

JOVANA KAROLINE DE LIMA

RELAÇÃO ENTRE FORMAS MOLECULARES DA
BUTIRILCOLINESTERASE E VARIÁVEIS METABÓLICAS

Curitiba

2012

JOVANA KAROLINE DE LIMA

RELAÇÃO ENTRE FORMAS MOLECULARES DA
BUTIRILCOLINESTERASE E VARIÁVEIS METABÓLICAS

Monografia referente à disciplina Estágio Supervisionado em Genética (BG014 e BG015), como requisito parcial para obtenção de grau de Bacharel em Ciências Biológicas, na Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a Dr^a Lupe Furtado-Alle

Curitiba

2012

À minha família

“Desejar é o primeiro passo para a conquista de nossos sonhos e todos eles podem tornar-se realidade se tivermos coragem de persegui-los.” (Walt Disney).

RESUMO

A butirilcolinesterase (BChE) é uma esterase sérica codificada pelo gene *BCHE* (3q26.1-q26.2), que apresenta quatro éxons, com mais de 65 variantes já descritas. Diversos estudos têm associado a BChE com aspectos metabólicos, como perfil lipídico e obesidade. No presente estudo foi investigada a relação entre as intensidades relativas das formas moleculares da BChE (G1, G1-alb, G2, G4), com dados de atividade enzimática, fenotipagem do loco *CHE2*, dados bioquímicos e antropométricos. A amostra consistiu de 290 indivíduos de Curitiba/PR Brasil. As intensidades relativas foram obtidas através de eletroforese em gel de poliacrilamida e da sua quantificação pelo programa *KODAK 1D Image Analysis Software*. A atividade da BChE plasmática foi medida utilizando a propioniltiocolina como substrato. E a fenotipagem do loco *CHE2* através da eletroforese em gel de ágar ácido. As mulheres representaram 62,10% da amostra; e apresentaram diferença significativa em relação aos homens quanto à idade ($t=-2,80$; $p=0,007$), HDL ($t=-5,41$; $p<0,001$) e triglicerídeos ($t=2,55$; $p=0,012$). Foi verificado que apesar de não haver diferença significativa entre a IR de cada forma molecular, (as proporções das IR são mantidas, independentemente do IMC), a análise quanto à atividade relativa, comparando IMCs normal, versus maiores que 25, revelou que, a forma monomérica é significativamente maior entre as categorias de IMC maior que 25 ($t=-2,36$; $p=0,02$). O que permite concluir que a atividade superior observada nos indivíduos obesos é devida principalmente as formas monoméricas da BChE. Foi identificada uma forte correlação entre glicose e intensidade relativa de G1 e G1-alb ($z=2,6$ e $p=0,008$; $z=2,98$ e $p=0,003$ respectivamente). Os grupos *CHE2 C5+* e *CHE2 C5-* diferiram significativamente quanto à atividade total ($t=2,56$ e $p=0,01$) e atividade das formas moleculares G2 ($t=2,34$ $p=0,02$) e G4 ($t=2,27$ $p=0,02$). Logo, em indivíduos com fenótipo *CHE2 C5+*, há predominância das formas dímero e tetrâmero em detrimento das outras. Possivelmente as diferentes formas moleculares da BChE participam ativamente no metabolismo e sua regulação tem grande importância nesse processo.

ABSTRACT

The butyrylcholinesterase (BChE) is an serum esterase encoded by the *BCHE* gene (3q26.1-q26.2) having four exons, over 65 variants already described. Several studies have associated BChE with metabolic aspects, such as lipid profile and obesity. In the present study we investigated the relationship between the relative intensities of the molecular forms of BChE (G1, G1-alb, G2, G4), with enzymatic activity data, the CHE2 loco phenotyping, biochemical and anthropometric data. The sample consisted of 290 individuals from Curitiba / PR Brazil. The relative intensities were obtained by polyacrylamide gel electrophoresis and its quantitation by the program Kodak 1D Image Analysis Software. The plasma BChE activity was measured using the propioniltiocolina as substrate. And phenotyping of loco CHE2 by agar gel electrophoresis acid. The women represented 62.10% of the sample, and showed a significant difference compared with men in terms of age ($t = -2.80$, $p = 0.007$), HDL ($t = -5.41$, $p < 0.001$) and triglycerides ($t = 2.55$, $p = 0.012$). It was found that although there was no significant difference between the IR of each molecular form, (the proportions of IR are maintained, regardless of BMI), the analysis as to relative activity, BMI comparing normal versus greater than 25, showed that the monomeric form is significantly higher among the categories of BMI greater than 25 ($t = -2.36$, $p = 0.02$). What allows us to conclude that the superior activity observed in obese individuals is due primarily monomeric forms of BChE. A strong correlation was found between glucose and relative intensity of G1 and G1-alb ($z = 2.6$ and $p = 0.008$, $z = 2.98$ and $p = 0.003$ respectively). The groups CHE2 C5 + and C5-CHE2 differed significantly in the total activity ($t = 2.56$, $p = 0.01$) and activity of molecular forms G2 ($t = 2.34$ $p = 0.02$) and G4 ($t = 2.27$, $p = 0.02$). Thus, in individuals with C5 + phenotype CHE2, there is a predominance of dimer and tetramer forms at the expense of others. It is possible to deduce that the different molecular forms of BChE actively participate in metabolism and its regulation is of great importance in this process.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Frequência relativa de homens e mulheres (%).....	29
Gráfico 2. Frequências relativas de homens e mulheres dentre as categorias de IMC.....	30
Gráfico 3. Médias de Intensidade Relativa (IR) das formas moleculares da BChE de acordo com as categorias de IMC.....	32
Gráfico 4. Médias das atividades relativas (IR x atividade total) das formas moleculares na amostra total, homens e mulheres.....	34
Gráfico 5. Frequência relativa (%) de indivíduos com fenótipo CHE 2 C5+ e CHE2 C5-, entre os grupos de IMC.....	38
Gráfico 6. Médias das atividades relativas das formas moleculares entre indivíduos CHE2 C5+ e CHE2 C5-.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação de adultos de acordo com o índice de massa corporal (IMC), e risco de comorbidades associadas à obesidade.....	13
Tabela 2. Caracterização da amostra geral e separada por sexo de acordo com a média \pm erro padrão dos parâmetros obtidos.....	30
Tabela 3. Média \pm erro padrão das atividades das formas moleculares da BChE e resultados dos testes t (p) na amostra categorizada por IMCs.....	33
Tabela 4. Correlação entre intensidades relativas das formas moleculares da butirilcolinesterase e variáveis antropométricas e bioquímicas na amostra total (com n= 73).....	36
Tabela 5. Correlação entre intensidades relativas das formas moleculares da butirilcolinesterase e variáveis antropométricas e bioquímicas na amostra de homens (n=28).....	36
Tabela 6. Correlação entre intensidades relativas das formas moleculares da butirilcolinesterase e variáveis antropométricas e bioquímicas na amostra de mulheres (n=43).....	37
Tabela 7. Média \pm erro padrão e resultados de testes t (p) das variáveis bioquímicas em amostra de fenótipos CHE2 C5- e CHE2 C5+ (mulheres)...	39

LISTA DE SIGLAS

- AChE - Acetilcolinesterase
- BChE - Butirilcolinesterase
- BCHE* - Gene da butirilcolinesterase
- CEPEFIS - Centro de Performance Física
- CHE2* - Loco condicionador do complexo C₅ da butirilcolinesterase
- ChEs - Colinesterases
- CT - Colesterol total
- DTNB - Ácido 5,5'-bisditio-2-nitrobenzóico
- EDTA - Ácido etilenodiaminotetraacético
- G1 - Monômero da butirilcolinesterase
- G1- alb - Monômero da butirilcolinesterase associado à albumina
- G2 - Dímero da butirilcolinesterase
- G4 - Tetrâmero da butirilcolinesterase
- HDL - Lipoproteína de alta densidade
- IMC - Índice de massa corporal
- LDL - Lipoproteína de baixa densidade
- NCBI - *National Center for Biotechnology Information*
- NQV - Núcleo de Qualidade de Vida
- OMS - Organização Mundial da Saúde
- PCR - *Polymerase Chain Reaction* PR – Paraná
- SNPs - *Single Nucleotide Polymorphisms*
- TBE - Tris-ácido bórico-EDTA
- TEMED - Tetramethylethylenediamine
- WHO - *World Health Organization*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 IMC e Obesidade.....	12
2.2 <i>BCHE</i>	15
2.2.1 Butirilcolinesterase (BChE) e função	15
2.2.2 Formas moleculares da BChE.....	16
2.2.3 Gene <i>BCHE</i>	17
2.2.4 Variantes do gene <i>BCHE</i>	18
2.2.5 Loco <i>CHE2</i>	19
2.3 BChE e a Obesidade.....	20
3 OBJETIVOS	23
3.1 Objetivo geral.....	23
3.2 Objetivo específico.....	23
4 MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1 Amostras.....	24
4.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida para a detecção das bandas G1, G1-alb, G2 e G4.....	25
4.3 Medida da atividade da BChE.....	26
4.4 Eletroforese em gel de ágar – Fenotipagem do loco <i>CHE2</i>	27
4.5 Análise dos dados.....	28
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
6 CONCLUSÕES	40
REFERÊNCIAS	41

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos 35 anos, o Brasil passou por uma impressionante transformação. Completou a transição de país rural para sociedade urbana e industrial, deixou para trás índices de mortalidade infantil e analfabetismo e, depois que conseguiu domar a inflação, na década de 90, consolidou um aumento substancial da renda da população. Esse conjunto de fatores permitiu reduzir drasticamente o histórico problema da desnutrição no Brasil. E resultou numa impressionante mudança no padrão físico do brasileiro. Desde 1974, quando foi feita a primeira pesquisa familiar que registrou peso e altura dos entrevistados, a população tornou-se mais alta e ganhou peso. Muito peso. E é aí que a boa notícia começa a dar lugar à preocupação. O sobrepeso e a obesidade aumentaram excessivamente, sendo causado geralmente por uma alimentação pouco saudável (SOARES e RITTO, 2010).

Como a obesidade pode provocar alterações metabólicas múltiplas que contribuem para doenças cardiovasculares (coronariopatias, hipertensão arterial, trombose venosa), diabetes, dislipidemias, afecções pulmonares, renais, biliares e certos tipos de neoplasias, dentre outras, podemos dizer que esta condição clínica caminha para ser a mais importante causa de doença crônica do mundo (GRUNDY, 1998). A etiologia da obesidade tem sido foco de muitas pesquisas, pelo que representa de redução na expectativa de vida e nos custos dos serviços de saúde. E diante dos múltiplos aspectos que estão envolvidos no seu desenvolvimento, vem se percebendo a importância genética na predisposição à doença. Inúmeros marcadores genéticos já foram relacionados com a obesidade e suas consequências metabólicas, mas as interações específicas entre genótipo e fenótipo da obesidade permanecem mal compreendidas (CLEMENT e FERRE, 2003).

Muitos estudos sugerem que a enzima butirilcolinesterase (BChE) está relacionada ao metabolismo de lipídeos, e às lipoproteínas. Clitherow, Mitchard e Harper (1963) propuseram que o papel da BChE no metabolismo de lipídeos seria hidrolisar ésteres de colina, preferencialmente butirilcolina, que são subprodutos do catabolismo de ácidos graxos livres, e da lipogênese no fígado. Desse modo, o aumento na disponibilidade e também do fluxo de ácidos

graxos livres para o fígado, bem como o aumento da lipogênese de carboidratos, poderiam levar a efeitos de hiperlipidemia e atividade elevada da BChE. Os resultados de Cucuianu, Popescu e Haragus (1968) concordam com essa hipótese.

A BChE humana é uma esterase plasmática, cuja síntese ocorre no fígado e então é difundida para outras partes do corpo. A enzima é codificada pelo gene *BCHE* (3q26.1-q26.2), que apresenta quatro éxons (ARPAGAUS *et al.*1990). Boberg *et al.* (2010), concordando com trabalhos anteriores, demonstraram que indivíduos obesos possuem atividade da BChE significativamente maior que não obesos. Nesse mesmo estudo também foi mensurada a intensidade relativa (IR) de cada banda eletroforética, referentes às formas moleculares de BChE, e os resultados revelaram que a IR de cada banda é mantida independentemente da obesidade, sugerindo que a proporção das formas moleculares da BChE é regulada, e pode ter grande importância para a função da BChE.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 IMC e obesidade

A obesidade é caracterizada por um depósito excessivo de gordura no organismo. Esse depósito funciona como um estoque, de modo que os nutrientes não utilizados para produção imediata de energia passam a ser armazenados em forma de gordura para disponibilização posterior. Isso ocorre devido a quantidade de energia ingerida ser maior do que a energia despendida, conseqüentemente ocorre uma expansão dos adipócitos, e em alguns casos, o aumento do número dessas células. Como resultado, tem-se um balanço energético positivo, associado ao aumento do peso.

Um preditor internacional de obesidade adotado pela OMS (Organização Mundial da Saúde) utilizado para calcular se uma pessoa está no peso ideal, é o índice de massa corporal (IMC), que consiste de um cálculo onde o peso da pessoa (em quilogramas) é dividido pelo quadrado da sua altura (em metros). IMC maior que 25 é considerado sobrepeso; e maior ou igual a 30 caracteriza a obesidade (tabela 1). O método baseia-se na premissa de que a maior parte da

variação no peso para pessoas de mesma altura, é devido a massa de gordura corporal desses indivíduos, por isso, a OMS considera o IMC um guia geral, já que pode não corresponder ao mesmo nível, em diferentes indivíduos.

Tabela 1. Classificação de adultos de acordo com o índice de massa corporal (IMC), e risco de comorbidades associadas à obesidade

Classificação	IMC (kg/m²)	Risco de comorbidades
Baixo peso	< 18,5	Baixo*
Normal	18,5 – 25	Médio
Pré-obeso (excesso de peso)	25 – 30	Aumentado
Obesidade classe I (obesidade leve)	30 – 35	Moderado
Obesidade classe II (obesidade grave)	35 – 40	Grave
Obesidade classe III (obesidade mórbida)	IMC ≥ 40	Muito grave

* Risco aumentado de outros problemas clínicos associados.

A obesidade é considerada uma doença, cuja distribuição mundial já permite considerar um quadro de epidemia. A doença pode acarretar consequências durante a vida de seus portadores desde sintomas psicológicos superficiais, até sérias comorbidades, podendo diminuir tanto a qualidade quanto o tempo de vida desses indivíduos.

A capacidade de armazenar energia sob a forma de gordura é fundamental para suprir nossos requerimentos. A homeostase possui papel em manter a relação entre ingestão e gasto de energia, porém, atua de forma mais eficiente para aumentar o volume de massa adiposa e, prevenir a perda de peso.

Na pré-história a luta para conseguir alimentos, a maior exposição ao frio e a necessidade de movimentação constante para encontrar condições ambientais que permitissem a sobrevivência de nossos antepassados, exigia capacidade de estocar energia e de obter proteção térmica. Neste contexto, existem teorias como a denominada “thrifty genotype”, que foi proposta há 50 anos, pelo geneticista James V. Neel (NEEL, 1962), sugerindo que os antepassados que apresentassem genótipos promotores de deposição de gordura, poderiam ter sido favorecidos durante as épocas de escassez alimentar, uma vez que aqueles mais resistentes a desnutrição teriam

sobrevivido em maior proporção. A presença desses genótipos, ditos “austeros” ou “poupadores” se tornou desvanjosa na nossa sociedade, já que promove a deposição de gordura e prepara os indivíduos para uma época de falta de alimentos que pode nunca acontecer. Portanto, o que antigamente era uma característica que aumentava a capacidade de sobrevivência, hoje pode ser uma das principais causas do acentuado aumento na obesidade por todo o mundo. A natureza dos “thrifty genes” permaneceu incerta, até que estudos familiares e análises clínicas trouxeram evidências de genes que contribuem para a obesidade humana, alterando a eficiência da estocagem de energia nos adipócitos (ÖHMAN, 2001).

A prevalência da obesidade, mais que duplicou globalmente, desde 1980 (STURM, 2007), e isso se deve principalmente a mudanças nos padrões socioeconômicos e culturais que acarretaram grandes transformações no estilo de vida das pessoas no mundo como um todo, influenciando nos padrões de balanço entre obtenção e gasto energético. Nas últimas décadas houve um aumento da ingestão de alimentos calóricos, pobres em nutrientes como vitaminas e minerais, e ricos em gordura, sal e açúcares, além disso, houve diminuição de atividade física devido a natureza cada vez mais sedentária de muitas formas de trabalho, com influência também dos novos meios de transporte. Segundo dados do ministério da saúde divulgados em abril de 2012, 49% da população brasileira está com excesso de peso. Curitiba (PR) é o 8º no ranking das capitais com maior IMC, na qual 50 % da população está acima do peso dos quais 12% são obesos (representando 16,2% da população). Em primeiro lugar está Porto Alegre (RS), seguido de Fortaleza (CE) (TONETO, 2012).

Estudos têm tentado separar as influências ambientais das genéticas. Stunkard *et al.* (1986) realizaram um estudo na Dinamarca onde as crianças adotadas puderam ser comparadas com seus pais biológicos e com seus pais adotivos. Foram obtidas informações sobre 3580 adotados, utilizando-se como critério o IMC, a população foi dividida em quatro classes, tomando-se toda a faixa de adiposidade: magros (IMC nos 4 percentis mais baixos); peso médio (IMC próximo à média); acima do peso (IMC entre percentis 92 e 96) e obesos (IMC acima do percentil 96). Houve uma relação clara entre a classe de peso dos adotados e a de seus pais biológicos, não havendo relação aparente entre

crianças adotadas e seus pais adotivos, sugerindo fortemente que influências genéticas são determinantes importantes da adiposidade e que as influências ambientais têm pouco efeito. É importante ressaltar que as influências genéticas observadas nesse estudo não são apenas confinadas ao grupo obeso, mas se estendem a toda a faixa de adiposidade (STUNKARD *et al.* 1986). Borjeson (1976), na Suécia, estudando 5008 pares de gêmeos, selecionou 101 onde um ou mais estavam acima do peso. O autor avaliou também dobras cutâneas tricípita, subescapular e abdominal e chegou à conclusão de que os fatores genéticos desempenham um papel decisivo na origem da obesidade. E concluiu nesse estudo que o risco de obesidade quando nenhum dos pais é obeso é de 9%, enquanto que, quando um dos genitores é obeso, sobe a 50% e atinge 80% quando ambos são obesos.

2.2 BCHE

2.2.1 Butirilcolinesterase (BChE) e função

As colinesterases (ChEs) são enzimas que desempenham papel chave na neurotransmissão colinérgica e em outras funções fisiológicas. Existem dois tipos de colinesterases nos vertebrados: acetilcolinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) e butirilcolinesterase (BChE, EC 3.1.1.8). A acetilcolinesterase é responsável por catalisar a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina na membrana pós-sináptica na junção neuromuscular, originando acetato e colina. É encontrada também em eritrócitos e no sistema nervoso (PATOCKA, KUCA e JUN, 2004). A BChE é produzida no fígado e adipócitos, com ampla distribuição no organismo, sendo um dos componentes do plasma, fígado, coração, pâncreas, endotélio vascular, pele, massa branca do cérebro, músculo liso e adipócitos (CHATONNET e LOCKDRIDGE, 1989). Embora as duas enzimas apresentem formas moleculares com certa semelhança estrutural, incluindo monômeros, dímeros, tetrâmeros e oligômeros complexos, elas diferem em especificidade e sensibilidade inibitória (LOCKRIDGE *et al.* 1987).

Embora permaneçam desconhecidos a função fisiológica e o substrato natural da BChE, sabe-se que ela é capaz de hidrolizar diversos ésteres de

colina, desde a acetilcolina até heptanoilcolina, sendo mais eficiente na hidrólise de butirilcolina (KUTTY, 1980).

Anteriormente chamada de pseudocolinesterase, colinesterase do soro e colinesterase não específica, a BChE foi estudada e associada a diversos processos biológicos. Um deles, com grande importância é o seu papel em mecanismos farmacológicos e toxicológicos. Alguns compostos que podem ser desintoxicados por BChE são: succinilcolina; organofosfatos e carbamatos; cocaína; amitriptilina; drogas anticonvulsivas e aspirina (ÇOKUĞRAŞ, 2003).

Além das funções colinérgicas, a BChE possui papel no desenvolvimento animal influenciando a morfogênese, movimentos morfogenéticos e também induzindo a expressão da AChE, que por sua vez estimula a diferenciação e adesão celular durante a neurogênese (ROBITZKI, *et al.* 1997).

Diversos estudos têm associado a BChE com aspectos metabólicos, por exemplo, com níveis de lipídeos (KUTTY, 1980; KÁLMÁN *et al.* 2004), lipoproteínas (KUTTY e PAYNE, 1994), peso (STUEBER-ODEBRECHT *et al.* 1985), índice de massa corporal (IMC) (ANDRADE, 2007; SOUZA *et al.*, 2005a) e obesidade (CHAUTARD-FREIRE-MAIA *et al.* 1991 e ALCÂNTARA *et al.*, 2003).

2.2.2 Formas moleculares da BChE

No plasma, a BChE ocorre predominantemente como um tetrâmero (G4), formado por dímero de dímeros. Na formação de cada dímero, os monômeros estão ligados por pontes de dissulfeto e, ao formar o tetrâmero, os dímeros ligam-se entre si por ligações não covalentes. Outras formas moleculares, como monômeros (G1), dímeros (G2) e trímeros (G3) também estão presentes no plasma em menores proporções (KUTTY, 1980). Os monômeros são constituídos de 574 aminoácidos e nove cadeias de carboidratos, com peso molecular aproximado de 85 kDa (LOCKRIDGE *et al.* 1987), movendo-se mais rapidamente em eletroforese em gel de poliacrilamida, seguido pelo conjunto monômero ligado à albumina, pelo dímero, e pelo tetrâmero, com peso molecular de aproximadamente 340 kDa. As formas moleculares G1, G2 e G4 são parcialmente interconvertíveis, e é possível que

as formas G1 e G2 sejam precursoras e/ou produtos da degradação de G4 (LA MOTTA *et al.* 1968).

Existe uma nomenclatura anterior relativa às formas moleculares de BChE, baseada na mobilidade eletroforética, proposta por Harris, Hopkinson e Robson (1962) que encontraram quatro bandas em eletroforese de gel de amido, chamadas de C₁ a C₄ em ordem decrescente de mobilidade. A forma C₁ (G1) é o monômero; C₂ (é referida como G1-alb) consiste de uma forma heteróloga da BChE, formada pela associação de um monômero ligado à albumina; C₃ (G2) é um dímero; e C₄ (G4), que é a forma mais abundante da BChE plasmática, é o tetrâmero. Nesse mesmo trabalho, os autores verificaram uma quinta banda, presente somente em alguns indivíduos, à qual denominou C₅, que consiste do tetrâmero ligado a uma substância ainda desconhecida de aproximadamente 60 kDa. O complexo C₅ é determinado pela interação entre os produtos dos genes *BCHE* e do loco *CHE2* (2q33-q35).

No estudo de Juul (1968) a análise da BChE do plasma revelou 12 bandas eletroforéticas, das quais oito provavelmente representam formas heterólogas nas quais a BChE se liga a outras substâncias como a albumina, a α 2-macroglobulina, a transferrina e outras moléculas ainda não identificadas (ALCÂNTARA *et al.* 1999).

2.2.3 Gene *BCHE*

Arpagaus *et al.* (1990) obtiveram evidências da provável existência de um único gene que codifica a BChE humana, bem como a estrutura deste gene.

Localizado na região 3q26.1-q26.2, o gene *BCHE* tem 64.559 kb e possui quatro éxons. 1722 pares de bases codificam a enzima BChE madura, que é formada por 574 resíduos de aminoácidos (NCBI, acessado em 09/10/2012).

O éxon 1 (149 pb) contém sequências não traduzidas, e dois potenciais sítios de início de tradução nos códons -69 e -47. O éxon 2 (1.525 pb) contém 83% da sequência codificadora da proteína madura, incluindo a extremidade N-terminal. O primeiro códon que codifica para o peptídeo maduro está localizado no éxon 2. O éxon 3 contém 167 pb. O éxon 4 (604 pb) codifica a

extremidade C-terminal da proteína e apresenta a região 3' não traduzida que possui dois sinais de poliadenilação (NCBI, acessado em 09/10/2012). A região que codifica a proteína madura abrange grande parte do éxon 2, todo o éxon 3 e parte do éxon 4, conforme mostrado na figura 1.

O mRNA da BChE humana possui 40% de C+G, que é, aproximadamente, a proporção dessas bases no genoma humano. Quando comparados com o índice de nucleotídeos C+G que codificam proteínas colinérgicas de mamíferos e aves (BChE, AChE, receptores nicotínicos e muscarínicos de acetilcolina e colina acetiltransferase) observa-se que o gene da BChE possui um conteúdo menor de C+G em relação a outras proteínas colinérgicas. O conteúdo de C+G pode ser importante para a regulação ao nível transcricional (CHATONNET e LOCKRIDGE, 1989). O mRNA da BChE é mais abundante na maioria dos tecidos que o da AChE, exceto no cérebro e músculo, onde o mRNA da AChE é mais abundante (LEGAY *et al.* 1993). No estudo de Jbilo *et al.* (1994) foi detectada a seguinte quantidade relativa de mRNA da BChE em tecidos humanos, em ordem decrescente: fígado> pulmão> cérebro> coração> músculo esquelético> pâncreas.

2.2.4 Variantes do gene *BCHE*

A primeira variante genética da *BCHE* foi descoberta após o uso de succinilcolina, que consiste de um relaxante muscular administrado em procedimentos de anestesia. Alguns indivíduos que possuem uma variante (*D70G*) da *BCHE* são incapazes de hidrolizar a succinilcolina, o que acarreta apnéia respiratória e paralisia muscular, quando submetidos a tratamentos com a dose fisiológica padrão (KALOW e GENEST, 1957).

Posteriormente outros polimorfismos foram identificados. Uma das variantes conhecidas é a mutação de ponto no nucleotídeo 1615 (GCA → ACA; A539T), no éxon 4, que resulta numa substituição do códon 539 (Ala-Thr⁵³⁹), a enzima resultante é conhecida como “variante K”. A estimativa da frequência da mutação K para a população brasileira é em torno de 18% (SOUZA, 2001). Na região não codificadora do gene *BCHE* no éxon 1 existe um sítio polimórfico no nucleotídeo -116 (TGC/TAC), conhecido como variante -116A com frequência de cerca de 8% em população norte-americana, semelhante à

brasileira de 8,5% (FURTADO-ALLE, 2005). Foi constatado que a variante -116A é preferencialmente encontrada em combinação cis com a 1615A (BARTELS, VAN DER SPEK e LA DU, 1990). Furtado-Alle *et al* (2008) propuseram que a baixa atividade antes atribuída à presença da mutação 1615A deve-se a presença conjunta da 1615A com -116A, pois quando apenas a mutação 1615A está presente, não há alteração na atividade da BChE. Os autores sugerem que a mutação -116A interfira na ligação de elementos reguladores na transcrição e/ou tradução do gene *BCHE*, já que a região 5' UTR do mRNA inclui a região -116.

Bartels, Van der Spek e La Du (1990) descreveram um polimorfismo na região 1914 (A/G) da *BCHE*, no éxon 4, situada em região não codificadora (189 nucleotídeos após o códon de parada de tradução). Este polimorfismo apresenta desequilíbrio de ligação com a variante -116A e também com a 1615A, exibindo configuração cis com estas. Esses dados sugerem que a diminuição da atividade enzimática da BChE pode ser atribuída à interação entre variantes e não apenas a um polimorfismo.

2.2.5 Loco *CHE2*

Além de apresentar formas diversas, devido às variantes que codificam o gene *BCHE*, a variabilidade da expressão da BChE pode ser influenciada pelo loco *CHE2*. Em eletroforese bidimensional de gel de amido, além das bandas C₁ a C₄, Harris, Hopkinson e Robson (1962) encontraram uma banda que foi denominada C₅. Essa banda foi encontrada em apenas 4,6% da amostra e o gene responsável pela sua determinação foi chamado *CHE2*, apresentando os alelos *CHE2**C₅⁺ e *CHE2**C₅⁻ responsáveis, respectivamente, pela presença e pela ausência da banda C₅. Chautard-Freire-Maia *et al.* (1991) encontraram, em amostra da população de Curitiba (PR), o fenótipo *CHE2* C₅⁺ com frequência de 10,3%, sendo que esses indivíduos apresentam atividade enzimática da BChE cerca de 30% superior a de indivíduos *CHE2* C₅⁻.

O loco *CHE2* codifica uma substância cuja natureza permanece desconhecida, que se liga à enzima, sendo responsável pelo surgimento da forma heteróloga da BChE, evidenciada pela banda eletroforética C₅, a qual

Masson (2001) sugere que seja formada pelo tetrâmero G4 associado com outra proteína (X); e apesar dos resultados obtidos nesse estudo não permitirem identificar a substância codificada pelo loco *CHE2*, várias hipóteses (albumina, imunoglobulina, híbrido de AChE/BChE, colágeno, fibronectina e fosfolípido) puderam ser descartadas. Li *et al.* (2008) identificaram o gene *RAPH1* (Ras-associated and PH domains, que codifica a lamelipodina) como um bom candidato para produzir esta substância que se liga a BChE na forma C₅.

Os indivíduos *CHE2* C5+ são menos sensíveis à succinilcolina, ou seja, a duração do efeito da droga é menor que os indivíduos *CHE2* C5- (SUGIMORI, 1986). Alcântara *et al.* (2001) demonstraram que a média de IMC de *CHE2* C5+ é menor que *CHE2* C5-, o que sugere a influência do loco *CHE2* no metabolismo de lipídeos. Furtado-Alle (2005) verificou que o fenótipo *CHE2* C5+ é menos frequente no grupo de obesos que em seus controles de peso normal, sugerindo inclusive, que esse fenótipo tem efeito protetor em relação à obesidade. Chautard-Freire-Maia (1991) também corrobora com os estudos citados, ao demonstrar que indivíduos *CHE2* C5+ têm em média, menor peso que *CHE2* C5-.

2.3 BChE e a Obesidade

A atividade da BChE mostrou-se correlacionada positivamente com peso e negativamente com altura, indicando aí sua correlação com o índice de massa corporal (CHAUTARD-FREIRE-MAIA, 1991). Alcântara (2001) verificou uma maior frequência de bandas extras da BChE em obesos do que na população geral, sugerindo um papel do gene *BCHE* na determinação genética da obesidade. Segundo Souza *et al.* (2005b), a *BCHE* pode estar relacionada com o metabolismo de lipídeos, uma vez que variantes do nucleotídeo 1615 do gene *BCHE* afetam diferentemente a variância do IMC. Furtado-Alle *et al.* (2008) investigando a associação do IMC com variantes do nucleotídeo -116, no qual a mutação -116A se apresenta preferencialmente em conformação cis com a variante K (A539T), demonstraram que esta mutação está associada a um menor IMC e menor atividade da BChE, sendo que essa diminuição

anteriormente atribuída somente a variante K, ocorre devido à presença concomitante da -116A.

A interação entre os produtos dos genes *BCHE*, e do loco *CHE2*, que determina uma proteína ainda não identificada, condicionando o fenótipo CHE2 C5 +, está associado com peso e IMC mais baixos do que o fenótipo CHE2 C5-. Assim, é esperado que o fenótipo CHE2 C5+, que determina cerca de 25% mais atividade da BChE, esteja associado com a diminuição do peso e do IMC (CHAUTARD-FREIRE-MAIA *et al.* 1991; ACÂNTARA *et al.* 2001).

Benyamin *et al.* (2011) demonstraram correlação positiva entre atividade da BChE e síndrome metabólica (SM), sendo que a correlação mais intensa foi com os fatores nível de triglicerídeos e IMC. Alcântara *et al.* (2005) constataram alta atividade da BChE, ao estudarem indivíduos obesos e fenótipo CHE C5-, sugerindo que altos valores de atividade da BChE pode ser considerado um marcador secundário para o risco de SM em indivíduos obesos, não portadores do alelo *CHE2**C5+.

Boberg *et al.* (2010) também demonstraram que indivíduos obesos possuem atividade da BChE significativamente maior que não-obesos. Nesse mesmo estudo foi mensurada a intensidade relativa (IR) de cada banda eletroforética, referentes às formas moleculares de BChE, o qual evidenciou não haver diferença significativa entre as proporções da IR entre obesos e não-obesos, podendo assim levar à conclusão de que a alta atividade enzimática se deve exclusivamente à atividade da BChE plasmática, e que a regulação nos níveis específicos de cada forma molecular, é controlada, e pode ser importante para a função da BChE.

Kálmán *et al.* (2004) encontraram associação positiva entre atividade da BChE plasmática e níveis de colesterol e triglicerídeos séricos, sugerindo que a alteração na atividade pode ser decorrente de mudanças na estrutura terciária e quaternária da enzima, devido a hiperlipidemia; outra hipótese seria que a expressão do gene *BCHE* seria regulada positivamente pela hiperlipidemia.

Randell *et al.* (2005) verificaram relação significativa entre níveis de BChE e fatores de risco para a SM, como níveis altos de triglicerídeos, LDL-colesterol, obesidade. Nesse estudo, indivíduos com SM, no Canadá, apresentaram níveis séricos da BChE mais altos, e foi citado que o significado funcional destes resultados ainda é incerto, mas alguns estudos sugerem que a

BChE tenha papel na clivagem da grelina, que constitui de um hormônio produzido no estômago e envolvido na indução de adiposidade e ganho de peso por estimular o apetite. Considerando que a grelina acilada está associada ao aumento de peso, a sua desacilação pela BChE a torna inativa. Essa função da BChE é considerada uma adaptação para o balanço energético e, portanto, relacionada ao desenvolvimento e progressão da obesidade.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Investigar a relação entre as formas moleculares da BChE e variáveis antropométricas e bioquímicas em amostra de funcionários da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

3.2 Objetivos específicos

- 1) Estimar a intensidade relativa, presença e ausência das bandas G1, G1-alb, G2 e G4 da BChE.
- 2) Comparar as classes de IMC quanto à média das intensidades relativas e atividades relativas das bandas.
- 3) Verificar os coeficientes de correlação entre as bandas da BChE e variáveis bioquímicas.
- 4) Estimar a frequência dos fenótipos CHE2 C5+ e CHE2C5- em grupos classificados por variáveis antropométricas e bioquímicas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostras

As amostras foram obtidas por meio de parceria entre o Laboratório de Polimorfismos e Ligação do departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas e o Núcleo de Qualidade de Vida (NQV) e Centro de Performance Física (CEPEFIS) do departamento de Educação Física, e consistem de material coletado de funcionários da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Amostras de sangue, dados antropométricos e bioquímicos foram cedidos pelo NQV e CEPFIS.

Todos os sujeitos tiveram esclarecimentos individuais a respeito dos objetivos, procedimentos utilizados, e condicionaram a sua participação de modo voluntário mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. O protocolo de pesquisa do presente estudo foi submetido para análise da conformidade com as diretrizes propostas na Resolução 196/96, do Conselho Nacional de Saúde, sobre pesquisas envolvendo seres humanos, e aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná. Não houve diferenciação de grupos raciais ou étnicos, nem de classe social.

4.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida para a detecção das bandas G1, G1-alb, G2 e G4

Eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada seguindo protocolo semelhante ao de Sambrook *et al.* (1989), com dois gradientes de densidade. A preparação dos géis também considerou adaptações de Boberg (2008).

O gel contém dois gradientes de densidade, um gel de alinhamento com concentração equivalente a 5% e um gel de separação com concentração de 7% (Figura 1).

O gel de separação é colocado primeiro entre as placas, separadas por espaçadores de 0,8 mm. Logo em seguida coloca-se uma fina camada de álcool butílico e deixa-se polimerizar por 30 minutos. Após o término dos 30 minutos, coloca-se o gel de alinhamento, deixando polimerizar por 20 minutos.

A placa de gel, então, é deixada em repouso por aproximadamente 24 horas em local refrigerado.

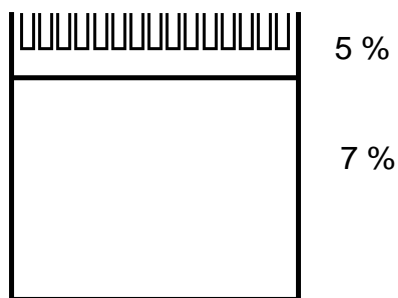


Figura 1: esquema do gel de poliacrilamida com 2 gradientes de concentração. Fonte:Boberg (2008).

Os reagentes utilizados no preparo, bem como a quantidade utilizada nos géis de 5 e 7% são, respectivamente (em mL): poliacrilamida (1,7 e 5,8), água destilada (6,2 e 14), TBE 5X (2,0 e 5,0), persulfato de amônia (0,25 e 0,25) e TEMED (0,03 e 0,03). A solução utilizada de poliacrilamida (30%) é composta por 29 g de acrilamida, 1 g de bisacrilamida e água destilada em quantidade suficiente para completar 100 mL.

Antes de aplicar a amostra no gel, mistura-se 5 μ L de plasma e 7 μ L de azul de bromofenol. Após a aplicação realiza-se a corrida eletroforética por 8 horas, com uma tensão de 100 V e corrente elétrica de 20 mA. O tampão de corrida utilizado na cuba é o TBE 1X.

Após a corrida, o gel é então imerso em solução de coloração (150 mg de Fast Red TR, 60 mL de tampão fosfato, 2,1 mL de solução de α -naftilacetato) e incubado a 37 °C na estufa, por 30 a 40 minutos. A butirilcolinesterase do plasma hidrolisa o acetato de α -naftila formando α -naftol e ácido acético. O α -naftol reage com o sal de Fast Red TR, produzindo um derivado de cor púrpura, que revela as bandas referentes às diversas formas moleculares da BChE no gel. Ao término da coloração, o gel é lavado três vezes com água destilada, e colocado entre duas folhas de transparência. Logo em seguida, o gel é digitalizado e arquivado em computador, para posterior análise pelo programa *KODAK1D Image Analysis Software*.

Para as análises de densitometria ótica no *KODAK1D Image Analysis* foi realizado um ajuste manual da melhor posição das linhas, a qual correspondeu à região em que todas as bandas a serem analisadas estavam bem definidas. Na caixa de diálogo de Ajuste de Linhas (*Adjust Lanes*) selecionou-se o modo

automático, no qual o próprio programa capta o número de amostras do gel e cria um número de linhas correspondente a esse valor. Com um aumento, foi realizada a definição das bandas com a utilização da ferramenta Ajuste de Bandas (*Adjust Bands*) e, posteriormente, ajustadas e delimitadas manualmente para possibilitar a análise da intensidade relativa de cada banda pelo programa.

4.3 Medida da atividade da BChE

Essa metodologia é baseada na hidrólise da propioniltiocolina pela BChE, produzindo ácido propiônico e tiocolina, a qual reage com o DTNB (ácido 5,5'-bisditio-2-nitrobenzóico), gerando 5-tio-2-nitrobenzoato de coloração amarela. A atividade é calculada com o uso de espectrofotômetro ajustado em 410 nm e com todos os reagentes mantidos em banho-maria a 25 °C. O tampão fosfato 0,1 M pH 7,6, utilizado na reação, foi preparado pela mistura de duas soluções (A e B). A solução "A" deve conter 4,73 g de Na₂HPO₄ anidro (PM = 141,96) em 1000 mL de água destilada e a solução "B" 13,61 g de KH₂PO₄ anidro (PM = 136,09) em 1000 mL de água destilada. O DTNB (0,423 mM) é dissolvido em tampão fosfato na proporção de 167 g por 1000 mL. O substrato (propioniltiocolina 100 mM) é preparado com 303 mg de iodeto de propioniltiocolina (PM = 303,2) em 10 mL de água destilada. Os tubos contendo 2,2 mL de tampão-DTNB, e os tubos com 25 µL de plasma (diluído 1:100 em água destilada), devem ser mantidos por três minutos em banho-maria a 25 °C. Após os três minutos adicionam-se 50 µL de substrato e é iniciada a leitura. A primeira leitura, chamada A0, deve ser efetuada imediatamente após a colocação dos reagentes na cubeta termostaticada do espectrofotômetro. As leituras A1, A2 e A3 são efetuadas com um, dois e três minutos a partir da leitura A0. Após as quatro leituras, é então calculado o Δ/minuto (variação de absorbância por minuto). Para a obtenção da atividade (KU/L), Δ/minuto é multiplicado pelo fator 0,07353 (fator estabelecido previamente para correção devido ao espectrofotômetro).

4.4 Eletroforese em gel de ágar – Fenotipagem do loco *CHE2*

Esta técnica foi desenvolvida por Robinson *et al.* (1957) para fenotipagem de variantes da hemoglobina e posteriormente, foi modificada por Van Ros e Vervoort (1973) para aplicação dessa técnica à BChE. Adaptações subsequentes foram introduzidas por Fadel-Picheth (1991) e Souza (1995). O gel de ágar é preparado com uma solução de Bacto ágar (Difco) a 1,4% p/v em tampão citrato de sódio, pH 6,38 (solução estoque de tampão citrato de sódio 50 mM, pH 6,7; pH ajustado com ácido cítrico 1,56 M). Esta solução é aquecida até que o ágar seja totalmente dissolvido, sendo importante não deixar a solução ferver. Após o aquecimento a solução é vertida sobre uma placa de vidro de 230 x 160 mm. O gel deve resfriar completamente e então ser colocado na geladeira e mantido em repouso por pelo menos 12 horas a fim de diminuir o efeito da eletroendosse. Após esse período de repouso as amostras de plasma são aplicadas no gel através da extremidade de uma lâmina de metal (5 x 5 x 0,1 mm) onde é colocado 1,5 µL de plasma ou soro. A placa contendo as amostras é então submetida à eletroforese com tampão citrato pH 6,7 nas cubas, por três horas e meia (a 4°C; 75 V e 35 mA). Após a corrida eletroforética despeja-se sobre a placa o cromógeno-substrato que deve ser preparado imediatamente antes do uso. A solução cromógeno-substrato é preparada utilizando-se Fast Red TR Salt (SIGMA F-2768) a 0,1% p/v em tampão fosfato de sódio pH 7,1 (670 mL de Na₂HPO₄, 0,2 M e 330 mL de NaH₂PO₄, 0,2 M) e solução de α-naftil-acetato 30 mM (2,5% v/v). A placa com o cromógeno-substrato deve ser incubada por uma hora a 37°C. Após a revelação das bandas a placa é lavada com água para retirar o excesso de corante. O gel é então colocado entre uma folha de papel cartão e uma folha de papel filtro, prensado entre duas placas de vidro e levado à estufa a 37°C até completa secagem.

4.5 Análise dos dados

Foi montada uma planilha de dados no programa Excel, com todos os dados obtidos, através da metodologia realizada (IR das formas moleculares, atividade total e relativa, presença ou ausência de banda C₅), bem como dados antropométricos e bioquímicos, da amostra estudada, de modo a unificar os dados para posterior análise com auxílio do programa Statistica para Windows. As variáveis foram comparadas entre os grupos por meio de teste t, e foram feitas análises de correlação. O valor da probabilidade para os testes comparativos considerados significativos foi $p < 0,05$ (5%).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram utilizadas 290 amostras para análise da intensidade relativa das formas moleculares da BChE, atividade e fenotipagem do loco *CHE2*. Destas amostras, possuímos as variáveis bioquímicas de 119 indivíduos. Quanto ao IMC, possuímos os valores de 185 indivíduos da amostra. Isso se justifica pelo fato deste trabalho fazer parte de um projeto maior que ainda está em andamento, no qual os dados bioquímicos e antropométricos são fornecidos pelo Programa de Pós-Graduação em Educação Física, parceiro deste projeto. Assim, foi obtida apenas parte desses dados do conjunto amostral.

A frequência de homens e mulheres está representada no gráfico 1.

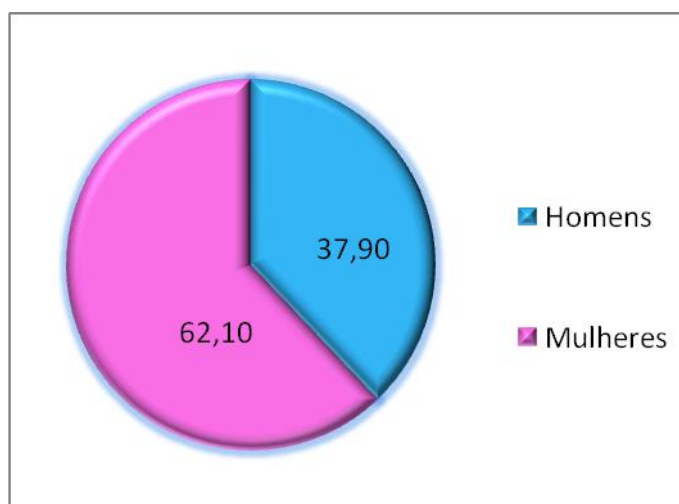


Gráfico 1. Frequência relativa de homens e mulheres (%).

Está representada no gráfico 2 a frequência de homens e mulheres dentre as categorias de IMC. Observa-se que existem relativamente menos mulheres obesas do que homens obesos. Foi observada também a mesma proporção de mulheres com IMC normal e com sobrepeso.

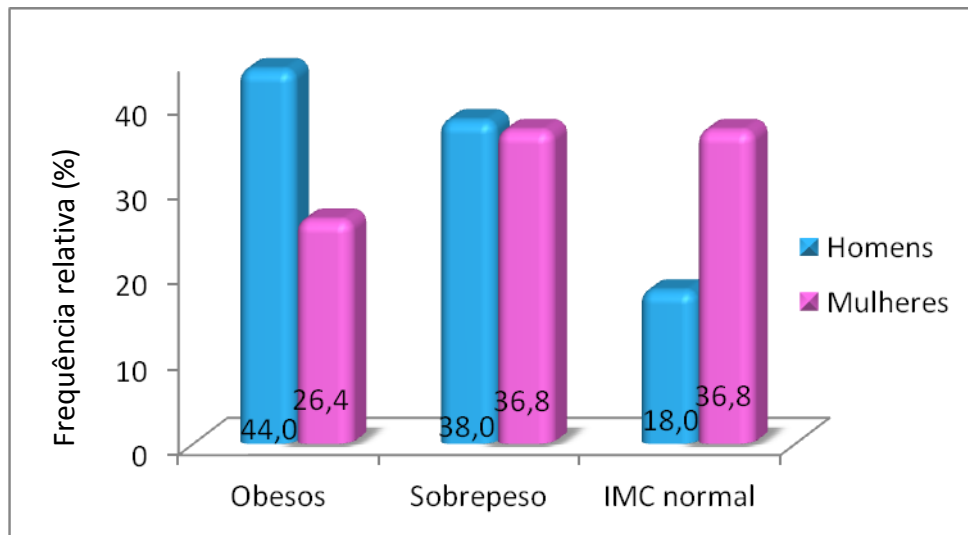


Gráfico 2. Frequências relativas de homens e mulheres dentro as categorias de IMC.

A tabela 2 apresenta as médias, acompanhadas do erro padrão das variáveis obtidas na amostra como um todo, e separadas entre homens e mulheres, considerando os 189 indivíduos com presença do monômero.

Tabela 2. Caracterização da amostra geral e separada por sexo de acordo com a média \pm erro padrão dos parâmetros obtidos

Variáveis	Total	Homens	Mulheres
Idade (anos) *	49,40 \pm 1,14	43,67 \pm 2,72	51,02 \pm 1,17
IMC (Kg/m ²)	27,24 \pm 0,42	26,71 \pm 0,54	27,48 \pm 0,57
Colesterol total	210,20 \pm 4,54	216,36 \pm 7,61	206,70 \pm 5,88
HDL *	49,86 \pm 1,30	42,82 \pm 1,36	54,55 \pm 1,69
LDL	135,15 \pm 3,75	142,23 \pm 7,14	131,40 \pm 4,22
Triglicerídeos *	133,79 \pm 7,37	155,53 \pm 11,39	117,67 \pm 9,39
Glicemia	87,70 \pm 2,54	87,03 \pm 1,28	87,81 \pm 4,25
Atividade total	4,74 \pm 0,11	5,08 \pm 0,32	4,72 \pm 0,13
Intensidade relativa G1	0,14 \pm 0,004	0,14 \pm 0,008	0,13 \pm 0,005
Intensidade relativa G1-alb	0,11 \pm 0,003	0,12 \pm 0,006	0,11 \pm 0,003
Intensidade relativa G2	0,14 \pm 0,004	0,15 \pm 0,009	0,14 \pm 0,005
Intensidade relativa G4	0,60 \pm 0,008	0,58 \pm 0,02	0,61 \pm 0,01

* Variáveis que apresentaram diferenças significativas entre homens e mulheres

Foi realizado teste t de Student, para verificar se havia diferença significativa quanto às variáveis sumarizadas na tabela 2, entre homens e mulheres. Dentre os parâmetros analisados, os homens diferiram significativamente das mulheres em relação à idade ($t=-2,80$; $p = 0,007$), HDL ($t=-5,41$; $p < 0,001$) e triglicerídeos ($t=2,55$; $p = 0,012$).

Quando se trata de HDL, (o colesterol “bom”), quanto maior o seu valor, menor o risco de doenças associadas ao metabolismo de lipídeos. Isto porque o HDL leva o colesterol “ruim” do sangue, evitando que ele se acumule nas artérias. As mulheres geralmente possuem níveis mais elevados de HDL em relação aos homens. Níveis de HDL considerados de risco para mulheres são abaixo de 50 mg/dL, e para homens, abaixo de 40 mg/dL (GRUNDY *et al.* 2004).

Outros trabalhos também encontraram diferenças quanto aos níveis de triglicerídeos entre homens e mulheres (GUEDES e GUEDES, 1998; RABELO *et al.* 1999; ARAÚJO *et al.* 2005). Os triglicerídeos consistem de gordura livre no sangue utilizado como forma de energia, sendo armazenado nos tecidos gordurosos e na produção de LDL; provém com mais facilidade dos ácidos graxos que estão presentes no abdômen. Nesse sentido pode-se destacar que alguns estudos sugerem que a variação da distribuição anatômica da gordura corporal é importante indicador relacionado a complicações endócrinas e metabólicas. Indivíduos com disposição central da gordura corporal tendem a apresentar alterações desfavoráveis no perfil das lipoproteínas plasmáticas (GUEDES e GUEDES, 1998). Os mecanismos mediante os quais um predomínio da gordura localizada na região central do corpo possa comprometer os níveis de lipídios e lipoproteínas plasmáticas não estão totalmente esclarecidos, porém, algumas possibilidades são discutidas na literatura. Freedman *et al.* (1990) sugerem que os efeitos da secreção dos hormônios esteróides e a densidade local de seus receptores levam a características específicas de distribuição regional da gordura corporal: homens com maiores proporções de tecido adiposo na região central e mulheres nas extremidades; e também, mulheres com maiores proporções do tecido adiposo na região subcutânea e homens nas regiões viscerais.

Para evitar problemas na análise, foram excluídos os indivíduos com ausência do monômero em relação aos dados de intensidade relativa das

formas moleculares, que totalizou 101 indivíduos. Logo, para a realização das análises que envolvessem as formas moleculares, foram utilizados os 189 indivíduos com presença de G1.

O gráfico 3 representa a média das Intensidades Relativas (IR) das formas moleculares da BChE entre grupos categorizados por IMC. Dentre as categorias de IMCs, não houve diferença significativa entre a IR de cada forma molecular, ou seja, as proporções das IR são mantidas, independentemente do IMC, resultado que concorda com trabalhos anteriores (BOBERG, *et al.* 2010 e SILVA, *et al.* 2012), que sugerem que pelo fato da proporção das formas moleculares ser mantida independentemente de fatores como a obesidade, esse mecanismo de regulação provavelmente tem grande importância para a função da BChE.

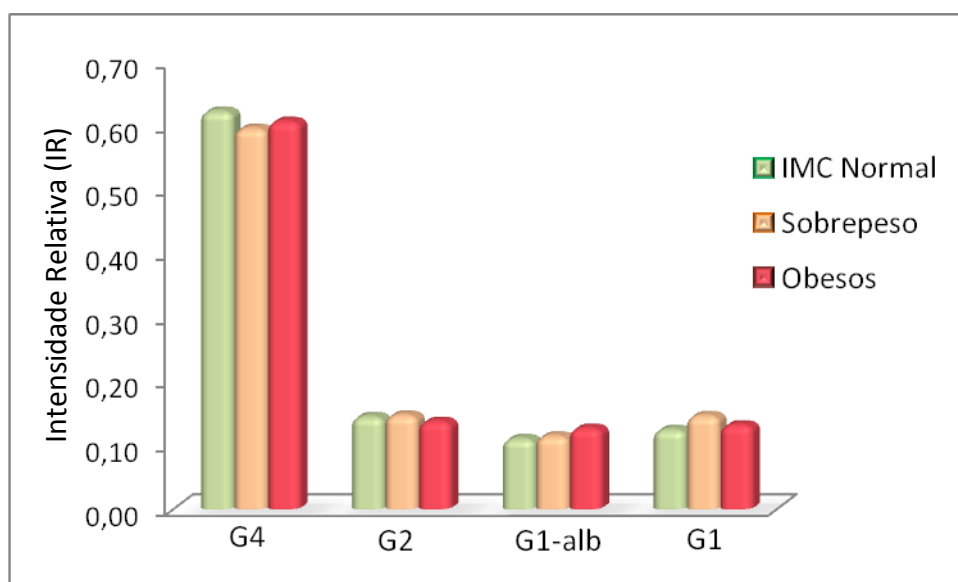


Gráfico 3. Médias de Intensidade Relativa (IR) das formas moleculares da BChE de acordo com as categorias de IMC.

É conhecido na literatura que indivíduos obesos apresentam média da atividade da BChE significativamente maior que não obesos (ALCÂNTARA *et al.* 2003; FURTADO-ALLE, 2005), corroborando com nossos resultados (tabela 3). Considerando esse dado, investigou-se se alguma das formas moleculares estaria contribuindo diferencialmente nessa atividade maior. Foram realizados testes categorizando os IMCs em dois grupos: IMC normal, e sobrepeso juntamente aos obesos. E foi realizado o teste t para amostras independentes,

que evidenciou diferença significativa na atividade de G1 entre as categorias de IMC (tabela 3). Evidenciou-se com esse resultado que as formas, monômero (G1) e monômero associado à albumina (com tendência a apresentar diferença significativa entre os grupos de IMC) estão contribuindo mais efetivamente no aumento da atividade em obesos. A partir disso deduz-se que apesar das proporções das formas moleculares, representadas pelas intensidades relativas, serem mantidas independentemente do IMC, a atividade superior observada nos obesos é devida principalmente as formas monoméricas da BChE. Como já se sabe o tecido adiposo não constitui gordura inativa. É na verdade um tecido metabolicamente ativo produtor de enzimas que podem causar resistência ao funcionamento da insulina, elevação da pressão arterial, aumento do depósito de colesterol nos vasos sanguíneos e outras alterações. Propomos que a obesidade pode estar alterando de alguma forma a expressão do gene *BCHE*, de modo a aumentar a atividade da enzima, assim, as formas monoméricas, que são derivadas mais diretamente da regulação gênica, estariam participando mais efetivamente nessa atividade aumentada num primeiro momento, já que para formar o dímero e o tetrâmero é necessário outros fatores. Vale lembrar que (como representado no gráfico 3) as proporções das intensidades relativas são mantidas independentemente do IMC, portanto, num segundo momento a proporção das formas moleculares logo é balanceada.

Tabela 3. Média \pm erro padrão das atividades das formas moleculares da BChE e resultados dos testes t (p) na amostra categorizada por IMCs

Formas Moleculares	IMC normal	Sobrepeso + obesos	t (p)
G1	0,55 \pm 0,29	0,72 \pm 0,39	-2,36 (0,02)
G1-alb	0,49 \pm 0,20	0,59 \pm 0,29	-1,93 (0,06)
G2	0,65 \pm 0,29	0,72 \pm 0,38	-0,84 (0,40)
G4	2,72 \pm 0,77	2,97 \pm 1,09	-1,25 (0,21)
Atividade total	4,41 \pm 0,98	4,99 \pm 1,12	-2,12 (0,04)

O gráfico 4 compara a amostra total, homens e mulheres quanto à atividade relativa das formas moleculares. Não foi observada diferença significativa entre os sexos. Pode-se perceber o nível ligeiramente maior das atividades relativas de G1, G1-alb e G2 dos homens em relação às mulheres,

que ocorre devido, ao que já é conhecido na literatura, à atividade total dos homens ser mais elevada que a das mulheres, (SHNIDER, 1965; SIDELL e KAMINSKIS, 1975), consistindo um dos motivos para essa diferença, o fato da atividade da BChE estar correlacionada negativamente ao estradiol, que é um hormônio feminino. Verificou-se diferença na atividade entre homens e mulheres, mas não foi significativa estatisticamente. Observou-se apenas a tendência da atividade de G1-alb diferir entre homens e mulheres ($t = 1,76$ e $p = 0,08$).

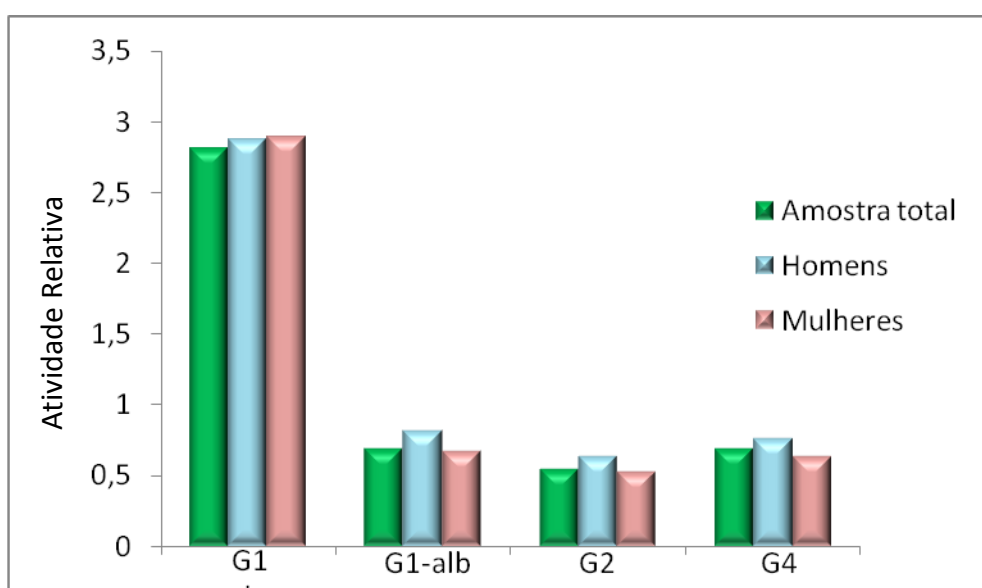


Gráfico 4. Médias das atividades relativas (IR x atividade total) das formas moleculares na amostra total, homens e mulheres.

As análises de correlação (tabelas 4, 5 e 6) foram realizadas através do teste Kendall Tau. Na amostra total (tabela 4) foram observadas correlações entre glicemia e as intensidades relativas das formas moleculares G1 e G1-alb. Quanto ao tetrâmero (G4) observa-se a tendência de apresentar correlação com a glicemia, assim realizou-se o teste de Spearman, com a finalidade de se comparar, e foi verificada a correlação significativa ($t = -2,05$ e $p = 0,04$) entre tais variáveis. Já é conhecido na literatura que a diabetes está relacionada a um aumento na atividade da BChE (CUCUIANU *et al.* 2002). E nesse trabalho foi identificada uma forte correlação entre glicose e intensidade relativa de G1 e G1-alb. Logo, tais formas moleculares estariam contribuindo mais efetivamente nesse aumento da atividade em diabéticos. Uma hipótese para ocorrência

desse fenômeno seria a glicose presente no sangue estar alterando de alguma maneira a expressão do gene *BCHE*.

Dentre os homens (tabela 5), nenhuma correlação apresentou significância estatística, apesar de se verificar tendência da intensidade de G1-alb e G2 se correlacionarem com LDL e G1 com glicemia.

Dentre as mulheres (tabela 6), G1-alb e G2 se correlacionaram com glicemia, e G1 apresenta tendência a apresentar essa correlação. G2 e G4 tendem a correlacionar-se com HDL.

É importante salientar que dentre a amostra de mulheres, havia grande amplitude dos valores de glicemia, que incluía pessoas diabéticas. Já na de homens, não; isso se deve possivelmente ao tamanho amostral. A intensidade relativa de G2 não foi correlacionada à glicemia na amostra total, entretanto foi possível verificar essa correlação significativa na amostra de mulheres. Assim, pode-se perceber que o efeito da diferença entre os sexos influenciando consideravelmente nos resultados, principalmente em relação aos valores de glicemia. É necessário, portanto, analisar os dados referentes à glicemia, separadamente quanto ao sexo, utilizando-se nesse caso, preferencialmente as mulheres, pois esse grupo possui representatividade maior na amostra e amplitude dos índices de glicemia maior também. Vale lembrar também que pelo motivo de possuímos apenas parte dos dados bioquímicos (119 de 290), além disso, termos eliminado amostras com ausência da banda G1 para análises que envolvessem formas moleculares (ficou 189 de 290), o tamanho amostral diminuiu muito ao combinar esses dois grupos. Para se inferir sobre a relação da glicose com as formas moleculares, é necessário analisar uma amostra maior, visto a diferença da significância estatística da correlação da glicose com G2 na amostra total e na de mulheres.

O gráfico 5 trata as categorias de IMC separadas por frequência relativa dos fenótipos CHE2 C5+ e C5-. Observa-se a frequência relativamente maior de CHE2 C5+ entre os grupos de obesos e com sobrepeso, porém, essa diferença não foi significativa.

Tabela 4. Correlação entre intensidades relativas das formas moleculares da butirilcolinesterase e variáveis antropométricas e bioquímicas na amostra total (com n= 73).

Formas moleculares	G1	G1- alb	G2	G4
Variáveis (amostra total)				
IMC	z = 0,26 p = 0,79	z = 0,39 p = 0,70	z = -0,02 p = 0,76	z = -0,29 p = 0,76
Colesterol total	z = 1,19 p = 0,23	z = -1,51 p = 0,13	z = -0,77 p = 0,43	z = 0,07 p = 0,95
HDL	z = -0,61 p = 0,54	z = -0,26 p = 0,79	z = 0,26 p = 0,79	z = 0,55 p = 0,58
LDL	z = 0,83 p = 0,40	z = -1,21 p = 0,23	z = -1,36 p = 0,17	z = 0,38 p = 0,71
Triglicerídeos	z = 1,60 p = 0,11	z = -0,22 p = 0,82	z = -0,25 p = 0,80	z = -1,14 p = 0,25
Glicemia	z = 2,6 p = 0,008	z = 2,98 p = 0,003	z = -1,21 p = 0,23	z = -1,89 p = 0,06

Tabela 5. Correlação entre intensidades relativas das formas moleculares da butirilcolinesterase e variáveis antropométricas e bioquímicas na amostra de homens (n=28)

Formas moleculares	G1	G1- alb	G2	G4
Variáveis (homens)				
IMC	z = -0,22 p = 0,83	z = 0,29 p = 0,77	z = -0,04 p = 0,96	z = -0,17 p = 0,86
Colesterol total	z = 1,27 p = 0,20	z = -1,44 p = 0,15	z = -1,41 p = 0,16	z = 0,64 p = 0,73
HDL	z = -0,16 p = 0,87	z = 0,50 p = 0,62	z = -0,14 p = 0,89	z = -0,02 p = 0,98
LDL	z = 0,71 p = 0,47	z = -1,76 p = 0,08	z = -1,80 p = 0,07	z = 1,05 p = 0,29
Triglicerídeos	z = 1,03 p = 0,30	z = -0,26 p = 0,80	z = 0,41 p = 0,68	z = -0,65 p = 0,51

Glicemia	z = 1,80 p = 0,07	z = 0,20 p = 0,84	z = 0,28 p = 0,78	z = -0,81 p = 0,41
----------	------------------------------------	------------------------------------	------------------------------------	-------------------------------------

Tabela 6. Correlação entre intensidades relativas das formas moleculares da butirilcolinesterase e variáveis antropométricas e bioquímicas na amostra de mulheres (n=43).

Formas moleculares	G1	G1- alb	G2	G4
Variáveis (mulheres)				
IMC	z = 0,63 p = 0,53	z = 0,57 p = 0,57	z = 0,08 p = 0,94	z = -0,58 p = 0,56
Colesterol total	z = 0,87 p = 0,38	z = -0,40 p = 0,69	z = 0,15 p = 0,88	z = -0,62 p = 0,53
HDL	z = 1,10 p = 0,27	z = -0,01 p = 0,99	z = 1,77 p = 0,08	z = -1,82 p = 0,07
LDL	z = 0,83 p = 0,41	z = 0,31 p = 0,75	z = -0,23 p = 0,82	z = -0,53 p = 0,59
Triglicerídeos	z = 0,45 p = 0,65	z = -0,40 p = 0,69	z = -1,30 p = 0,19	z = -1,30 p = 0,19
Glicemia	z = 1,65 p = 0,10	z = 2,92 p = 0,003	z = -2,26 p = 0,02	z = -1,14 p = 0,25

Os grupos CHE2 C5+ e CHE2 C5- diferiram significativamente quanto à atividade total ($t=2,56$ e $p=0,01$), como já seria esperado (ALCÂNTARA *et al.* 2003; FURTADO-ALLE, 2005). Partindo disso, investigou-se se alguma das formas moleculares apresentaria maior contribuição nesse resultado. Para tanto, foi realizado o teste-t de comparando os fenótipos CHE2 C5+ e C5- quanto à atividade relativa das formas moleculares. Foi observada diferença significativa, apenas nas formas moleculares G2 ($t = 2,34$ $p = 0,02$) e G4 ($t = 2,27$ $p = 0,02$). G1 e G1-alb não diferiram significativamente entre C5+ e C5- (no gráfico 6 está representada as médias das atividades relativas entre tais grupos). Constata-se, assim, que em indivíduos com fenótipo CHE2 C5+, há predominância das formas dímero e tetrâmero em detrimento das outras.

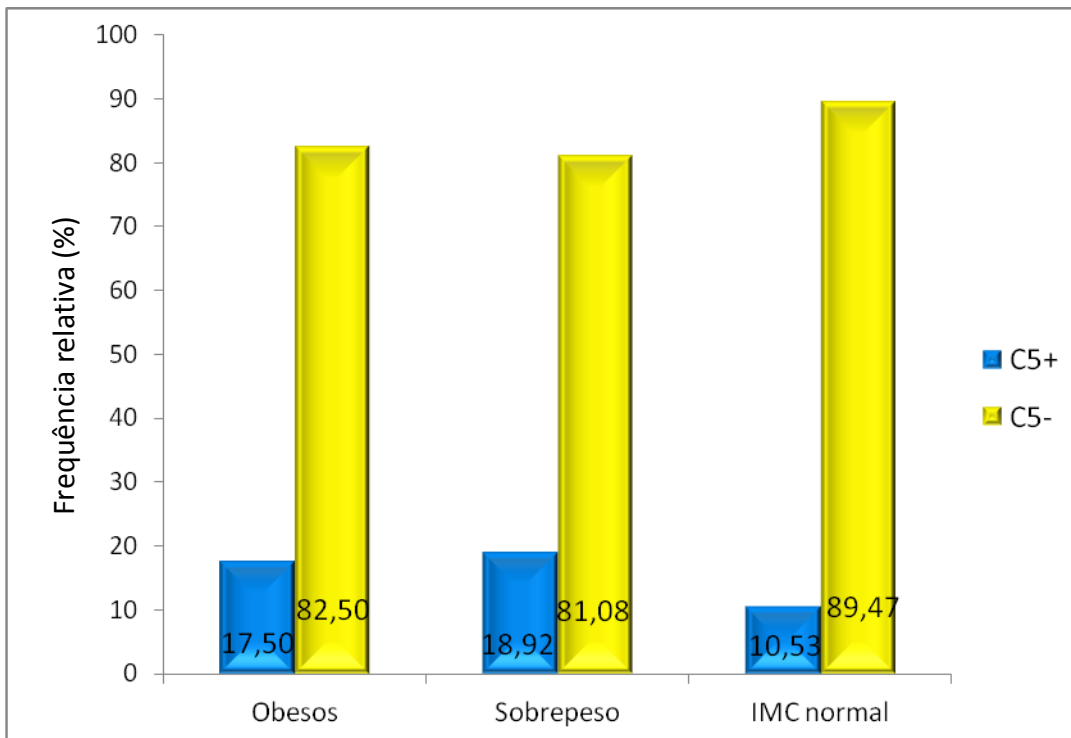


Gráfico 5. Frequência relativa (%) de indivíduos com fenótipo CHE 2 C5+ e CHE2 C5-, entre os grupos de IMC.

Masson (2001) sugere que a banda C₅ seja formada pelo tetrâmero G4 associado com outra proteína (X). Li *et al.* (2008) identificaram o gene *RAPH1* (Ras-associated and PH domains, que codifica a lamelipodina) como um bom candidato para produzir esta substância que se liga a BChE na forma C5+. Os autores observaram que o gene que codifica esta proteína desconhecida, presente no complexo C₅ em indivíduos CHE2 C5+, está localizado próximo ao gene que codifica a lamelipodina no cromossomo 2. Então levantaram a hipótese de que a proteína desconhecida, componente da variante C₅, possa ser uma forma atípica da lamelipodina, o que poderia levar ao mau funcionamento de alguma protease no soro ou fígado, responsável por clivá-la, deixando-a com um tamanho maior em relação à lamelipodina presente no complexo C₄. Está sendo desenvolvido no laboratório um trabalho de doutorado visando elucidar essa questão. Sabe-se que as formas moleculares da BChE são parcialmente interconvertíveis (MASSON, 1989), e também que a proteína associada ao tetrâmero, que determina o fenótipo C5+, tem papel na tetramerização.

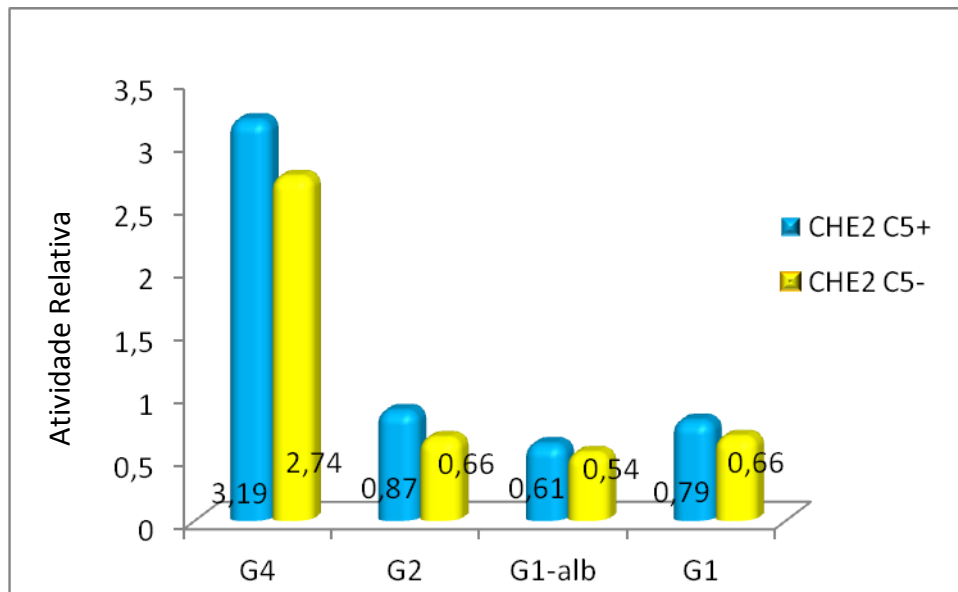


Gráfico 6. Médias das atividades relativas das formas moleculares entre indivíduos CHE2 C5+ e CHE2 C5-

Investigou-se também se havia diferença entre C5+ e C5- quanto às variáveis bioquímicas. Considerando a amostra como um todo, não houve essa diferença. Mas separando entre homens e mulheres, pôde-se verificar diferença significativa quanto ao colesterol total e LDL em mulheres (tabela 7). Cwiertnia (2010) comparou CHE2 C5+ e CHE2 C5- em amostra de mulheres e verificou diferença significativa entre os grupos em relação aos dados de: glicemia, colesterol total e triglicerídeos. Dados de LDL não foram abordados nesse trabalho. Menciona-se que tal diferença observada leva à suposição que os portadores do fenótipo CHE2 C5+ possuam certa proteção quanto aos distúrbios metabólicos. Porém, nosso trabalho contraria essa afirmação, já que o perfil lipídico das portadoras do fenótipo CHE2 C5+ é desfavorável.

Tabela 7. Média \pm erro padrão e resultados de testes t (p) das variáveis bioquímicas em amostra de fenótipos CHE2 C5- e CHE2 C5+ (mulheres)

Variáveis (mulheres)	CHE2 C5+	CHE2 C5-	t (p)
Colesterol total	240 \pm 59,73	203,52 \pm 37,11	2,19 (0,03)
HDL	56,17 \pm 12,51	55,63 \pm 11,93	0,10 (0,92)
LDL	156,37 \pm 54,44	127,80 \pm 28,21	2,18 (0,03)
Triglicerídeos	137,33 \pm 67,57	108,76 \pm 57,32	1,15 (0,25)
Glicemia	88,67 \pm 7,34	85,03 \pm 23,31	0,39 (0,71)

6. CONCLUSÕES

Homens e mulheres diferem quanto às variáveis de perfil lipídico, sendo, portanto, necessário analisar em grupos separados.

Apesar da proporção das formas moleculares da BChE ser mantida independentemente do IMC, a forma monomérica da BChE contribui em maior proporção que as outras formas moleculares, na atividade aumentada observada em obesos.

Existe relação entre as formas moleculares da BChE e glicemia.

O dímero e o tetrâmero da BChE contribuem mais efetivamente no aumento da atividade observado em indivíduos com fenótipo CHE2 C5 +.

Em mulheres, perfis de LDL e colesterol total foram desfavoráveis (ou seja, tiveram valores maiores, quando seria melhor metabolicamente serem menores) entre portadoras do fenótipo CHE2 C5+.

REFERÊNCIAS

- ALCÂNTARA, V. M. *et al.* Formas moleculares da butirilcolinesterase (BChE) e índice de massa corporal (IMC). **Genet. Mol. Biol.** v. 22, p. 213, 1999.
- ALCÂNTARA, V. M. *et al.* Association of the *CHE2* locus with body mass index and butyrylcholinesterase activity. **Hum Biol.** v. 73, p. 587-595, 2001.
- ALCÂNTARA, V. M. *et al.* Butyrylcholinesterase and obesity in individuals with the *CHE2* C5+ and *CHE2* C5- phenotypes. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.**, v. 27, p. 1557-1564, 2003.
- ALCÂNTARA, V. M. *et al.* Butyrylcholinesterase activity and metabolic syndrome in obese patients. **Clin. Chem. Lab. Med.** v. 43(3), p 285-288, 2005.
- ANDRADE, F. A. Variantes dos sítios -116 e 1615 do gene *bche* da butirilcolinesterase humana e índice de massa corporal 76f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.
- ARAÚJO, F. *et al.* Perfil Lipídico de Indivíduos sem Cardiopatia com Sobrepeso e Obesidade **Arq. Bras. Cardiol.** v. 84 n. 5 p. 405-409, 2005.
- ARPAGAUS, M. *et al.* Structure of the gene for human butyrylcholinesterase. Evidence for a single copy. **Biochemistry**, v. 29, p. 124-131, 1990.
- BARTELS, C. F.; VAN DER SPEK, A. F. L.; LA DU, B. N. Two polymorphisms in the non-coding regions of the *BCHE* gene. **Nucleic Acids Res.** v. 18, p. 6171, 1990.
- BENYAMIN, B. *et al.* GWAS of butyrylcholinesterase activity identifies four novel loci, independent effects within *BCHE* and secondary associations with metabolic risk factors. **Hum Mol Genet.** v. 20 (22), p. 4504-4514, 2011.
- BOBERG, D. R. **Formas moleculares da butirilcolinesterase e obesidade** 84f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.
- BOBERG, D. R. *et al.* Molecular forms of butyrylcholinesterase and obesity. **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, n. 3, 2010.
- BORJERSON M. The aetiology of obesity in children. A study of 101 twin pairs. **Acta Paediatr Scand**, v. 65, p. 279-287, 1976;
- CHATONNET, A.; LOCKRIDGE, O. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. **Biochem. J.** v. 260, p. 625-634, 1989.

CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A. *et al.* The C5 isozyme of serum cholinesterase and adult weight. **Hum. Hered.** v. 41, p. 330-339, 1991.

CLEMENT, K.; FERRÉ, P.; Genetics and the pathophysiology of obesity. **Pediatr Res**, v.53, p.721-725, 2003.

CLITHEROW, J.W.; MITCHARD, M. e HARPER, N.J. The possible biological function of pseudocholinesterase. **Nature**, v. 199, p. 1000-1001, 1963.

ÇOKUĞRAŞ, A. N. Butyrylcholinesterase: Structure and Physiological Importance. **Turk. J. Biochem.** v. 28 n. 2 p. 54-61, 2003.

CUCUIANU, M.; POPESCU, T.A. e HARAGUS, ST. Pseudocholinesterase in obese and hyperlipemic subjects. **Clin. Chim. Acta**, v. 22, p. 151-155, 1968.

CUCUIANU, M. *et al.* Serum cholinesterase activity correlates with serum insulin, C-peptide and free fatty acids levels in patients with type 2 diabetes. **Rom. J. Intern. Med.**, v.40, p.43-51, 2002.

CWIERTNIA, M. M. Variabilidade das frações de baixo peso molecular da butirilcolinesterase no diabetes mellitus tipo 1 e tipo 2. 95f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

FADEL-PICHETH, C. **Variabilidade do loco BCHE da butirilcolinesterase e peso do adulto em amostra de Curitiba.** 107f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1991.

FREEDMAN D. S. *et al.* Body fat distribution and male/female differences in lipids and lipoproteins. **Circulation** v. 81 p. 1498-1506, 1990.

FURTADO-ALLE, L. **Variabilidade Genética da Butirilcolinesterase e Obesidade.** 175 f. Tese (Doutorado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

FURTADO-ALLE, L. *et al.* Association of variants of the -116 site of the butyrylcholinesterase *BCHE* gene to enzyme activity and body mass index. **Chemico-Biological Interactions** v. 175, p. 115–118, 2008.

GUEDES D. P.; GUEDES J. E. Body fat distribution, blood pressure and plasma lipids and lipoprotein levels. **Arq. Bras. Cardiol.** v. 70 p. 93-98, 1998.

GRUNDY, S. M. Multifactorial causation of obesity: implications for prevention. **Am. J. Clin. Nutr.** v. 67 p. 563-572, 1998.

GRUNDY, S. M. *et al.* Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. **Circulation**, v. 109, p. 433-438, 2004.

HARRIS, H.; HOPKINSON, D.A; ROBSON, E.B. Two-dimensional electrophoresis of pseudocholinesterase components in human serum. **Nature**, v.196, p. 1296-1298, 1962.

JBILLO, O. *et al.* Promoter and Transcription Start Site of Human and Rabbit Butyrylcholinesterase Genes. **J. Biol. Chem.** v. 269, n. 33, p. 20829-20837, 1994.

JUUL, P. Human plasma cholinesterase isoenzymes. **Clin. Chim. Acta**, v. 19, p.205-213, 1968.

KÁLMÁN, J. *et al.* Increased serum butyrylcholinesterase activity in type IIb hyperlipidaemic patients. **Life Sciences** v. 75, p. 1195-1204, 2004.

KALOW, W.; GENEST, K. A method for the detection of atypical forms of human serum cholinesterase: determination of dibucaine numbers. **Can. J. Med. Sci.** v.35, p.339-346, 1957.

KUTTY, K. M. Review: Biological function of cholinesterase. **Clin. Biochem.** v. 13, p. 239-43, 1980.

KUTTY, K. M. e PAYNE, R. H. Serum pseudocholinesterase and very-low-density lipoprotein metabolism. **J. Clin. Lab. Anal.**, v. 8, p.247-250, 1994.

LA MOTA, R. V. *et al.* Multiples forms of serum cholinesterase. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 124, p. 299-308, 1968.

LEGAY, C. *et al.* Cloning and expression of rat acetylcholinesterase subunit: generation of multiple molecular forms and complementary with a Torpedo collagenic subunit. **J. Neurochem.** v. 60, p. 337-346, 1993.

LI, H. *et al.* Lamellipodin proline rich peptides associated with native plasma butyrylcholinesterase tetramers. **Biochem. J.** v. 411, p. 425–432, 2008.

LOCKRIDGE, O. *et al.* Complete aminoacid sequence of human serum cholinesterase. **J. Biol. Chem.** v. 262, p. 549-557, 1987.

MASSON, P. A naturally occurring molecular form of human plasma cholinesterase is an albumin conjugate. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 988, p. 258-266, 1989.

MASSON, P. *et al.* Effects of mutations of active site residues and amino acids interacting with the loop on substrate activation of butyrylcholinesterase. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1544, p. 166-176, 2001.

NCBI (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 09/10/2012.

NEEL, J.V. Diabetes mellitus: a “thrifty” genotype rendered detrimental by “progress”? **Am. J. Hum. Genet.**, v. 14, p. 353-362, 1962.

ÖHMAN, M. **The search for genes predisposing to obesity**. Tese de Doutorado. Department of Molecular Medicine, National Public Health Institute and Department of Medical Genetics, University of Helsinki, Finland, 2001.

PATOCKA, J.; KUCA, K.; JUN, D. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase - important enzymes of human body. **Acta Medica**, v. 47 n.4 p.215-228, 2004.

RABELO L. M. *et al.* Risk factors for atherosclerosis in students of a private university in São Paulo-Brazil. **Arq. Bras. Cardiol.** v. 72 p. 569-580, 1999.

RANDELL E. W. *et al.* Relationship between serum butyrylcholinesterase and the metabolic syndrome. **Clin. Biochem.** v. 38, p. 799-805, 2005.

ROBINSON, A.R. *et al.* A new technique for differentiation of hemoglobin. **J. Lab. Clin. Med.** v. 50, p. 745-52, 1957.

ROBITZKI A. *et al.* Transfection of reaggregating embryonic chicken retinal cells with an antisense 5'-DNA butyrylcholinesterase expression vector inhibits proliferation and alters morphogenesis. **J. Neurochem.** v. 69, n. 2, p. 823-833, 1997.

SAMBROOK, J. *et al.* **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, 2^a ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, 1989.

SHNIDER, S. M. Serum cholinesterase activity during pregnancy labor and the puerperium. **Anesthesiology**, v. 26, p. 335-339, 1965.

SIDELL, F.R. e KAMINSKIS, A. Influence of age, sex and oral contraceptives on human blood cholinesterase activity. **Clin. Chem.** v. 21, p. 1393-1395, 1975.

SILVA, I. M. W. *et al.* Effects of physical exercise on butyrylcholinesterase in obese adolescents, submetido e aceito **Genetics and Molecular Biology**, 2012.

SOARES, L. e RITTO, C. Pesquisa do IBGE confirma que obesidade é epidemia no Brasil. **Veja**. Reportagem. Disponível em: <<http://veja.abril.com.br/noticia/saude/pesquisa-do-ibge-mostra-que-obesidade-e-epidemia-no-brasil>> Acesso em: 09/10/2012.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES Disponível em: <<http://www.diabetes.org.br/>>. Acesso em: 09/10/2012.

SOUZA, R. L. R. **Estudos sobre nova banda da butirilcolinesterase humana (C_{4/5}) verificada em eletroforese**. 74f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1995.

SOUZA, R. L. R. **Varição fenotípica e genotípica da butirilcolinesterase humana e sua relação com altura e índice de massa corporal.** 146f. Tese (Doutorado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

SOUZA, R. L. R. *et al.* Possible influence of *BCHE* locus of butyrylcholinesterase on stature and body mass index. **Am. J. Phys. Ant.**, v. 326, p. 329-334, 2005a.

SOUZA, R. L. R. *et al.* Four new mutations in the *BCHE* gene of butyrylcholinesterase in a Brazilian blood donor sample. **Mol. Genet. Metab.** v. 84, p. 349-353, 2005b.

STUEBER-ODEBRECHT, N. *et al.* Studies on the CHE1 locus of serum cholinesterase and surnames in a sample from Southern Brazil. **Rev. Brasil. Genet.** v. 8 p. 535-543, 1985.

STUNKARD A. J. *et al.* An adoption study of human obesity. **N Engl J Med**, v. 314 (4) p. 193-198, 1986.

STURM, R. Increases in morbid obesity in the USA: 2000-2005. **Public Health** v. 121(7) p. 492-496, 2007.

SUGIMORI, T. Shortened action of succinylcholine in individuals with cholinesterase C5 isoenzyme. **Canad. Anaesth. Soc. J.** v. 33, p. 321-327, 1986.

TONETTO, M. **O Brasil acima do peso** Ministério da Saúde. Reportagem. Disponível em: <<http://www.terra.com.br/noticias/infograficos/obesidade-no-brasil/>>. Acesso em: 09/10/2012.

VAN ROS, G.; VERVOORT, T. Frequencies of the "atypical" and C5 variants of serum cholinesterase in Zairians and Belgians. Detection of the C5 variant by agar gel electrophoresis with an acid buffer. **Ann. Soc. Belg. Med. Trop.** v. 53, p. 633-644, 1973.