; Koelle, 1975).

A forma ligada à membrana ocorre em locais inesperados, como o eritrócito, onde sua função é desconhecida (Watanabe e Katzung, 1994).

No sistema nervoso central as diferenças na concentração dessa enzima também são visíveis. Com algumas exceções, existem correlações aceitáveis entre as concentrações de AChE, ACh e colina acetiltransferase (Rocha e Silva, 1973; Koelle, 1975).

As múltiplas formas das colinesterases existentes nos vários tecidos, a estrutura dos genes envolvidos, assim como a sua biossíntese e regulação foram estudadas independentemente por Rachinski e cols, Li e cols, Maulet e cols e Rotundo e cols. Para as diferentes formas da acetilcolinesterase foi identificado um loco gênico localizado no braço longo do cromossomo 7, mais especificamente na região 7q22 (Brown *et al.*, 1981; Layer e Willbold, 1995).

I.4. Pseudocolinesterase (EC 3.1.1.8):

A pseudocolinesterase é uma glicoproteína solúvel, com peso molecular de, aproximadamente, 342.000 daltons, apresentando vários resíduos de ácido siálico na sua porção terminal. Essa enzima

tem um período de meia-vida que varia entre 8-12 dias e apresenta uma ampla distribuição tecidual, sendo detectada no fígado, na pele, no cérebro, na musculatura lisa gastrointestinal além do plasma sangüíneo (Pedersen e Jensen, 1994).

O local da síntese dessa enzima é o fígado, mais especificamente nos ribossomos dos hepatócitos (Saez-Alquezar, 1983).

A molécula consiste de 4 sub-unidades idênticas ou cadeias peptídicas, cada uma contendo 574 resíduos de aminoácidos, nove cadeias de carboidrato e um sítio ativo, interligadas por pontes dissulfídicas e forças hidrofóbicas não covalentes (Jensen *et al.*, 1995).

Em gel de eletroforese bi-dimensional, Harris e cols., em 1962, notaram, pela primeira vez, o aparecimento de quatro bandas dessa enzima, designadas, C1, C2, C3 e C4. Esta última, banda C4, é a que se move mais lentamente no gel e contém por volta de 90% da enzima ativa. Essa isozima parece diferir das demais no seu peso molecular e se apresenta como um tetrâmero, resultante da associação de dois dímeros ligados por pontes dissulfídicas (LaMotta e Waronick, 1971; Atack *et al.*, 1986; Chatonnet e Lockridge, 1989; Pedersen e Jensen, 1994).

As bandas C1, C2 e C3 movem-se mais rapidamente que a C4, sendo que essa velocidade diminui progressivamente da banda C1 para a C3 (LaMotta e Waronick, 1971). Isso sugere que a pseudocolinesterase forma uma família de isozimas, cujas diferentes formas moleculares se expressam sob distintos comportamentos eletroforéticos, que variam nos substratos e inibidores utilizados. Até hoje foram descritas, pelo menos, sete isozimas distintas, cuja nomenclatura recomendada para sua designação utiliza a inicial "Che", seguida de numeral arábico (LaMotta e Waronick, 1971).

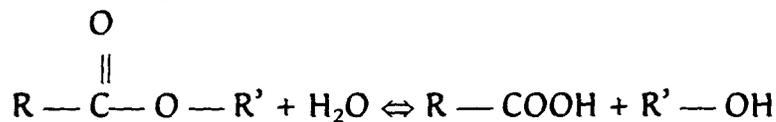
A função fisiológica dessa enzima permanece desconhecida até hoje, embora ela pareça estar envolvida na hidrólise de ésteres de colina que inibem a acetilcolinesterase. Isso inclui substâncias como a propionilcolina e a butirilcolina (que podem ser formadas *in vitro* pelos sistemas enzimáticos responsáveis pela síntese da acetilcolina e também podem ser originadas pela ação da flora bacteriana do intestino) (Funnel e Oliver, 1965; Lehmann e Liddel, 1969; Brown *et al.*, 1981; Pedersen e Jensen, 1994).

Clitherow e colaboradores sugeriram que essa enzima desempenharia um papel no metabolismo dos lipídios no fígado, hidrolisando a butirilcolina formada do complexo butiril-coA que, nesse tecido, tem uma ação nicotínica (Clitherow *et al.*, 1963; Funnel e Oliver, 1965).

Como essa enzima também está presente na matriz da substância branca do cérebro, em associação com outras células neuronais específicas, em várias regiões do cérebro de ratos, gatos, macacos e humanos, sugere-se um papel biológico dessa enzima, não só no processo de neuro-transmissão nessas áreas, como também no processo de mielinização, uma vez que os inibidores da pseudocolinesterase interferem neste processo (Atack *et al.*, 1986; Kutty e Payne, 1994).

Assim como a AChE, a PSChE apresenta dois sítios ativos. O primeiro deles, considerado sítio aniônico, é uma região da molécula carregada negativamente, com um resíduo de glutamato que se liga ao átomo de nitrogênio quaternário do substrato. O segundo, considerado sítio esterásico, contém um anel imidazólico de histidina e um grupamento hidroxila da serina (Lehman e Liddel, 1969).

A hidrólise catalítica ocorre por um mecanismo comum a outras hidrolases da serina, mediante o qual o grupamento acetila é transferido para o grupamento hidroxila da serina e gera (transitoriamente) uma molécula acetilada da enzima e uma molécula de colina livre. A enzima com seu sítio acetilado reage rapidamente com a água, produzindo ácido acético e a enzima com seu sítio ativo regenerado (Lehman e Liddel, 1969; Kutty e Payne, 1994). A equação abaixo representa de modo geral, a reação geral catalisada pela pseudocolinesterase:



A biossíntese da enzima é controlada por um gene chamado CHE₁ (E₁), localizado no cromossomo 3, na região 3q21-q26, provavelmente ligado ao gene da transferrina. Esse gene descrito pela primeira vez

por La Du e cols. em 1990, tem, aproximadamente, 80 kilobases. Sua região codificadora, de 1722 pares de bases está distribuída entre quatro éxons, sendo 83% dessa região contida no éxon 2, incluindo a seqüência do sítio ativo serina 198. Estudos utilizando hibridização *in situ*, revelaram a existência de um outro gene, chamado CHE₂ (E₂), localizado no braço longo do cromossomo 16 (Lovrien *et al.*, 1978; Soreq *et al.*, 1987; Pedersen e Jensen, 1994; Layer e Willbold, 1995).

I.4ª Os anticolinesterásicos:

Os inibidores das colinesterases representam o segundo maior grupo de drogas que produzem efeitos semelhantes aos da acetilcolina, sendo o resultado da inibição destas enzimas envolvidas na hidrólise da acetilcolina (Westfal, 1976).

Os efeitos farmacológicos desses componentes devem-se, principalmente, à sua ação sobre a acetilcolinesterase, cuja inibição resulta no acúmulo de quantidades excessivas do transmissor colinérgico na região sináptica. Eles podem ter uso clínico, como por exemplo no tratamento do glaucoma, da miastenia grave e da atonia dos tratos gastrintestinal e urinário, mas podem, também, ser ingredientes ativos de inseticidas potentes. Já foram muito utilizados, também, como agentes de guerra química (Koelle, 1975; Westfal, 1976).

Eles podem ser enquadrados em três grupos químicos, ou seja: 1) álcoois simples contendo um grupamento de amônio quaternário (edofrônio); 2) ésteres do ácido carbâmico de álcoois que têm grupamentos de amônio terciário ou quaternário (neostigmina); e 3) derivados orgânicos do ácido fosfórico (organofosforados, isofluorato) (Miller, 1994).

Geralmente costumam-se classificar os inibidores das colinesterases levando-se em conta o tipo de interação química que ocorre entre o inibidor e a enzima; assim temos os inibidores reversíveis, onde podemos destacar o edofrônio, a fisostigmine e a neostigmine, e os inibidores irreversíveis, ou seja, os compostos organofosforados (isofluorato (DFP), ecotiofato, paration, entre outros) (Westfal, 1976).

Com relação a esse último grupo vale ressaltar o trabalho de Ratner (1989), que relatou a existência de uma variação sazonal nos níveis de pseudocolinesterase de uma amostra populacional da região rural de Afula (Israel). Segundo esse autor havia uma diminuição significativa nos níveis de pseudocolinesterase dessas pessoas no segundo verão de observação, quando comparado com os níveis exibidos no inverno. Provavelmente, esses níveis estejam reduzidos por causa da alimentação ingerida no verão anterior, basicamente à base de frutas e legumes “contaminados” com pesticidas, uma vez que nessa população não existem outros fatores que levariam à diminuição da atividade da enzima, como por exemplo, doenças hepáticas ou uso de drogas.

I_{4b}. As variantes genéticas da Pseudocolinesterase:

Existem mais de cinco variantes alelomórficas da pseudocolinesterase, cuja biossíntese é controlada por diferentes genes. A grande maioria dessas variantes está associada com uma diminuição na afinidade pelo substrato (LaMotta e Waronick, 1971). As principais variantes serão descritas abaixo:

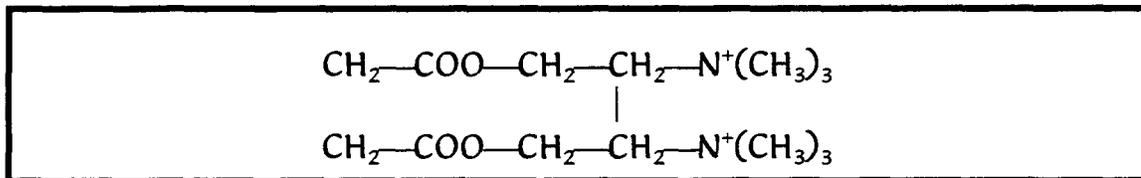
A variante atípica:

A descoberta de que algumas pessoas possuem atividade alterada da pseudocolinesterase e que isso pode ter um determinante genético está intimamente relacionada com a descoberta da ação relaxante muscular do suxametônio (succinilcolina ou succinildicolina).

Essa história tem início em 1906, quando a utilização de animais curarizados por Hunt e Taveaux, em experiências com a succinilcolina impediu-os de observar a atividade bloqueadora neuromuscular dessa substância (Koelle, 1975).

Dessa forma, as propriedades farmacológicas da succinilcolina permaneceu no olvido até 1949, quando Bovet e colaboradores descobriram ser este agente, um potente relaxante muscular (Lehman e Liddel, 1969; Koelle, 1975).

A succinilcolina é um éster dicolinico do ácido succínico, que tem a seguinte fórmula:



Devido à presença dos átomos de nitrogênio quaternário, ela forma sais e é usualmente administrada sob a forma de cloreto, sendo sua comercialização feita sob a forma de pó estéril contendo 20, 50 ou 100mg/ml (Lehman e Liddel, 1969).

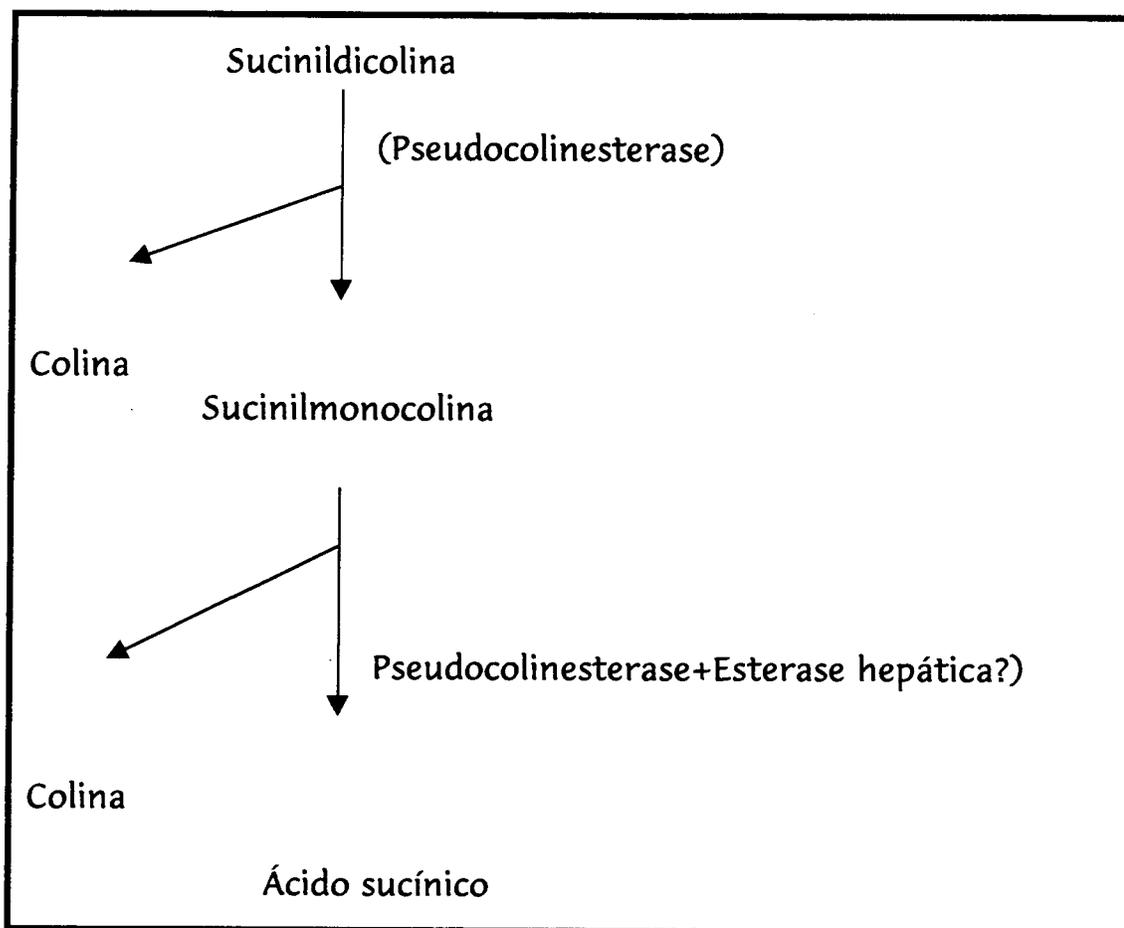
A sua aplicação clínica ocorreu logo em seguida, mais precisamente, em 1951 e, atualmente, ela é amplamente usada, quer como auxiliar na anestesia cirúrgica (facilitando a obtenção de relaxamento da musculatura esquelética), quer em manobras ortopédicas (redução de luxação e fraturas), ou para facilitar a laringoscopia, broncoscopia e esofagoscopia (Koelle, 1975).

A sua utilização nos procedimentos descritos acima está relacionada com a falta de toxicidade de seus produtos de degradação o ácido succínico e a colina ambos metabólitos normais, e, principalmente, com o seu efeito de curta duração, uma vez que após administração de dose única intravenosa de 10 a 30 mg de succinilcolina ocorrem breves fasciculações musculares. À medida que os efeitos da droga evoluem, as fasciculações são substituídas por uma paralisia cada vez maior, em que o relaxamento dos músculos do pescoço e dos membros, precede aquele dos músculos abdominais e do tronco (Taylor, 1976).

Pode-se, é claro, conseguir um relaxamento muscular de maior duração com injeções repetidas em intervalos regulares ou por infusão contínua (Koelle, 1975).

A droga é hidrolisada em duas fases (vide esquema abaixo). Na primeira fase pela pseudocolinesterase, sendo degradada em succinilmonocolina e colina, farmacologicamente inativas. Na segunda fase, com provável participação de outra esterase hepática, a succinilmonocolina é hidrolisada em ácido succínico e colina. Vale

ressaltar que cerca de 10% do componente original são excretados sem alterações (Koelle, 1975; Taylor, 1976).



Hidrólise da succinilcolina (Magna, 1982)

Uma vez que a succinilcolina injetada intravenosamente causa contrações e fasciculações musculares, é freqüente a ocorrência de dor muscular pós-operatória, mas o seu efeito adverso mais importante e ocasional é a apnéia prolongada (Taylor, 1976).

Depois que essa droga foi introduzida, numerosos casos de indivíduos sensíveis a ela foram descritos. Quando estudados, essas pessoas demonstravam ter baixos níveis de pseudocolinesterase como uma característica herdada geneticamente e não adquirida, como ocorre por exemplo, na doença hepática (Lehman e Liddel, 1969).

As diferenças qualitativas existentes entre a pseudocolinesterase de indivíduos sensíveis à succinilcolina e de indivíduos normais foi descrita, pela primeira vez, por Evans e cols. em 1952, Bourne e cols., também em 1952 e por Frobat e cols. em 1953, evidenciando que os indivíduos sensíveis eram homozigotos de um gene anormal (Lehman e Liddel, 1969; Whittaker, 1980).

Kalow e cols. trabalhando no Canadá no ano de 1957, superaram muitas dificuldades para esclarecer esse suposto polimorfismo genético que se apresentava. Estudando e comparando a cinética enzimática da pseudocolinesterase de indivíduos normais com a de sensíveis, encontraram os seguintes resultados: a enzima dos indivíduos normais tem maior afinidade para todos os substratos em comparação com a enzima dos indivíduos sensíveis e, além disso, demonstraram que a atividade da enzima dos indivíduos normais era inibida muito mais fortemente por alguns, mas não todos, inibidores da pseudocolinesterase.

O experimento realizado por Kalow e cols. (1957), citado acima, utilizava a benzoilcolina como substrato e a dibucaína (um anestésico local que produz uma marcante inibição diferencial) como inibidor e, por intermédio de análise espectrofotométrica, em condições ideais de pH e temperatura, dosaram a atividade da enzima ora na presença ora na ausência do inibidor (com concentração de 10^{-5} M), chegando assim, a um percentual de inibição, o qual chamaram número de dibucaína, DN em inglês.

Assim, ficou demonstrado que os indivíduos sensíveis apresentavam $DN \cong 20$ enquanto os indivíduos normais apresentavam $DN \cong 80$ enquanto indivíduos da mesma família que os indivíduos sensíveis apresentavam $DN \cong 60$.

Para explicar esses dados estabeleceu-se a hipótese de que um par de genes alelos, autossômicos, estaria agindo em co-dominância. A enzima cuja conformação molecular estava alterada foi denominada “variante atípica”, enquanto a enzima normal foi denominada “usual”.

Um indivíduo normal, com $DN \cong 80$, seria homozigoto dos genes que condicionam atividade normal da enzima, um indivíduo com $DN \cong 20$, seria um homozigoto dos alelos que condicionam a enzima atípica, enquanto o indivíduo com $DN \cong 60$ seria um heterozigoto

portador dos alelos determinantes da enzima normal e atípica (Kalow e Staron, 1957; Pantuck, 1993; Whittaker, 1980).

Em 1964 três sistemas de nomenclatura foram propostos, um por Motulsky, um por Lehmann e Liddel e outro por Goedde e Baitsch. Muito embora todos tenham sido aceitos, aquele proposto por Motulsky é, até hoje, o mais utilizado (Brown *et al.*, 1981).

No sistema Motulsky o primeiro locus é denominado E_1 , E de esterase e o segundo locus é chamado E_2 . No caso da variante atípica, descrita por Kalow e cols., denomina-se E_1^a o gene que produz a enzima atípica e E_1^u o gene que produz a enzima usual (Motulsky, 1964; Brown *et al.*, 1981).

Por conseqüência, os homozigotos normais têm o genótipo $E_1^u E_1^u$, os homozigotos sensíveis têm o genótipo $E_1^a E_1^a$ enquanto os portadores de fenótipo intermediário, os heterozigotos, possuem o genótipo $E_1^u E_1^a$ (Brown *et al.*, 1981).

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. 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 (Magna, 1982)

Um outro inibidor que distingue claramente a enzima normal da atípica é o brometo de dimetilcarbamato de 2-hidroxi-5-fenilbenzil trimetilamônio, que recebe o número de código Ro2-0683 do seu fabricante, o laboratório Hoffman La Roche, mas infelizmente, não disponível no mercado. Um dos pioneiros na utilização desse produto e que descreveu uma técnica de fácil execução foram Morrow e Motulsky (1968) (Lehman e Liddel, 1969; Beiguelman, 1979).

Numerosas técnicas com alto poder discriminatório entre as variantes da pseudocolinesterase foram descritas. Uma técnica que exhibe relativa facilidade de execução foi descrita por Magna (1982). Esse procedimento requer um inibidor de fácil obtenção e baixo custo, a neostigmine, e um substrato que se liga à enzima somente no seu sítio esterásico, ou seja, o acetato de alfa-naftila.

Os inibidores utilizados nas técnicas descritas acima contêm um nitrogênio quaternário em sua molécula, que liga à enzima no seu sítio aniônico. Os inibidores que se ligam ao sítio esterásico, como por exemplo, os organofosforados, não inibem diferencialmente as enzimas usual e atípica (Lehman e Liddel, 1969).

Assim, em 1958, Kalow e Davies sugeriram que a principal diferença entre essas enzimas está localizada no seu sítio aniônico, Muensch e cols. e Lockridge e La Du, também confirmaram essas hipóteses independentemente em 1978.

Que essas enzimas diferem no seu sítio aniônico não existem mais dúvidas e, devido à isso, iniciaram-se estudos para se determinar qual a alteração molecular que determina essa baixa afinidade pelos substratos exibida pela enzima atípica.

Dessa forma, Lockridge e La Du (1978) acharam consistente a hipótese de haver, nesse sítio, uma substituição de um ácido glutâmico por um outro aminoácido neutro. Além disso, esses autores também aventaram a possibilidade de a enzima atípica ter somente três sítios ativos e não quatro como a enzima usual. Isso não pôde ser confirmado, infelizmente, uma vez que a enzima atípica não foi completamente purificada.

Em 1986 esses mesmos pesquisadores determinaram a seqüência do sítio ativo das pseudocolinesterases, usual e atípica, no intuito de confirmar a hipótese de Yamato e cols. (1983), que sugeria haver uma simples substituição de ácido glutâmico por histidina na posição 7 do N terminal. Essa hipótese não foi confirmada, uma vez que nas duas seqüências obtidas, o ácido glutâmico estava presente nessa posição.

Mas, nesse mesmo experimento, eles sequenciaram o sítio ativo das enzimas usual e atípica e detectaram uma diferença no tamanho desses sítios: a enzima usual possuía 29 resíduos de aminoácidos, enquanto a enzima atípica possuía apenas 22 resíduos, não havendo, no entanto, nessas seqüências nenhuma alteração nos aminoácidos presentes (Lockridge e La Du, 1986).

McGuire e cols. (1989) identificaram uma mutação de ponto no códon 70 (GAT → GGT), que modifica o aminoácido aspargina para glicina, na enzima atípica. A substituição proposta por Yamato e cols. (1983) também não foi confirmada nesse experimento.

Estudos populacionais mostram que na maioria das populações caucasóides a freqüência de ocorrência de heterozigotos, portadores do gene normal e do mutante está por volta de 1/25 e a freqüência de homozigotos para a enzima atípica é, aproximadamente, 1/2.500 (Pantuck, 1993).

Em algumas populações européias a freqüência de homozigotos atípicos está por volta de 1/10.000 e, cerca de 3,3% dos europeus são heterozigotos (McGuire *et al.*, 1989).

Em populações negróides e mongolóides, a enzima atípica é extremamente rara, ou ainda, muitas vezes inexistente. Mas entre judeus a freqüência varia bastante, sendo que nos judeus europeus a freqüência do gene é estimada em 1,7%, chegando a 5,1% entre os judeus orientais, mais especificamente, daqueles originários do Irã, Iraque e Turquia (Acuña e Riquelme, 1989). A tabela abaixo relata as freqüências encontradas em diferentes populações estudadas.

Tabela 2 : Freqüência gênica da variante atípica da pseudocolinesterase em diferentes populações estudadas, (modificada de Acuña e Riquelme, 1989).

POPULAÇÕES	n	FREQUENCIA GÊNICA (%)	REFERÊNCIAS
<u>Européias</u>			
Inglaterra	703	1,9%	Kattamis et al
Alemanha	8.314	1,6%	Altland et al. (1967)
Tcheco-Eslováquia	180	3,3%	Altland et al. (1967)
Iugoslávia	248	1,6%	Motulsky e Morrow (1968)
Grécia	360	1,8%	Kattamis et al. (1962)
Grécia	561	1,4%	Motulsky e Morrow (1968)
Portugal	179	1,7%	Kattamis et al. (1962)
<u>Africanas</u>			
Pigmeus (Ituri)	125	0,0%	Motulsky e Morrow (1968)
Pigmeus (Babinga)	300	0,0%	Giblett (1966)
Gâmbia	103	0,5%	Whittaker (1968)
Nigéria (Ibos)	69	0,0%	Stegmüller (1975)
Congo	460	0,1%	Motulsky e Morrow (1968)
<u>Asiáticas</u>			
Japão	250	0,0%	Omoto e Goedde (1965)
Tailândia		0,0%	Altland (1967)
<u>Australianas</u>			
Aborígenes	98	0,5%	Horsfall et al. (1963)
<u>Americanas</u>			
Canadá	2.017	1,9%	Kalow e Gunn (1959)
México (índios)	377	0,9%	Lisker et al. (1964)
USA	246	1,6%	Motulsky e Morrow (1968)
Venezuela	291	0,0%	Arends et al. (1967)
Bolívia	90	0,0%	Arends et al. (1967)
Chile (Atacamenös)	180	1,6%	Goedde et al. (1967)
Chile (Santiago do Norte)	200	1,2%	Acuña e Riquelme (1989)

Os dados relativos à frequência do alelo E^a_1 em populações brasileiras são, até hoje, muito escassos. O primeiro estudo foi realizado por Simpson e Kalow (1965) que estimaram a frequência do gene E^a_1 entre 2138 nordestinos brasileiros em 1,5%. Tendo em vista o grande fluxo gênico de índios e de negróides na amostra da população estudada, e levando em conta que, nesses grupos, a prevalência do gene é muito baixa ou nula, poder-se-ia supor que nas populações caucasóides brasileiras tal gene teria frequência alta, já que entre os nordestinos ela foi similar, e não menor, à encontrada em populações caucasóides (Simpson e Kalow, 1965; Beiguelman, 1979).

No entanto, os dados de Magna e cols. (1978), não favorecem essa hipótese, pois mostraram que em caucasóides do sudeste brasileiro a frequência do gene E^a_1 é similar à encontrada entre caucasóides europeus.

Os dados de Chautard-Freire-Maia (1984), em estudos realizados em Salvador e Curitiba, revelam uma frequência de 0,8% para o gene E^a_1 nessas populações.

A variante tipo fluoreto:

Harris e Whittaker (1961) descobriram que o fluoreto de sódio é um inibidor diferencial para a enzima usual e atípica, similar à dibucaína, definindo, então, o percentual de inibição produzido por 5×10^{-5} molar de fluoreto como “número de fluoreto”, FN em inglês.

Utilizando as técnicas discriminatórias da dibucaína e do fluoreto em famílias de indivíduos sensíveis à succinilcolina e previamente classificados como homozigotos do gene alelo da enzima atípica, Harris e Whittaker descobriram uma estreita relação entre esses indivíduos, com o aparecimento, inesperado, de dois subgrupos compostos por indivíduos com discreta diminuição do DN e uma diminuição bastante acentuada do FN.

Estudos familiares subsequentes demonstraram que a variante tipo fluoreto era, também, herdada, e postulou-se, então, a existência de um terceiro alelo ao gene usual do locus E_1 , sendo segregado nas

famílias estudadas. Assim, os indivíduos estudados e classificados anteriormente como $E^u_1E^a_1$, foram reclassificados como $E^a_1E^f_1$. Não passado muito tempo, Liddel e cols. em 1963 descreveram um indivíduo homozigoto para a enzima tipo fluoreto $E^f_1E^f_1$ (Liddel *et al.*, 1963; Brown *et al.*, 1981).

Estudando alguns indivíduos heterozigotos para os alelos atípico e fluoreto, genótipo $E^a_1E^f_1$, que apresentaram cerca de 30 minutos de apnéia após a injeção de succinilcolina, Nogueira e cols.(1992) detectaram duas mutações de ponto que estariam associadas a essa resposta alterada ao fármaco.

A primeira mutação, designada por eles como fluoreto 1 seria uma substituição na posição 243 da cadeia polipeptídica, mudando o aminoácido treonina para metionina. A segunda mutação detectada, a fluoreto 2, seria uma substituição na posição 390, trocando uma glicina por uma valina (Nogueira *et al.*, 1992).

O gene para essa variante é bastante raro e Steegmuller (1975) estima que a freqüência de homozigotos $E^f_1E^f_1$ parece estar por volta de 1:150.000, a freqüência gênica mais significativa (1,2%) é encontrada na população de Punjab na Índia (Steegmuller, 1975; Nogueira *et al.*, 1992; Pantuck, 1993).

A variante “silenciosa” (ausência de pseudocolinesterase):

A presença de um gene dito “silencioso” foi inicialmente proposta para explicar a aparente distorção na segregação dos fenótipos usual e atípico da pseudocolinesterase em duas famílias, por Kalow e Staron em 1957 e Harris e cols. em 1960 (Nogueira *et al.*, 1990).

A descoberta de alguns indivíduos que apresentavam baixíssima ou nenhuma atividade enzimática foi feita, pela primeira vez, por Liddel e cols. em 1962. Esses indivíduos mostravam uma resposta exagerada à succinilcolina.

Simpson e Kalow em 1964 consideraram ser esses indivíduos portadores de outra variante causada pela expressão de outro gene alelo ao usual no locus E^a_1 . Dessa forma, criaram a expressão “variante silenciosa” e a notação genotípica E^s_1 para se referirem, respectivamente, ao fenótipo e ao genótipo desses indivíduos.

O mecanismo que envolve essa variante é bastante complexo, uma vez que o entendimento da ausência ou a atividade muito baixa da enzima implica vários fatores, sendo o principal a comprovação de uma extensa heterogeneidade genética dentro desse grupo. Dessa forma, Rubinstein e cols. em 1970, estudando soros de indivíduos classificados como homozigotos $E^s_1 E^s_1$, reclassificaram essa amostra em dois grupos, um chamado tipo I (E^s_1), com 1-2% da atividade usual, e um outro grupo, chamado tipo II (E^t_1), com 3% da atividade usual. Esses dois grupos diferiam tanto quantitativa quanto qualitativamente frente a diferentes inibidores, substratos e técnicas utilizadas (inibição, eletroforética e imunológica) (Rubinstein *et al.*, 1970; Whittaker, 1980; Brown *et al.*, 1981; Nogueira *et al.*, 1990).

A ocorrência de homozigotos $E^s_1 E^s_1$ é extremamente baixa (1:100.000). Em populações caucasóides a freqüência do gene é estimada em 0,3%, sendo essa freqüência gênica aumentada, significativamente, não só em Esquimós, como também em algumas populações da Índia, podendo atingir 2,2% (Steegmuller, 1975; Nogueira *et al.*, 1990).

Scott e Wright em 1976 descreveram uma terceira variante, chamada E^r_1 presente em esquimós. Essa variante apresenta menos de 10% de atividade da enzima usual.

Lockridge e La Du (1986) demonstraram haver uma diminuição na seqüência de aminoácidos do sítio ativo dessa variante que contém serina, apresentando apenas 8 resíduos ao contrário dos 29 resíduos detectado no mesmo sítio da enzima usual.

Nogueira e cols. (1990) descreveram, em duas famílias distintas, uma mutação tipo “frameshift”, no aminoácido glicina (117), que leva à formação de um código finalizador. Dessa forma a cadeia polipeptídica próxima ao sítio ativo serina (198) não é formada.

As variantes K, H e J:

Três outras variantes da pseudocolinesterase foram identificadas posteriormente.

A variante K foi descoberta por Rubinstein e cols. em 1978. Ela recebeu esse nome em homenagem ao Dr. Werner Kalow pesquisador

que muito contribuiu para o conhecimento da enzima. Ela é caracterizada como uma variante quantitativa, pois há uma redução efetiva no número de moléculas circulantes, devido a mudanças na sua produção, estabilidade e período de meia-vida das moléculas. Essa enzima apresenta apenas 1/3 da atividade da enzima usual, mas, mesmo assim, os indivíduos portadores do gene E^k_1 não apresentam sensibilidade à succinilcolina. Quando isso acontece, isto é, uma resposta aumentada à succinilcolina, talvez seja devido a combinações com outros fatores, como por exemplo, uma combinação com outras variantes da pseudocolinesterase, com a gravidez, com alguns tipos de estados mórbidos, ou ainda, a desnutrição.

Bartels e cols. (1992) descreveram uma mutação de ponto associada à variante K, que consiste de uma substituição no aminoácido alanina (539) por uma treonina. A frequência de dessa mutação é 1:65 indivíduos (Bartels *et al.*, 1992; Pantuck, 1993).

A variante H (abreviatura de Hammersmith, nome da família onde se detectou pela primeira vez essa variante) está associada com 90% da redução da atividade enzimática e foi primeiramente descrita por Whittaker e Britten (1987). A combinação dessa variante com a atípica ($E^a_1E^h_1$) confere significativa sensibilidade à succinilcolina. Uma mutação que, possivelmente, leva à formação dessa variante foi descrita por Jensen e cols. em 1992 e consiste de uma substituição do aminoácido valina (142) por uma metionina. Com relação a sua frequência populacional, existem poucos dados relatados, tanto é que, até 1993 apenas quatro famílias haviam sido descritas (Whittaker e Britten, 1987; Pantuck, 1993; Jensen *et al.*, 1995).

A variante J, tem a sua frequência de homozigotos estimada em 1:150.000 e sua atividade enzimática é reduzida em cerca de 66%. Poucos estudos foram realizados até hoje, talvez devido ao escasso número de famílias averiguadas. Num desses estudos detectou-se uma mutação de ponto que modifica o aminoácido glutamina (497) transformando-o em valina (Jensen *et al.*, 1995).

Para se discriminar os fenótipos dessas variantes (J,K,H), o método que utiliza o componente Ro2-0683 parece ser o mais seletivo, sendo superior em sua seletividade à dibucaína (Pantuck, 1993).

Outras variantes:

Estudando o efeito do cloreto de sódio nas variantes da pseudocolinesterase, Whittaker em 1968 descreveu a provável existência de dois novos fenótipos. Usou-se, então, CN (número de cloreto em inglês) como sigla para indicar a inibição realizada por esse componente. Dos 9 indivíduos estudados, dois apresentavam DN=80, FN=60 e CN=25, e eram sensíveis à succinilcolina (Brown *et al.*, 1981).

King e Dixon em 1970 descreveram uma família na qual outro possível fenótipo foi detectado. Nesse estudo, seis dos sete indivíduos estudados tinham valores de DN e FN típicos do genótipo $E^u_1E^u_1$ ou $E^u_1E^f_1$. No entanto, eles apresentaram CN=0, sendo esse o único trabalho em que a total ausência de inibição pelo cloreto foi descrita.

Quando estudou os efeitos do n-butanol em vários fenótipos, Whittaker (1968) sugeriu o aparecimento de dois novos fenótipos, com base no número de dibucaína e de butanol. Um limitado número de famílias foi estudado e dessa forma, não ficou muito bem caracterizada essa nova variante, uma vez que Garry e cols. em 1976 acreditam que esses indivíduos eram heterozigotos do gene E^j_1 .

Outros tipos de pseudocolinesterase dependem de outro sistema de alelos, menos importantes do ponto de vista prático, os quais fazem parte do sistema E_2 (provavelmente presente no cromossomo 16). Essas variantes são detectadas somente ao exame eletroforético e determinam o aparecimento ou não de faixas adicionais às quatro encontradas normalmente (Lovrien, 1978; Beiguelman, 1979; Soreq *et al.*, 1987). Assim, Harris e cols. em 1962 descreveram que o soro de alguns indivíduos, em eletroforese de gel de amido, pH 6, exibiam uma banda adicional de migração lenta, que foi, por eles, designada C_5 . Estudos familiares demonstraram ser essa condição herdada, com certeza de modo autossômico e, provavelmente, dominante. Indivíduos que não tinham essa banda foram denominados C_5^- e aqueles que possuíam essa banda adicional foram denominados C_5^+ .

Essa variante determina um aumento na atividade enzimática de, aproximadamente, 30%. Testes de imunodifusão radial também comprovam o aumento de atividade nesses fenótipos (Brown *et al.*, 1981).

O gene que codifica essa banda adicional foi designado E_2^+ por Motulsky (1964) enquanto seu alelo foi designado E_2^- .

A frequência gênica dessa variante parece variar muito nas diferentes populações humanas, com valores que vão de 0,3% (negróides) a 10,1% (caucasóides), segundo dados de Steegmuller (1975).

Os indivíduos portadores dos genótipos $E^u_1E^u_1-E_2^+E_2^+$ e $E^u_1E^u_1-E_2^-E_2^-$ são indistinguíveis quando se utilizam técnicas discriminatórias cujo inibidor é a dibucaína, fluoreto ou Ro2-0683. Interessante é notar que alguns indivíduos heterozigotos para a enzima atípica ($E^u_1E^a_1$) são também C^+_5 . Para esse fato sugere-se alguma interação entre essas duas enzimas (LaMotta e Waronick, 1971).

Gallango e cols. observaram uma alta incidência muito significativa (22%) da variante C^+_5 em pacientes com mieloma em contraste com a incidência de 8,5% da população venezuelana.

Em 1966, Neitlich descreveu uma família de quatro membros que apresentavam uma enzima com atividade muitas vezes maior que a enzima usual. O valor encontrado foi associado com uma banda extra de migração muito lenta em eletroforese de gel de amido, mais lenta até que a variante C^+_5 .

Um dos indivíduos dessa família demonstrou ser sensível à succinilcolina; dessa forma Yoshida e Motulsky (1969) designaram essa variante como "Cynthiana" em homenagem ao local onde ela foi descrita.

Outras bandas acessórias foram detectadas e já citadas nesse trabalho, demonstrando haver heterogeneidade genética na determinação dessas isozimas (LaMotta e Waronick, 1971).

Do exposto acima podemos aceitar a definição de Lockridge e La Du que comparam a heterogeneidade genética na determinação das muitas variantes da pseudocolinesterase com aquela existente nas hemoglobinas, uma vez que, na anemia falciforme, a hemoglobina S, a variante mais comum, é fruto de uma simples substituição de aminoácidos na posição 6 da cadeia da β -globina (Glu \rightarrow Val) e, atualmente, nos EUA são reconhecidas, pelo menos, 200 variantes menos comuns (Lockridge e La Du, 1978).

A tabela abaixo resume as principais variantes da pseudocolinesterase relativas ao locus E_1 , com os seus respectivos

genótipos e fenótipos, bem como algumas possíveis combinações destes, além da sensibilidade à succinilcolina demonstrada pelos seus portadores:

Tabela 3: Variantes da pseudocolinesterase, notações genotípicas e fenotípicas e sensibilidade à succinilcolina. Nas colunas 1 e 5 está a nomenclatura proposta por Motulsky (1964). Na coluna 2 está nomenclatura proposta por Goedde e Baisch (1964). Na coluna 3 está a nomenclatura proposta por Lehmann e Liddel (1964).

Legenda da tabela: (—) = ausente (+) = presente e leve (++) = presente e acentuada (±) = provável (?) = sem informação (Modificada de Brown *et al.*, 1981).

GENÓTIPO			FENÓTIPO			SENSIBILIDADE À SUCINILCOLINA
$E_1^u E_1^u$	$Ch_1^u Ch_1^u$	NN	U	U	Usual	—
$E_1^a E_1^a$	$Ch_1^D Ch_1^D$	DD	A	A	Atípica	++
$E_1^f E_1^f$	$Ch_1^F Ch_1^F$	FF	F	F	Fluoreto	+
$E_1^s E_1^s$	$Ch_1^S Ch_1^S$	SS	S	S_1^a	Silencioso; Silencioso tipo I e silencioso tipo O	++
$E_1^u E_1^a$	$Ch_1^u Ch_1^D$	ND	UA	I	Interme diário	±
$E_1^u E_1^f$	$Ch_1^u Ch_1^F$	NF	UF	UF	—	±
$E_1^u E_1^s$	$Ch_1^u Ch_1^S$	NS	US	U	—	±
$E_1^a E_1^f$	$Ch_1^D Ch_1^F$	DF	AF	IF	—	+
$E_1^a E_1^s$	$Ch_1^D Ch_1^S$	DS	AS	A	—	++
$E_1^f E_1^s$	$Ch_1^F Ch_1^S$	FS	FS	F	—	+
$E_1^u E_1^j$	—	—	UJ	—	—	?
$E_1^a E_1^j$	—	—	AJ	—	—	?
$E_1^f E_1^j$	—	—	FJ	—	—	?
$E_1^u E_1^k$	—	—	UK	—	—	?
$E_1^a E_1^k$	—	—	AK	—	—	?

Outras causas de alteração da atividade da pseudocolinesterase:

A Unidade de Investigação da Pseudocolinesterase da Dinamarca, estudou, incansavelmente, durante 20 anos, 6.688 pacientes de 2.081 famílias, sendo 1.247 pacientes sensíveis à succinilcolina e 4.514 parentes desses indivíduos.

A amostra foi composta por 2.966 (44%) homens e 3.722 (56%) mulheres. Além disso, 927 pacientes foram investigados com a finalidade de constituir um grupo controle. Um total de 3.916 indivíduos receberam um cartão de identificação com o fenótipo devidamente esclarecido. Utilizaram-se os métodos clássicos de

determinação genotípica, incluindo estudos com dibucaína e fluoreto de sódio (Jensen *et al.*, 1995).

Merece especial atenção alguns achados desse trabalho:

- Em crianças genotipicamente normais com idade até 10 anos a atividade enzimática não variou, significativamente, com a idade e o sexo.
- Em crianças com idade próxima aos 10 anos, a atividade enzimática começou a diminuir, mais pronunciadamente em mulheres.
- Nas mulheres a atividade enzimática foi mais baixa no grupo que apresentava idade entre 30 e 40 anos.
- Nas mulheres com idade próxima aos 60 anos a atividade da enzima retornou aos níveis da puberdade.
- Em homens, a atividade enzimática diminuiu ligeiramente no grupo com idade entre 50 e 60 anos.
- As diferenças entre homens e mulheres, nas demais idades, não foram significativas.

Sabe-se que algumas mudanças fisiológicas, como por exemplo, a gravidez, a puberdade e a menopausa, interferem nos níveis de atividade enzimática, havendo muitas evidências de que ocorra, na gravidez e no pós-parto imediato, uma significativa diminuição na atividade da enzima (Whittaker, 1980; Evans *et al.*, 1988; Peyster *et al.*, 1994; Jensen *et al.*, 1995).

Essa diminuição deve ser devida a alterações dos níveis de hormônios sexuais, uma vez que na pós-menopausa há aumento da atividade enzimática. Um fato que se relaciona muito com isso é que do mesmo modo que a pseudocolinesterase, a albumina é, também, sintetizada no fígado, e a albumina sérica varia, também, com a idade e o sexo.

Outro fato relacionado é que mudanças “momentâneas” nos níveis estrogênicos causadas pelos anticoncepcionais orais também provocam uma diminuição da atividade da pseudocolinesterase (Whittaker, 1980; Jensen *et al.*, 1995).

Pacientes que fazem uso de terapia à base de lítio também demonstram diminuição na atividade enzimática. Assim, alguns indivíduos com psicose maníaco-depressiva apresentaram baixos níveis de atividade enzimática durante o tratamento (Whittaker, 1980).

Um aumento nos níveis da pseudocolinesterase foi detectado em pacientes obesos e, também, em diabéticos, fenômeno que é notado em modelos experimentais com animais que apresentavam obesidade, diabete (induzido) e hiperlipoproteínemia. Nos animais diabéticos, após o tratamento, os níveis enzimáticos tendem a diminuir (Cucuianu *et al.*, 1968; Kutty e Payne, 1994; Crook *et al.*, 1994).

Kaniaris e cols. (1979) demonstraram uma significativa diminuição na atividade da pseudocolinesterase em pacientes com câncer, sendo bem menor a atividade nos portadores de metástases. Um dado significativo desse trabalho foi a averiguação de que, dependendo do local da lesão primária da doença, os níveis de atividade enzimática diferem significativamente. Dessa forma, em tumores de mama, a diminuição da atividade da enzima é bem menor, quando comparada com outros tipos de tumores, como por exemplo, os do trato gastrointestinal e genito-urinário.

Muitos trabalhos demonstram haver uma diminuição da atividade da pseudocolinesterase em diferentes doenças hepáticas (La Mota *et al.*, 1957; Evans e Lehmann, 1971; Ward, 1976; Kaniaris *et al.*, 1979; Saez-Alquezar, 1983; Hada *et al.*, 1988).

Uma vez que a pseudocolinesterase, como já citado anteriormente, é sintetizada no fígado, é fundamental que se coloque aqui uma breve explicação sobre esse órgão:

O fígado constitui cerca de 1/40 do peso do homem (\cong 1.500 g), sendo um pouco menor na mulher. No recém-nascido ele é relativamente maior que no adulto, constituindo cerca de 1/25 do peso do corpo (\cong 120 g), uma vez que possui um lobo esquerdo mais volumoso. Após um ano seu peso dobra e na puberdade seu valor é dez vezes maior que ao nascimento.

O fígado está intimamente relacionado com o metabolismo, embora na vida embrionária exerça, também, um importante papel na hematopoiese. Quando no adulto ocorre algum tipo de lesão extensa na medula óssea, o fígado pode voltar a produzir células sanguíneas (hemocitopoese extracelular), porém a quantidade de glóbulos produzidos é insuficiente para as necessidades do organismo (Hamilton e McMinn, 1982; Junqueira e Carneiro, 1995).

Está localizado no hipocôndrio direito, estando a borda superior do lobo direito na altura da quinta costela. Possui dupla circulação

sangüínea aferente, que entra pelo pedículo hepático numa fissura chamada “porta-hepatis”, na superfície póstero-inferior do lobo direito. A artéria hepática fornece sangue com alta tensão de oxigênio, enquanto a veia porta traz sangue dos intestinos, do pâncreas e do baço. Tal irrigação desempenha papel fundamental no trofismo das células hepáticas, graças a nutrientes trazidos do intestino e a fatores hepatotróficos originados mais provavelmente no pâncreas.

O sistema sangüíneo eferente é constituído pelas veias hepáticas direita e esquerda, que se formam na parte posterior do fígado e desembocam na veia cava inferior. Dessa forma nota-se que a sua circulação sangüínea é bastante peculiar pois, ao contrário dos demais órgãos que recebem apenas sangue arterial, ele recebe considerável volume de sangue venoso (Junqueira e Carneiro, 1995).

Com relação à sua estrutura, ele é recoberto, quase que totalmente, pelo peritônio que forma uma cobertura serosa. A trama de tecido conjuntivo (cápsula de Glisson) consiste de uma cápsula externa contendo fibras colágenas e elásticas, e septos que dividem o tecido do fígado em lóbulos (prismas poligonais formados por lâminas de células hepáticas dispostas ao redor da veia central) as clássicas unidades funcionais do fígado, descrito por Kiernan, ao estudar esse órgão em porco (Gayotto e Bogliolo, 1994).

Nesses animais as lobulações são muito aparentes, mas no homem, onde o tecido conjuntivo e os septos fibrosos são indistintos, os lóbulos não estão claramente marcados um do outro, dessa forma, esse conceito foi substituído, do ponto de vista estrutural e fisiológico, pelo ácino de Rappaport. Ele difere ligeiramente do lóbulo e é, atualmente, considerado a unidade funcional do fígado (Gayotto e Bogliolo, 1994; Hamilton e McMinn, 1982).

O ácino possui uma forma losangular incluído entre as veias centrais e dois canais portas. Possui um eixo ou hilo formado por uma arteríola hepática terminal, uma vênula portal e um ducto biliar em meio ao qual se encontram vasos linfáticos e nervos (espaço portal).

O ácino pode ser dividido em três zonas, periportal, perivenular e médio-zonal. Postula-se que o comportamento dos hepatócitos (célula epitelial que mede aproximadamente 30 μm no seu maior eixo) nas três zonas, além das diferenças resultantes da variação do gradiente de oxigenação, teria também características funcionais e

morfológicas distintas. Assim, os hepatócitos localizados no centro do ácino têm “primeiro contato” com o oxigênio e algumas substâncias nutritivas e tóxicas. Essa disposição particular dos hepatócitos, pelo qual nem todos são expostos igualmente a influências entrantes, ajuda a explicar certos distúrbios metabólicos.

Aproximadamente 80% do volume do fígado é constituído por hepatócitos, os quais se distribuem em trabéculas sustentadas por delicada trama de fibras reticulares, em sua maioria formada por colágeno tipo III. A grande predominância de hepatócitos confere ao órgão consistência firme e suscetibilidade a lesões traumáticas que podem resultar em sua laceração (Hamilton e McMinn, 1982).

O hepatócito é uma célula de grande versatilidade funcional. Tem funções glandulares endócrinas (síntese protéica) e exócrinas (produção de bile). Além disso é responsável pelo acúmulo de vários compostos (lipídios e glicídios sob a forma de gorduras neutras e glicogênio), neutraliza moléculas tóxicas devido a processos de oxidação, acetilação metilação e conjugação. E também, transporta corantes do sangue para a bile (Junqueira e Carneiro, 1995).

À microscopia eletrônica o núcleo do hepatócito é regular e sua membrana porosa permite amplo intercâmbio com o citoplasma. Entre as organelas citoplasmáticas presentes, destaca-se o papel dos ribossomos, abundantes e que formam o retículo endoplasmático rugoso, onde se realiza a síntese de muitas proteínas essenciais para o organismo.

Com relação à síntese protéica o hepatócito é considerado uma célula endócrina pois, renova suas proteínas e sintetiza, também, várias proteínas de exportação, como a albumina, protrombina, fibrinogênio e grande número de enzimas, intra e extra-celulares, onde chama a atenção a síntese da pseudocolinesterase, que logo após ser sintetizada é lançada no sangue circulante (Gayotto e Bogliolo, 1994).

A queda nos níveis séricos de atividade dessa enzima pode, portanto, refletir diminuição na capacidade de sua síntese pelo parênquima hepático, ou da massa hepática funcionante. Alguns processos patológicos condicionam uma diminuição na capacidade de síntese pelos hepatócitos, onde podemos destacar: a cirrose hepática e tumores (primários ou metastásicos) (Saez-Alquezar *et al.*, 1983).

Já na hepatite aguda por vírus essa diminuição é pouco acentuada, ao contrário das formas colestáticas da hepatite, nas quais se observam maiores diminuições da capacidade sintetizadora do órgão. Evidentemente, todas as condições acima citadas associam-se à diminuição da atividade de pseudocolinesterase, além daquelas anteriormente abordadas (Saez-Alzquezar *et al.*, 1983).

Destaca-se, também, uma significativa diminuição da síntese hepática nas intoxicações agudas ou crônicas por inseticidas organofosforados (Ratner *et al.* 1989).

A tabela abaixo resume algumas das principais causas da diminuição da atividade da colinesterase:

Tabela 4: Algumas das principais condições que determinam diminuição da atividade da pseudocolinesterase (Modificada de Whittaker, 1980).

TIPO	CAUSA
Deficiência herdada geneticamente	Variantes da colinesterase
Variações fisiológicas	Último trimestre de gravidez, recém-nascidos e crianças na 1ª infância.
Causas adquiridas	Doença hepática, infarto do miocárdio, distrofias musculares, hiperpirexia, tuberculose, carcinomas, doenças debilitantes crônicas, anemia crônica, uremia, desnutrição.
Causas iatrogênicas	Terapia com raio-X, drogas anti-cancer, inibidores da MAO, pílulas contraceptivas, neostigmine, propanidide, inseticidas organofosforados, pancurônio

II. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos rever a literatura pertinente sobre as causas de diminuição da atividade da pseudocolinesterase, incluindo determinar a atividade dessa enzima em uma amostra de pacientes portadores de hepatopatias crônicas, com a finalidade de averiguar a correlação entre o grau de comprometimento hepático e a atividade da pseudocolinesterase em comparação com as de outras variáveis, rotineiramente utilizadas com o mesmo propósito.

III. METODOLOGIA

III₁. Casuística:

A casuística do presente trabalho foi composta por 49 pacientes portadores de hepatopatias crônicas cujo estágio foi estabelecido segundo a classificação de Child-Pugh. A avaliação clínica foi realizada no Departamento de Gastroenterologia do Hospital Universitário da Universidade São Francisco da cidade de Bragança Paulista.

Um grupo composto de 132 indivíduos normais, doadores de sangue, se prestou ao fornecimento de amostras de sangue para a determinação da distribuição normal da atividade da pseudocolinesterase.

III₂ Métodos:

III_{2a}. Obtenção das amostras de soro:

A coleta de sangue foi realizada com o uso de seringas e agulhas descartáveis, colhendo-se 5ml de sangue de cada paciente ou doador de sangue, que estava, devidamente, em jejum no momento da coleta.

As amostras foram transferidas para tubos de ensaio secos e mantidas à temperatura ambiente com a finalidade de se obter uma completa coagulação. Em seguida, esses tubos foram centrifugados a 2.000RPM, sendo o soro transferido sem sinais de hemólise para frascos com tampa, que foram acondicionados em congelador à -20°C, para análise posterior.

III_{2b}. Classificação de Child-Pugh:

A classificação de Child-Pugh obedece os critérios resumidos na tabela abaixo:

VARIÁVEIS	1 Ponto	2 Pontos	3 Pontos
Encefalopatia	Ausente	I e II	III e IV
Ascite	Ausente	Moderada	Tensa
Bilirrubina (UI/l)	≤ 2	2 a 3	≥ 3
Albumina (UI/l)	≥ 3,5	3,5 a 2,8	≤ 2,8
Atividade de Protrombina (%)	≥ 50	50 a 30	≤ 30

De acordo com os resultados obtidos os indivíduos foram classificados da seguinte forma:

GRUPO	TOTAL DE PONTOS
A	5 a 6
B	7 a 9
C	10 a 15

III_{2c} Dosagem da atividade enzimática da pseudocolinesterase:

Para a determinação da atividade enzimática da pseudocolinesterase, foi utilizado o teste descrito por Magna (1982), que é uma modificação do teste proposto por Morrow e Motulsky (1968).

Vale a pena ressaltar que todas as dosagens foram feitas de acordo com o teste “duplo cego”, isto é, as amostras de sangue dos pacientes foram dosadas sem que se soubesse do estágio clínico de cada um deles.

Este teste utiliza como substrato, o acetato de alfa-naftila.

A escolha do acetato de alfa-naftila como substrato da pseudocolinesterase deve-se ao fato de essa substância, ao sofrer hidrólise por ação da enzima, produzir, como produto da reação, o alfa-naftol, cuja concentração 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, com pico de absorção máximo em 555 nm (Magna, 1982)

Esse teste segue o seguinte protocolo:

A. Reagentes utilizados:

- Tampão de fosfato a 200 mM e pH 7,1;
- Substrato (solução estoque) : acetato de alfa-naftila a 30 mM em acetona, guardado em geladeira, que deve ser diluído em tampão de fosfato a 200 mM e pH 7,1 no momento do uso, para fornecer uma solução contendo 1,5 mM de acetato de alfa-naftila para dosagem da atividade e 0,6 mM para a discriminação fenotípica;
- Inibidor : neostigmina a $4,4 \times 10^{-6}$ M em tampão de fosfato a 200 mM e pH 7,1;
- Duponal (laurilsulfato de sódio) a 1,2%;
- 5-cloro-o-toluidina a 4 mg/ml em duponal a 1,2%, preparada no momento do uso.

B. Técnica:

SOLUÇÃO	Tubo TESTE (ml)	Tubo BRANCO (ml)
Soro a 1% em tampão de fosfato a 200 mM pH 7,1	0,2	—
Tampão de fosfato a 200 mM pH 7,1	0,2	0,4
Acetato de alfa-naftila a 1,5 mM (em tampão de fosfato a 200 mM pH 7,1)	2,0	2,0
Incubação dos tubos em banho-maria, 37°C durante 15 minutos		
5-cloro-o-toluidina a 4 mg/ml diluído em duponal a 1,2%	0,2	0,2

Após um intervalo de 15 minutos, à temperatura ambiente, procedeu-se a leitura espectrofotométricas das amostras em absorbância de 555nm. O valor obtido foi utilizado como medida da atividade enzimática, sendo expressa em A_{555} (atividade presente em 200 μ l de soro a 1% em tampão de fosfato a 200 mM pH 7,1).

III_{2d}. Análise estatística:

Foi realizada análise de regressão linear múltipla do tipo escalonado, que segue a fórmula geral:

$$y = a + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + \dots + b_nx_n$$

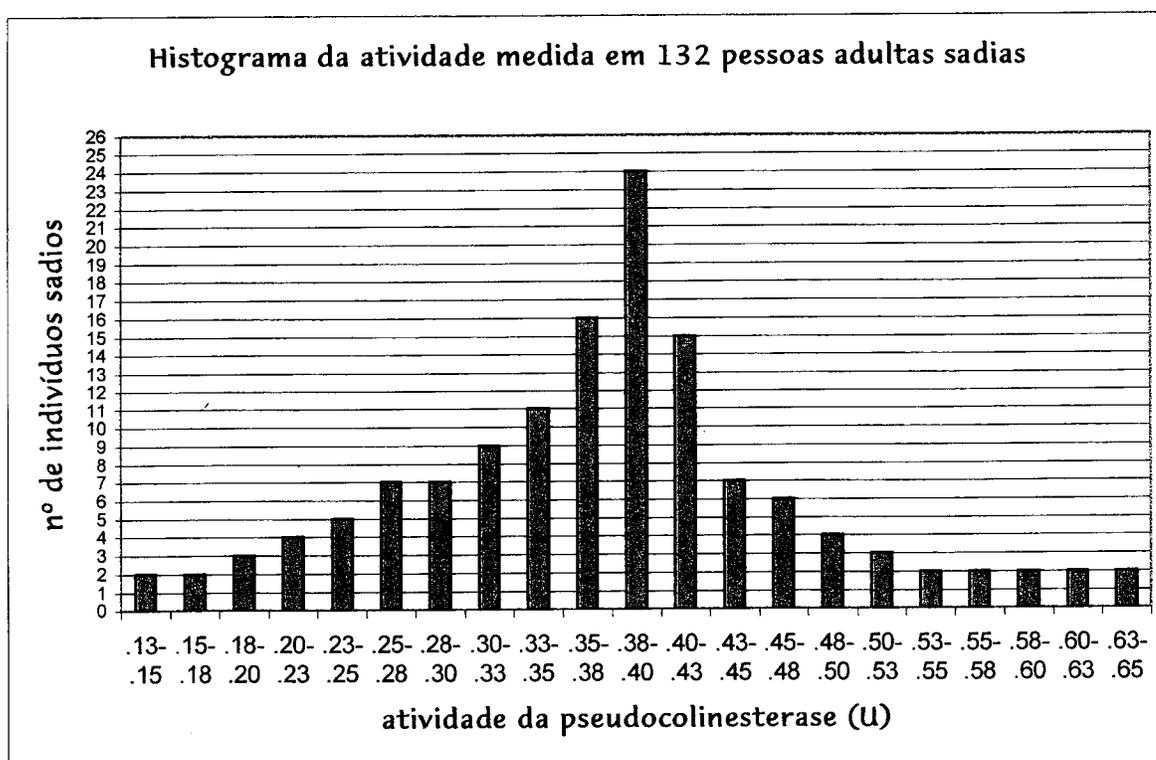
onde y é a estimativa da variável dependente, a é o intercepto múltiplo, x_1 a x_n são as variáveis independentes e b_1 a b_n são os coeficientes de regressão que medem a variável média de y em relação às variáveis correspondentes. O estágio clínico dos pacientes foi tomado como variável dependente. As variáveis independentes (atividade da pseudocolinesterase, nível sérico de albumina, TGO, TGP, gama-GT, bilirrubinas e fosfatase alcalina) foram submetidas a testes

de correlação com estágio clínico, seguindo a classificação de Child-Pugh, antes de serem incluídas na análise de regressão.

IV. RESULTADOS

A Figura 1 apresenta o histograma da distribuição da atividade da pseudocolinesterase, expressa em unidades (1U = 1 de absorbância a 555nm nas condições de ensaio descritas), relativo a 132 pessoas adultas e sadias. A média da atividade enzimática ficou em 0,375 U, com desvio padrão de 0,098 U, permitindo estimar o intervalo de confiança de 95% dos valores de atividade da enzima entre 0,183 U e 0,567 U.

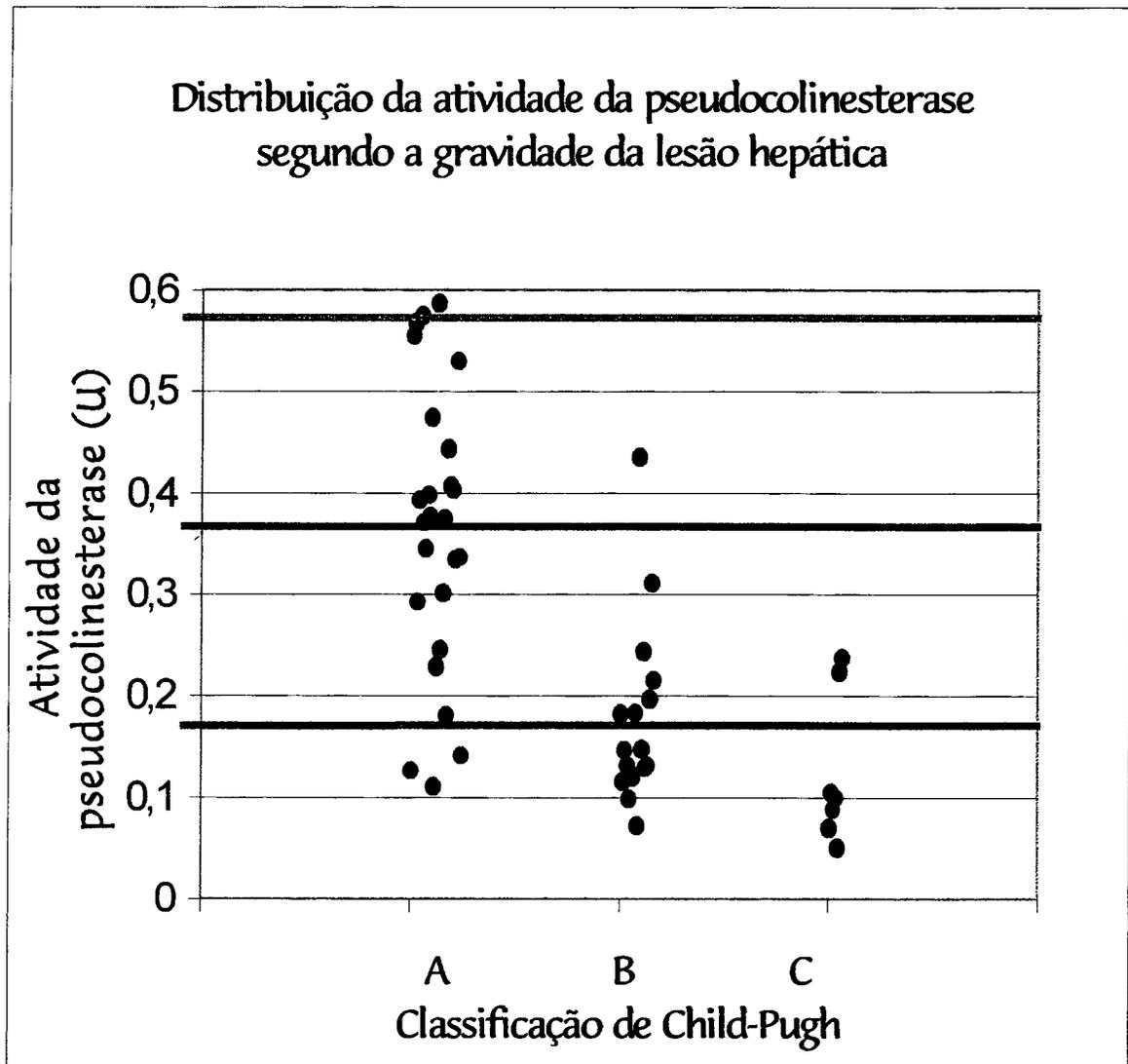
Figura 1.



Na Figura 2 são apresentados os valores de atividade da pseudocolinesterase dos 25 pacientes pertencentes ao grupo avaliado como grau A na classificação de Child-Pugh (cirrose hepática compensada), assim como a atividade dos 17 pacientes com grau B de Child-Pugh (cirrose hepática descompensada moderada) e a dos 7 pacientes com grau C (cirrose hepática descompensada grave).

Nessa mesma figura estão assinalados, para melhor visualização, os valores inferiores e superiores do intervalo de confiança da atividade da pseudocolinesterase observada em indivíduos sadios bem como sua média.

Figura 2.



Como se pode observar na Figura 2, a grande maioria dos pacientes (72%) avaliados como grau A apresentam a atividade da pseudocolinesterase dentro do intervalo de confiança dos valores observados entre indivíduos sadios (dentro do espaço delimitado pela faixa azul, A= 0,183 e a faixa verde, A = 0,567 do gráfico). Essa proporção diminui entre os pacientes com grau B, entre os quais

29,4% mantém sua atividade enzimática dentro do intervalo normal, enquanto que 70,6% já mostram a atividade da pseudocolinesterase abaixo do limite inferior (faixa azul do gráfico) da atividade observada entre os indivíduos sadios. Finalmente, os pacientes classificados como grau C apresentam, em sua grande maioria (71,4%), a atividade da pseudocolinesterase abaixo do limite inferior (faixa azul do gráfico) do intervalo normal obtido entre os indivíduos sadios.

De fato, a análise da variância aplicada aos dados dos pacientes classificados segundo o grau de comprometimento de sua função hepática avaliado pela classificação de Child-Pugh, mostra que há uma diferença significativa ($F_{(2,46)} = 18,9$; $P \ll 0,001$) entre os pacientes do grupo classificado como A (média = 0,363 U e dp = 0,14) quando comparados aos dos grupos classificados como B e C (médias de 0,175 U e de 0,125 U e desvios-padrão de 0,089 U e 0,074 U respectivamente). Não há diferença significativa, no entanto, entre a média dos pacientes classificados como A e a obtida entre os indivíduos sadios ($t = 0,41$; $0,60 < p < 0,70$).

A avaliação laboratorial do paciente com cirrose hepática, atualmente, é feita segundo acompanhamento de algumas variáveis clínicas, as quais são mostradas na tabela 5, juntamente com seus valores observados nos pacientes aqui estudados, e de acordo com o seu grau de comprometimento da função hepática segundo a classificação de Child-Pugh. Foram acrescentados também, nessa tabela, os valores observados da atividade da pseudocolinesterase nos mesmos pacientes.

A análise de correlação simples entre a classificação de Child-Pugh, tomando o grupo classificado como A como tendo valor 1 e os demais grupos B e C como tendo valores 2 e 3 respectivamente, leva aos resultados apresentados na tabela 6.

Os dados desta tabela permitiram realizar a análise de regressão múltipla escalonada, tomando como variável dependente a classificação de Child-Pugh e como variáveis independentes a concentração sérica de bilirrubina indireta e de albumina e as atividades de fosfatase alcalina e de pseudocolinesterase. Não foi incluída no modelo a concentração sérica de bilirrubina total, uma vez que esta última está correlacionada com a bilirrubina indireta e, como mostra a tabela 6, a correlação entre a classificação de Child-Pugh e a

bilirrubina total depende, exclusivamente, da fração indireta desta última.

Das variáveis que, isoladamente, estão correlacionadas com a classificação de Child-Pugh, a atividade da pseudocolinesterase foi a que apresentou maior coeficiente de determinação (0,41107 ou 41,11%), tendo sido, portanto, a primeira a ser incluída no modelo. A próxima variável incluída foi a concentração sérica da albumina que, juntamente com a atividade da pseudocolinesterase, elevou o coeficiente de determinação da classificação de Child-Pugh para 0,4887 ou 48,81%, representando, pois, a inclusão de albumina sérica um incremento de 0,077 ou 7,70%. Após a inclusão da concentração sérica de albumina no modelo, tanto a concentração sérica de bilirrubina indireta quanto a atividade da fosfatase alcalina deixam de ter um coeficiente de regressão significativo com a classificação de Child-Pugh sendo, portanto, essas variáveis descartadas.

Tabela 5. Principais variáveis utilizadas na avaliação do paciente hepatopata e seus valores observados neste estudo

VARIÁVEIS	CLASSIFICAÇÃO DE CHILD-PUGH								
	A			B			C		
	\bar{x}	dp	n	\bar{x}	dp	n	\bar{x}	dp	n
TGO (UI/L)	69,80	56,61	25	113,13	106,02	16	72,29	23,27	7
TGP (UI/L)	44,88	36,17	25	57,25	109,44	16	31,86	11,94	7
Gama-GT (UI/L)	160,58	100,95	24	244,00	315,73	15	124,83	125,13	6
Bilirrubina total (mg%)	1,19	3,79	22	1,82	1,4	13	4,58	1,81	6
Bilirrubina indireta (mg%)	0,69	0,60	22	1,69	1,85	15	1,93	1,02	7
Bilirrubina direta (mg%)	1,66	3,54	21	2,06	2,71	13	2,49	1,23	6
Albumina (UI/L)	3,63	0,73	25	2,50	0,73	17	2,34	0,73	7
Gamaglobulina	4,50	.	1	5,17	0,50	3	4,76	0,86	5
Fosfatase alcalina (UI/L)	182,83	343,97	23	380,23	667,95	3	624,50	398,31	6
Pseudocolinesterase (U)	0,364	0,140	25	0,175	0,90	17	0,125	0,74	7

Tabela 6. Coeficientes de correlação simples entre as variáveis apresentadas e a classificação de Child-Pugh (A = 1 ; B = 2 ; C = 3)

VARIÁVEL	CORRELAÇÃO COM A CLASSIFICAÇÃO DE CHILD-PUGH	COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO (%)	p
TGO	0,109	1,18	0,40 < p < 0,50
TGP	-0,022	0,05	0,80 < p < 0,90
Gama-GT	0,130	1,69	0,30 < p < 0,40
Bilirrubina total	0,317	10,04	< 0,05
Bilirrubina indireta	0,398	15,84	< 0,01
Bilirrubina direta	0,158	2,49	0,30 < p < 0,40
Albumina sérica	-0,597	35,64	< 0,001
Gamaglobulina	- 0,041	0,17	> 0,90
Fosfatase alcalina	0,324	10,49	< 0,05
Pseudocolinesterase	-0,641	41,11	< 0,001

O modelo matemático final para a avaliação laboratorial do paciente com cirrose hepática, que hoje se baseia em 9 variáveis (tabela 6), pode ser simplificado a 2 variáveis, sendo uma delas a clássica determinação da concentração sérica da albumina e a outra a determinação da atividade da pseudocolinesterase.

Sendo a atividade da pseudocolinesterase determinada segundo o método descrito neste trabalho, o modelo matemático a ser utilizado na estimativa do grau de comprometimento hepático passa a ser :

$$y = 2,995 - 2,0912 [\text{PsChE}] - 0,2650 [\text{Alb}]$$

Onde Y é a estimativa do grau de comprometimento hepático, [PsChE] é a atividade da pseudocolinesterase expressa em U e [Alb] é a concentração de albumina sérica.

V. DISCUSSÃO

A diminuição na atividade da pseudocolinesterase em indivíduos portadores de hepatopatias foi descrita pela primeira vez por Antipol e cols. (1937), sendo que McArdle (1940) confirmou essa observação (para referências confira Vorhaus *et al.*, 1950).

Wescoe *et al.* (1940), Vorhaus *et al.* (1950), La Motta *et al.* (1957), Kekwick (1960), Evans e Lehmann (1971), Ward (1976), Kaniaris *et al.* (1979) e Hada *et al.* (1988), são alguns autores que, entre outros, demonstraram a correlação entre atividade da pseudocolinesterase e doença hepática.

Faber (1943) demonstrou haver uma estreita correlação entre pseudocolinesterase e albumina sérica. Essa mesma correlação foi descrita por Saez-Alquezar (1983) que também sugere ser a dosagem da atividade da pseudocolinesterase bastante sensível para detecção de alterações hepáticas, uma vez que ela é uma enzima extra-celular e a queda dos seus níveis de atividade reflete uma diminuição na capacidade de síntese pelo parênquima hepático, ou da massa hepática funcionante.

Segundo Saez-Alquezar (1983) a albumina e a pseudocolinesterase são os indicadores mais sensíveis para avaliação da função hepática, sendo a pseudocolinesterase mais sensível ainda que a albumina, devido à meia-vida dessa última ser mais longa, o que é confirmado neste trabalho.

Nos casos de fígado adiposo a atividade da pseudocolinesterase está, geralmente, aumentada. A explicação para esse fato encontra-se nos dados de Cucuianu *et al.* (1968) e Chu *et al.* (1978) que mostram um aumento na atividade da pseudocolinesterase em pacientes hiperlipidêmicos.

É de causar surpresa que poucos trabalhos atuais associem a atividade enzimática da pseudocolinesterase com doença hepática e que, principalmente, esse método não esteja incluído dentre aqueles rotineiros cujo intuito é avaliar a função hepática.

Segundo Brown *et al.* (1981), o ponto fraco dos testes para determinação da atividade da pseudocolinesterase, cuja finalidade seja a avaliação da função hepática, reside no fato de, muitas vezes, o indivíduo não apresentar baixa atividade relacionada à doença e sim ser portador de uma deficiência enzimática determinada geneticamente, pois, segundo esses autores, os testes inibitórios que

utilizam dibucaína, fluoreto ou outros agentes, não são sensíveis o suficiente para se determinar a presença da variante “silenciosa”.

De acordo com os dados da literatura pertinente e aqueles obtidos no presente trabalho, deve se considerar a investigação da atividade da pseudocolinesterase um ótimo indicativo da função hepática, uma vez que, as variantes genéticas têm uma frequência extremamente baixa na grande maioria das populações (vide tabela 2, introdução), o substrato utilizado neste experimento liga-se à enzima em seu sítio esterásico, quando as variantes genéticas demonstram, segundo a bibliografia citada, alteração em seu sítio aniônico.

Foldes e cols. (1956) demonstraram não haver correlação entre apnéia prolongada (após injeção de succinilcolina) e doença hepática, o que ajuda a comprovar a hipótese de ser a diminuição da atividade da pseudocolinesterase extremamente relacionada com a diminuição da função hepática.

Como citado anteriormente, os processos patológicos que causam diminuição de massa hepática funcionante, mostram diminuição na atividade enzimática da pseudocolinesterase, como nos tumores (primários ou metastásicos) e nas cirroses, embora nessa última, a avaliação da pseudocolinesterase não permita identificar os diferentes tipos de cirrose. Na hepatite aguda por vírus a diminuição da atividade da enzima é pouco acentuada, ao contrário das formas colestáticas da hepatite (Saez-Alquezar, 1983).

VI. CONCLUSÃO

Considerando estar a atividade da pseudocolinesterase negativa e significativamente correlacionada com o grau de comprometimento hepático, fornecendo um coeficiente de determinação de 41,11%, superior ao das demais variáveis rotineiramente utilizadas na avaliação clínica de paciente com insuficiência hepática, pode-se concluir que este método pode ser bastante útil com esse propósito.

De fato, trata-se de um método não invasivo, de fácil execução e baixo custo e, além disso, quando a atividade da pseudocolinesterase se acompanha da concentração de albumina sérica, o coeficiente de determinação do grau de comprometimento hepático sobe para 48,81%, aumentando, assim, a precisão da avaliação laboratorial do comprometimento do fígado no paciente hepatopata crônico.

SUMMARY

Pseudocholesterase (EC 3.1.1.8), also known as serum cholinesterase or butyrylcholinesterase is an enzyme encountered in blood serum, pancreas, heart and in the white substance of the brain, but its concentration is more noticeable in the liver.

The main scope of this work was to review in pertinent literature the causes for the pseudocholesterase activity reduction and to determine the activity of this enzyme in a group of patients carrying chronic liver diseases, in order to investigate the relationship between the degree of hepatic injury and the enzyme activity, in relation to other variables usually taken for the same purpose.

The forty nine patients evaluated had their clinical condition recorded and classified according to Child-Pugh rating. A group of 132 healthy blood donors, was utilized as source for blood samples for achieving the normal pseudocholesterase activity distribution.

According to the results, the majority of patients (72%) with degree A on Child-Pugh rating, presented pseudocholesterase activity within confident intervals of found values among healthy individuals.

This ratio becomes reduced among patients pertaining to group B, where 29,4% maintain their enzymatic activity within the normal interval, while 70,6% present their pseudocholesterase activity below the lower limit of that interval obtained among healthy individuals.

Also, the great majority of patients (71,4%) classified as C grade, presented the pseudocholesterase activity below the lower limit of the normal interval obtained within healthy individuals.

After carrying out a stepwise multiple regression analysis to the encountered data, the following formula has been yielded to estimate the clinical status of the hepatic compromissing in individuals carrying chronic liver diseases:

$$y = 2,995 - 2,0912 [\text{PsChE}] - 0,2650 [\text{Alb}]$$

Where: y is the estimated value for the hepatic compromissing,
[PsChE] is the pseudocholesterase activity expressed in U and
[Alb] is the serum albumin concentration.

VII. BIBLIOGRAFIA

- Acuña, P.M. & Riquelme, P.Z.- Frecuencias Fenotípicas, Genotípicas y Genicas. Seudocolinesterasa Serica en Doadores de Sangre En Santiago de Chile. *Rev. Med. Chile*, 117:879-883, 1989.
- Alles, G.A. & Hawes, R.C.- Cholinesterases in the Blood of Man. *J. Biol. Chem.*, 133:375-90, 1940.
- Atack, J.R.; Perry, E.K.; Bonham, J.R.- Molecular Forms of AchE and BchE in the Aged Human Central Nervous System. *J. of Neurochem.*, 47:263-277, 1986.
- Bartels, C.F.; Jensen, F.S.; Lockridge, O.; van der Spek, A.F.L.; Rubinstein, H. M. ; Lubrano, T.; La Du, B.N.- DNA Mutation Associated with the Human Butyrylcholinesterase K-Variant and Its Linkage to the Atypical Variant Mutation and Other Polymorphic Sites. *Am. J. Hum. Genet.*, 50:1086-1103, 1992.
- Beiguelman, B.- A Deficiência da Pseudocolinesterase. In: *Farmacogenética e Sistemas Sangüíneos Eritrocitários em genética e na Prática Médica*. 1ª ed. São Paulo, Edart 1979.p.37-43.
- Brown, S.S.; Kalow W.; Pilz,W.- The Plasma Cholinesterase: A new Perspective. *Adv. in Clin. Chem.*, 22:2-5, 1981.
- Chatonnet, A. & Lockridge, O.- Comparison of Butyrylcholinesterase and Acetylcholinesterase. *Biochem. J.*, 260:625-34, 1989.
- Chautard-Freire-Maia, E.A.; Duarte, S.R.; Bahiana, M.C.- Frequencies of atypical serum cholinesterase in a mixed population of North Eastern Brazil. *Human Hered.*, 34: 364-370, 1984.
- Chu, M.I.; Fontaine,P.; Kuttu, K.M.; Murphy, D.; Redheendran, R.- Cholinesterase in Serum and Low Density Lipoprotein of Hyperlipidemic Patients. *Clin. Chim. Acta*, 85:55-59, 1978.
- Clitherow, J.W.; Mitchard, M.; Harper, N.J.- The Possible Biological Function of PSCHE. *Nature*, 199 (7):1000-01, 1963.
- Crook, M.; Haq, M.; Tutt, P.- Serum Lipids, Acute Phase Proteins and Serum Cholinesterase in Normal Subjects. *Scand J. Clin. Lab. Invest.*, 54:601-603, 1994.
- Cucuianu, M.; Popescu, T.A. ; Haragus S.T.- Pseudocholesterase in Obese and Hyperlipemic Subjects. *Clin. Chim. Acta*, 22:151-155, 1968.
- Dermot B.T.- Relaxantes Musculares: Periféricos e Centrais. In : Bevan J. A. *Fundamentos da Farmacologia: Introdução aos Princípios de Ação das Drogas*. São Paulo, Harper e Raw do Brasil Ltda., 1976. p. 142-150.

- Evans, D.B. & Lehman, H.- Pseudocolinesterase Activity in Liver Transplantation. *Lancet*, maio (22):1040-1044, 1971.
- Evans, R.T.; O'Callaghan, J.; Norman, A.- A Longitudinal Study of Cholinesterase Changes in Pregnancy. *Clin. Chem.*, 34(11):2249-2252, 1988.
- Faber, M.- The Relationship between Serum Choline Esterase and Serum Albumin. *Acta Med. Scand.*, CXIV, Fasc.1:73-91,1943.
- Foldes, F.F.; Swerdlow, M.; Lipschitz, E.; Shanor, S.P.- Comparison of the Respiratory Effects of Suxamethonium and Suxethonium in Man. *Anesthesiology*, 17:559,1956.
- Funnel, H.S. & Oliver, W.T.- Proposed Physiological Function for Plasma Cholinesterase. *Nature*, 208 (13):689-690, 1965.
- Gallango, M.L.; Arends, T.- Phenotypical Variants of Pseudocholinesterase in Myeloma Patients. *Humangenetik*, 7:104-108, 1969.
- Garry, P. J.; Dietz, A.A.; Lubrano, T.; Ford, P.C.; James, K.; Rubinstein, H.M.- New Allele at Cholinesterase Locus 1. *J. Med. Genet.*, 13:38-42, 1976.
- Gayotto, L.C.C. & Bogliolo, L.- Fígado e vias biliares. In: Bogliolo, L. *Patologia*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 1994, 5ªed.p.599-654.
- Hada, T.; Ohue, T.; Imanishi, H.; Nakaoka H.- Alteration of Serum Cholinesterase Isozyme in Patients with Liver Cirrhosis. *Clin. Chim. Acta*, 178:111-112, 1988.
- Hamilton, J.W.; McMinn, R.M.H.- Aparelho digestivo. In: *Tratado de Anatomia Humana*, Rio de Janeiro, Interamericana, 1982.p.415-423.
- Harris, H. & Whittaker, M.- Differential Inhibition of "Usual" and "Atypical" Serum Cholinesterase by NaCl and NaF. *Ann. Hum. Genet.*, 27:53-58, 1963.
- Harris, H. & Whittaker, M. - Differential Inhibition of Human Serum Cholinesterase with Fluoride: Recognition of Two New Phenotypes. *Nature*, 29:496-498, 1961.
- Harris, H.; Hopkinson, D.A.; Robson, E.B.- Two - Dimensional Electrophoresis of Pseudocholinesterase Components in Normal Human Serum. *Nature (London)*, 196:1296-1298, 1962.
- Jensen F.S.; Schwartz, M.; Viby-Mogensen, J.- Identification of Human Plasma Cholinesterase Variants using Molecular Biological Techniques. *Acta Anaesthesiol. Scand.*, 39:142-149, 1995.

- Jensen, F.S.; Skovgaard, L.T.; Viby-Mogensen, J.- Identification of Human Plasma Cholinesterase Variants in 6,688 Individuals Using Biochemical Analysis. *Acta Anaesthesiol. Scand.*, 39:157-162, 1995.
- Junqueira, L.C.; Carneiro, J. - Glândulas Anexas do Tubo Digestivo. In: *Histologia Básica*. 5ªed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. p.268-285 1995.
- Kalow W. & Staron, N.- On Distribution and Inheritance of Atypical Forms of Human Serum Cholinesterase, as Indicated by Dibucaine Numbers. *Can. J. Biochem. Physiol.* 35:1305-1320, 1957.
- Kalow, W. & Genest, K.- A Method for the Detection of Atypical Forms of Human Serum Cholinesterase. Determination of Dibucaine Numbers. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 35:339-346, 1957.
- Kalow, W & Davies, R.O. - The activity of various esterase inhibitors toward atypical human serum cholinesterase. *Biochem. Pharmacol.* 1: 183, 1958.
- Kaniaris, P. ; Fassoulaki, A.; Liarmakopoulou, K.; Dermitzakis, E.- Serum Cholinesterase Levels in Patients with Cancer. *Anesth. Analg.*, 58:82-84, 1979.
- Kekwick, R.G.O.- Serum-Cholinesterase Activity in Health and in Liver Disease. *Biochem. J.*, 76:420,1960.
- King, J. & Dixon, R. I.- A Source of Error in the Determination of Inhibitor Constants of Serum Cholinesterase. *Br. J. Anaesth.*, 42:698-670, 1970.
- Koelle, G. B.- Anticolinesterásicos. In : Goodman, L.S.-*Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 5.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1975.p.398-526.
- Koelle, G. B. - Bloqueadores Neuromusculares. In : Goodman, L.S.-*Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 5.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1975.p.514-526.
- Koelle, G. B. - Substâncias que Atuam nas Sinapses Neuroefetoras. In : Goodman, L.S.- *Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 5ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1975.p.712-789
- Kutty, K.M. & Payne, R.H.- Serum Pseudocolinesterase - Very Low Density Lipoprotein Metabolism. *J. of Clin. Lab. Analysis*, 8:247-50, 1994.
- LaMotta, R.V. & Waronick, C.L.- Molecular Heterogeneity of Human Serum Cholinesterase. *Clin. Chem.*, 17(3): 135-144, 1971.

- LaMotta, R.V. ; Willians, H.M. ; Wetstone, H.J.- Studies of Cholinesterase Activity. *Gastroenterology*, 33:50- 57, 1957.
- Layer, P.G. & Willbold, E.- Novel Functions of Cholinesterases in Development, Physiology and Disease. *Prog. in Histochem. and Cytochem.*, 29(3):1-93, 1995.
- Lehmann, H. & Liddel, J.- Human Cholinesterases : Genetic Variant and their Recognition. *Brit. J. Anaesth.*, 41:235-244, 1969.
- Liddel J. ; Lehmann, H. ; Silk, E.- A Silent Pseudocholinesterase Gene. *Nature*, 10:561-562, 1962.
- Liddel, J.; Lehmann, H.; Davies, D.- Harris and Whittaker's Pseudocholinesterase Variant With Increased Resistance to Fluoride. A Study of Four Families and the Identification of the Homozygote. *Acta Genet. (Basel)*,13:95-108, 1963.
- Lockridge, O. & La Du, B.N.- Amino Acid Sequence of the Active Site of Human Serum Cholinesterase from Usual, Atypical, and Atypical-Silent Genotypes. *Biochem. Genet.*, 24(5/6):485-498, 1986.
- Lockridge, O.; La Du, B.- Comparison of Atypical and Usual Human Serum Cholinesterase. *The J. of Biol. Chem.*, 253(2):361-366, 1978.
- Lovrien, E.W.; Magenis, R.E.; Rivas, M.L.- Serum Cholinesterase E₂ Linkage analysis : Possible Evidence for Localization to Chromosome 16. *Cytogenet. Cell Genet.*, 22:324-326, 1978.
- Magna, L.A.- A Practical Method for Screening Atypical Cholinesterase. *Clin. Chim. Acta*, 123:333-338, 1982.
- Magna, L.A.; Pinto Jr., W.; Beiguelman, B.- Deficiência de Pseudocolinesterase em uma População Brasileira. *Ciência e Cultura*, 30:516, 1978.
- Massoulié, J. & Bom, S.- The Molecular Forms of Cholinesterases and Acetylcholinesterase in Vertebrates. *Ann. Ver. Neurosci.*, 5:57-106, 1982.
- McGuire, C.M.; Nogueira, P.C.; Bartels, C.F. Lightstone, H.; Hajra, A.; Abraham, F.L.; van der Spek, A.F.L.; Lockridge, O.; La Du, B.N.- Identification of the Structural Mutation Responsible for the Dibucaine-Resistant (Atypical) Variant Form of Human Serum Cholinesterase. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:953-957, 1989.
- Mendel, B. & Rudney, H.- Studies on Cholinesterases. *Biochem. J.*, 37:59-63, 1943.

- Miller, R. D. - Relaxantes do músculo esquelético. In: Katzung, B.G.- Farmacologia Básica e Clínica. 5ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1994.p 277-285.
- Morrow, A.C. & Motulsky, A.G.- A Rapid Screening method for the Common Atypical Pseudocolinesterase Variant. *J. Lab. Clin. Med.*, 71:350-356, 1968.
- Motulsky, A.G.- Pharmacogenetics. *Prog. Med. Genet.*, 3:49-74, 1964.
- Muensch, H.; Yoshida A.; Altland, K.; Jensen, W.; Goedde, H.W.- Structural Difference at the Active Site of Dibucaine Resistant Variant of Human Plasma Cholinesterase. *Am. J. Hum. Genet.*, 30:302-307, 1978.
- Neitlich, H.W.- Increased Plasma Cholinesterase Activity and Succinylcholine resistance: A Genetic Variant. *J. Clin. Invest.*, 45:380-387, 1966.
- Nogueira, P.C.; Bartels, C.F.; Mcguire, M.C.- Identification of Two Different Point Mutations Associated with the Fluoride-resistant Phenotype for Human Butyrylcholinesterase. *Am. J. Human. Genet.*, 51:821-828, 1992.
- Nogueira, P.C.; McGuire, M.C.; Graese, C.- Identification of a Frameshift Mutation responsible for the Silent Phenotype of Human Serum Cholinesterase, Gly 117 (GGT → GGAG). *Am. J. Human. Genet.*, 46: 934-942, 1990.
- Panteghini, M.- Methods for Serum Cholinesterase Assay and Classification of Genetic Variants. *Clin. Chim. Acta*, 183:87-90, 1989.
- Pantuck J.E.- Plasma Cholinesterase : Gene and Variations. *Anesth. Analg.*, 77:380-6, 1993.
- Pedersen N.A. & Jensen, F.S.- Clinical Importance of Plasma Cholinesterase for the Anaesthetist. *Annal. Acad. of Med.*, 23(Suppl. 6):120-24, 1994.
- Peyster, A.; Willis, W.O.; Liebhaber, M.- Cholinesterase Activity in Pregnant Women and Newborns. *Clin. Toxicol.*, 32(6):683-696, 1994.
- Ratner, D.; Sella, P.B.; Schneeyour, A.; Kardontchik, A.; Eshel, E.- Seasonal Variation in Blood Cholinesterase Activity. *Israel J. of Med. Sci.*, 25:247-250, 1989.
- Rocha e Silva, M.- Conceitos Básicos de Farmacologia. In:- Fundamentos da Farmacologia e suas Aplicações. 3ª ed. São Paulo, Edart, 1973.v.1. p.1-37.

- Rubinstein, H.M.; Dietz, A.A.; Hodges, L.K.; Lubrano, T.; Czeboter, V.- Silent gene: Variations in the Properties of Serum Enzyme in Apparent Homozygotes. *J. Clin. Invest.*, 49:479-486, 1970.
- Rubinstein, H.M.; Dietz, A.A.; Lubrano, T.- E^k₁ Another Quantitative Variant as Cholinesterase Locus I. *J. Med. Genet.*, 15:27-29, 1978.
- Saez-Alquezar, A. ; Carrilho, J.F.; Raia, S.A.; Silva, C.L.- Níveis Séricos de Atividade Enzimática nas Hepatopatias. *Rev. Bras. Med.*, 40(08): 284-293, 1983.
- Scott, E.M. & Wright, R.C.- A Third Type of Serum Cholinesterase Deficiency in Eskimos. *Am. J. Human Genet.*, 28:253-276, 1976.
- Simpson, N.E. & Kalow, W.- Comparison of Two Methods for typing of Serum Cholinesterase and Prevalence of its Variants in a Brazilian Population. *Am. J. Hum. Genet.*, 17:156-162, 1965.
- Simpson, N.E. & Kalow, W.- The Silent Gene for Serum Cholinesterase. *Am. J. Human. Genet.*, 16:180-188, 1964.
- Soreq, H.; Zamir, R.; Zakut, H.- Human Cholinesterase Genes Localized by Hibridization to Chromossomes 3 and 16. *Human Genetics*, 77:325-328, 1987.
- Stedman, E.; Stedman, E.; Easson, H.L.- Choline-esterase. An enzyme Present in the Blood-serum of the Horse. *Biochem. J.*, 26:2056-66, 1932.
- Stegmuller, H. - On the Geographical Distribution of Pseudocolinesterase Variants. *Humangenetik*, 26:167-185, 1975.
- Taylor, P. - Relaxantes Musculares: Periféricos e Centrais. In: Bevan J. A. *Fundamentos da Farmacologia: Introdução aos Princípios de Ação das Drogas.* São Paulo, Harper e Raw do Brasil Ltda., 1976 p. 142-149.
- Vorhaus, J.L.; Scudmore, H.H.; Kark, M.R.- Measurement of Serum Cholinesterase Activity in the Study of Diseases of the Liver and Biliary System. *Gastroenterology*, 15:304-315, 1950.
- Ward, M.E.; Knights, K.M.; Strunin, J.M.; Strunin, L.- Serum Cholinesterase Concentrations in Fulminant Hepatic Failure. *Brit. J. of Anaesthesia*, 48:818, 1976.
- Watanabe, A.M.; Katzung, B.G.- Drogas Ativadoras de Colinoreceptores e Inibidoras da Colinesterase. In : Katzung, B.G.- *Farmacologia Básica e Clínica.* 5ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1994.p.64-74.

- Wescocoe, W.C.; Hunt, C.C.; Riker, W.F.Jr; Litt, I.C.- Regeneration Rates of Serum Cholinesterase in Normal Individuals and in Patients with Liver Damage. *Am. J. Physiol.*, 149:549, 1947.
- Westfall, T.C.- Inibidores da Colinesterase. In : Bevan J. A. *Fundamentos da Farmacologia: Introdução aos Princípios de Ação das Drogas.* São Paulo, Harper e Raw do Brasil Ltda., 1976.p.107-112.
- Whittaker, M.- Plasma Cholinesterase Variants and the Anaesthetist. *Anaesthesia*, 35:174-197, 1980.
- Whittaker, M.- The Pseudocolinesterase Variants. Differentiation by Means of Alkylalcohols. *Acta Genet. (Basel)*,18:325-334, 1968.
- Whittaker, M. & Britten, J. - A new Allele at Cholinesterase Locus 1. *Human Hered.*, 37:54-58, 1987.
- Yamato, K.; Yie-Huang, I.; Muensch, H.; Yoshida A.; Heinz-Werner, G.; Agarwal, P.D.- Amino Acid Sequence of the Active Site of Human Pseudocolinesterase. *Biochem. Genet.*, 21(1/2):135-145, 1983.
- Yoshida, A. & Motulsky, A.G.- A Pseudocholinesterase variant (E Cynthiana) Associated with Elevated Plasma Enzyme Activity. *Am. J. Human. Genet.*, 21: 486-498, 1969.
- Zanini, A. C. & Oga, S. - Sistema Nervoso Autônomo. In : *Farmacologia Aplicada.* 5ª ed. São Paulo, Atheneu, 1994.p.78-92.