

FABIANA ANTUNES DE ANDRADE

**VARIABILIDADE DO GENE *RAPH1* E SUA RELAÇÃO COM A
BUTIRILCOLINESTERASE**

CURITIBA
2013

FABIANA ANTUNES DE ANDRADE

**VARIABILIDADE DO GENE *RAPH1* E SUA RELAÇÃO COM A
BUTIRILCOLINESTERASE**

Tese de Doutorado apresentada ao curso de Pós Graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo R. L. de Souza.

Co orientadora: Profa. Dra. Liya R. Mikami.

CURITIBA

2013

Para meu esposo, minha mãe e minha irmã.
Com amor e gratidão.

Agradecimentos

A Deus por estar comigo todos os dias e, ao longo desses quatro anos de doutorado, me sustentando.

A minha família, em especial a minha mãe, pelo exemplo de dedicação, comprometimento e perseverança; ao meu esposo, por sempre me incentivar a procurar em Deus a força maior para superar os momentos difíceis; a minha irmã pelo amor, carinho e companhia. Por tudo isso, dedico e reconheço a vocês, minha imensa gratidão e todo amor.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo Lethonen Rodrigues de Souza, pelos ensinamentos, dedicação e o entusiasmo demonstrado por este trabalho.

À minha co-orientadora, Profa Dra. Liya R. Mikami pela amizade e estímulo.

À Dra. Lupe Furtado Alle pelo interesse e sugestões no desenvolvimento deste trabalho. Por se mostrar sempre disposta a ajudar, muito obrigada.

À professora Eleidi Chautard Freire Maia, pelo constante apoio e interesse dedicados, minha admiração e gratidão.

A todos os meus queridos amigos do Laboratório de Polimorfismos e Ligação, pela excelente convivência, pelas conversas, pela ajuda, incentivos diários para a concretização deste trabalho.

Aos alunos de iniciação científica: Sarah, Anaíti e André, muito obrigada pela ajuda e empenho investidos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa de doutorado.

Lista de Tabelas

Referencial Teórico

Tabela 1 Lista de variantes já descritas do gene *BCHE*, incluindo a alteração de nucleotídeo e o nome do alelo -----12

Tabela 2 Sequência de aminoácidos de peptídeos associados à BChE e seus respectivos valores de espectrometria de massa (m/z)-----33

Manuscrito do Artigo Científico - Variabilidade do Gene *RAPH1* em Amostras de Euro-Brasileiros e Afro-Brasileiros

Tabela 1. Número de indivíduos genotipados através de PCR-SSCA para o SNP rs 2465520, suas frequências alélicas e genotípicas, bem como a comparação dessas frequências (χ^2 ; p) entre ois grupos étnicos. -----45

Tabela 2. Número de indivíduos genotipados por *TaqMan* para o SNP rs 3814365, suas frequências genotípicas e alélicas, bem como a comparação dessas frequências (χ^2 ; p) entre os grupos étnicos -----48

Tabela 3. Número de indivíduos genotipados por *TaqMan* para o SNP rs2246118, suas frequências genotípicas e alélicas, bem como a comparação dessas frequências (χ^2 ; p) entre os grupos étnicos-----49

Tabela 4. Frequência dos haplótipos estimados e suas comparações (χ^2 ; p), entre os grupos de indivíduos euro-brasileiros e afro-brasileiros -----51

Tabela 5. Comparação entre as frequências genotípicas e alélicas observadas e as disponíveis no NCBI para o SNP rs2465520 das populações Européia (CEU) e Africana (YRI) -----54

Tabela 6. Comparação entre as frequências genotípicas e alélicas observadas e as disponíveis no NCBI para o SNP rs2246118 das populações Européia (CEU) e Africana (YRI) -----55

Tabela 7. Comparação entre as frequências genotípicas e alélicas observadas e as disponíveis no NCBI para o SNP rs384365 das das populações Européia (CEU) e Africana (YRI) -----58

Tabela 8. Frequências alélicas e genotípicas dos SNPs do gene *RAPH1* estudados em diferentes populações -----62

Manuscrito do Artigo Científico - Associação entre Haplótipos do Gene *RAPH1* e Fenótipos do Loco *CHE2*

Tabela 1. Número de indivíduos genotipados para o SNP rs3814365, suas frequências alélicas e genotípicas bem como a comparação dessas frequências (χ^2 ; p) entre os grupos CHE2 C5+ e CHE2 C5- -----76

Tabela 2. Número de indivíduos genotipados para o SNP rs2465520 suas frequências alélicas e genotípicas bem como a comparação dessas frequências (χ^2 ; p) entre os grupos CHE2 C5+ e CHE2 C5-. -----	77
Tabela 3. Número de indivíduos genotipados para o SNP rs2246118, suas alélicas e genotípicas bem como a comparação dessas frequências (χ^2 ; p) entre os grupos CHE2 C5+ e CHE2 C5-. -----	78
Tabela 4. Frequências dos haplótipos estimados e suas comparações (χ^2 ; p) entre os grupos CHE2 C5+ e CHE2 C5- -----	79
Tabela 5. Número de indivíduos classificados como CHE2 C5+ forte, CHE2 C5+ fraco e CHE2 C5- para o SNP rs2465520, suas frequências alélicas e genotípicas e a comparação dessas frequências (χ^2 ; p) entre os grupos fenotípicos. -----	81
Tabela 6. Número de indivíduos classificados como CHE2 C5+ forte, CHE2 C5+ fraco e CHE2 C5- para o SNP rs3814365, suas frequências alélicas e genotípicas e a comparação dessas frequências (χ^2 ; p) entre os grupos fenotípicos. -----	82
Tabela 7. Número de indivíduos classificados como CHE2 C5+ forte, CHE2 C5+ fraco e CHE2 C5- para o SNP rs2246118, suas frequências alélicas e genotípicas e a comparação dessas frequências (χ^2 ; p) entre os grupos fenotípicos. -----	83
Tabela 8. Média de atividade da BChE nos indivíduos do fenótipos do loco <i>CHE2</i> , bem como os valores de t referentes as comparações entre esses grupos. -----	84
Tabela 9. Frequências dos haplótipos estimados e suas comparações (χ^2 ; p) entre os grupos CHE2 C5+ forte, CHE2 C5+ fraco e CHE2 C5-. -----	85

Apêndice 1

Tabela 1. Características dos iniciadores utilizados para amplificar os fragmentos de DNA do exon 17 do gene <i>RAPH1</i> , através da técnica PCR-SSCA e suas respectivas condições eletroforéticas.-----	115
Tabela 2. Características dos iniciadores utilizados para amplificar os fragmentos de DNA do exon 4 do gene <i>RAPH1</i> , através da técnica PCR-SSCA e suas respectivas condições eletroforéticas.-----	116

Apêndice 2

Tabela 1. Famílias selecionadas para o estudo de ligação entre variantes do gene <i>RAPH1</i> e loco <i>CHE2</i> , genotipadas para o SNP rs3814365 e rs2246118. -----	125
--	-----

Lista de Figuras

Referencial Teórico

Figura 1. Representação da superposição da BChE (azul claro), TcAChE (azul escuro) e AChE de <i>Drosophila melanogaster</i> (verde) na região da entrada do sítio ativo (Fonte: NICOLET et al., 2003). -----	06
--	----

Figura 2. Alça Ω da BChE e aminoácidos que interagem com ela.-----	07
Figura 3. Representação do gene <i>BCHE</i> com os quatro exons e seus respectivos pares de bases. -----	08
Figura 4. Representação do cromossomo 2 e a correspondente posição do gene <i>RAPH1</i> em 2q33. (Fonte: Ensembl, acessado em 09/02/2011).-----	16
Figura 5. Representação esquemática do gene <i>RAPH1</i> com seus 17 exons. -----	16
Figura 6. Isoformas resultantes do processo de recomposição alternativa do transcrito do gene <i>RAPH1</i> . -----	18
Figura 7. Sequência de aminoácidos da proteína Lamalipodina, também, chamada proteína <i>RMO1</i> . Fonte: KRAUSE et al. (2004).-----	20
Figura 8. Representação dos domínios conservados na família de proteínas MRL.----	22
Figura 9. Células neuronais de murinos coradas para a observação da Lamalipodina.	25

Manuscrito do Artigo Científico - Variabilidade do Gene *RAPH1* em Amostras de Euro-Brasileiros e Afro-Brasileiros

Figura 1. Reprodução de placas de gel de poliacrilamida submetidas à eletroforese, contendo fragmentos do exon 17 do gene <i>RAPH1</i> -----	44
Figura 2. Eletroferograma de uma amostra heterozigota para o SNP rs2465520, CCC > CCT, na posição nt 3918 do exon 17 do gene <i>RAPH1</i> . A seta em vermelho indica heterozigose no sítio. -----	44
Figura 3. Eletroferograma de uma amostra heterozigota para o SNP rs3814365, CCA > CCG na posição nt 3038 do exon 17. A seta vermelha indica heterozigose no sítio. -----	46
Figura 4. Reprodução de placas de gel de poliacrilamida submetidas à eletroforese, contendo fragmentos do exon 4 do gene <i>RAPH1</i> .. -----	50
Figura 5. Valor de desequilíbrio de ligação relativo (D'), entre os SNPs estudados gerados através do programa Haploview. -----	61
Figura 6. Comparação da conservação genômica do gene <i>RAPH1</i> entre <i>H. sapiens</i> e outras 4 espécies. -----	65

Manuscrito do Artigo Científico - Associação entre Haplótipos do Gene *RAPH1* e Fenótipos do Loco *CHE2*

Figura 1. Reprodução de uma placa de gel de ágar 1%, pH 6,2, submetida à eletroforese. Amostra 1: fenótipo <i>CHE2</i> C5-, amostras 2 e 3 <i>CHE2</i> C5+ fraco, amostras 4, 5 e 6 fenótipo <i>CHE2</i> C5+ forte. -----	80
---	----

Figura 2. Representação do SNP do gene *ABI2* (rs11675251) e SNPs do *RAPH1* em
desequilíbrio de ligação. -----92

Apêndice 1

Figura 1. Gráfico exemplificando o método utilizado para inferir os genótipos,
Indicando valores de pico das fluorescências (FAM e VIC) em cada amostra e os
três grupos genotípicos formados. ----- 118

Apêndice 2

Figura 1. Valores de intensidades da banda C5+ avaliadas através do programa
KODAK1D Image Analysis Software. ----- 122

Figura 2. Valores de intensidade da banda C5+ para os fenótipos CHE2 C5+ forte e
fraco, obtidos através do programa *KODAK1D Image Analysis Software*.----- 123

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

AChE	Acetilcolinesterase
<i>ACHE</i>	Gene da acetilcolinesterase
BChE	Butirilcolinesterase
<i>BCHE</i>	Gene da butirilcolinesterase
<i>CHE2</i>	Loco condicionador do complexo C5 da butirilcolinesterase
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
HEMEPAR	Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná
IMC	Índice de massa corporal
IUBMB	<i>International Union of Biochemistry & Molecular Biology</i>
Lpd	Proteína Lamelipodina
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PRIMA	<i>Proline-rich membrane anchor</i>
<i>RAPH1</i>	<i>Ras association (RalGDS/AF-6) and pleckstrin homology domains 1</i>
<i>RMO1</i>	<i>Reduced expression in metastatic osteosarcoma</i>
SNPs	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>
SSCA	<i>Single Strand Conformational Analysis</i>
TBE	Tris-ácido bórico-EDTA

Resumo

A butirilcolinesterase (BChE; EC 3.1.1.8) é uma esterase sérica, sintetizada por células hepáticas e amplamente distribuída no organismo. Peptídeos ricos em poliprolina derivados da lamelipodina (Lpd) foram observados dirigindo a formação e fazendo parte da estrutura tetramérica da BChE. A Lpd é uma proteína que atua na formação de protrusões da membrana celular e, é codificada pelo gene *RAPH1*, localizado no mesmo sítio cromossômico do loco *CHE2* (2q33). A coincidente localização no cromossomo e a relação com o tetrâmero da BChE levou à hipótese do gene *RAPH1* ser o loco *CHE2*. O presente trabalho estudou a variabilidade do gene *RAPH1* em amostras de euro (N = 100) e afro-brasileiros (N = 66), buscando também encontrar a mutação responsável pelo fenótipo CHE2 C5+, avaliando em 34 indivíduos CHE2 C5+ e 92 CHE2 C5-, os SNPs encontrados encontrados no estudo da variabilidade do *RAPH1*. Nos exons estudados foram encontrados apenas 2SNPs (rs3813365 e rs2465520), ambos já descritos nos grupos étnicos estudados. A genotipagem de um tagSNPs selecionado (rs2246118, íntron 6) e os observados nos exons mostrou que apenas o rs3814365 apresentou frequência alélica diferente entre afro e euro-brasileiros. Quando as frequências dos SNPs nas populações de estudo foram comparadas com frequências européias e africanas (disponíveis no NCBI), os resultados indicaram, para os três SNPs, um gradiente de frequência entre as populações, que reflete, provavelmente, as variantes alélicas presentes nas populações fundadoras. A avaliação da região codificadora do *RAPH1* entre diferentes espécies indicou um alto grau de homologia e conservação. A frequência dos três SNPs estudados foi avaliada entre os fenótipos CHE2 C5+ e CHE2 C5-. Foi observada associação apenas quando as combinações dos alelos em haplótipos foram avaliadas, sendo dois haplótipos observados associados ao fenótipo CHE2 C5+. Quando o fenótipo CHE2 C5+ foi separado em fenótipo fraco e forte, com relação à intensidade da banda C₅, os mesmos haplótipos mostraram associação, um ao fenótipo forte e o outro ao fraco. A atividade da BChE também foi avaliada nesses fenótipos, e mostrou ser, em média, maior em CHE2 C5+ forte quando comparado com fraco e CHE2 C5-. Estes resultados corroboram a hipótese de que o gene *RAPH1* seja o loco *CHE2* e que a interação entre Lpd e BChE parece interferir na atividade enzimática apenas em CHE2 C5+ forte.

Abstract

The butyrylcholinesterase (BChE, EC 3.1.1.8) is a serum esterase synthesized by liver cells and widely distributed in the body. Polyproline-rich peptides derived from lamellipodin (Lpd) were observed driving the formation and being part of the tetrameric BChE structure. The Lpd is a protein that acts in the formation of cell membrane protrusions, and is encoded by the *RAPH1* gene, located on the same chromosomal site of *CHE2* locus (2q33). The coincident location on chromosome and the relationship with BChE tetramer, led to the hypothesis that *RAPH1* gene is the *CHE2* loco. This work studied the *RAPH1* gene variability in a samples of Euro-Brazilians (N = 100) and African-Brazilians (N = 66), also looking to find the mutation responsible for the CHE2 C5+ phenotype, evaluating in 34 CHE2 C5+ individuals and 92 CHE2 C5-, SNPs previously found in the *RAPH1* variability study. In the studied exons only 2 SNPs (rs3813365 and rs2465520) were found, both already described in the ethnic groups studied. The genotyping of a selected tagSNPs (rs2246118, intron 6) and of those observed in exons showed that only rs3814365 allele frequency is different between African and Euro-Brazilians. When the SNPs frequencies in the study populations were compared with European and African frequencies (available at NCBI), the results indicated, for the three SNPs, a frequency gradient between populations, reflecting, probably, the allelic variants present in founder populations. The evaluation of *RAPH1* coding region between different species indicates a high degree of conservation and homology. The frequency of the three SNPs studied was evaluated between CHE2 C5+ phenotype and CHE2 C5-. Values of association were observed only when the allelic combinations in haplotypes were evaluated, being two haplotypes associated with the CHE2 C5+ phenotype. When the CHE2 C5+ phenotype was separated into faint and intense, considering the intensity of the C₅ band, the same haplotypes showed association, one with the intense phenotype and the other with the faint phenotype. The mean BChE activity was also evaluated between phenotypes and showed to be higher in intense CHE2 C5+ phenotype when compared with faint and CHE2 C5- phenotypes. These results corroborate the hypothesis that the *RAPH1* gene may be the *CHE2* locus and that the interaction between Lpd and BChE seems to interfere with the enzyme activity only in intense CHE2 C5 + .

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 COLINESTERASES: ASPECTOS GERAIS	3
2.2 FORMAS MOLECULARES	4
2.3 ESTRUTURA DA BChE HUMANA	5
2.4 GENE <i>BCHE</i>	8
2.5 VARIABILIDADE GENÉTICA	10
2.5.1 Loco <i>CHE2</i>	10
2.5.2 Gene <i>BCHE</i>	11
2.6 BChE E SUAS RELAÇÕES COM LÍPIDES, PESO, IMC E OBESIDADE	14
2.7 GENE <i>RAPH1</i>	15
2.8 PRODUTO DO GENE <i>RAPH1</i>	17
2.8.1 Domínios Estruturais	19
2.9 FUNÇÕES DA LAMELIPODINA	23
2.9.1 Lamelipodina e o Recrutamento de Proteínas Ena/VASP	23
2.9.1.1 Proteínas Ena/VASP	23
2.9.1.2 Lamelipodina Ligante de Domínios EVH1 de Proteínas Ena/VASP	24
2.9.2 Lamelipodina e a Morfogênese dos Axônios	26
2.9.3 Lamelipodina e Proliferação Celular	27
2.10 GENE <i>RAPH1</i> E CÂNCER	28
2.11 LAMELIPODINA E BUTIRILCOLINESTERASE	30
2.11.1 Loco <i>CHE2</i> e Lamelipodina	34
3 OBJETIVOS	37
3.1 OBJETIVO GERAL	37
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4 MANUSCRITO DO ARTIGO CIENTÍFICO - VARIABILIDADE DO GENE <i>RAPH1</i> EM AMOSTRAS DE EURO-BRASILEIROS E AFRO-BRASILEIROS	38
5 MANUSCRITO DO ARTIGO CIENTÍFICO - ASSOCIAÇÃO ENTRE HAPLÓTIPOS DO GENE <i>RAPH1</i> E FENÓTIPOS DO LOCO <i>CHE2</i>	69
6 DISCUSSÃO GERAL	97
7 CONCLUSÕES	99
8 REFERÊNCIAS	100
APÊNDICE 1	113
Materiais e Métodos	113

Construção de Oligonucleotídeos Iniciadores-----	113
Genotipagem por PCR-SSCA-----	113
Genotipagem por <i>TaqMan</i> -----	117
Sequenciamento de DNA-----	118
APÊNDICE 2-----	120
Materiais e Métodos-----	120
Determinação da Atividade da BChE-----	120
Fenotipagem do Loco <i>CHE2</i> -----	120
Avaliação da intensidade da banda C ₅ em gel de ágar-----	122
Classificação do fenótipo CHE2 C ₅ + em forte e fraco-----	123
Análises Adicionais-----	123
Estudo de Ligação entre o Gene <i>RAPH1</i> e o Loco <i>CHE2</i> -----	123

1 INTRODUÇÃO

A butirilcolinesterase (BChE; EC 3.1.1.8) é uma esterase sérica que hidrolisa diversos ésteres de colina, mas utiliza a butirilcolina como substrato preferencial. A BChE é sintetizada pelas células hepáticas e amplamente distribuída no organismo. Sua função fisiológica, bem como seu substrato natural, não foram completamente esclarecidos, no entanto, a BChE já foi relacionada a lipoproteínas pelos autores Lawrence e Melnick (1961), Kutty et al. (1977), Ryhänen et al. (1982), que observaram a presença da BChE em LDL (lipoproteína de densidade baixa); sua forma heteróloga (C₅), está associada a menor peso (CHAUTARD-FREIRE-MAIA et al., 1991) e IMC (ALCÂNTARA et al., 2001) e sua atividade enzimática é maior em obesos que em controles normais nos indivíduos com fenótipo CHE2 C5– (ALCÂNTARA et al., 2003).

O gene *BCHE* está localizado no braço longo do cromossomo três (3q26.1-q26.2; SOREQ et al., 1987; ALLDERDICE et al., 1991; GAUGHAN et al., 1991) e sua estrutura de 4 exons e sequência de nucleotídeos foram estabelecidos por ARPAGAUSS et al. (1990). O sítio promotor e o de início de transcrição do gene *BCHE* foram elucidados por JBILO et al. (1994).

O uso de succinilcolina, como relaxante muscular pré-operatório, durante a década de 50, possibilitou a descoberta da primeira variante genética do gene *BCHE*, denominada de atípica. A variante atípica é incapaz de hidrolisar a succinilcolina em doses fisiológicas, causando paralisia muscular e apnéia respiratória prolongadas nos pacientes portadores dessa variante. O sequenciamento de DNA vem permitindo a identificação de muitas outras variantes do gene *BCHE*.

O loco *CHE2* (2q33-35) codifica uma substância cuja natureza permanece desconhecida, que se associa ao tetrâmero da BChE formando o complexo C₅ (HARRIS et al., 1962; MASSON, 1991). Esse loco apresenta dois alelos: *CHE2**C5+ e *CHE2**C5– responsáveis, respectivamente, pela presença e ausência do complexo C₅.

Em populações caucasóides, a frequência do alelo *CHE2**C5+ é geralmente 5%. Dados do nosso laboratório mostraram que indivíduos do fenótipo CHE2 C5+ apresentam média de peso significativamente menor (CHAUTARD-FREIRE-MAIA et al., 1991) e média de índice de massa corporal significativamente menor (ALCÂNTARA et al., 2001) que seus controles CHE2 C5–. Além disso, indivíduos obesos CHE2 C5+ e

CHE2 C5– parecem apresentar comportamentos diferentes em relação às atividades da BChE, perda de peso e nível de potássio (ALCÂNTARA et al., 2003).

Diversos autores constataram em seus trabalhos que o fenótipo CHE2 C5+ apresenta atividade enzimática superior à observada para o fenótipo CHE2 C5– (HARRIS, 1970; PRIMO-PARMO et al., 1986; SUGIMORI, 1986; CHAUTARD-FREIRE-MAIA et al., 1991).

LI et al. (2008) verificaram a existência de peptídeos ricos em prolina em tetrâmeros da BChE (C₄), presentes no plasma sanguíneo. Esses peptídeos além de dirigirem a formação do complexo C₄ fazem parte do seu complexo final e permanecem intrínsecos ao tetrâmero. Também foi proposto no mesmo trabalho que os peptídeos ricos em prolina obtidos após desnaturação de C₄, são todos derivados de uma mesma proteína: a Lamelipodina humana, a qual está associada à membrana celular e participa da protrusão lamelipodial, um componente importante no direcionamento da motilidade celular (KRAUSE et al., 2004).

Tanto o gene para a Lamelipodina humana (*RAPH1*) quanto o da proteína desconhecida codificada pelo loco *CHE2* presente no complexo C₅ em indivíduos *CHE2** C5+, estão localizados na mesma região do cromossomo 2 (q33); (NCBI GENE) sugerindo que a proteína presente no complexo C₅ poderia ser uma forma atípica da Lamelipodina, devido a um mau funcionamento de alguma protease no fígado responsável por clivá-la, deixando-a com um tamanho maior em relação à Lamelipodina presente no complexo C₄.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 COLINESTERASES: ASPECTOS GERAIS

Nos vertebrados, existem dois tipos de enzimas capazes de hidrolisar ésteres de colina: a acetilcolinesterase (AChE) e a butirilcolinesterase (BChE). A acetilcolinesterase hidrolisa o neurotransmissor acetilcolina a acetato e colina nas membranas pós-sinápticas das junções neuromusculares. A butirilcolinesterase utiliza como substrato preferencial a butirilcolina, hidrolisando também a acetilcolina, além de outros ésteres de colina.

Além da hidrólise de ésteres de colina, a AChE e a BChE possuem atividade de aril-acil-amidase. As sequências similares entre diferentes esterases, lípases, tiroglobulina, proteínas de adesão celular e colinesterases sugerem que as colinesterases têm a capacidade de exibir mais de uma atividade biológica e funções biológicas mais amplas (BALASUBRAMANIAN e BHANUMATHY, 1993).

A butirilcolinesterase é sintetizada pelas células hepáticas e amplamente distribuída no organismo, sendo encontrada no plasma, músculo liso, pâncreas, adipócitos, pele, massa branca do cérebro e coração (WESCOE et al., 1947). Foi mostrado, em murinos, que ela também é sintetizada nas células do tecido adiposo (ORESKOVIC e KUNEC-VAJIC, 1992). A função fisiológica desta enzima, bem como seu substrato natural, permanecem desconhecidos.

De acordo com a Comissão de Enzimas da União Internacional de Bioquímica, a butirilcolinesterase é classificada como acilcolina-acilhidrolase (EC 3.1.1.8). A sigla “EC” é a abreviação de *Enzyme Commission*. O primeiro número desse código, refere-se à classe da enzima, no caso da BChE, classe hidrolase, pois catalisa reações de hidrólise. O segundo número designa a subclasse e a ação da enzima sobre ligações ésteres. O terceiro número indica a sub-subclasse, que enquadra a BChE na categoria hidrolase de éster carboxílico (carboxylic ester hydrolase). O último número representa a série dentro da sub-subclasse (IUBMB, acessado em 16/08/2009).

2.2 FORMAS MOLECULARES

No plasma, os produtos do gene *BCHE* existem em variadas formas moleculares, as principais designadas em ordem decrescente de mobilidade eletroforética são: C₁, C₂, C₃ e C₄ (HARRIS et al., 1962), respectivamente, um monômero, um monômero ligado à albumina, um dímero e um tetrâmero.

A forma C₁, monomérica da BChE humana, é constituída por 574 aminoácidos e nove cadeias de carboidratos ligadas a nove asparaginas (LOCKRIDGE et al., 1987).

A composição de C₂ foi elucidada por MASSON (1989), que concluiu que C₂ era formada pela associação covalente de um monômero da BChE à albumina. Apesar da forma molecular da C₂ ter sido elucidada, seu significado biológico ainda permanece desconhecido.

A forma C₃ é um dímero, com peso molecular de aproximadamente 180 kDa (LOCKRIDGE et al., 1987).

A forma C₄, de peso molecular de 340 kDa, está organizada em um arranjo de dois dímeros, cada um mantido por ponte disulfídrica, sendo que a redução e alquilação dessa ponte mostrou que ela não é necessária para a organização tetramérica e a conservação da atividade da BChE (LOCKRIDGE et al., 1979). Trabalho subsequente (LOCKRIDGE e LA DU, 1982) mostrou resultados consistentes com os anteriores, concluindo que no tetrâmero os monômeros são mantidos unidos por ligações hidrofóbicas e pontes de dissulfeto.

Uma outra nomenclatura (MASSOULIÉ e BON, 1982) representa as formas globulares (G) e assimétricas (A) da enzima e o número de subunidades. As formas globulares podem ser solúveis ou ligadas à membrana celular por uma proteína transmembrânica, denominada PRIMA, do inglês *proline-rich membrane anchor* (PERRIER et al., 2002). A nomenclatura das formas globulares é representada por G1, G2 G3 e G4, respectivamente monômero, dímero, trímero de mobilidade intermediária entre G2 e G4 e o tetrâmero. O complexo formado pelo monômero da butirilcolinesterase mais albumina é representado por G1-ALB. As formas assimétricas (alongadas), representadas pela letra A, são formadas de um a três tetrâmeros (A4, A8, A12) covalentemente associados a uma cauda de colágeno (Col-

Q) que os ancora na matriz extra-celular da junção neuro-muscular (KREJCI et al., 1997).

2.3 ESTRUTURA DA BChE HUMANA

Um modelo tridimensional da BChE humana foi construído por MILLARD e BROOMFIELD (1992) derivado por análise computacional a partir da estrutura cristalográfica da AChE de *Torpedo californica* (TcAChE), que apresenta 53,8% de identidade com a BChE humana (LOCKRIDGE et al., 1987a).

A estrutura cristalográfica da BChE humana foi determinada por NICOLET et al. (2003) e, de forma geral, ela é bastante similar à estrutura da TcAChE (Figura 1). Porém, os resíduos aromáticos encontrados na entrada do sítio ativo da TcAChE foram substituídos, na BChE, por resíduos hidrofóbicos e aqueles no bolso de ligação de grupamento acil (resíduos Phe288 e Phe290) foram substituídos por Leu286 e Val288, respectivamente. Essas mudanças tornam possível a ligação de uma gama maior de substratos na BChE em relação à AChE.

O sítio aniônico periférico da BChE humana está envolvido no mecanismo de ativação de substratos (Figura 2). Dois locais de ligação de substrato, Asp70 no sítio aniônico periférico e Trp82 no sítio ativo, são conectados por uma alça ômega (Ω). A ativação do substrato da BChE envolve a participação de diferentes domínios na entrada do sítio ativo da enzima, incluindo o sítio aniônico periférico (Asp70 e Tyr332), o sub-sítio de ligação do sítio ativo (Trp82 e Ala328), o resíduo estabilizador Glu197 e o resíduo Asn83 da alça Ω (MASSON et al., 2001).

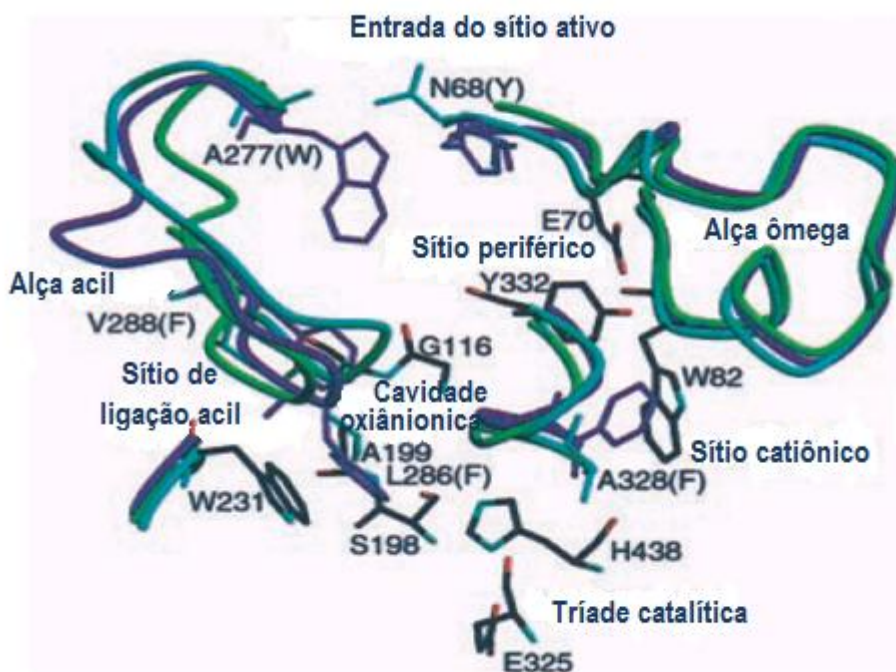


Figura 1. Representação da superposição da BChE (azul claro), TcAChE (azul escuro) e AChE de *Drosophila melanogaster* (verde) na região da entrada do sítio ativo (Fonte: NICOLET et al., 2003).

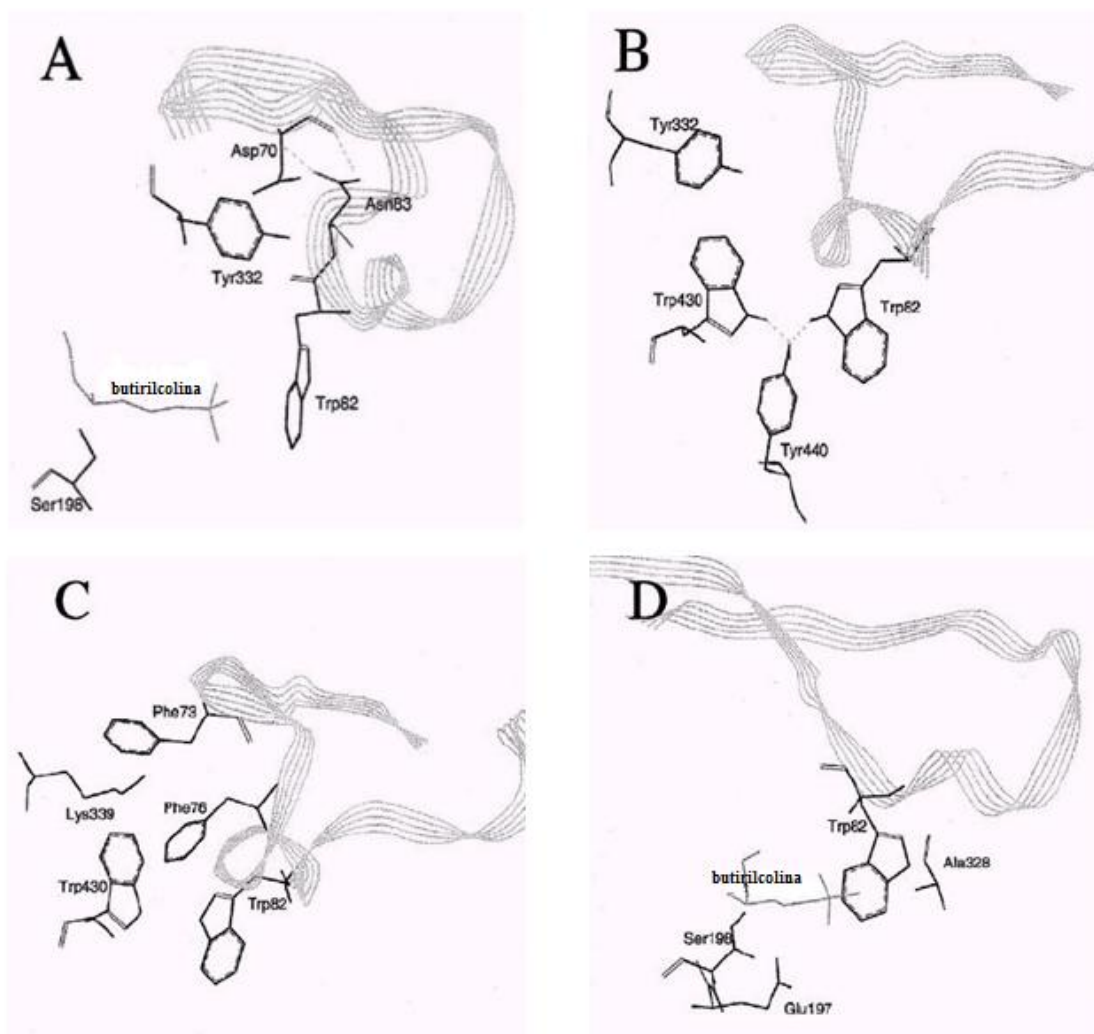


Figura 2. Alça Ω da BChE e aminoácidos que interagem com ela. (A) O sítio aniônico periférico da BChE é definido pelos resíduos Asp70 e Tyr332. Ao entrar no canal do sítio ativo, a butirilcolina liga-se ao sítio aniônico periférico e subsequentemente ao Trp82. A fita é a alça Ω formada pelos aminoácidos 65 a 92. Asn83 é ligado por ponte de hidrogênio a Asp70. O sítio ativo é a Ser198 no fundo do túnel. A distância entre o sítio aniônico periférico e o sítio ativo é de cerca de 10 Å. (B) Trp430 interage com Trp82, Tyr332 e Tyr440. (C) Lys339 interage com Phe73 e Phe76 na alça Ω . (D) Os resíduos Trp82, Glu197 e Ala328 participam da ligação com o substrato, (Fonte: MASSON et al., 2001).

2.4 GENE *BCHE*

ARPAGAUS et al. (1990) obtiveram evidências sobre a existência de um único gene que codifica a BChE humana, bem como, descreveram a estrutura deste gene. O gene *BCHE* (3q26.1-q26.2), localizado no braço longo do cromossomo três tem 64.559 pb até o sítio CA de poliadenilação e é formado por 4 exons com 2.444 pares de bases. Destes, apenas 1.722, o que corresponde a 574 aminoácidos, determinam a estrutura da enzima madura (NCBI, NT_005612).

O exon 1, com 149 pares de bases, contém as sequências não traduzidas, e dois sítios potenciais de início de tradução nos códons -69 e -47. O exon 2, com 1.525 pb, contém 83% da sequência que codifica a proteína madura, incluindo a extremidade N-terminal, o sítio ativo e um possível sítio de início de tradução, no códon -28. O exon 3 contém 167 nucleotídeos, que fazem parte da sequência que codifica a proteína madura. O exon 4, com 603 pares de base, possui as sequências que codificam a extremidade C-terminal da proteína e a região 3' não-traduzida com dois sinais de poliadenilação (Figura 3). Os três introns também foram identificados, totalizando 62.115 pb. O intron 1 tem 6.272 pb, o intron 2 tem 43.205 pb e o intron 3 tem 12.638 pb (NCBI, NT_005612).

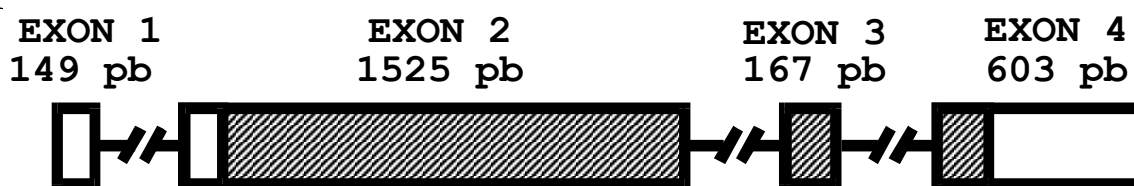


Figura 3. Representação do gene *BCHE* com os quatro exons e seus respectivos números de pares de bases. A região hachurada corresponde à sequência que codifica a proteína madura e a região não hachurada do exon 2 corresponde a sequência que codifica o peptídeo líder.

O mRNA da BChE possui cerca de 40% de bases G+C, proporção semelhante à encontrada para essas bases, no genoma humano total. Porém, quando comparado com o índice de nucleotídeo G+C de genes que codificam proteínas colinérgicas, tais como os receptores muscarínicos e nicotínicos de acetilcolina, em mamíferos e aves, o gene *BCHE* tem um menor conteúdo desses nucleotídeos em relação aos genes dessas outras proteínas (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 mRNA da AChE é mais abundante (LEGAY et al., 1993).

A região promotora e o sítio de início de transcrição do gene *BCHE* foram elucidados por JBILO et al. (1994). Eles analisaram a região regulatória a montante da região codificadora e encontraram o sítio de início de transcrição, localizado 157 pares de bases a montante do sítio de início de tradução, Met⁻²⁸. Os autores também identificaram potenciais elementos regulatórios do sítio promotor, incluindo um sítio de ligação para o fator de transcrição (AP1) e múltiplos sítios para Oct-1 (proteína ligadora de octâmero), PEA-3 (elementos que contêm sequências similares ao sítio de ligação da classe Ets de oncoproteínas) e topoisomerase. As sequências que estão ao redor do sítio de início de transcrição do gene *BCHE* mostraram homologia com elementos iniciadores encontrados em genes sem TATA *box*, que são regulados durante o desenvolvimento. Como o gene *BCHE* humano não apresenta uma sequência consenso TATA *box* e, sabendo que na ausência do TATA *box*, a transcrição tem início em um elemento localizado no sítio de início da transcrição chamado iniciador, os autores sugeriram que, no gene *BCHE*, a ativação do elemento de iniciação pode ocorrer através de um fator AP1, pois o plasmídeo pCB58wI, que não continha o sítio AP1, não apresentou atividade de promotor JBILO et al. (1994).

Existem dois sítios poli A (JBILO et al., 1994) funcionais, sendo provável que um deles determine a forma anfifílica, ainda não encontrada na BChE, mas produzida na AChE por recomposição alternativa. A região 5' não traduzida apresenta uma estrutura em grampo que vai do nucleotídeo +17 até +39, com 9 bases pareadas e 3 bases não pareadas no topo da estrutura. Estudos em eucariotos mostram que esse tipo de estrutura pode modular a tradução (KOZAK et al., 1991).

ARPAGAUS et al. (1991) mostraram que há uma grande identidade entre o gene da BChE humana e o de vários outros mamíferos (macaco, vaca, carneiro, porco, cão, coelho e camundongo). A maior identidade da sequência de aminoácidos foi entre BChE humana e *M. mulatta* (100%) e a menor entre BChE humana e camundongo (91,5%). As sequências em torno do sítio ativo e do sítio aniônico estavam conservadas em todos os animais estudados. NUNES (2007) comparou a região transcrita do gene *BCHE* entre *H.sapiens*, *P. troglodytes*, *M. mulatta*, *F. catus*, *P. tigris*, *C. familiaris*, *E. caballus*, *R. novergicus*, *M. musculus*, e *G. gallus* e observou que os sítios de DNA, que apresentam papel importante para a função da enzima, estavam altamente conservados entre as espécies analisadas e sítios que condicionam aminoácidos da superfície da enzima, estavam pouco conservados. A autora observou também que a região codificadora da proteína madura do gene *BCHE* mostrou estar bem conservada entre as espécies.

2.5 VARIABILIDADE GENÉTICA

A variação genética da BChE é condicionada por alelos de dois locos: *BCHE* e *CHE2*.

2.5.1 Loco *CHE2*

HARRIS et al. (1962; 1963), usando eletroforese bidimensional em papel e gel de amido, verificaram a presença de algumas das variadas formas moleculares da BChE. Além das bandas C₁, C₂, C₃ e C₄, foi observada uma banda extra, denominada C₅, em 14 dos 300 indivíduos analisados, representando 4,6% da amostra. A banda C₅ é determinada, tanto pelo loco *BCHE*, como pelo loco *CHE2* (2q33-35; EIBERG et al., 1989) e apresenta dois alelos *CHE2**C₅⁺ e *CHE2**C₅⁻ responsáveis, respectivamente, pela presença e ausência da banda C₅.

HARRIS (1970) relata que os indivíduos *CHE2**C₅⁺ têm atividade média da BChE cerca de 25,0% superior a dos *CHE2**C₅⁻. SUGIMORI (1986) mostrou que nos indivíduos *CHE2**C₅⁺ há menor duração da ação da succinilcolina que nos indivíduos

*CHE2***C5*–, que seriam mais sensíveis a esta droga. CHAUTARD-FREIRE-MAIA et al. (1991) encontraram o fenótipo *CHE2* *C5*+ em amostra da população de Curitiba, com frequência de 10,3%.

A natureza molecular da banda *C5* não foi completamente elucidada. SCOTT e POWERS (1974) sugerem que a banda *C5* seria um híbrido, formado da associação entre BChE e uma substância desconhecida codificada pelo loco *CHE2*.

A associação do tetrâmero da butirilcolinesterase a uma proteína foi proposta por MASSON (1991), para explicar a formação da banda *C5*. Como a massa molecular dessa banda (400kDa) é 60kDa maior que a massa molecular de G4 (340kDa), esta diferença pode ser atribuída a essa proteína. Apesar dos resultados obtidos por MASSON (1991) não permitirem identificar a substância codificada pelo loco *CHE2*, varias proteínas candidatas puderam ser descartadas.

2.5.2 Gene *BCHE*

O uso de succinilcolina, durante a década de 50, como relaxante muscular pré-operatório, possibilitou a descoberta da primeira variante do gene *BCHE*, denominada de atípica. Alguns pacientes, quando submetidos a esse relaxante muscular, apresentavam paralisia muscular e apnéia respiratória prolongadas. Essa resposta exagerada deve-se à presença de uma enzima não-usual, que apresenta uma menor eficiência, quando comparada à usual, na hidrólise da succinilcolina, em doses fisiológicas.

KALOW e STARON (1957), através de inibição enzimática, puderam identificar alguns alelos do gene *BCHE* e posteriormente, o sequenciamento do gene *BCHE* (ARPAGAUS et al., 1990) possibilitou a análise do DNA, o que vem permitindo a identificação de muitas outras variantes do gene *BCHE*.

Os diversos alelos já identificados indicam a grande heterogeneidade molecular do gene *BCHE*. Alguns alelos são evidenciados por fenotipagem, com o uso de inibidores diferenciais, como o determinante da variante atípica, com menor afinidade por ésteres de colina, e resultante de mutação de GAT para GGT, levando à substituição de ácido aspártico por glicina, na posição do aminoácido 70 (MCGUIRE et al.,1989). Diversas variantes podem apresentar o fenótipo silencioso, por terem

atividade enzimática inferior a 10% em relação à enzima usual. Existem, também, polimorfismos descritos fora da região codificadora da enzima madura, como as variantes no sítio -116 no exon 1, (-116; TGC>TAC; BARTELS et al., 1990). A variante *K* (1615; GCA>ACA), também chamada 539T ocorre no exon 4 e encontra-se em desequilíbrio de ligação com a variante *-116A*, no exon 1, (BARTELS et al., 1990), estas variantes são encontradas em maior frequência em amostras de atividade baixa da BChE (FURTADO-ALLE et al., 2008). As mutações do gene *BCHE* já identificadas são apresentadas na tabela 1.

Tabela 1 - Lista de variantes descritas, até o ano de 2008, do gene *BCHE* incluindo a alteração de nucleotídeo e o nome do alelo.

Alteração de nucleotídeo	Nome ^a	Referência
Exon 1		
-116; G→A		BARTELS et al., 1990
Exon 2		
9-11; CATCAT→CAT	<i>I4del</i>	MAEKAWA et al., 1997
16; ATT→TT	<i>I6fs</i>	BARTELS et al., 1992b; PRIMO-PARMO et al., 1996
35; AAA→AGA	<i>K12R</i>	MIKAMI et al, 2008
45; GGG→GGC	<i>G15G</i>	MIKAMI et al, 2008
71; ACG→ATG	<i>T24M</i>	MAEKAWA et al., 1997
82; TTT→ATT	<i>F28I</i>	YEN et al., 2003
98; TAT→TGT	<i>Y33C</i>	PRIMO-PARMO et al., 1996
109; CCT→TCT	<i>P37S</i>	PRIMO-PARMO et al., 1996
208; GAT→CAT	<i>D70H</i>	BOECK et al., 2002
209; GAT→GGT	<i>D70G (A)</i>	MCGUIRE et al., 1989
223; GGC→CGC	<i>G75R</i>	SOUZA et al., 2005b
270; GAA→GAC	<i>E90D</i>	SOUZA et al., 2005b
286; AAT→TAT	<i>N96Y</i>	YEN et al., 2003
297; ATT→ATG	<i>I99M</i>	SOUZA et al., 2005B
298; CCA→TCA	<i>P100S</i>	MAEKAWA et al.; TAKAGI et al.; LU et al., 1997
318; AAT→AAAT	<i>N106fs</i>	YEN et al., 2003; ON-KEI CHAN et al., 2005
344; GGT→GAT	<i>G115D</i>	PRIMO-PARMO et al., 1997
351; GGT→GGAG	<i>G117fs</i>	NOGUEIRA et al., 1990
355; CAA→TAA	<i>Q119X</i>	SUDO et al., 1996
375; TTA→TTT	<i>L125F</i>	PRIMO-PARMO et al., 1996

continua

Alteração de nucleotídeo	Nome ^a	Referência
383; TAT→TGT	<i>Y128C</i>	HIDAKA et al., 1997 ^a
424; GTG→ATG	<i>V142M (H)</i>	JENSEN et al., 1992
486; GCT→GCC	<i>A162A</i>	SOUZA et al., 2005b
510; GAT→GAG	<i>D170E</i>	PRIMO-PARMO et al., 1996
514; CAG→TAG	<i>Q172X</i>	GÄTKE et al., 2001
551; GCC→GTC	<i>A184V (SC)</i>	GREENBERG et al., 1995
592; AGT→GGT	<i>S198G</i>	PRIMO-PARMO et al., 1996
596; GCA→GTA	<i>A199V</i>	SAKAMOTO et al., 1998
601; GCA→ACA	<i>A201T</i>	PRIMO-PARMO et al., 1996
607; TCA→CCA	<i>S203P</i>	HIDAKA et al., 2001
728; ACG→ATG	<i>T243M (F-1)</i>	NOGUEIRA et al., 1992
748; ACT→CCT	<i>T250P</i>	MAEKAWA et al., 1995
765; GAG→GAC	<i>E255D</i>	PRIMO-PARMO et al., 1996
800; AAA→AGA	<i>K267R</i>	MAEKAWA et al., 1997
811; GAA→TAA	<i>E271X</i>	PRIMO-PARMO et al., 1996
880; GTG→ATG	<i>V294M</i>	MIKAMI et al., 2008
943; ACC→AACC	<i>T315fs</i>	HIDAKA et al., 1992
943; ACC→TCC	<i>T315S</i>	LIU et al., 2002
988; TTA→ATA	<i>L330I</i>	SUDO et al., 1997
997; GGT→TGT	<i>G333C</i>	MIKAMI et al., 2008
1062 - 1076	<i>K355insALU</i>	MURATANI et al., 1991; MAEKAWA et al., 2004
1093; GGA→CGA	<i>G365R</i>	HIDAKA et al., 1992; HADA et al., 1992
1156; CGT→TGT	<i>R386C</i>	YEN et al., 2003
1169; GGT→GTT	<i>G390V (F-2)</i>	NOGUEIRA et al., 1992
1200; TGC→TGA	<i>C400X</i>	HIDAKA et al., 1997b
1253; TTC→TCC	<i>F418S</i>	MAEKAWA et al., 1995
1270; CGA→TGA	<i>R424X</i>	YEN et al., 2003
1273; TCC→CCC	<i>S425P</i>	GNATT et al., 1990
1294; GAA→TAA	<i>E432X</i>	LEVANO et al., 2005
1303; GGA→AGA	<i>G435R</i>	DEY et al., 1997
1336; TTT→GTT	<i>F446V</i>	DEY et al., 1998
1351; GAA→TAA	<i>E451X</i>	DEY et al., 1998
1378; GAG→AAG	<i>E460K</i>	YEN et al., 2003
1393; AGA→TGA	<i>R465X</i>	MAEKAWA et al., 1995
1408; CGG→TGG	<i>R470W</i>	MIKAMI et al., 2008
1411; TGG→CGG	<i>W471R</i>	PRIMO-PARMO et al., 1996
1420; TTT→CTT	<i>F474RL</i>	ON-KEI CHAN et al., 2005
Intron 2		
IVS2-8T→G		PRIMO-PARMO et al., 1996
Exon 3		
1490; GAA→GTA	<i>E497V (J)</i>	BARTELS et al., 1992 ^a
1500; TAT→TAA	<i>Y500X</i>	BARTELS et al., 1992b; PRIMO-PARMO et al., 1996
1543; CGT→TGT	<i>R515C</i>	MAEKAWA et al., 1995

continua

Alteração de nucleotídeo	Nome ^a	Referência
1553; CAA→CTA	<i>Q518L</i>	PRIMO-PARMO et al., 1996
Exon 4		
1615; GCA→ACA	<i>A539T (K)</i>	BARTELS et al., 1992b
1914 A→G		BARTELS et al., 1990

^a: nome comum entre parênteses

Fonte: Souza et al. (2005b), com atualizações.

2.6 BChE E SUAS RELAÇÕES COM LÍPIDES, PESO, IMC E OBESIDADE

A butirilcolinesterase é uma enzima cuja função natural permanece pouco conhecida, contudo, vários trabalhos apontam sua relação com o metabolismo dos lípidos e lipoproteínas, peso, índice de massa corporal (IMC) e obesidade.

A presença da BChE em LDL (lipoproteína de densidade baixa) foi relatada pelos autores Lawrence e Melnick (1961), Kutty et al. (1977), Ryhänen et al. (1982) e HDL (lipoproteína de densidade alta) por Ryhänen et al. (1982). Correlações positivas entre o níveis de colesterol e da atividade da BChE (CUCUIANU et al. 1968), bem como entre níveis da apolipoproteína B e da atividade da BChE (ALCÂNTARA et al. 1995) já foram mostradas.

A associação entre a forma heteróloga da BChE (*C₅*) e peso foi evidenciada por CHAUTARD-FREIRE-MAIA et al. (1991) e com índice de massa corporal (IMC) por ALCÂNTARA et al. (2001), que observaram, respectivamente, que indivíduos do fenótipo CHE2 *C₅*+ apresentam em média, peso e IMC significativamente menores quando comparados a seus controles CHE2 *C₅*-. Existem também trabalhos indicando a influência do próprio loco *BCHE* no peso e IMC mostrando que a variância de peso e IMC é maior nos heterozigotos *1615GA* do que nos seus controles *1615GG*, e que a presença da variação *-116A* é necessária no genótipo *1615GA* para que a variância do peso e do IMC sejam maiores do que em controles *1615GG* (SOUZA et al., 2005a e FURTADO-ALLE et al., 2008).

Com relação à obesidade, ALCÂNTARA (2000) mostrou a ocorrência significativamente mais alta de bandas eletroforéticas extras da BChE em obesos

(1,1% ± 0,8%) do que na população geral de Curitiba (0,25% ± 0,14%). ALCÂNTARA et al. (2003) investigaram a associação da BChE e IMC em indivíduos obesos e não obesos. Nos indivíduos de fenótipo CHE2 C5-, verificaram que a atividade média da BChE é significativamente maior em obesos, quando comparados com seus controles de peso normal. Neste mesmo trabalho, os autores sugerem que o alelo *CHE2**C5+ poderia predispor a uma maior facilidade para perder peso, isso porque observaram uma frequência significativamente maior de pacientes que perderam peso no grupo de fenótipo CHE2 C5+ do que no grupo de fenótipo CHE2 C5-. FURTADO-ALLE et al. (2008) observaram que obesos com genótipo *-116AG/1615GA* apresentaram menor atividade da BChE que obesos com genótipo *-116GG/1615GA*, como a variante *1615* sozinha não está associada a baixa atividade da BChE, a presença do alelo *-116A* parece ser necessária para a queda da atividade enzimática, provavelmente por afetar a transcrição ou tradução do gene *BCHE*.

2.7 GENE *RAPH1*

A sequência do gene *RAPH1* (*Ras association (RalGDS/AF-6) and pleckstrin homology domains 1*) foi identificada (NAGASE et al., 2000) em um projeto desenvolvido para sequenciar cDNA humano de genes não identificados, obtidos de amostras do cérebro e hipocampo. Os autores obtiveram o sequenciamento completo de 100 cDNAs, dentre estas sequências estava a do gene *RAPH1*, cuja localização foi determinada no cromossomo 2. Além disso, os autores observaram que o produto do gene *RAPH1*, nomeado como KIAA1681, apresentava 1236 aminoácidos e 33% de identidade com a sequência da proteína Grb10 de camundongo. EPPERT et al. (2005) refinaram a localização do gene *RAPH1* como 2q33 (Figura 4) e também observaram homologia com as proteínas humanas Grb7, Grb10 e Grb14 (29% a 35% de identidade), levando os autores a sugerir um possível papel desta proteína na migração e sinalização celular. Existem 39 espécies de vertebrados, disponíveis no banco de dados do Ensembl, que possuem sequências ortólogas a do gene *RAPH1*, sendo o maior valor de identidade observado entre *Homo sapiens* e *Pongo pygmaeus* de 98% (Ensembl, acessado em 09/02/2011).

O gene *RAPH1* é constituído por 17 exons (EPPERT et al., 2005). O exon 1 e parte do exon 17 contêm sequências não traduzidas (Figura 5). O exon 17 possui 7.734 pares de bases (pb), mas apenas 1.977pb, o que corresponde a 659 aminoácidos fazem parte da proteína madura.

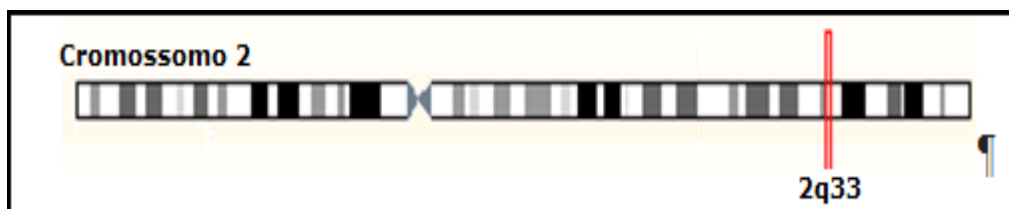


Figura 4. Representação do cromossomo 2 e a correspondente posição do gene *RAPH1* em 2q33. (Fonte: Ensembl, acessado em 09/02/2011).



Figura 5. Representação esquemática do gene *RAPH1* com seus 17 exons. A região hachurada corresponde à sequência não traduzida (Fonte: EPPERT et al., 2005).

2.8 PRODUTO DO GENE *RAPH1*

KRAUSE et al. (2004) nomearam o produto do gene *RAPH1* como Lamelipodina (Lpd), pois seus resultados apontaram a presença desta proteína em bordas de protrusões do citoesqueleto (lamelipodia). Além disso, neste mesmo trabalho, análises em *western blot* determinaram uma massa molecular de aproximadamente 200KDa para a proteína total. Os autores ainda observaram quatro recomposições alternativas do transcrito do gene *RAPH1*, gerando sequências de mRNA com respectivamente 2 Kb, 2,2 Kb, 5 Kb e 9 Kb. As formas alternativas de 2 Kb, 5 Kb e 9 Kb foram observadas sendo altamente expressas no cérebro, ovário e embriões, já a forma alternativa de 2,2Kb foi identificada em amostras de embriões, ovário e fígado.

EPPERT et al. (2005) observaram a existência de proteínas variantes originadas do processo de recomposição alternativa do transcrito do gene *RAPH1*. Devido à observada expressão reduzida em osteossarcoma humano, o autor denominou de gene *RMO1* (*reduced expression in metastatic osteossarcoma*) à sequência correspondente ao gene *RAPH1* e proteína RMO1 ao produto deste gene. Nove isoformas, (Figura 6a) derivadas de recomposição alternativa foram observadas por EPPERT et al. (2005), elas variam de 592 a até 1250 aminoácidos. No meio da região codificadora do gene *RAPH1* foram observados dois sítios de recomposição alternativa, localizados nos nucleotídeos 957 e 1035, exons 5 e 6 respectivamente. Análises de RT-PCR, da região contendo os exons 5 e 6, indicam que as formas mais comuns dos transcritos alternativos não possui os exons 5 e 6 (Figura 6b). O exon 15 contém um sítio de recomposição alternativa 15 pares de base a jusante do códon de término que, quando utilizado, pode levar à união do exon 15 ao exon 16 ou 17, como observado na figura 5. A remoção de parte da sequência do exon 16, que codifica 5 aminoácidos, parte da região que codifica a extremidade C-terminal da proteína, gera uma proteína truncada chamada pelo autor de variante *RMO1c*.

Segundo o banco de dados do Ensembl, a recomposição alternativa do transcrito do *RAPH1* gera 17 isoformas que variam de 89 a 1302 aminoácidos e possuem respectivamente 4 e 15 exons (Ensembl, acessado em 09/02/2011).

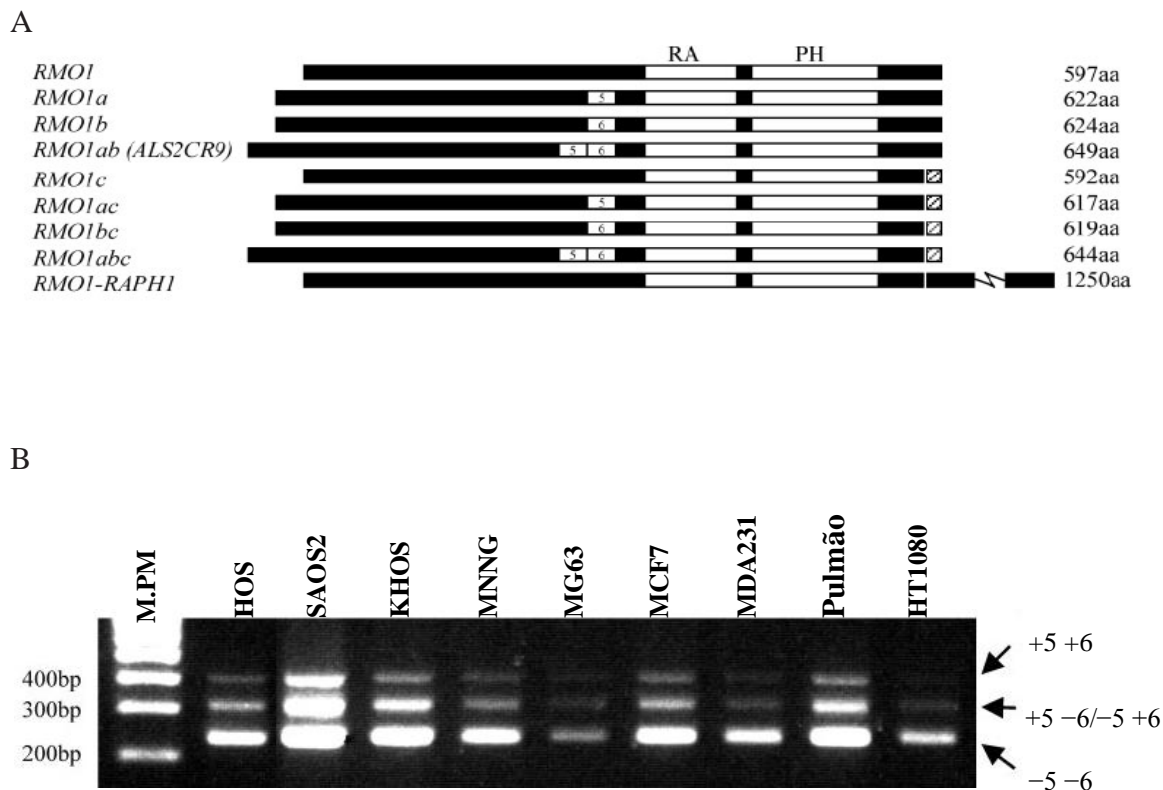


Figura 6. (A), 9 isoformas resultantes do processo de recomposição alternativa do transcrito do gene *RAPH1*. A remoção de 5 aminoácidos codificados pelo exon 16, parte da região C-terminal, está representada na porção final das quatro variantes: *RMO1c*, *RMO1ac*, *RMO1bc* e *RMO1abc*, como um quadrado hachurado. A sequência *ALS2CR9* e a forma alternativa *RMOc* compartilham sequências idênticas. A sequência do gene *RAPH1* corresponde à que gera a variante chamada de *RMO1-RAPH1*. (B), produtos de RT-PCR da região que contém os sítios de recomposições alternativas nos exons 5 e 6, em amostras de linhagens celulares de osteossarcoma (HOS, SAOS2, KHOS, MNNG, MG63) câncer de mama (MCF7, MDA231), pulmão e fibrossarcoma (HT1080). A banda superior representa o produto da PCR que contém ambos os exons (398 pb). A banda de posição mediana representa produtos da PCR que apresentam apenas um dos exons, considerando que o produto da PCR dos exons 5 e 6 apresentam tamanhos similares e portanto, aparecem como apenas uma banda no gel. A banda inferior representa produtos que não possuem os exons 5 e 6 (Fonte: EPPERT et al. (2005)).

2.8.1 Domínios Estruturais

A lamelipodina apresenta, em sua região N-terminal, um motivo *coiled coil* do aminoácido 242 até 267 (NCBI_NM 2135891), este motivo é formado por duas ou três alfas hélices e ocorre em proteínas estruturais ou motoras. Em seguida, a região N-terminal apresenta um domínio RA (*Ras association - RalGDS/AF-6*) envolvendo os aminoácidos 261 a 354. Os domínios RA são conhecidos por terem diferentes especificidades para GTPases (VICIANA et al., 2004) porém não se sabe ao certo qual GTPase está fisiologicamente associada com a Lpd e como esta ligação afeta suas atividades celulares (LEGG e MACHESKY, 2004). Possui também um domínio PH (*Pleckstrin homology domain*) do aminoácido 397 ao 505 que se liga especificamente ao fosfolípido componente da membrana plasmática PI(3,4)P₂, que é produzido pela defosforilação de PI(3,4,5)P₃. Este domínio corresponde a uma sequência presente em proteínas relacionadas com sinalização intracelular ou constituintes do citoesqueleto (KRAUSE et al., 2006).

A porção C-terminal da proteína é uma região rica em prolina e abriga 8 potenciais sítios de ligação para proteínas que apresentem domínio SH3, 3 sítios potenciais de ligação para a proteína profilina que é um ligante de monômeros de actina e seis sítios, agrupados em quatro grupos, de ligação para proteínas que apresentam o domínio FPPPP, chamado EVH1 (KRAUSE et al., 2004), (Figura 7).


```

MEQLSDEEID HGAEEDSDKE DQDLDKMFGA WLGE LDKLTQ SLDS DKPMEP 50
VKRSPLRQET NMANFSYRFS IYNLNEALNQ GETVDLDALM ADLCSIEQEL 100
SSIGSGNSKR QITETKATQK LPVSRHTLKH GTLKGLSSSS NRIAKPSHAS 150
YSLDDVTAQL EQASLSMDEA AQQSVLEDTK PLVTNQHRRT ASAGTVSDAE 200
VHSISNSSHS SITSAASSMD SLDIDKVTRP QELDLTHQGG PITEEQAAK 250
LKAEKIRVAL EKIKEAQVKK LVIRVHMSDD SSKTMMVDER QTVRQVLDNI 300
MDKSHCGYSL DWSLVETVSE LQMERIFEDH ENLVENLLNW TRDSQNKLIH 350
MERIEKYALF KNPQNYLLGK KETAEMADRN KEVLLEECFC GSSVTVPEIH 400
GVLWLKDDGK KSWKKRYFLI RASGIYYVPK GKAKVSRDLV CFLQLDHVNV 450
YYGQDYRNKY KAPT DYCLVL KHPQIQKKSQ YIKYLCDDV RTLHQWVNGI 500
RIAKY GKQLY MNYQEALKRT ESAYDWTSL SSSIKSGSSS SSIPESQSNH 550
SNQSDSGVSD TQPAGHVRSQ SIVSSVFSEA WKRGTQLEES SKARMESMNR 600
PYTSLVPPLS PPKIVTPYT ASQ PSPPPLPP PPPPPPPPPP PPPPPPPLP 650
SQSAPSAGSA APMFVKYSTI TRLQNASQHS GALF KPPTPE VMQSQSVKQP 700
ILVPPNGVVP PPPPPPPPPT PGSAMAQLKP APCAPSLPQF SA PPDPLI IH 750
QVQHITQVAP PTPPPPPIIP APLP PPQAPK PLVTIPAPTS TKT VAPVVTQ 800
AAPPTPTP EV PEAK KQPAFP ASYIPSPPT PPVPVPPPTL PKQSFCA KI 850
PPSE LSPVPS VVKQIASQFP PPPTPPAMES QPLKVPANV APQSPPAVKA 900
KPKWQPSSIP VPSP DFPPPP PESSLVFPPP PPSPVPA PPP PPPPTASPTP 950
DKSGSPGKKT SKTSSPGG KK PPPTPE QRNSS IKSSSGAHP PKRPSVDSL 1000
VSKFTPPAES GSPSKETLPP PAAPK PGKL NLSGVNLPGV QQGCVSACA 1050
PVLSGRGKDS VVE FFSPSPSD SDFPPPPPET ELPLPPIE IP VFSGNTSPK 1100
VAVVNPQPQQ WSKMSVKKAP PPTRPKRNDS TRLTQAEISE PTMATVVPQ 1150
VPTSPKSSLS VQPGFLADLN RTLQRKSITR HGSLSRMSR EPTATMDDM 1200
ALPPPPPELL SDQQKAGYGG SHISGYATLR RGF PPAPK R QNTKLSRDW 1250

```

Figura 7. Sequência de aminoácidos da proteína Lamelipodina, também, chamada proteína RMO1. Estão representadas: a sequência que origina o motivo *coiled coil* (sequência sublinhada e negritada), o domínio RA (azul), o domínio PH (verde), 8 sítios de ligação para proteínas com domínio SH3 (vermelho), 3 sítios de ligação para proteína Profilina (amarelo) e quatro grupos de ligação para proteínas com domínio EVH1 (cinza). Fonte: KRAUSE et al. (2004).

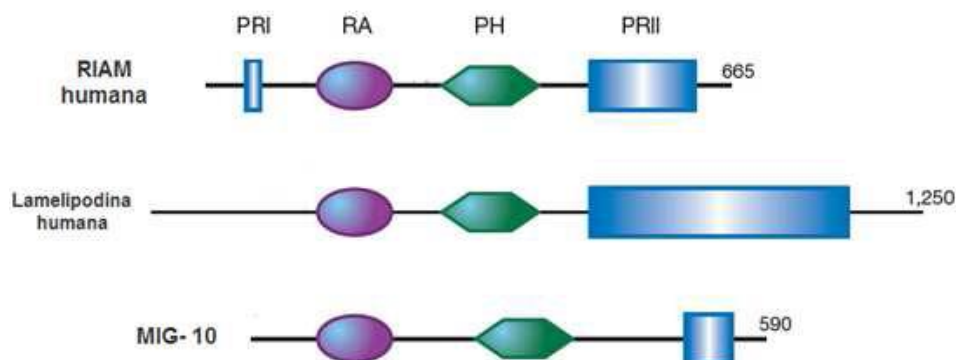
Diversos organismos apresentam proteínas homólogas à produzida pelo gene *RAPH1*. Durante suas análises KRAUSE et al. (2004) observaram que o produto do gene *RAPH1*, chamado pelos autores de proteína Lamelipodina (Lpd), apresentava similaridade com uma proteína humana chamada RIAM (*Rap1 interacting adaptor molecule*), que estimula a polimerização de actina e a formação de lamelipódios. Ambas proteínas compartilham domínios RA e PH conservados e possuem domínio SH3, sítios de ligação para Profilina e para proteínas com domínio EVH1. A região C-terminal apresenta 23,2% de identidade entre seus aminoácidos, porém a sequência da

Lpd é 500 aminoácidos maior que a observada em RIAM. A região N-terminal destas proteínas apresentam 29,1% de identidade entre os aminoácidos. As regiões RA e PH apresentam uma alta homologia com as proteínas humanas Grb7, Grb10 e Grb14 (EPPERT et al., 2005).

O genoma de *C. elegans* codifica uma única molécula homóloga a Lpd e RIAM de mamíferos, a proteína MIG-10, que está relacionada com orientação e crescimento de neurônios (CHANG et al. 2006). Uma única proteína, chamada Pico (CG11940), semelhante a Lpd, RIAM e MIG-10, é produzida em *Drosophila*, e mostrou-se essencial para a proliferação celular e crescimento dos tecidos e do organismo de forma geral LYULCHEVA et al. (2008).

KRAUSE et al. (2004) propuseram que a Lpd, RIAM e MIG-10 pertencem a uma mesma família proteica, chamada MRL (MIG-10, RIAM e Pico), caracterizada por possuir os domínios PH (*pleckstrin homology*), RA (*Ras-association*) além de polipeptídeos rico em prolina na região C-terminal (Figura 8).

A



B

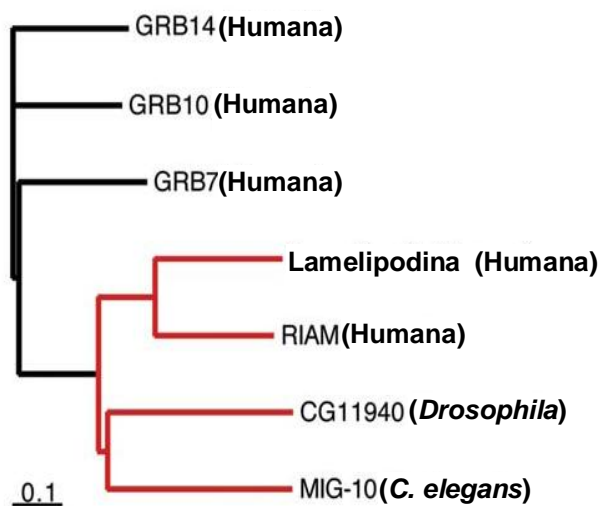


Figura 8. A) Representação dos domínios conservados na família de proteínas MRL. PRI e PRII são domínios ricos em prolina; RA é o domínio *Ras – association*; PH é o domínio *Pleckstrin homolog* (Fonte: LEGG e MACHESKY 2004), B) Dendrograma mostrando as relações evolutivas de proteínas homólogas entre *C. elegans*, *Drosophila* e humanos. A escala, no canto inferior, corresponde a 10% de eventos de substituição (Fonte: CHANG et al. 2006).

2.9 FUNÇÕES DA LAMELIPODINA

2.9.1 Lamelipodina e o Recrutamento de Proteínas Ena/VASP

KRAUSE et al. (2004) identificaram a lamelipodina como ligante de domínios EVH1 em proteínas Ena/VASP. O autor observou que a lamelipodina contém sítios de ligação de alta afinidade para tais domínios ocorrendo na porção C-terminal da proteína, região rica em prolina e que abriga quatro grupos de sítios de ligação EVH1.

2.9.1.1 Proteínas Ena/VASP

Em vertebrados as proteínas Ena/VASP consistem de três famílias: VASP (*vasodilator stimulated phosphoprotein*), Mena (*mammalian enabled*), e EVL (*Ena VASP like*). Todas as proteínas que fazem parte do grupo Ena/VASP possuem estruturas domínios, regiões bem definidas dentro da proteína, muito conservadas: um domínio homologo 1 Ena/VASP na região amino terminal (EVH1), seguido por uma região central rica em prolina e um domínio homologo 2 Ena/VASP (EVH2) na região carboxi terminal (revisão em KRAUSE et al., 2003).

O domínio EVH2 das proteínas Ena/VASP contém sítios de ligação para G-actina (proteína globular) e F-actina (polímeros de G-actina), além de um motivo *coiled-coil* que medeia a tetramerização de proteínas Ena/VASP. A região central rica em prolina contém sítios de ligação para Profilina, uma proteína que se liga a monômeros de actina, e sítios de ligação para proteínas que possuem domínios SH3 e WW, conhecidos pela habilidade de se ligar a sequências ricas em prolina (revisão em KRAUSE et al., 2003). O domínio EVH1 nas proteínas Ena/VASP confere ligação com proteínas que contêm um específico motivo rico em prolina (D/E)(F/L/W/Y)PPPPX(D/E)(D/E) abreviado como FPPPP, onde X representa qualquer aminoácido (NIEBUHR et al., 1997). Diversas proteínas possuem este motivo rico em prolina, que serve de mediador para o recrutamento de proteínas Ena/VASP para sítios celulares específicos e complexos receptores de membrana (PULA e KRAUSE, 2008).

A função sugerida por KRAUSE et al. (2002) para as proteínas Ena/VASP é a de se ligar a, ou, próximo a extremidade final dos filamentos de actina protegendo-os de serem cobertos por outras proteínas, o que permite o alongamento dos filamentos de actina. Como as proteínas Ena/VASP estão atuando diretamente na regulação da ultra-estrutura da actina, elas estão envolvidas em atividades celulares cruciais como: mudança na forma da célula, adesão celular, migração e interações célula-célula (revisão em KRAUSE et al., 2003).

2.9.1.2 Lamelipodina ligante de domínios EVH1 de proteínas Ena/VASP

Através do rastreamento em bancos de dados por proteínas que abrigavam o motivo FPPPP, o qual confere ligação com domínios EVH1 (NIEBURHR et al., 1997) de proteínas Ena/VASP, KRAUSE et al. (2004) identificaram o produto do gene *RAPH1* (NAGASE et al., 2000). Muitas proteínas foram identificadas a princípio, porém esta proteína foi selecionada depois de passar por caracterizações adicionais baseadas na presença de um domínio PH (*Pleckstrin homology domain*), o que aumenta a possibilidade da proteína selecionada estar localizada na membrana plasmática. Além disso, ela também foi identificada como ortóloga ao gene *MIG-10* de *C.elegans*, um gene identificado em um rastreamento para defeitos na migração celular neuronal. Após a identificação, os autores nomearam o produto do gene *RAPH1*, a proteína KIAA1681, como Lamelipodina (Lpd), devido ao fato de seus resultados mostrarem que a proteína Lpd se localiza na borda de protrusão do citoesqueleto (lamelipodia) e projeções afiladas do citoesqueleto (filopodia).

A localização celular da Lamelipodina foi verificada por KRAUSE et al. (2004) através do uso de anticorpos anti-Lpd em cultura celular de fibroblastos humanos e de camundongo e em células neuronais de murinos. Os autores observaram que a Lpd encontrava-se concentrada nas bordas de filopodias e lamelipodias e estava colocalizada com proteínas Ena/VASP (Figura 9).

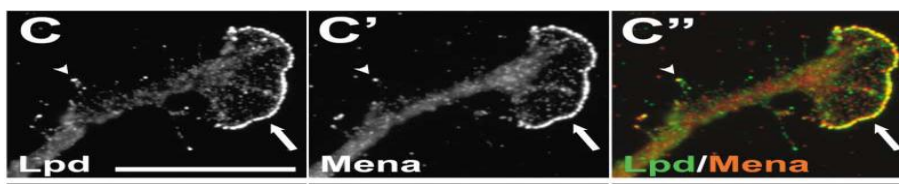


Figura 9. Células neuronais de murinos coradas para a observação da Lamelipodina (C), de proteínas Mena (C') e a Lpd colocalizada com proteínas Mena (C'') em bordas de filopodias (cabeça da seta) e lamelipodias (seta). Fonte: KRAUSE et al. (2004).

Para determinar a região da Lpd requerida para sua localização nas bordas de lamelipodias e filopodias, KRAUSE et al. (2004) construíram uma proteína contendo apenas a região N-terminal da Lpd e os domínios RA e PH que foi então expressa em células de fibroblastos de camundongo. Esta proteína construída continuou sendo encontrada nas bordas das protrusões e projeções da membrana plasmática. Um fragmento contendo apenas os domínios RA e PH também foi testado e resultados semelhantes foram obtidos, sugerindo que os domínios RA e PH juntos são suficientes para que Lpd se localize na borda de estruturas lamelipodiais e filopodiais. Os autores observaram ainda que o domínio PH da Lpd ligava-se especificamente ao fosfolípido componente da membrana plasmática PI(3,4)P₂. A ativação de PI3 quinase e SHIP (*Src homology 2 domain-containing inositol 5*) cataliza a degradação de PI(3,4,5)P₃ para PI(3,4)P₂. Os autores sugeriram que a Lpd, como ligante de PI(3,4)P₂ e de proteínas Ena/VASP, fornece uma ligação entre vias de sinalização e a remodelagem do citoesqueleto.

Em fibroblastos de camundongo estimulados a uma expressão elevada de Lpd, KRAUSE et al. (2004) observaram a formação significativamente mais rápida de protrusões lamelipodiais que o observado para estas células em condições normais de expressão. Para testar se o fenótipo observado sob elevada expressão da Lpd é dependente de proteínas Ena/VASP, os autores neutralizaram a função Ena/VASP nas células com expressão elevada de Lpd e em células controles de expressão normal. As

proteínas Ena/VASP foram retiradas de sua localização intracelular normal e foram recrutadas artificialmente para a mitocôndria. Os autores observaram, em células onde a função Ena/VASP foi neutralizada e a expressão da Lpd era elevada, uma significativa redução na velocidade de formação das protrusões lamelipodiais, sugerindo que a Lpd possa estar envolvida na dinâmica do citoesqueleto através das proteínas ENA/VASP, já que o efeito da expressão elevada de Lpd, formando protrusões lamelipodiais significativamente mais rápidas, pode ser reprimida ao se bloquear a função das proteínas Ena/VASP.

Os resultados de KRAUSE et al. (2004) sugerem que a principal função da Lpd é o recrutamento de proteínas Ena/VASP, através de interações entre o domínio EVH1 e o motivo FPPPP da Lpd para a borda da célula. Este evento deve ser precisamente regulado para a formação controlada de protrusões lamelipodiais e projeções filopodiais da membrana, componentes essenciais para a motilidade celular, para a organização de domínios na membrana, para a fagocitose e para o desenvolvimento de substrato de aderência (SMALL et al., 2002).

MICHAEL et al. (2010) mostraram em seu trabalho que o recrutamento eficiente de proteínas Ena/VASP pela Lpd para a borda da célula requer a presença de tirosina cinase c-Abl. Os autores observaram que a Lpd é substrato da família de enzimas tirosina cinase c-Abl e possui 3 principais sítios de fosforilação: 2 presentes no domínio PH e 1 na região C-terminal. A interação entre Lpd e proteínas Ena/VASP mostrou ser positivamente regulada pela enzima tirosina cinase c-Abl que, apesar de não fosforilar diretamente na Lpd os sítios que se ligam às proteínas Ena/VASP, teria este efeito pois a fosforilação poderia alterar a estrutura terciária da Lpd, deixando os sítios de ligação a proteínas Ena/VASP expostos.

2.9.2 Lamelipodina e a Morfogênese dos Axônios

O desenvolvimento das redes de conexões entre os neurônios se forma em resposta à sinalização de orientação extracelular para o crescimento do axônio, dentro

de cones de crescimento especializados, que formam as projeções do axônio, onde F-actina e microtubulos se acumulam (QUINN et al., 2008).

CHANG et al. (2006) mostraram que a proteína MIG-10 (ortóloga da Lamelipodina) e Unc-34 (homóloga de proteínas Ena/VASP) cooperam para guiar o crescimento do axônio em direção a Unc-6/*netrin* e para longe de STL-1/*slit*, ambas proteínas extracelulares. QUINN et al. (2006) obtiveram resultados que indicam que MIG-10/RIAM/lamelipodina funcionam a jusante das moléculas UNC-6/*netrin* e SLT-1/*slit* guiando o crescimento do axônio. A super expressão de MIG-10 em neurônios AVM (neurônios mecanosensoriais) de *C. elegans*, na ausência das proteínas de sinalização UNC-6/*netrin* e STL-1/*slit*, causou o crescimento de múltiplos processos mal orientados e a adição destas proteínas sinalizadoras resultou na formação de um único processo.

MICHAEL et al. (2010) obteve resultados que indicam que em vertebrados o processo de morfogênese do axônio ocorre através da cooperação da Lpd e proteínas Ena/VASP e funciona, assim como em *C. elegans*, a jusante de uma proteína de sinalização para orientação do axônio. Além disso, os autores observaram que sinalização dessa proteína induz a fosforilação temporária da Lpd, pela tirosina cinase c-Abl, levando a um aumento na interação Lpd-MENA

2.9.3 Lamelipodina e Proliferação Celular

LYULCHEVA et al. (2008) mostraram que a proteína Pico, e a proteína Lamelipodina, têm um papel conservado na regulação da proliferação celular. Os autores observaram que a redução da expressão da proteína Pico ou da proteína Lpd resulta na redução das taxas de divisão celular, retardo no crescimento e letalidade, enquanto a super expressão de Pico promoveu o crescimento excessivo de tecido. A ação da proteína Pico parece ser dependente da atividade normal do receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR), pois quando este se apresentava comprometido a proteína Pico não promoveu crescimento e proliferação celular.

LYULCHEVA et al. (2008) obtiveram evidências de que as proteínas Lpd e Pico exercem seu efeito mitogênico pois, as mudanças na dinâmica da actina induzidas pela

interação entre as proteínas Lpd e Pico com proteínas Ena/VASP, podem ativar uma resposta do fator de transcrição SRF (*serum response factor*) que está envolvido no crescimento de tecidos, sugerindo um papel conservado para as proteínas MRL envolvido na via de crescimento de tecidos e proliferação celular.

2.10 GENE *RAPH1* E CÂNCER

EPPERT et al. (2005) analisaram a expressão de aproximadamente 950 genes, com a intenção de selecionar aqueles que apresentassem um padrão diferencial de expressão entre osteossarcomas primários e metastáticos. O gene *RAPH1*, chamado pelo autor de *RMO1* (*reduced expression in metastatic osteosarcoma*), foi selecionado, baseado na baixa expressão em amostras metastáticas quando comparadas com sua correspondente amostra de osteossarcoma primário (mesmo paciente), mostrando que sua expressão variou durante a progressão do tumor e, pelo fato da região do gene *RAPH1* (2q33) ser uma região comum de perda de heterozigose (LOH) em osteossarcomas. Os dados de EPPERT et al. (2005) levantaram a possibilidade do gene *RAPH1* atuar como um supressor na progressão do tumor, sendo um bom candidato para investigações adicionais de um gene envolvido no desenvolvimento e progressão de osteossarcomas.

A expressão da Lamelipodina parece estar diferentemente regulada em cânceres quando comparada com tecido normal. DAHL et al. (2005), identificaram um conjunto de genes que se apresentavam diferentemente expressos em cânceres de ovário e mama quando comparados com tecido normal. Entre estes genes estava o gene *RAPH1*, que se apresentou menos expresso em 25% das amostras de cânceres de ovário e em 43% da amostra de câncer de mama, quando comparado com amostras de tecido normal.

Os dados de LYULCHEVA et al. (2008) mostrando um papel conservado das proteínas MRL no controle da proliferação celular e as observações que EPPERT et al. (2005) e DAHL et al. (2005) obtiveram, de que a expressão da Lpd encontra-se diferentemente regulada em cânceres quando comparado com tecido normal, sugerem que as proteínas da família MRL podem desempenhar um importante papel na

patogênese de certos cânceres e podem representar novos alvos moleculares para a intervenção terapêutica (LYULCHEVA et al., 2008).

BAE et al. (2009) observaram que células MDA-231, uma linhagem celular de câncer de mama altamente invasiva e metastática, foram encontradas sendo mais móveis quando a expressão de Pfn1 (profilina 1), proteína que se liga a monômeros de actina, foi silenciada. Os autores examinaram o efeito da queda da expressão da Pfn1 sobre a motilidade de células MDA-231 para identificar o possível mecanismo que leva ao aumento da motilidade desta linhagem celular de câncer de mama. As análises de BAE et al. (2009) mostraram um aumento dramático de proteínas VASP localizadas nas bordas da membrana plasmática quando a expressão de Pfn1 foi reduzida nas células analisadas. Estas células com expressão reduzida de Pfn1 exibiram também uma forte colocalização de proteínas VASP e Lamelipodina nas bordas da membrana plasmática. A inibição de PI3 quinase (envolvida na degradação de PI(3,4,5)P3 para PI(3,4)P2, fosfolípídeo reconhecido pelo domínio PH da Lpd), leva a não localização de proteínas VASP nas bordas da membrana plasmática. Com base em seus resultados os autores sugeriram um modelo para explicar como a queda na expressão de Pfn1 pode elevar a motilidade celular. A queda da expressão de Pfn1 cria um fenótipo de aumento da motilidade nas células de câncer de mama analisadas através do aumento da disponibilidade de PI(3,4)P2, como tanto a Lpd quanto a Pfn1 se ligam a PI(3,4)P2, a queda da expressão de Pfn1 diminui a competição por este sítio aumentando o recrutamento do complexo Lpd e Ena/VASP elevando a motilidade da célula.

Deleções da região onde se localiza o gene *RAPH1* (2q33) são comuns em diversos tipos de cânceres como: carcinoma cervical, carcinoma de células escamosas de boca, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, carcinoma de células escamosas do esôfago, neuroblastoma e câncer de pulmão, (Otsuka, T. et al., 1996; Yamamoto, N. et al., 2003; Takita J. et al., 2001; Beder L. B. et al., 2003; Pack S. D. et al., 1999, *apud* Eppert et al., 2005).

2.11 LAMELIPODINA E BUTIRILCOLINESTERASE

A forma molecular da BChE mais abundante no soro é o tetrâmero (C_4). Aproximadamente 98% da BChE encontra-se sob a forma tetramérica (LOCKRIDGE e MASSON, 2000), e possui uma vida média ativa de 11 dias no soro (OSTERGAARD et al., 1988). O tetrâmero da BChE, de peso molecular aproximadamente igual 340 kDa, está organizado em um arranjo de dois dímeros, sendo, cada dímero composto de duas subunidades idênticas mantidas unidas por uma ponte dissulfídrica. A redução e alquilação dessa ponte mostrou que ela não é necessária para a organização tetramérica e a conservação da atividade da BChE, e que as quatro subunidades são mantidas unidas por ligações não covalentes (LOCKRIDGE et al., 1979). Trabalho subsequente (LOCKRIDGE e LA DU, 1982) mostrou resultados consistentes com os anteriores, concluindo que o tetrâmero é um conjunto de subunidades monoméricas idênticas mantidas unidas por ligações hidrofóbicas e pontes de dissulfeto.

A região da BChE responsável pela formação do tetrâmero, ou seja, o domínio de tetramerização da BChE, localiza-se na porção carboxi terminal (C-terminal) da enzima (BLONG et al., 1997). Ao avaliar a BChE recombinante, secretada em células ovarianas de hamster chinês (CHO) que tiveram até 50 aminoácidos da região C-terminal deletados, BONG et al. (1997) observaram que houve a secreção de monômeros exclusivamente, sugerindo que a região C-terminal é necessária para a formação de tetrâmeros da BChE.

Ao analisar a região C-terminal da BChE, MASSOULIÉ et al. (1993) observaram resíduos aromáticos altamente conservados (trp 543, fen 547, trp 550, tir 553, trp557, fen 561 e tir 564) entre humano, coelho, camundongo, gato, cavalo, vaca, galinha, a cobra *Bungarus fasciatus*, enguia e a arraia *Torpedo californica*. MASSON e CLÉRY (1995) sugeriram que interações entre estes compostos aromáticos estabilizam o tetrâmero da BChE pois, mesmo sob alta pressão, o tetrâmero não se dissocia, enquanto a maioria das outras proteínas o faz.

BONG et al. (1997) observaram que a forma predominante de BChE recombinante secretada em células ovarianas de hamster chinês (CHO) foi o dímero (50% - 55%), seguido pelo monômero (15% - 40%) e tetrâmero (10% - 30%). ALTAMIRANO e LOCKRIDGE (1999), em estudo semelhante, observaram que a

expressão da BChE do tipo selvagem em células 293T e CHO produziu 10% de tetrâmeros e que mutantes, sem os sete resíduos aromáticos da região C-terminal, formaram dímeros e monômeros mas não formaram tetrâmeros. Contudo, ao adicionarem poli L – prolina, de massa molecular média igual a 8KDa, à cultura de células 293T ou a coexpressão em células CHO da BChE selvagem e CoLQ (*collagen tail protein*), que contém um domínio de ligação rico em prolina (PRAD – *proline-rich attachment domain*), aumentaram o total de tetrâmeros observados de 10% para 70%, sem qualquer efeito nos mutantes da BChE sem os resíduos aromáticos. Os autores notaram também que peptídeos, que faziam parte da região PRAD, eram encontrados vinculados exclusivamente aos tetrâmeros da BChE. Os dados indicaram que este peptídeo rico em prolina não apenas dirige a formação do tetrâmero, mas também faz parte da estrutura tetramérica final. Estas observações sugerem que a formação do tetrâmero da BChE é mediada através da interação dos sete resíduos aromáticos conservados e que poli L prolina e PRAD atuam através desses resíduos induzindo a tetramerização.

Os resultados do trabalho de ALTAMIRANO e LOCKRIDGE (1999) levantaram a questão sobre a possibilidade de que os tetrâmeros da BChE no plasma contenham também peptídeos ricos em prolina associados a ela. Buscando responder a esta questão, LI et al. (2008) analisaram em amostras de humanos e equinos tetrâmeros da BChE purificados e desnaturados. As amostras desnaturadas liberaram peptídeos que foram separados da proteína BChE, em uma centrífuga filtro, por onde passam moléculas com até 10.000 Da. A solução que passou através deste filtro foi coletada e sua espectrometria de massa analisada. Uma série de peptídeos foi identificada variando de 2.000 Da até 3.000 Da. Como controle para este procedimento, os autores utilizaram amostras da BChE que não passaram pelo processo de desnaturação e observaram que ao sujeitar esta amostra à centrifugação nenhum peptídeo foi observado na solução que passou através do filtro.

As diferenças entre as massas dos peptídeos observados no trabalho de LI et al. (2008) mostram que a maioria deles difere por apenas um aminoácido, sugerindo que eles representem uma família de peptídeos relacionados e que não são uma coleção de sequências totalmente diferentes. Os resultados também indicam que os peptídeos são

parte da estrutura do tetrâmero da BChE e não estão acidentalmente ligados à superfície dela já que a série de peptídeos pode ser encontrada apenas após a desnaturação da BChE. Além disso, os autores analisaram alguns dos peptídeos liberados da desnaturação da BChE através de sequenciamento e ao compará-los observaram que todos apresentaram uma sequência núcleo rica em prolina, e que de fato diferem em poucos aminoácidos, como mostrado na tabela 2. Observações similares foram obtidas para as amostras de equinos.

LI et al. (2008) ainda investigaram, através de bancos de dados do NCBI, sequências que poderiam ser idênticas àquelas obtidas do sequenciamento de aminoácidos dos peptídeos liberados da desnaturação da BChE. E através da ferramenta BLAST observaram que a única sequência que correspondeu exatamente às sequências obtidas era a da proteína lamelipodina (Lpd; *RAPH1*, gi:82581557), que foi então identificada como a fonte dos peptídeos liberados do tetrâmero da BChE humana desnaturada.

Tabela 2. Sequência de aminoácidos de peptídeos associados à BChE e seus respectivos valores de espectrometria de massa (m/z).

m/z	Sequência dos peptídeos
2074,3	⁶⁸² PPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPLP ⁷⁰² a
2171,5	⁶⁸¹ PPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPLP ⁷⁰²
2285,1	⁶⁸⁰ LPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPLP ⁷⁰²
2452,8	⁶⁷⁶ PSPPLPPPPPPPPPPPPPPPPPPPP ⁷⁰⁰
2566,7	⁶⁷⁷ SPPLPPPPPPPPPPPPPPPPPPPLP ⁷⁰²
2663,7	⁶⁷⁶ PSPPLPPPPPPPPPPPPPPPPPPPLP ⁷⁰²
2795,8	⁶⁸³ PPPPPPPPPPPPPPPPPPPLPSQSAPSAGSAAP ⁷¹⁴
2878,5	⁶⁷⁶ PSPPLPPPPPPPPPPPPPPPPPPPLPSQ ⁷⁰⁴

Tabela modificada de LI et al. (2008).

^a Cada sequência está marcada, em suas extremidades N e C-terminal, com a posição correspondente a sequências de aminoácidos da Lamelipodina humana. Todos os peptídeos estão alinhados de acordo com sua posição relativa à sequência da Lpd. Um peptídeo da Lpd que engloba todos os dados observados possui a sequência: ⁶⁷¹YTASQSPPLPPPPPPPPPPPPPPPPPPPLPSQSAPSAGSAAPMFVKYS⁷²⁰.

Como a adição de PRAD ou poli L prolina à cultura celular facilita a tetramerização da BChE, os resultados obtidos por LI et al. (2008) definem uma nova ocorrência natural de peptídeos envolvidos na tetramerização, reforçando a necessidade de um peptídeo rico em prolina para a formação do tetrâmero e também abrindo a possibilidade para que outros peptídeos, ainda não identificados, que organizam o tetrâmero da BChE possam existir em outros tecidos.

Como os peptídeos observados são derivados de uma mesma proteína, LI et al. (2008) sugerem que a observada heterogeneidade entre os peptídeos (variando de 2.000 Da até 3.000 Da), deve ser resultado da ação progressiva de proteólise atuando nas extremidades N-terminal e C-terminal da proteína. Este processo de clivagem ocorreria nos peptídeos da lamelipodina já ligados ao tetrâmero da BChE deixando esta sequência embutida no tetrâmero. Os autores ainda observaram que estes

peptídeos estão localizados aproximadamente no meio da sequência total que forma a lamelipodina e se questionaram se toda esta região ao redor desta sequência não poderia produzir um obstáculo durante a ligação com a BChE. Segundo os autores, o esperado era que este domínio de ligação se localizasse próximo à região terminal da lamelipodina, o que ocorre com a proteína transmembrânica humana PRIMA, do inglês *proline-rich membrane anchor* (PERRIER et al., 2002), que possui um domínio de ligação, onde a BChE ancora, rico em prolina e localizado cerca de 20 aminoácidos da região N-terminal. Como a lamelipodina tem muito mais aminoácidos ao redor deste domínio de ligação, considerando o comprimento total da proteína, a sugestão dos autores seria de que formas derivadas de recomposição alternativa poderiam produzir proteínas cujo domínio de ligação estivesse próximo à região terminal, tornando-a acessível à ligação com a BChE.

BIBEROGLU et al. (2012) utilizando metodologia semelhante a de LI et al. (2008), observaram que o tetrâmero da BCHE do soro de bovinos, quando desnaturada, estava liberando uma série de peptídeos ricos em prolina. Os autores observaram ao todo 27 peptídeos derivados de pelo menos 9 diferentes proteínas, sugerindo que o tetrâmero da BCHE do soro bovino possa estar associado a peptídeos ricos em prolina de uma variedade de proteínas. Entre os peptídeos liberados alguns apresentaram homologia com sequências do genoma de *H. sapiens*: da proteína R3H domain containing 1 (2q21.3) e UDP-N-acetylglucosamine transferase subunit ALG13 homolog (Xq23).

2.11.1 Loco *CHE2* e Lamelipodina

A interação entre os produtos dos genes *BCHE* (3q26.1-q26.2) e *CHE2* (2q33-35) dá origem aos fenótipos CHE2 C5+ e CHE2 C5-, responsáveis respectivamente pela presença e ausência da banda detectada em eletroforese, chamada C₅, cujo padrão de herança foi proposto por HARRIS et al. (1962), como sendo autossômico dominante.

Em populações caucasóides, a frequência do alelo *CHE2** C5+ apresenta-se geralmente em torno de 5%. A frequência do fenótipo CHE2 C5+ observado por CHAUTARD-FREIRE-MAIA et al. (1991) em amostra da população de Curitiba foi de 10,3%.

Diversos trabalhos constataram que o fenótipo CHE2 C5+ apresenta atividade enzimática da BChE superior à observada para o fenótipo CHE2 C5- (HARRIS, 1970; PRIMO-PARMO et al., 1986; SUGIMORI, 1986; CHAUTARD-FREIRE-MAIA et al., 1991).

Dados do nosso laboratório mostraram que indivíduos de fenótipo CHE2 C5+ apresentam em média, peso (CHAUTARD-FREIRE-MAIA et al., 1991) e índice de massa corporal significativamente menores (ALCÂNTARA et al., 2001) quando comparados a seus controles CHE2 C5-.

A banda C₅ foi visualizada em eletroforese pela primeira vez por HARRIS et al. (1962), e até o momento a natureza molecular da substância codificada pelo loco *CHE2* não foi completamente elucidada. Entretanto, os resultados de experimentos realizados por MASSON (1991), na tentativa de explicar a formação da banda C₅, sugerem a associação do tetrâmero da butirilcolinesterase a uma proteína. Quando o autor tratou as amostras C₅ com tripsina e altas concentrações de NaCl (1,5-4,0M) observou a dissociação de C₅ em C₄. Seus resultados mostraram também que a banda C₅ não se dissocia sob a ação de agentes redutores ou pressão de 3,5kbar. Como a massa molecular da banda C₅ (400kDa) é 60kDa maior que a massa molecular de C₄ (340kDa), esta diferença pode ser atribuída à proteína associada. Embora os resultados obtidos por MASSON (1991) não permitissem identificar a substância codificada pelo loco *CHE2*, várias proteínas candidatas puderam ser descartadas, como: albumina, fragmento de imunoglobulina, AChE, proteína de membrana basal, fibronectina e fosfolípido.

LI et al. (2008) observaram que o gene que codifica esta proteína desconhecida (*CHE2*; 2q33-35; EIBERG et al., 1989), presente no complexo C₅ em indivíduos CHE2 C5+, está localizado na mesma posição do cromossomo 2 que o gene que codifica a lamelipodina (*RAPH1*; 2q33, NCBI). Os autores 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.

Outra evidência de uma relação entre BChE e o *RAPH1* veio do trabalho de BENYAMIN et al. (2011). Os autores realizaram um trabalho de associação utilizando

SNPs distribuídos em todo genoma (*genome-wide*) para descobrir variantes genéticas que poderiam estar afetando a atividade da BChE. Os genótipos de 2,5 milhões de SNPs foram avaliados em uma amostra de 6879 indivíduos que tiveram a atividade da BChE mensurada. Foi detectada associação significativa entre a atividade da BChE e SNPs dentro, ou próximos, do gene *BCHE* e outros 4 loci, um deles o *ABI2*. Como o gene *ABI2* não apresentava uma conexão óbvia com a atividade da BChE os autores sugeriram que a associação observada seria devido a uma variação no gene *RAPH1* em desequilíbrio de ligação com o SNP do gene *ABI2*, considerando que apesar de a associação mais significativa ocorrer com o SNP dentro do gene *ABI2*, ela cobria uma região que incluía outros genes, dentre estes o *RAPH1*.

Descobrir a proteína responsável pelo fenótipo CHE2 C5+ será muito importante para o melhor entendimento sobre as possíveis funções da BChE, uma vez que esse fenótipo é responsável por uma menor média de peso corporal e uma maior atividade enzimática. No presente projeto nossa hipótese é de que o loco *CHE2* seja o gene *RAPH1*. O estudo da variabilidade do gene que codifica a Lpd (*RAPH1*) também é importante para um melhor conhecimento do gene, uma vez que ainda não existem trabalhos nesse sentido.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a variabilidade genética do gene *RAPH1* e sua relação com a butirilcolinesterase.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudar a variabilidade do gene *RAPH1* através de PCR-SSCA em amostras de euro-brasileiros e afro-brasileiros.
2. Comparar as frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas entre os diferentes grupos étnicos.
3. Sequenciar as amostras que apresentarem um padrão de banda diferente em PCR-SSCA.
4. Verificar o desequilíbrio de ligação entre os SNPs estudados.
5. Genotipar SNPs do gene *RAPH1* em indivíduos de fenótipo CHE2 C5+ e CHE2 C5- e verificar se o loco *CHE2* é o gene *RAPH1* através de um estudo de associação entre estes SNPs e o fenótipo CHE2 C5+.
6. Estudar a variabilidade genética do gene *RAPH1*, por PCR-SSCA, buscando encontrar a mutação responsável pelo fenótipo CHE2 C5+.

4. MANUSCRITO DO ARTIGO CIENTÍFICO - VARIABILIDADE DO GENE *RAPH1* EM AMOSTRAS DE EURO-BRASILEIROS E AFRO-BRASILEIROS

Resumo: O gene *RAPH1* (2q33) codifica a proteína lamelipodina (Lpd), altamente expressa no cérebro, ovário, fígado e embrião. A principal função da Lpd é o recrutamento de proteínas Ena/VASP e assim atuar no direcionamento da motilidade e proliferação celular e no crescimento de tecido. Alguns trabalhos também sugerem um papel desta proteína na patogênese de certos cânceres. Além disso, peptídeos ricos em prolina da Lpd foram observados dirigindo a formação do tetrâmero da enzima butirilcolinesrerase (BChE) e também fazendo parte de sua estrutura tetramérica final. O presente trabalho estudou a variabilidade do gene *RAPH1* avaliando os exons 17 e 4 quanto à presença de SNPs e, através da genotipagem de um SNP do íntron 6, em amostras de euro-brasileiros (N =100) e afro-brasileiros (N =66). Este é o primeiro relato da variabilidade do gene em amostras brasileiras desses grupos étnicos. Durante a avaliação da variabilidade nos exons foram encontrados 2 SNPs, já descritos, ambos no exon 17 e nenhuma variação foi observada no exon 4 nos grupos étnicos estudados. Dos SNPs avaliados (dois no exon 17 e um no íntron 6), apenas o rs3814365 (exon 17) apresentou frequência alélica diferente entre os grupos étnicos estudados. Quando avaliados entre diferentes populações disponíveis no NCBI, os alelos dos SNPs estudados foram considerados mutações antigas de origem africana. A avaliação da região codificadora entre diferentes espécies indicou um alto grau de homologia. Os resultados obtidos nos presente trabalho sugerem que a região codificadora do gene *RAPH1* deve estar sobre pressão seletiva purificadora, pois apresenta pouca variação e se apresenta bem conservada entre diferentes espécies.

Palavras-chaves: gene *RAPH1*, lamelipodina, variabilidade genética.

Abstract: The *RAPH1* gene (2q33) encoding the lamellipodin (Lpd) protein, is highly expressed in brain, ovary, liver and embryo. The Lpd main function is the Ena / VASP proteins recruitment and so acts in the motility guidance and cell proliferation and tissue growth. Some studies also suggest a role for this protein in the pathogenesis of certain cancers. Moreover, proline-rich peptides from Lpd were found driving the

tetramer butyrylcholinesterase (BChE) formation and also being part of the final tetrameric structure. This work studied the *RAPH1* gene variability, for the presence of SNPs in exons 17 and 4 and, by genotyping a SNP in intron 6, in Euro-Brazilian (N = 100) and African-Brazilians (N = 66) samples. This is the first report of *RAPH1* gene variability in a sample of these Brazilian ethnic groups. During the exons variability evaluation 2 already described SNPs were found, both in exon 17 and no variation was observed in exon 4, in the studied populations. Of the evaluated SNPs (two in exon 17 and one in íntron 6), only rs3814365 (exon 17) showed a different allelic frequency among the ethnic groups. Compared to different populations available in NCBI, alleles of the studied SNPs were considered ancient mutations with African origin. The evaluation of coding region among different species indicates a high degree of homology. The results obtained in this study suggest that the coding region of *RAPH1* gene must be on purifying selective pressure, because it shows a little variation and appears conserved among different species.

Keywords: *RAPH1* gene, lamellipodin, genetic variability.

INTRODUÇÃO

O gene humano *RAPH1* (*Ras association (RalGDS/AF-6) and pleckstrin homology domains 1*) contém 17 exons e está localizado no cromossomo 2q33 (EPPERT et al., 2005). Seu transcrito produz a proteína Lamelipodina (Lpd), cuja massa molecular (proteína total), é de aproximadamente 200KDa. Diferentes possibilidades de recomposição alternativa já foram descritas para o mRNA do gene, as quais resultam em transcritos que codificam isoformas com maior ou menor número de aminoácidos, algumas dessas, sendo altamente expressa no cérebro, ovário, embriões e fígado (Krause et al. 2004).

EPPERT et al. (2005) observaram a existência de homologia entre a sequência do gene *RAPH1* (chamado pelo autor de RMO1) e as sequências que geram as proteínas humanas Grb7, Grb10 e Grb14 (29% a 35% de identidade), que atuam na proliferação e migração celular. Durante suas análises KRAUSE et al. (2004) também observaram similaridade entre a Lpd e a proteína humana RIAM (*Rap1 interacting adaptor*

molecule), que estimula a polimerização de actina e a formação de lamelipódios. O genoma de *C. elegans* codifica uma única molécula homologa a Lpd e a RIAM de mamíferos, a proteína MIG-10, que está relacionada com a orientação e crescimento de neurônios (CHANG et al. 2006).

Juntamente com as proteínas RIAM e MIG-10, a Lpd forma a família proteica MRL, caracterizada por possuir os domínios: PH (*pleckstrin homology*), RA (*Ras-association*) além de domínios ricos em prolina na região C-terminal. Estes domínios são sítios de ligação para: um fosfolípido componente da membrana plasmática, para ligação de GTPases, e para ligação de proteínas Ena/VASP, respectivamente. As proteínas MRL funcionam como adaptadores de sinais para modular a montagem do citoesqueleto de actina (LAFUENTE et al., 2004; KRAUSE et al., 2004), intimamente relacionadas com a protrusão lamelipodial e a motilidade celular.

KRAUSE et al. (2004) sugerem que a principal função da Lpd é o recrutamento de proteínas Ena/VASP, através das interações entre o seu domínio EVH1 e o motivo FPPPP, (sequência rica em prolina) na região C-terminal da Lpd, para a borda da célula. A função das proteínas Ena/VASP (KRAUSE et al., 2002) é a de se ligar a, ou, próximo à extremidade final dos filamentos de actina protegendo-os de serem cobertos por outras proteínas, o que permite o alongamento destes filamentos. O recrutamento de proteínas Ena/VASP deve ser precisamente regulado para a formação controlada de protrusões lamelipodiais e projeções filopodiais da membrana, componentes essenciais para a motilidade celular, organização de domínios na membrana, fagocitose e o desenvolvimento de substrato de aderência (SMALL et al., 2002).

Diversos trabalhos indicam a atuação das proteínas MIG-10/RIAM/lamelipodina na morfogênese dos axônios, através da cooperação entre estas proteínas e as proteínas Ena/VASP e Unc-34 (ortóloga à Ena/VASP em *C. elegans*), para guiar o crescimento dos axônios em resposta a proteínas extracelulares de sinalização (CHANG et al., 2006, QUINN et al., 2006 e 2008, MICHAEL et al. 2010)

A lamelipodina já foi relacionada com a patogênese de certos cânceres. DAHL et al. (2005) observaram que o gene *RAPH1* se apresentou menos expresso em 25% das amostras de cânceres de ovário e em 43% da amostra de câncer de mama, quando comparado com amostras de tecido normal. EPPERT et al. (2005) observaram que a

expressão do gene *RAPH1* variou durante a progressão de osteossarcomas, sendo menor em amostras metastáticas quando comparada com a expressão em amostra do mesmo paciente em osteossarcoma primário, sugerindo que gene *RAPH1* poderia atuar como um supressor na progressão do tumor. Deleções da região onde se localiza o gene *RAPH1* (2q33) são comuns em diversos tipos de cânceres como: carcinoma cervical, de células escamosas de boca, de células escamosas de cabeça e pescoço, de células escamosa do esôfago, neuroblastoma e câncer de pulmão, (Otsuka, T. et al., 1996; Yamamoto, N. et al., 2003; Takita J. et al., 2001; Beder L. B. et al., 2003; Pack S. D. et al., 1999, *apud* Eppert et al., 2005).

Não foram observados na literatura disponível trabalhos voltados ao estudo da variabilidade do gene *RAPH1*, sendo a função de seu transcrito, a Lpd, na célula o principal foco de pesquisa. Em vista disso, este trabalho teve por objetivo estudar a variabilidade do gene *RAPH1* em amostras de euro-brasileiros e afro-brasileiros.

MATERIAIS E MÉTODOS*

Amostra. Para estudar a variabilidade do gene *RAPH1* foram selecionadas aleatoriamente amostras de doadores de sangue do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (HEMEPAR) de dois grupos étnicos: 100 indivíduos que se autodeclararam euro-brasileiros, com média de idade de 29 anos, todos do gênero masculino e 66 indivíduos que se autodeclararam afro-brasileiros, com média de idade de 33,2 anos, sendo 16 do gênero feminino e 50 do gênero masculino.

Extração e Quantificação de DNA genômico. A extração de DNA foi realizada pelo protocolo descrito por LAHIRI E NURNBERGER (1991), com algumas modificações. Após a extração, o DNA genômico foi quantificado no espectrofotômetro *NanoDrop* e alíquotado à concentração de 100ng/uL para avaliações por PCR-SSCA e 20ng/ul para genotipagens por *TaqMan*.

Genotipagem por PCR-SSCA. A técnica de PCR-SSCA (*polymerase chain reaction - single strand conformational analysis*) consiste na amplificação de uma sequência de DNA, através de PCR e posterior desnaturação do produto amplificado que é, então, submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida para a análise de conformação de DNA em fita simples. O mix para amplificação dos fragmentos do

gene *RAPH1*, contém: 9 µl de Supermix (Invitrogen), 1 µl de DNA genômico (100ng/µl) e 10 pmoles de cada iniciador. No presente trabalho foram construídos 6 pares de oligonucleotídeos iniciadores (Lpd 17b, 14d, 14e, 14g, 14h e 14i) para estudar a variabilidade genética do exon 17 e 2 (Lpd 4a e 4b) para o exon 4.

Genotipagem por TaqMan. Para a genotipagem dos SNPs rs3814365 (exon 17) e rs2246118 (íntron 6) foram utilizados os Kits de Genotipagem TaqMan SNP (Applied Biosystems). A reação de PCR em tempo real foi realizada no aparelho Mastercycler Realplex 2 (Eppendorf). Para a análise de cada um dos SNPs o mix de reação continha: 5,0µl de *TaqMan* Universal PCR Master Mix, 0,5µl do Kit de Genotipagem TaqMan SNP específico, 2,5µl de água ultra-pura e 2µl do DNA (20ng/µl). Foram utilizadas amostras já sequenciadas como controles para a genotipagem.

Sequenciamento. Foram sequenciadas amostras que apresentaram um padrão diferente em eletroforese (uma amostra por padrão de banda eletroforética) com o uso dos mesmos iniciadores utilizados na técnica PCR-SSCA. A amplificação dos fragmentos que foram sequenciados foi realizada através do kit de sequenciamento Bigdye Terminator v 3.1 - Applied Biosystems. O sequenciamento foi realizado em um aparelho ABI 377, e as análises dos eletroferogramas foram feitas com o auxílio computacional do programa BioEdit (HALL, 1999). Cada amostra sequenciada passou por esse procedimento quatro vezes, duas vezes para cada fita de DNA, totalizando oito sequências.

Análise Estatística. As frequências alélicas e genotípicas foram calculadas por contagem direta do número de cromossomos e de indivíduos, respectivamente e comparadas entre os grupos étnicos pelo teste do qui-quadrado com o uso do programa BioEstat versão 5.0 (Ayres et al., 2007). O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi verificado através do programa Arlequin 3.11 (SCHNEIDER et al., 2000) de acordo com o teste de GUO E THOMPSON (1992). O valor de probabilidade (p) para as avaliações de desequilíbrio de ligação também foi estimado pelo programa Arlequin 3.11 (SCHNEIDER et al., 2000). A inferência da fase haplotípica foi obtida a partir dos dados das frequências genotípicas observadas, baseada no método de máxima verossimilhança do programa Arlequin 3.11 (SCHNEIDER et al., 2000). O valor da

probabilidade para os testes comparativos significativos considerou $p < 0,05$. *Ver Detalhes da Metodologia no Apêndice 1.

RESULTADOS

GENOTIPAGEM DO EXON 17 DO GENE RAPH1

Genotipagem por PCR-SSCA.

Os fragmentos do exon 17 amplificados pelos iniciadores Lpd 17b, 14d, 14e, 14g e 14h não apresentaram variação no padrão de bandas eletroforéticas nas amostras de ambas as populações de estudo, sendo o padrão correspondente ao de amostras homozigotas (figura 1 A, B, C, D e E; respectivamente). Foi observada variação no padrão de bandas do produto amplificado pelo par de iniciadores Lpd 14i. O padrão de bandas obtido permitiu a identificação dos genótipos homozigotos e heterozigoto (figura 1 F).

A presença de uma variação, no fragmento amplificado pelo par de iniciadores Lpd 14i, foi confirmada através de sequenciamento. Foi observada a presença de uma substituição de nucleotídeo (CCC > CCT; rs2465520) na posição nt 3918 do exon 17 (figura 2), que leva a uma variação sinônima (prolina > prolina).

O número de indivíduos genotipados para o SNP rs2465520, presente no fragmento amplificado pelo par de iniciadores Lpd 14i, suas frequências alélicas e genotípicas, bem como a comparação dessas frequências entre os grupos étnicos, podem ser observados na tabela 1. As frequências genotípicas encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg em ambos os grupos étnicos, e a comparação das frequências alélicas e genotípicas entre as etnias não mostrou diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

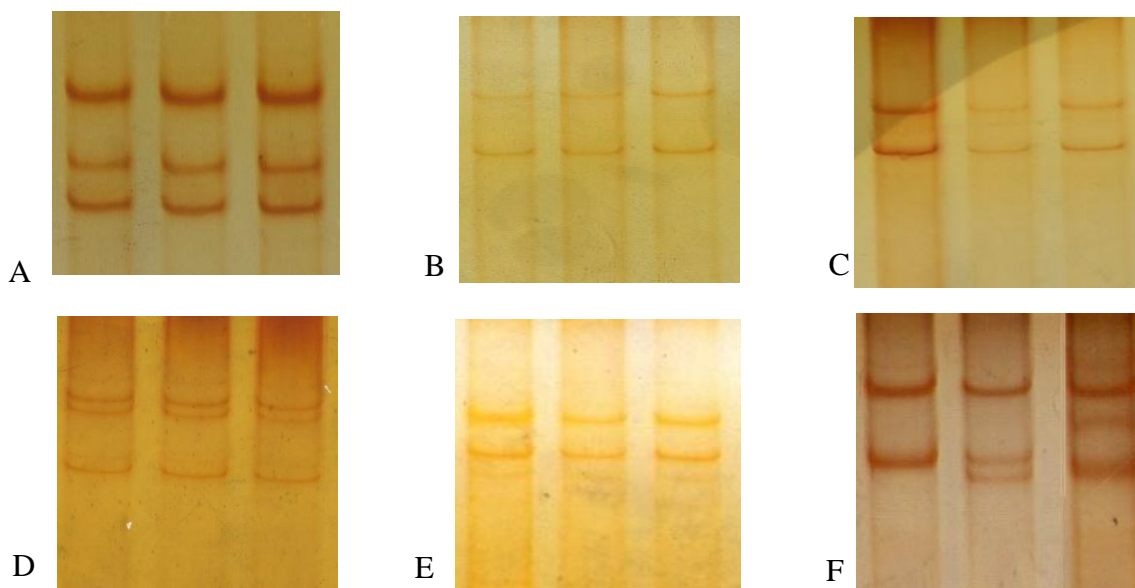


Figura 1. Reprodução de placas de gel de poliacrilamida submetidas à eletroforese, contendo fragmentos do exon 17 do gene *RAPHL*. As figuras A, B, C, D e E apresentam amostras amplificadas respectivamente pelos pares de iniciadores: Lpd 17b, 14d, 14e, 17g e 17h e possuem padrões que correspondem a genótipos homocigotos. A figura F apresenta amostras amplificadas pelo par de iniciadores Lpd 14i, e possui padrões que correspondem a: amostra 1 homocigoto, 2 heterocigoto e 3 homocigoto para o outro alelo.

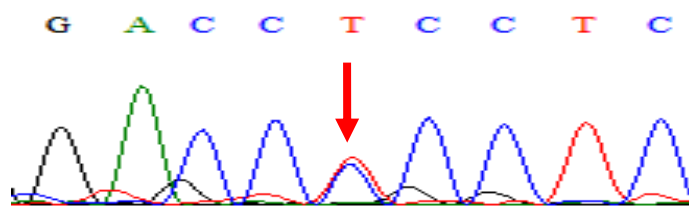


Figura 2. Eletroferograma de uma amostra heterocigota para o SNP rs2465520, CCC > CCT, na posição nt 3918 do exon 17 do gene *RAPHL*. A seta em vermelho indica heterocigose no sítio.

Tabela 1. Número de indivíduos genotipados através de PCR-SSCA para o SNP rs2465520, suas frequências alélicas e genotípicas, bem como a comparação dessas frequências (χ^2 ; p) entre os grupos étnicos.

Genótipo	Euro-brasileiro			Afro-brasileiro		
	N	Frequência \pm EP	Hardy-Weinberg	N	Frequência \pm EP	Hardy-Weinberg
<i>CC</i>	74	0,779 \pm 0,043		35	0,625 \pm 0,065	
<i>CT</i>	20	0,211 \pm 0,042	$\chi^2 = 0,075$; p = 0,784	21	0,375 \pm 0,065	$\chi^2 = 2,982$; p = 0,084
<i>TT</i>	1	0,011 \pm 0,011		-	-	
Total	95			56		
$\chi^2 = 5,256$; p = 0,072						
<hr/>						
Alelo						
<i>C</i>	168	0,884 \pm 0,023		91	0,812 \pm 0,037	
<i>T</i>	22	0,116 \pm 0,023		21	0,188 \pm 0,037	
Total	190			112		
$\chi^2 = 2,967$; p = 0,085						

Genotipagem por TaqMan

O fragmento do exon 17 que contém o rs3814365 foi analisado inicialmente através de PCR-SSCA, onde observou-se variação no padrão de bandas eletroforéticas. A presença de uma variação neste fragmento foi confirmada através do sequenciamento (figura 3), onde foi observada uma substituição de nucleotídeo (CCA > CCG; rs3814365) na posição nt 3038 do exon 17, que leva a uma variação sinônima (prolina > prolina)

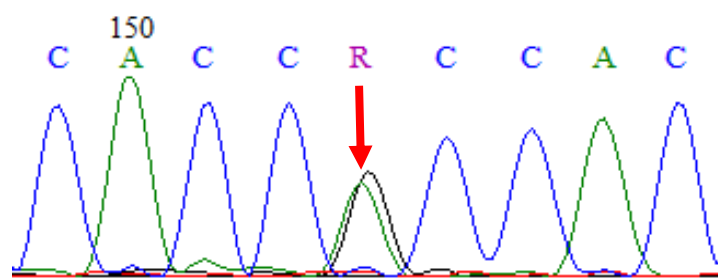


Figura 3. Eletroferograma de uma amostra heterozigota para o SNP rs3814365, CCA > CCG na posição nt 3038 do exon 17. A seta vermelha indica heterozigose no sítio.

As análises para o SNP rs3814365 prosseguiram através de genotipagem por *TaqMan*, utilizando as amostras sequenciadas como controle. Foram genotipadas amostras populacionais de euro-brasileiros e afro-brasileiros. O número de indivíduos correspondente a cada genótipo, suas frequências alélicas e genotípicas, bem como a comparação dessas frequências entre os grupos étnicos, podem ser observadas na tabela 2. As frequências genotípicas encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg em ambos os grupos étnicos. Quanto às frequências alélicas e genotípicas, apenas a alélica mostrou diferença estatisticamente significativa entre as etnias.

GENOTIPAGEM DE UM SNP DO ÍNTRON 6 DO GENE *RAPH1*

O SNP rs2246118 está presente no íntron 6 do gene *RAPH1* e corresponde a substituição do nucleotídeo Timina por uma Citosina (T > C; posição no cromossomo

2 = 204327639). Amostras de 100 euro-brasileiros e 66 afro-brasileiros foram genotipados por *TaqMan* para este SNP. O número de indivíduos correspondente a cada genótipo, suas frequências alélicas e genotípicas, bem como a comparação dessas frequências entre os grupos étnicos, podem ser observadas na tabela 3. As frequências genotípicas encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg e não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos étnicos, assim como as alélicas.

Tabela 2. Número de indivíduos genotipados por *Taqman* para o SNP rs3814365, suas frequências alélicas e genotípicas, bem como a comparação dessas frequências (χ^2 ; p) entre os grupos étnicos.

Genótipo	Euro-brasileiro			Afro-brasileiro		
	N	Frequência \pm EP	Hardy-Weinberg	¹ N	Frequência \pm EP	Hardy-Weinberg
AA	30	0,300 \pm 0,046		28	0,459 \pm 0,064	
AG	48	0,480 \pm 0,050	$\chi^2 = 0,114$; p= 0,735	26	0,426 \pm 0,064	$\chi^2 = 0,066$; p= 0,797
GG	22	0,220 \pm 0,041		7	0,115 \pm 0,040	
Total	100			61		
$\chi^2 = 5, 228$; p = 0,07						
<hr/>						
Alelo						
A	108	0,540 \pm 0,035		82	0,672 \pm 0,043	
G	92	0,460 \pm 0,035		40	0,328 \pm 0,043	
Total	200			122		
$\chi^2 = 4,937$; p = 0,026*						

*Diferença estatisticamente significativa. ¹Não puderam ser genotipadas 5 amostras afro-brasileiras.

Tabela 3. Número de indivíduos genotipados por *Taqman* para o SNP rs2246118, suas frequências alélicas e genotípicas, bem como a comparação dessas frequências (χ^2 ; p) entre os grupos étnicos.

Genótipo	Euro-brasileiro			Afro-brasileiro		
	N	Frequência \pm EP	Hardy-Weinberg	N	Frequência \pm EP	Hardy-Weinberg
<i>TT</i>	20	0,200 \pm 0,040		13	0,197 \pm 0,049	
<i>CT</i>	47	0,470 \pm 0,050	$\chi^2 = 0,192$; p = 0,661	27	0,409 \pm 0,061	$\chi^2 = 1,461$; p = 0,227
<i>CC</i>	33	0,330 \pm 0,047		26	0,394 \pm 0,060	
Total	100			66		
$\chi^2 = 0,790$; p = 0,674						
Alelo						
<i>T</i>	87	0,435 \pm 0,035		53	0,402 \pm 0,043	
<i>C</i>	113	0,565 \pm 0,035		79	0,598 \pm 0,043	
Total	200			132		
$\chi^2 = 0,366$; p = 0,545						

GENOTIPAGEM DO EXON 4 DO GENE RAPH1

A análise da variabilidade genética do exon 4 do gene *RAPH1* foi realizada através de PCR-SSCA. Para isso, dois pares de iniciadores foram desenhados de forma a conter todo o exon. Foram genotipadas amostras de euro-brasileiros e de afro-brasileiros, para cada par de iniciador. A avaliação das amostras submetidas a PCR-SSCA em gel de poliacrilamida não mostrou nenhuma variação com relação ao padrão de bandas eletroforéticas, em ambas as etnias, sendo que os padrões observados parecem corresponder a de homozigotos, como pode ser observado na figura 4.

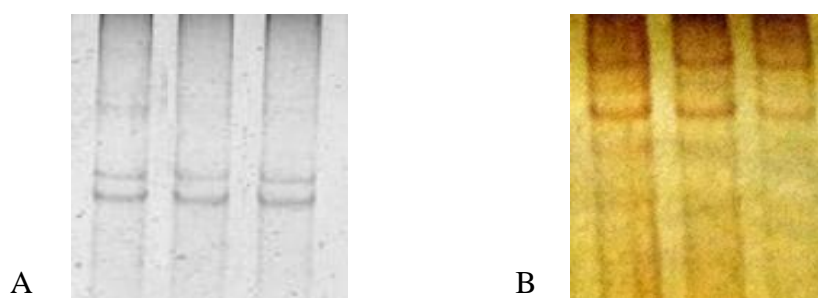


Figura 4. Reprodução de placas de gel de poliacrilamida submetidas à eletroforese, contendo fragmentos do exon 4 do gene *RAPH1*. Figura A, amostras amplificadas pelos iniciadores Lpd 4a. Figura B, amostras amplificadas pelo par de iniciador Lpd 4b, ambos os padrões correspondem a indivíduos homozigotos.

ESTIMATIVA DE HAPLÓTIPO

Como a frequência observada para os três SNPs avaliados estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg nos grupos étnicos, foi realizada a inferência das frequências de haplótipos nestas populações. Os SNPs utilizados para a inferência dos haplótipos foram ordenados segundo a sua disposição dentro do gene *RAPH1* a partir do centrômero: SNP rs2465520, rs3814365 e rs2246118.

As frequências dos haplótipos estimados, com relação aos três SNPs avaliados, no grupo de indivíduos euro-brasileiros e afro-brasileiros, podem ser observadas na tabela 4. Após a Correção de Bonferroni foram consideradas diferenças estatisticamente significativas apenas as frequências observadas entre euro-brasileiros e afro-brasileiros do haplótipo TAC.

Tabela 4. Frequências dos haplótipos estimados e suas comparações (χ^2 ; p) entre os grupos de indivíduos euro-brasileiros e afro-brasileiros

Haplótipos	Euro-brasileiros		Afro-brasileiros		χ^2 ; p
	N	%	N	%	
CAC	12	6,3	11	10,4	1,566; 0,211
CAT	71	37,4	37	34,9	0,178; 0,673
CGC	83	43,7	35	33,0	3,228; 0,072
CGT	2	1,1	2	1,9	0,355; 0,551
TGC	2	1,1	-	-	1,123; 0,289
TAT	9	4,7	2	1,9	1,545; 0,214
TAC	11	5,8	19	17,9	11,001; 0,0009*
Total	190		106		

* Diferença estatisticamente significativa, após correção de Bonferroni = 0,007

DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO

Os resultados dos testes de desequilíbrio de ligação entre os SNPs estudados foi significativo para as amostras de indivíduos euro-brasileiros entre os SNPs rs3814365 e rs2246118 ($p = 0,000$) e aproximou-se da significância entre os SNPs rs2465520 e rs3814365 ($p = 0,0615$) e não foi significativo entre rs2465520 e rs2246118 ($p = 0,563$). No grupo de afro-descendentes os três SNPs apresentaram valores significativos de desequilíbrio de ligação, sendo entre o rs3814365 e rs2246118, $p = 0,00001$; entre rs2465520 e rs3814365, $p = 0,0087$ e, entre o rs2465520 e rs2246118 $p = 0,0284$.

DISCUSSÃO

GENOTIPAGEM DO EXON 17, EXON 4 E DE UM SNP DO ÍNTRON 6 DO GENE *RAPH1* EM AMOSTRAS POPULACIONAIS

O estudo da variabilidade do gene *RAPH1* foi iniciado pelo exon 17. O interesse inicial por este exon se deveu ao fato dele possuir a sequência que codifica para a porção C-terminal da proteína, onde estão presentes as sequências que codificam os domínios de ligação para proteínas que junto com a Lpd atuam na formação de protruções lamelipodiais e projeções filopodiais. Além de conter a região rica em

prolina identificada, no trabalho de LI et al. (2008), como a fonte dos peptídeos liberados do tetrâmero da BChE humana desnaturada. Dos 1977 nucleotídeos (nt) que fazem parte da região traduzida desse exon, foram avaliados, quanto à presença de variantes genéticas, 1769 nt, sendo que 208 nt presentes na região inicial do exon, que inclui o sítio poliprolina, não puderam ser avaliados, pois os oligonucleotídeos iniciadores, construídos (três pares) para amplificar esta região, não geravam produto suficiente para ser avaliado em gel de poliacrilamida, possivelmente devido à natureza deste fragmento do gene, que é formado por uma região de nucleotídeos repetidos. Os oligonucleotídeos desenhados sobre estas sequências acabam por formar estruturas em grampos, dímeros de um iniciador ou heterodímeros; interações que diminuem a concentração de iniciadores disponíveis na reação, levando à queda no produto final da PCR (RYCHLIK, 1995).

Segundo o banco de dados do Hapmap (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>), a região traduzida do exon 17 apresenta 3 variantes descritas. Durante a genotipagem dois destes SNPs foram observados (rs2465520 e rs3814365), ambos levando à variações sinônimas (prolina > prolina). Considerando que a técnica de PCR-SSCA foi sensível para identificar os SNPs acima, é provável que a terceira variante descrita (rs13029446) seja uma mutação rara, já que não apresenta dados populacionais disponíveis no NCBI.

O SNP rs2246118 (íntron 6) foi selecionado para ser avaliado no presente trabalho por se tratar de um *TagSNP*, ou seja, um polimorfismo em desequilíbrio de ligação com grande parte do gene, além disso este polimorfismo já havia sido avaliado em outro estudo do nosso grupo e portanto havia oligonucleotídeos iniciadores disponíveis para uso.

A genotipagem desses polimorfismos em amostra populacional de euro-brasileiros e afro-brasileiros mostrou que as frequências alélicas e genotípicas dos SNPs rs2465520 e rs2246118 encontram-se igualmente distribuídas entre os grupos populacionais (tabela 1 e 3), sendo o alelo C mais comum em ambos os SNPs. As frequências genotípicas e alélicas observadas foram comparadas com os valores das frequências disponíveis no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), para estes SNPs, nas populações: Européia (CEU – Norte americanos residentes em Utah com

ancestralidade oeste e norte européia) e Africana (YRI – Africanos do grupo étnico Yoruba residentes em Ibadan, Nigéria) e podem ser observadas nas tabelas 5 e 6. Esta avaliação mostrou que, para os SNPs rs2465520 e rs2246118 a amostra de euro-brasileiros não é diferente da CEU quanto as frequências alélicas e genotípicas (tabela 5 e 6, respectivamente). Embora existam diferenças nas frequências alélicas e genotípicas entre YRI e CEU nossas amostras de euro-brasileiros e afro-brasileiros provavelmente não apresentaram diferenças significativas, em parte, porque nossa população é miscigenada, segundo Braun-Prado et al. (2000), que analisou polimorfismos HLA de classe I em amostras da população de Curitiba, a população branca possui uma contribuição européia de 94% e 3% africana, enquanto a população negra de Curitiba, uma contribuição 25% européia e 74% africana. A comparação das frequências alélicas e genotípicas entre afro-brasileiros e YRI, para os SNPs rs2465520 e rs2246118, foi estatisticamente diferente ($p < 0,05$) e indica um gradiente de frequência entre as populações euro-brasileiros/CEU, afro-brasileiros e YRI que refletem, provavelmente, às variantes alélicas presentes nas populações fundadoras (efeito fundador), sendo a frequência intermediária de afro-brasileiros pode ser devido a considerável contribuição européia (25%) na população negra de Curitiba (Braun-Prado et al., 2000).

Tabela 5. Comparação entre as frequências genótípicas e alélicas observadas e as disponíveis no NCBI para o SNP rs2465520 das populações Européia (CEU) e Africana (YRI).

Genótipo	Euro-brasileiro		¹ CEU			Afro-brasileiro		² YRI		
	N	% ± EP	N	% ± EP	χ^2 ; p	N	% ± EP	N	% ± EP	χ^2 ; p
<i>CC</i>	74	0,779 ± 0,043	90	0,796 ± 0,023	$\chi^2 = 1,011$ p = 0,603	35	0,625 ± 0,065	43	0,381 ± 0,046	$\chi^2 = 15,166$ p=0,0005*
<i>CT</i>	20	0,211 ± 0,042	20	0,177 ± 0,027		21	0,375 ± 0,065	50	0,442 ± 0,047	
<i>TT</i>	1	0,010 ± 0,011	3	0,027 ± 0,011		-	-	20	0,177 ± 0,036	
Total	95		113			56		113		
Alelo										
<i>C</i>	168	0,884 ± 0,023	200	0,885 ± 0,016	$\chi^2 = 0,001$	91	0,812 ± 0,037	136	0,602 ± 0,033	$\chi^2 = 15,078$
<i>T</i>	22	0,116 ± 0,023	26	0,115 ± 0,016	p = 0,981	21	0,188 ± 0,037	90	0,398 ± 0,033	p=0,0001*
Total	190		226			112		226		

¹CEU – Norte americanos residentes em Utah com ancestralidade oeste e norte européia. ²YRI – Africanos do grupo étnico Yoruba

Tabela 6. Comparação entre as frequências genotípicas e alélicas observadas e as disponíveis no NCBI para o SNP rs2246118 das populações Européia (CEU) e Africana (YRI).

Genótipo	Euro-brasileiro		¹ CEU			Afro-brasileiro		² YRI		
	N	% ± EP	N	% ± EP	χ^2 ; p	N	% ± EP	N	% ± EP	χ^2 ; p
<i>TT</i>	20	0,200 ± 0,040	8	0,133 ± 0,027	$\chi^2 = 1,164$ p = 0,559	13	0,197 ± 0,049	1	0,017 ± 0,011	$\chi^2 = 10,874$ p = 0,004*
<i>CT</i>	47	0,470 ± 0,050	31	0,517 ± 0,049		27	0,409 ± 0,061	26	0,433 ± 0,044	
<i>CC</i>	33	0,330 ± 0,047	21	0,350 ± 0,038		26	0,394 ± 0,060	33	0,550 ± 0,044	
Total	100		60			66		60		
Alelo										
<i>T</i>	87	0,435 ± 0,035	47	0,392 ± 0,027	$\chi^2 = 0,579$ p = 0,447	53	0,402 ± 0,043	28	0,233 ± 0,027	$\chi^2 = 8,151$ p = 0,0043*
<i>C</i>	113	0,565 ± 0,035	73	0,608 ± 0,027		79	0,598 ± 0,043	92	0,767 ± 0,027	
Total	200		120			132		120		

*Diferença estatisticamente significativa. ¹CEU – Norte americanos residentes em Utah com ancestralidade oeste e norte européia. ²YRI – Africanos do grupo étnico Yoruba residentes em Ibadan, Nigéria.

Para o rs3814365, a distribuição das frequências genotípicas não se apresenta significativamente diferente entre os grupos étnicos avaliados (tabela 3), enquanto a alélica é maior para o alelo A ($p = 0,026$), em afro-brasileiros (67,2%) que em euro-brasileiros (54%). Ao comparar as frequências observadas em euro-brasileiros com as disponíveis no NCBI para este SNP na população européia (CEU), observou-se que as frequências alélicas e genotípicas encontram-se igualmente distribuídas entre estes grupos (tabela 7). As frequências observadas em afro-brasileiros quando comparadas com as disponíveis no NCBI para este SNP em populações Africanas (YRI), mostraram que as frequências alélicas e genotípicas são significativamente diferentes ($p < 0,0001$ e $p < 0,0001$, respectivamente), sendo o alelo A mais comum em ambas as populações, porém a frequência é maior em YRI (87,6%) que em afro-brasileiro (67,2%). Estes resultados mostram um claro gradiente de frequência entre as populações, sendo: YRI > afro-brasileiros > euro-brasileiros/CEU. Esta diferença entre as frequências é resultado, provavelmente, das variantes alélicas presentes nas populações fundadoras, sendo que a frequência intermediária observada em afro-brasileiros deve ser resultado da considerável contribuição européia (25%) na população negra de Curitiba (Braun-Prado et al., 2000).

As amostras afro-brasileiras foram comparadas com amostras de africanos do grupo étnico Yoruba residentes em Ibadan – Nigéria (YRI), cuja localização corresponde a região de onde escravos Sudaneses foram trazidos para o Brasil. De acordo com SALZANO et al. (1970) a população negra no Brasil se originou de africanos Sudaneses e Bantus, trazidos como escravos. Os Sudaneses ocupam a região norte do Golfo da Guiné e os Bantus uma larga faixa que vai do Atlântico ao Oceano Índico, ligando Angola e Congo ao Moçambique. Assim, nossas amostras afro-brasileiras provavelmente possuem, também, uma ancestralidade Yoruba possibilitando a comparação entre estas amostras.

O exon 4 também foi selecionado para o estudo da variabilidade do gene *RAPH1*. Ele é o segundo maior exon do gene, (506 pb), correspondendo a 13,5% dos aminoácidos da proteína madura e está presente em todas as sequências que levam as possíveis isoformas do gene *RAPH1*. A genotipagem deste exon não apontou a presença de variação genética nas populações avaliadas. Os dados do Hapmap também

indicam ausência de SNPs nessa região. Quanto a isso, podemos considerar a hipótese de que se existirem variantes genéticas neste exon elas são raras, (< 0,5% o alelo de menor frequência, considerando o maior N amostral) sendo que esta falta de variabilidade pode ser resultado da pressão seletiva sobre esta região. Sobre isso, o fato de todas as isoformas do gene possuírem o exon 4 sugere que esta sequência deve ser importante para a proteína madura. Lee et. al, (2009) identificaram que a porção N-terminal da sequência que leva a proteína Lpd possui um motivo estrutural α -hélice, formado do aminoácido 13 ao 60. Os experimentos mostraram que este motivo tem a capacidade de se ligar diretamente à proteína citoplasmática talina que, ao ligar-se à porção citoplasmática da proteína transmembrana Integrina, promove sua ativação. A ativação da proteína Integrina está envolvida em processos como: montagem da matriz extracelular, crescimento, migração e proliferação celular, sugerindo que a Lpd pode servir como suporte que conecta o recrutamento da talina para integrinas na membrana plasmática. A região observada por Lee et. al, (2009) formando a estrutura α -hélice é formada por parte da sequência do exon 4 do *RAPH1*, corroborando a hipótese de que a ausência de variação no exon 4 se deve à pressão seletiva sobre essa região por atuar em eventos celulares essenciais.

Tabela 7. Comparação entre as frequências genótípicas e alélicas observadas e as disponíveis no NCBI para o SNP rs3814365 das populações Européia (CEU) e Africana (YRI).

Genótipo	Euro-brasileiro		¹ CEU			Afro-brasileiro		² YRI		
	N	% ± EP	N	% ± EP	χ^2 ; p	N	% ± EP	N	% ± EP	χ^2 ; p
AA	30	0,300 ± 0,046	22	0,195 ± 0,027	$\chi^2 = 3,433$ p = 0,179	28	0,459 ± 0,064	87	0,770 ± 0,032	$\chi^2 = 19,312$ p < 0,0001*
AG	48	0,480 ± 0,050	59	0,522 ± 0,035		26	0,426 ± 0,064	24	0,212 ± 0,031	
GG	22	0,220 ± 0,041	32	0,283 ± 0,031		7	0,115 ± 0,040	2	0,018 ± 0,010	
Total	100		113			61		113		
Alelo										
A	108	0,540 ± 0,035	103	0,456 ± 0,024	$\chi^2 = 3,013$ p = 0,083	82	0,672 ± 0,043	198	0,876 ± 0,019	$\chi^2 = 20,967$ p < 0,0001*
G	92	0,460 ± 0,035	123	0,544 ± 0,024		40	0,328 ± 0,043	28	0,124 ± 0,019	
Total	200		226			122		226		

*Diferença estatisticamente significativa. ¹CEU – Norte americanos residentes em Utah com ancestralidade oeste e norte européia. ²YRI – Africanos do grupo étnico Yoruba residentes em Ibadan, Nigéria.

HAPLÓTIPOS DO GENE *RAPH1*

Dos 8 haplótipos possíveis para as combinações dos SNPs avaliados, euro-brasileiros apresentaram 7 (tabela 7), sendo mais frequente a combinação CGC (43,7%). Em afro-brasileiros, foram observados 6 haplótipos, sendo o mais comum CAT (34,9%). O haplótipo TGC não foi observado em afro-brasileiros, e em euro-brasileiros em uma frequência pequena (1,1%). Apenas o haplótipo TGT não foi encontrado em ambas as populações avaliadas, sendo possível que ele seja extremamente raro ou inexistente.

Apenas o haplótipo TAC foi observado apresentando uma frequência estatisticamente diferente entre os grupos étnicos, sendo maior em afro-brasileiros (17,9%) que em euro-brasileiros (5,8%). As frequências dos alelos presentes nesse haplótipo foram avaliadas entre a população africana (YRI) e europeia (CEU). A frequência do alelo T em YRI (39%) é maior que em CEU (12%) para o rs2465520 ($p < 0,0001$); a frequência do alelo A em YRI (87,6%) foi maior que em CEU (45,5%) para o rs3814365, ($p < 0,0001$) e o alelo C é mais comum em YRI (76,7%) que em CEU (60,8%) para o rs2246118, ($p = 0,008$). Estas avaliações mostram que os alelos presentes nesse haplótipos mais comum em afro-brasileiros que em euro-brasileiros, são mais frequentes na população africana (YRI) que europeia (CEU), mostrando a contribuição africana da população afro-brasileira, como esperado, considerando que a composição genética de uma população está intimamente relacionada às variantes alélicas presentes nas populações fundadoras.

Ao avaliar o alinhamento dos nucleotídeos do exon 17 e íntron 6 do gene *RAPH1* entre sequências ortólogas de três espécies de primatas (*Pan paniscus*, *Gorilla gorilla gorilla*, *Pongo pygmaeus*), foi observado que o alelo ancestral para o SNP rs2465520 é C, para o rs3814365 é o alelo A, enquanto para rs2246118 é o alelo T. A amostra da população afro-brasileira apresenta no haplótipo mais frequente (CAT = 34,9%) os alelos ancestrais, o que corrobora com a hipótese de que haplótipos mais frequentes são provavelmente os mais antigos.

DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS SNPs DO GENE RAPH1 ESTUDADOS

Através do programa Haploview (Barrett et al., 2005), que utiliza dados do Hapmap, foi possível observar valores de DL entre os SNPs rs3814365 e rs2465520 ($D' = 0,49$, Figura 5 A) na população europeia (CEU) e na população africana (YRI), ($D' = 1$, figura 5, B). Os valores de DL observados no presente trabalho e os gerados pelo Haploview indicam que o DL entre rs3814365 e rs2465520 deve ser mais forte nas populações de origem africana (afro-brasileira e YRI) que de origem europeia (euro-brasileiros e CEU), pois apenas se aproximou da significância em euro-brasileiros e, em CEU, foi a metade do valor (D') observado em YRI. O Hapmap apresenta os dados para o SNP rs2246118 em um banco de dados separado dos outros dois avaliados neste trabalho, devido a isso, não puderam ser realizadas avaliações de DL entre este SNP e os demais na população europeia (CEU) e na população africana (YRI), através do Haploview, porém, os dados do presente trabalho indicam que há DL entre os SNPs rs3814365 e rs2246118 em afro-brasileiros e euro-brasileiros e entre rs2465520 e rs2246118 apenas em afro-brasileiros.

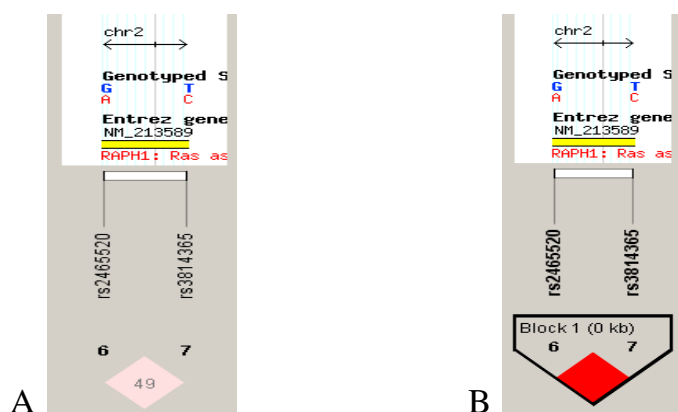


Figura 5. Valor de desequilíbrio de ligação relativo (D'), entre os SNPs estudados gerados através do programa Haploview. Figura A, indica valor de D' entre os SNPs na população europeia (CEU). Figura B, indica valor de D' entre os SNPs na população africana (YRI).

FREQUÊNCIA DOS SNPs DO GENE RAPH1 ESTUDADOS EM DIFERENTES POPULAÇÕES

A comparação entre as frequências alélicas e genóticas em diferentes populações pode trazer indícios sobre a origem do alelo, por exemplo, um alelo que esteja presente apenas em populações de origem africana sugere que a mutação surgiu na África depois da saída do *H. sapiens* deste continente. Para avaliar a distribuição das frequências dos SNPs estudados em diferentes populações, foram coletados dados do NCBI da população: chinesa (HCB: Chineses do grupo étnico Han residentes em Pequim); japonesa, (JPT: Japoneses residentes em Tóquio, Japão); africana (YRI: Africanos do grupo étnico Yoruba residentes em Ibadan) e europeia (CEU: Norte Americanos de descendência oeste e norte europeia), esses dados podem ser observados na tabela 8. A avaliação desses dados indica que a provável origem dos alelos dos SNPs estudados é africana, pois a população YRI apresenta todos eles. Além disso, a ampla distribuição geográfica observada, considerando que todas as populações avaliadas apresentam os três SNPs, indica que as mutações são antigas.

Tabela 8. Frequências alélicas e genotípicas dos SNPs do gene *RAPH1* estudados em diferentes populações.

		EB	AB	CEU	HCB	JPT	YRI
		<hr/>					
		rs2465520					
	N	95	56	113	43	86	113
Frequência	<i>CC</i>	0,779	0,625	0,796	0,814	0,872	0,381
Genotípica	<i>CT</i>	0,211	0,375	0,177	-	0,105	0,442
	<i>TT</i>	0,010		0,027	0,186	0,023	0,177
	H-W	0,784	0,084	0,200	1,00	0,020	0,439
Frequência	<i>C</i>	0,884	0,812	0,885	0,907	0,924	0,602
Alélica	<i>T</i>	0,116	0,188	0,115	0,093	0,076	0,398
		<hr/>					
		rs3814365					
	N	100	61	113	43	85	113
Frequência	<i>AA</i>	0,300	0,459	0,195	0,465	0,471	0,770
Genotípica	<i>AG</i>	0,480	0,426	0,522	0,395	0,459	0,212
	<i>GG</i>	0,220	0,115	0,283	0,140	0,071	0,018
	H-W	0,735	0,797	0,584	0,479	0,403	1,000
Frequência	<i>A</i>	0,540	0,672	0,456	0,663	0,700	0,876
Alélica	<i>G</i>	0,460	0,328	0,544	0,337	0,300	0,124

Continua

		EB	AB	CEU	HCB	JPT	YRI
rs2246118							
	N	100	66	60	45	45	60
Frequência	<i>TT</i>	0,200	0,197	0,133	0,422	0,333	0,017
Genotípica	<i>CT</i>	0,470	0,409	0,517	0,356	0,511	0,433
	<i>CC</i>	0,330	0,394	0,350	0,222	0,156	0,550
	H-W	0,661	0,227	0,527	1,000	0,752	0,150
Frequência	<i>T</i>	0,435	0,402	0,392	0,600	0,589	0,233
Alélica	<i>C</i>	0,565	0,598	0,608	0,400	0,411	0,767

Colunas em branco indicam que não há informação disponível.

EB: Brasileiros de descendência europeia - presente estudo;

AB: Brasileiros de descendência africana - presente estudo;

CEU: Norte Americanos de descendência oeste e norte europeia (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>);

HCB: Chineses do grupo étnico Han residentes em Pequim, China (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>);

JPT: Japoneses residentes em Tóquio, Japão (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>);

YRI: Africanos do grupo étnico Yoruba residentes em Ibadan, Nigéria (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

CONSERVAÇÃO DOS EXONS DO GENE *RAPH1*

Os resultados obtidos com as genotipagens nos exons 17 e 4 do gene *RAPH1* mostraram a presença de poucos SNPs ocorrendo nestas regiões. Para avaliar melhor esta questão, os dados disponíveis do NCBI e Hapmap foram utilizados para buscar possíveis SNPs que estivessem ocorrendo nas regiões codificadoras do gene. A pesquisa mostrou que não há descrição de polimorfismos que levem a uma variação não sinônima ocorrendo nos exons. Estavam descritos apenas 4 polimorfismos (um no exon 8 e três no exon 17), todos levando a variações sinônimas.

Através da ferramenta BLAST no NCBI (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) foram observados valores de homologia, baseados na comparação de sequências de DNA complementar (cDNA) e aminoácidos, de várias espécies. Estes valores observados entre *H. sapiens* e outras 9 espécies (*Pan paniscus*, *Pan troglodytes*, *Gorilla gorilla gorilla*, *Pongo abelii*, *Macaca mulatta*, *Equus caballus*, *Canis lupus familiaris*, *Felis catus*, *Mus musculus*), indicam identidade de 99% a 84% para os nucleotídeos presentes nos exons do gene *RAPH1* e de 99% a 90% para os aminoácidos da Ldp. Ao avaliar os valores de homologia entre os mesmo organismos para o gene *BCHE* obteve-se 99% a 80% de identidade de nucleotídeos e aminoácidos. NUNES (2007) observou valores semelhantes entre a região codificadora do gene *BCHE* em *M. musculus* e *H. sapiens* (81,1% para nucleotídeos e 80,8% para aminoácidos). O gene *BCHE* apresenta quatro variantes com frequência $\geq 1\%$, que levam à mudança de aminoácido (*A539T*, *D70G* e *E255D*), sendo que na população euro-brasileira (semelhante à do presente trabalho) apresentam frequências iguais a: *A539T*: 18%; *D70G*: 2% e *E255D*: 1% (Mikami et al., 2008). Os valores de identidade obtidos indicando uma maior homologia entre as sequências avaliadas para o gene *RAPH1* que para o gene *BCHE* e, o fato do gene *BCHE* apresentar variações não sinônimas enquanto *RAPH1* apenas sinônimas, sugerem que a região codificadora do gene *RAPH1* apresenta-se mais conservada.

Os valores de identidade observados acima contemplam apenas a região codificadora do gene *RAPH1*. Para realizar o alinhamento global do gene *RAPH1*, foi utilizada a ferramenta computacional VISTA Browser (FRAZER et al., 2004) que identifica sequências conservadas, registrando através de picos, os casos com mais de

50% de identidade. A figura 6 mostra o resultado obtido após o uso dessa ferramenta. Todos os exons (picos azuis) aparecem bem conservados nas quatro espécies (1 - *Pan troglodytes*, 2 - *Macaca Mulatta*, 3 - *Bos taurus* e 4 - *Mus musculus*) quando comparados com *H. sapiens*. Um maior grau de conservação é esperado em regiões transcritas, devido à ação da seleção purificadora, enquanto um menor grau em regiões não codificadoras devido a um relaxamento da seleção (GRAUR et al., 1999). Na região não codificadora do gene *RAPH1* apareceram conservadas principalmente as sequências dos limites dos íntrons. A conservação de sequências que flanqueiam os íntrons está relacionada com seu envolvimento na regulação do processamento do pré-mRNA (AST, 2004).

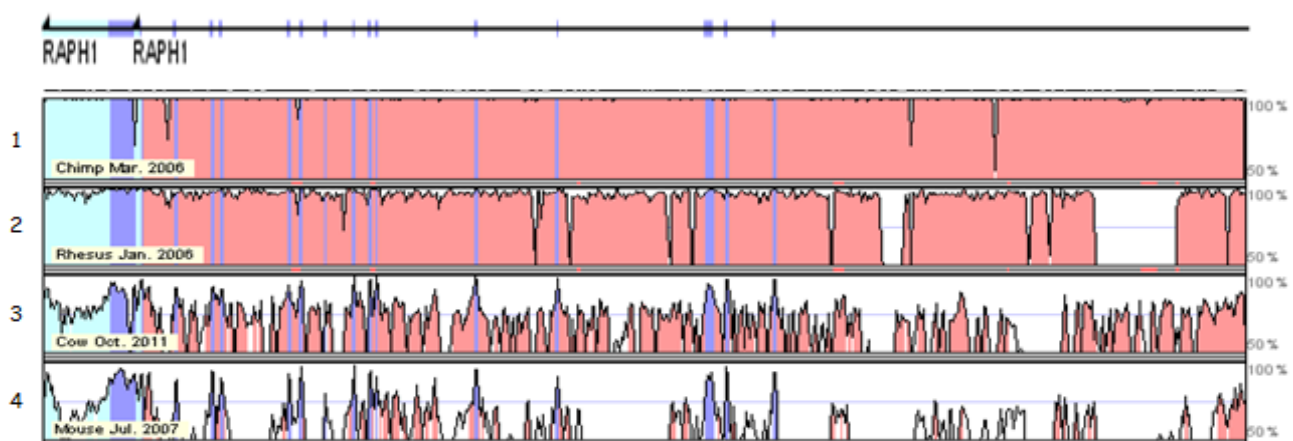


Figura 6. Comparação da conservação genômica do gene *RAPH1* entre *H. sapiens* e outras 4 espécies. Os picos indicam conservação maior que 50%. Os picos em azul escuro representam as regiões dos exons, os picos em azul claro representam as regiões UTR e os picos em vermelho representam as regiões não codificadoras. O gene *RAPH1* está representado no sentido de leitura no cromossomo da direita para a esquerda.

Os resultados da avaliação da variabilidade do gene *RAPH1*, obtidos no presente trabalho, indicam que a região codificadora do gene deve estar sobre pressão seletiva, pois apresenta pouca variação e está conservada entre diferentes espécies. É possível supor que esta região seria mais restrita a aceitar alterações de nucleotídeos, pois, as mutações afetariam a função da Lpd, sendo eliminadas por seleção purificadora devido ao seu efeito deletério.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Polimorfismos e Ligação do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná. Ao apoio financeiro da Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

BIBLIOGRAFIA

- AST, G. How did alternative splicing evolve? **Nature**. v. 5, p. 773-782, 2004.
- AYRES M, AYRES JR M, AYRES DL, SANTOS AAS. BioEstat 5.0. Aplicações Estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas (software), 2007.
- BARRETT, J.C., FRY, B., MALLER, J., DALY, M. J., Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. **Bioinformatics**. v.2 p. 263-5, 2005.
- BRAUN-PRADO, K.; MION, A. L. V.; PEREIRA, N. F.; CULPI, L.; PETZL-ERLER, M. L. HLA class I polymorphism, as characterised by PCR-SSOP, in a Brazilian exogamic population. **Tissue Antigens**, v.56, p.417-427, 2000.
- CHANG, C., ADLER, C. E., KRAUSE, M., CLARK, S. G., GERTLER, F. B., LAVIGNE, M T., E BARGMANN, C. I. MIG-10/Lamellipodin and AGE-1/PI3K Promote Axon Guidance and Outgrowth in Response to Slit and Netrin. **Current Biology**. v.16, p. 854–862, 2006.
- DAHL, E., SADR-NABAVI, A., KLOPOCKI, E., BETZ, B., GRUBE, S., KREUTZFELD, R. Systematic identification and molecular characterization of genes differentially expressed in breast and ovarian cancer. **J. of Pathol.**, v. 205p. 21–28, 2005.
- EPPERT, K.; WUNDER, J. S.; ANELIUNAS, V.; TSUI, L.; STEPHEN, W. S. E ANDRULIS L. Altered expression and deletion of *RMO1* in osteosarcoma. **Int. J. Câncer**. v. 114, p. 738–746, 2005.
- FRAZER KA, PACHTER L, POLIAKOV A, RUBIN EM, DUBCHAK I. VISTA: computational tools for comparative genomics. **Nucleic. Acids. Res.** p.273-9, 2004.
- GRAUR D.; LI, W.H; **Fundamentals of molecular evolution**. Sunderland: Sinauer, v. 2, p.67-163,1999.

- GUO, S.W.; THOMPSON, E.A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiples alleles. **Biometrics**, v.48, p.361-372, 1992.
- Hall, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser.** v. 41, p.95-98, 1999.
- INTERNATIONAL HAPMAP PROJECT (HAPMAP). Disponível em: <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>
- KRAUSE, M., BEAR, J. E., LOUREIRO, J. J., AND GERTLER F. G. The Ena/VASP enigma. **Journal of Cell Science** v. 115, p. 4721-4726, 2002.
- KRAUSE, M., LESLIE, J. D., STEWART, M., LAFUENTE, E.M., VALDERRAMA, F., JAGANNATHAN, R., STRASSER, G.A., RUBINSON, D.A., LIU, H., WAY, M. Lamellipodin, an Ena/VASP ligand, is implicated in the regulation of lamellipodial dynamics. **Dev. Cell** v. 7, p. 571–583, 2004.
- LAFUENTE, E.M; PUIJENBROEK, A.A.F.L; KRAUSE, M.; CARMAN, C.V. RIAM, an Ena/VASP and Profilin Ligand, Interacts with Rap1-GTP and mediates Rap1. Induced Adhesion. **Dev Cell**, v. 7, p. 585-595, 2004.
- LAHIRI DK, NURNBERGER JR JL. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Res** v. 19, p. 5444, 1991.
- LEE, H. S., LIM, C. J., MCLAUGHLIN, W. P., SHATTIL, S. J., e GINSBERG, M. H. RIAM Activates Integrins by Linking Talin to Ras GTPase Membrane-targeting Sequences. **The journal of biological chemistry**, v.284, p. 5119–5127, 2009.
- LI, HE; SCHOPFER, L. M. ; MASSON, P.; LOCKRIDGE, O. Lamellipodin proline rich peptides associated with native plasma butyrylcholinesterase tetramers. v. 411, p. 425-432, 2008.
- LYULCHEVA, E., TAYLOR, E., MICHAEL, M., VEHLow, A., TAN, S., FLETCHER, A., KRAUSE, M., E BENNETT, E. Drosophila Pico and Its Mammalian Ortholog Lamellipodin Activate Serum Response Factor and Promote Cell Proliferation. **Developmental Cell**. v. 15 p. 680–690, 2008.
- MICHAEL, M., VEHLow, A., NAVARRO, C., E KRAUSE, M. c-Abl, Lamellipodin, and Ena/VASP Proteins Cooperate in Dorsal Ruffling of Fibroblasts and Axonal Morphogenesis. **Curr Biol**. v. 20, p. 783–791, 2010.

- MIKAMI, L. R.; WIESELER, S.; SOUZA, L.R. L.; SCHOPFER, L. M.; NACHON, F.; LOCKRIDGE, O. e CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. Five new naturally occurring mutations of the BCHE gene and frequencies of 12 butyrylcholinesterase alleles in a Brazilian population. **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 18, p. 213–218, 2008.
- NAGASE, T.; KIKUNO, R.; HATTORI, A., KONDO, Y., OKUMURA, K E OHARA, O. Prediction of the Coding Sequences of Unidentified Human Genes. The complete Sequences of 100 New cDNA Clones from Brain Which Code for Large Proteins *in vitro*. **DNA Research** v. 7, p. 347-355, 2000.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- QUINN, C. C. PFEIL, D.S., CHEN, E., STOVALL, E.L., HARDEN, M. V., GAVIN, M. K., FORRESTER, W. C., RYDER, E. F., SOTO, M E WADSWORTH W. G. UNC-6/netrin and SLT-1/slit guidance cues orient axon outgrowth mediated by MIG-10/RIAM/lamellipodin. **Current. Biol.** v.16, p. 845–853, 2006.
- QUINN, C. C., E WADSWORTH, E W. Axon guidance: asymmetric signaling orients polarized outgrowth. **Cell Press.** v.18, 590-603, 2008.
- RYCHLIK W. Selection of primers for polymerase chain reaction. **Mol. Biotech.** v.3, p. 129-134, 1995.
- SALZANO, F. M. and FREIRE-MAIA, N. **Problems in Humam Biology. A study of Brazilian populations.** Wayne State University Press, p.41-42, 1970.
- SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D. E EXCOFFIER, L. **Arlequin ver. 2.000: A software for population genetics data analysis.** Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland, 2000.
- SMALL, V. J., STRADAL, T., VIGNAL, T., E ROTTNER, K. The lamellipodium: where motility begins. **Trends in Cell Biology**, v. 12, p. 112-120, 2002.

5. MANUSCRITO DO ARTIGO CIENTÍFICO - ASSOCIAÇÃO ENTRE HAPLÓTIPOS DO GENE *RAPH1* E FENÓTIPOS DO LOCO *CHE2*

Resumo. A butirilcolinesterase (BChE) é uma esterase sérica que utiliza como substrato preferencial a butirilcolina, sua variabilidade genética é condicionada por alelos do loco *BCHE* (3q26.1-q26.2) e *CHE2* (2q33-35). A interação entre o produto destes genes dá origem aos fenótipos CHE2 C5+ e CHE2 C5-, responsáveis respectivamente pela presença e ausência da banda C₅. Diversos trabalhos buscaram identificar a natureza molecular do transcrito do loco *CHE2*, no entanto os resultados não responderam completamente esta questão. A hipótese de que o loco *CHE2* é o gene *RAPH1*, que codifica a Lamelipodina (Lpd), vem da coincidente posição cromossômica (2q33) e da relação observada entre peptídeos ricos em prolina da Lpd e o tetrâmero da BChE. O presente estudo avaliou três SNPs do gene *RAPH1* em 34 indivíduos CHE2 C5+ e 92 CHE2 C5- buscando por associação entre estes SNPs e o fenótipo CHE2 C5+. Os resultados mostraram associação de dois haplótipos ao fenótipo CHE2 C5+. Quando estas amostras foram classificadas de acordo com a intensidade da banda C₅, as avaliações mostraram associação entre haplótipos do *RAPH1* e os fenótipos CHE2 C5+ forte e fraco. A atividade da BChE também foi avaliada, e apresentou-se maior em indivíduos do fenótipo forte que em fraco. Os resultados obtidos no presente estudo corroboram a hipótese de que o gene *RAPH1* possa ser o loco *CHE2* e sugerem que a expressividade variável observada no fenótipo CHE2 C5+ é resultado, também, da heterogeneidade genética da banda, que leva a uma maior atividade da BChE apenas nos indivíduos CHE2 C5+ forte.

Palavas-chave: gene *BCHE*, butirilcolinesterase, loco *CHE2*, gene *RAPH1*, *lamelipodina*.

Abstract: The butyrylcholinesterase (BChE) is a serum esterase that uses butyrylcholine as preferential substrate, their genetic variability is conditioned by alleles of *BCHE* (3q26.1-q26.2) and *CHE2* (2q33-35) loci. The interaction between the product of these genes leads to CHE2 C5 + and CHE2 C5- phenotypes, responsible respectively for the presence and absence of C₅ band. Several studies attempted to

identify the CHE2 locus transcript molecular nature, however the results did not answer this question completely. The hypothesis that the CHE2 locus is the *RAPH1* gene, which encodes Lamellipodin (Lpd), comes from the coincident chromosomal position (2q33) and the observed relationship between the proline-rich Lpd peptides and BChE tetramer. This study evaluated three SNPs in *RAPH1* gene in 34 CHE2 C5 + individuals and 92 CHE2 C5-, looking for association between these SNPs and the CHE2 C5 + phenotype. The results showed association of two haplotypes with CHE2 C5 + phenotype. When these samples were classified according to the intensity of C₅ band, evaluations showed association between *RAPH1* haplotypes and intense and faint CHE2 C5 + phenotypes. BChE activity was also evaluated, and was higher in intense CHE2 C5 + phenotype than in faint CHE2 C5 +. The results obtained in this study corroborate the hypothesis that the *RAPH1* gene is the *CHE2* locus and suggest that the variable expressivity observed in the CHE2 C5 + phenotype is a result, also, of the genetic heterogeneity of C₅ band, which leads to increased BChE activity only in strong CHE2 C5+ individuals.

Keywords: *BCHE* gene, butyrylcholinesterase, *CHE2* locus, *RAPH1* gene, lamellipodin.

INTRODUÇÃO

A butirilcolinesterase (BChE; EC 3.1.1.8) é uma esterase sérica que hidrolisa diversos ésteres de colina e utiliza a butirilcolina como substrato preferencial. A BChE é sintetizada pelas células hepáticas e amplamente distribuída no organismo. Sua função fisiológica, bem como seu substrato natural, não foram completamente esclarecidos, no entanto a BChE já foi associada a lípidos, lipoproteínas, peso, índice de massa corporal (IMC) e obesidade (KÁLMÁN et al., 2004; KUTTY e PAYNE, 1994; STUEBER-ODEBRECHT et al., 1985; SOUZA et al., 2005, ALCÂNTARA et al., 2003 e FURTADO-ALLE et al., 2008, respectivamente).

O gene *BCHE* está localizado no braço longo do cromossomo três (3q26.1-q26.2; SOREQ et al., 1987; ALLDERDICE et al., 1991; GAUGHAN et al., 1991), e apresenta 4 exons (ARPAGAUS et al. 1990).

A variabilidade da BChE é condicionada por alelos do loco *BCHE* (3q26.1-q26.2) e *CHE2* (2q33-35). A interação entre o produto destes genes dá origem aos fenótipos CHE2 C5+ e CHE2 C5-, responsáveis respectivamente pela presença e ausência da banda C₅ detectada em eletroforese, cujo padrão de herança foi proposto por como sendo autossômico dominante (HARRIS et al., 1962). A frequência do fenótipo CHE2 C5+ observado por CHAUTARD-FREIRE-MAIA et al. (1991) em amostra da população de Curitiba foi de 10,3% e a frequência do alelo *CHE2** C5+ apresenta-se geralmente em torno de 5%. O fenótipo CHE2 C5+ apresenta atividade enzimática superior (HARRIS, 1970; PRIMO-PARMO et al., 1986; SUGIMORI, 1986) e média de peso e IMC menores à observada para o fenótipo CHE2 C5- (CHAUTARD-FREIRE-MAIA et al., 1991 ALCÂNTARA et al., 2001).

Diversos trabalhos buscaram identificar a natureza molecular do transcrito do loco *CHE2*, estes resultados descartaram várias proteínas candidatas, mas não responderam completamente esta questão (SCOTT e POWERS 1974, MASSON, 1991). O trabalho realizado por LI et al. 2008, levantou a hipótese de que o gene *RAPH1* é loco *CHE2*. A autora observou que o gene que codifica a proteína desconhecida presente no complexo C₅ em indivíduos CHE2 C5+ (*CHE2*; 2q33-35; EIBERG et al., 1989), está localizado na mesma posição cromossômica do gene que codifica a lamelipodina (*RAPH1*; 2q33, NCBI). Se o gene *RAPH1* é o loco *CHE2*, então a presença da Lpd com tamanho maior que a observada em relação à que se liga a C₄ no fenótipo CHE2 C5- pode indicar o mau funcionamento de alguma protease no fígado. Outra evidência que reforça esta hipótese, vem do trabalho de BENYAMIN et al. (2011). Os autores realizaram um trabalho de associação utilizando SNPs distribuídos em todo genoma (*genome-wide*) para descobrir variantes genéticas que poderiam estar afetando a atividade da BChE. Além de SNPS dentro do próprio gene *BCHE*, foram observados SNPs em regiões distantes do gene. Um destes SNPs está presente no gene *ABI2*, a montante do *RAPH1*. Os autores sugeriram que a associação observada seria devido a uma variação presente no gene *RAPH1*, já que o gene *ABI* não apresenta nenhuma relação aparente com a BChE.

A lamelipodina (Lpd) é uma proteína de aproximadamente 200KDa, altamente expressa no cérebro, ovário, fígado e embrião (Krause et al. 2004) codificada pelo

gene *RAPH1* (2q33; *Ras association (RalGDS/AF-6) and pleckstrin homology domains 1*). A principal função da Lpd é o recrutamento de proteínas Ena/VASP, através de interações entre o domínio EVH1 e o motivo FPPPP, (sequência rica em prolina) na região C-terminal da Lpd, para a borda da célula (Krause et al. 2004). A proteína Lpd atua modulação da montagem do citoesqueleto de actina através das proteínas Ena/VASP, estando intimamente relacionadas com a protrusão lamelipodial e a motilidade celular. (LAFUENTE *et al.*, 2004; KRAUSE *et al.*, 2004),

Considerando os dados da literatura indicando que o loco *CHE2* é o gene *RAPH1*, o presente estudo tem por objetivo avaliar esta hipótese, através da genotipagem de SNPs do gene *RAPH1* em indivíduos de fenótipo CHE2 C5+ e CHE2 C5- buscando por associação entre estes SNPs e o fenótipo CHE2 C5+.

MATERIAIS E MÉTODOS*

Amostra. Foram avaliadas 126 amostras de euro-brasileiros doadores de sangue do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (HEMEPAR), sendo: 92 indivíduos do fenótipo CHE2 C5-, todos do sexo masculino e com média de idade de 28,76 anos e, 34 do fenótipo CHE2 C5+, sendo, 33 indivíduos do sexo masculino e com média de idade de 25,94 anos e 1 indivíduo do sexo feminino com 37 anos. Dos indivíduos CHE2 C5+, 16 pertencem ao fenótipo CHE2 C5+ forte e 18 ao CHE2 C5+ fraco.

Genotipagem por PCR-SSCA. As genotipagens para SNP rs2465520 foram realizadas através da técnica de PCR-SSCA (*polymerase chain reaction - single strand conformational analysis*), que consiste na amplificação de uma sequência de DNA, através de PCR e posterior desnaturação do produto amplificado que é, então, submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida para a análise de conformação de DNA em fita simples. O mix para amplificação dos fragmentos do gene *RAPH1*, contém: 9 µl de Supermix (Invitrogen), 1 µl de DNA genômico (100ng/ µl) e 10 pmoles de cada iniciador.

Genotipagem por TaqMan. Os SNPs rs3814365 e rs2246118 foram genotipados por *TaqMan*, utilizando Kits de Genotipagem TaqMan SNP (Applied Biosystems). A reação de PCR em tempo real foi realizada no aparelho Mastercycler Realplex 2

(Eppendorf). Para a análise de cada um dos SNPs o mix de reação continha: 5,0µl de TaqMan Universal PCR Master Mix, 0,5µl do Kit de Genotipagem TaqMan SNP específico, 2,5µl de água ultra-pura e 2µl do DNA (20ng/µl).

Determinação da atividade da BChE. Para a determinação da atividade da BChE foi utilizada a técnica de Dietz *et al.* (1972), modificada por Evans e Wroe (1978), cujo princípio é a hidrólise da propioniltiocolina pela butirilcolinesterase, produzindo ácido propiônico e tiocolina, que reage com o DTNB (ácido 5,5'-bisditio-2-nitrobenzóico), gerando 5-tio-2-nitrobenzoato de coloração amarela. A atividade é mensurada KU/L em espectrofotômetro ajustado em 410 nm e com todos os reagentes mantidos em banho-maria a 25°C.

Fenotipagem do loco CHE2. Para a fenotipagem do loco *CHE2* foi utilizada a técnica desenvolvida por Robinson *et al.* (1957) para fenotipagem de variantes da hemoglobina, posteriormente modificada por Van Ros e Vervoort (1973) para aplicação à BChE e com adaptações subsequentes de Fadel-Picheth (1991) e Souza (1995).

Avaliação da Intensidade da banda C₅ em gel de Ágar. As amostras do grupo CHE2 C₅⁺ foram selecionadas após a avaliação da intensidade da banda C₅⁺ através do programa *KODAK1D Image Analysis Software*. Como a coloração do gel e a cópia em *scanner* podem variar de um gel para outro, os valores de intensidade foram corrigidos dividindo-os pelo valor de intensidade média das bandas C₅⁺ controles de cada gel. Com isso, cada valor passou a ser uma porcentagem do quanto a banda avaliada representava do valor médio de C₅⁺ controle. Foram considerados como tendo o fenótipo CHE2 C₅⁺ os indivíduos que possuíam banda C₅⁺ com valores de intensidade maiores que 20% do valor médio dos controles C₅⁺. Esse valor foi estipulado, uma vez que o registro de valores de intensidade $\leq 0,2$ correspondiam a bandas que não eram percebidas visualmente no gel e $> 0,2$ eram de possível visualização. Além disso, quando os valores eram observados em ordem crescente em um gráfico, observou-se uma queda entre as intensidades de 0,2 e 0,3. As amostras com intensidade $\leq 0,2$ não foram incluídas neste trabalho.

Classificação do fenótipo CHE2 C₅⁺ em forte e fraco. Os valores de intensidade da banda C₅ maiores ou iguais a 70% do valor médio dos controles CHE2

C5+, foram classificados como fenótipo CHE2 C5+ forte e valores menores ou iguais a 0,69 foram classificados como fenótipo CHE2 C5+ fraco. Esse valor foi estipulado, uma vez que o registro de valores de intensidade $\geq 0,7$ correspondiam a bandas visualmente mais fortes no gel, além disso, quando os valores eram observados em ordem crescente em um gráfico, observou-se uma queda entre as intensidades de 0,6 e 0,7.

Análise Estatística. As frequências alélicas e genóticas foram realizadas por contagem direta do número de cromossomos e de indivíduos, respectivamente, e comparadas entre os grupos étnicos através do teste do qui-quadrado com o uso do programa BioEstat versão 5.0 (Ayres et al., 2007). O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi verificado através do programa Arlequin 3.11 (SCHNEIDER et al., 2000) de acordo com o teste de GUO E THOMPSON (1992). O valor de probabilidade (p) para as avaliações de desequilíbrio de ligação também foi estimado pelo programa Arlequin 3.11 (SCHNEIDER et al., 2000). A inferência da fase haplotípica foi obtida a partir dos dados das frequências genóticas observadas, baseada no método de máxima verossimilhança do programa Arlequin 3.11 (SCHNEIDER et al., 2000). O valor da probabilidade para os testes comparativos significativos considerou $p < 0,05$. *Ver Detalhes da Metodologia no Apêndice 2.

RESULTADOS

GENOTIPAGEM DE SNPS DO GENE RAPH1 EM INDIVÍDUOS DO FENÓTIPO CHE2 C5+ E CHE2 C5-

Foram genotipados 92 indivíduos do fenótipo CHE2 C5- e 34 CHE2 C5+ para três polimorfismos presentes no gene *RAPH1*: o SNP rs2246118, rs3814365 e rs2465520. As frequências genóticas e alélicas, bem como a comparação dessas frequências entre os grupos amostrais, para cada uma das variantes avaliadas podem ser observadas, respectivamente, nas tabelas 1, 2 e 3. Para os três SNPs, as frequências genóticas encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg, tanto no grupo CHE2 C5- quanto no CHE2 C5+, e as comparações das frequências alélicas e genóticas entre estes grupos não mostrou diferença estatisticamente significativa. As frequências

genóticas também foram calculadas com os genótipos homocigoto/heterocigoto agrupados, para se testar o possível efeito dominante de um dos alelos sobre o outro. Para estas avaliações as frequências observadas entre os grupos, nos três SNPs, não apresentou diferença estatisticamente significativa.

Tabela1. Número de indivíduos genotipados para o SNP rs3814365, suas frequências alélicas e genotípicas bem como a comparação dessas frequências (χ^2 ; p) entre os grupos CHE2 C5+ e CHE2 C5-.

Genótipo	CHE2 C5+			CHE2 C5-		
	N	Frequência \pm EP	Hardy-Weinberg	N	Frequência \pm EP	Hardy-Weinberg
AA	8	0,235 \pm 0,072	$\chi^2 = 0,105$; p = 0,746	29	0,315 \pm 0,048	$\chi^2 = 0,985$; p = 0,321
AG	16	0,471 \pm 0,085		41	0,446 \pm 0,051	
GG	10	0,294 \pm 0,078		22	0,239 \pm 0,044	
Total	34			92		
$\chi^2 = 0,870$; p = 0,647						
Alelo						
A	32	0,471 \pm 0,060		99	0,538 \pm 0,036	
G	36	0,529 \pm 0,060		85	0,462 \pm 0,036	
Total	68			184		
$\chi^2 = 0,905$; p = 0,341						
AA	8	0,235 \pm 0,073		29	0,315 \pm 0,048	
AG+GG	26	0,765 \pm 0,073		63	0,685 \pm 0,048	
Total	34			92		
$\chi^2 = 0,706$; p = 0,401						

Tabela 2. Número de indivíduos genotipados para o SNP rs2465520 suas frequências alélicas e genotípicas bem como a comparação dessas frequências (χ^2 ; p) entre os grupos CHE2 C5+ e CHE2 C5-.

Genótipo	CHE2 C5+			CHE2 C5-		
	N	Frequência \pm EP	Hardy-Weinberg	¹ N	Frequência \pm EP	Hardy-Weinberg
<i>CC</i>	25	0,893 \pm 0,058	$\chi^2 = 0,089$; p = 0,764	67	0,770 \pm 0,045	$\chi^2 = 0,073$; p = 0,787
<i>CT</i>	3	0,107 \pm 0,058		19	0,218 \pm 0,044	
<i>TT</i>				1	0,011 \pm 0,011	
Total	28			87		
$\chi^2 = 2,091$; p = 0,351						
Alelo						
<i>C</i>	53	0,946 \pm 0,030		153	0,879 \pm 0,025	
<i>T</i>	3	0,054 \pm 0,030		21	0,121 \pm 0,025	
Total	56			174		
$\chi^2 = 2,042$; p = 0,153						
<i>CC</i>	25	0,893 \pm 0,058		67	0,770 \pm 0,045	
<i>CT+TT</i>	3	0,107 \pm 0,058		20	0,230 \pm 0,045	
Total						
$\chi^2 = 1,995$; p = 0,158						

Tabela 3. Número de indivíduos genotipados para o SNP rs2246118, suas frequências alélicas e genotípicas bem como a comparação dessas frequências (χ^2 ; p) entre os grupos CHE2 C5+ e CHE2 C5-.

Genótipo	CHE2 C5+			CHE2 C5-		
	N	Frequência \pm EP	Hardy-Weinberg	N	Frequência \pm EP	Hardy-Weinberg
<i>TT</i>	6	0,176 \pm 0,065	$\chi^2 = 1,073$; p = 0,300	20	0,217 \pm 0,043	$\chi^2 = 0,844$; p = 0,358
<i>CT</i>	13	0,382 \pm 0,083		41	0,446 \pm 0,052	
<i>CC</i>	15	0,441 \pm 0,085		31	0,337 \pm 0,049	
Total	34			92		
$\chi^2 = 1,172$; p = 0,556						
Alelo						
<i>T</i>	25	0,368 \pm 0,058		81	0,440 \pm 0,037	
<i>C</i>	43	0,632 \pm 0,058		103	0,560 \pm 0,037	
Total	68			184		
$\chi^2 = 1,073$; p = 0,300						
<i>TT+CT</i>	19	0,559 \pm 0,085		61	0,663 \pm 0,049	
<i>CC</i>	15	0,441 \pm 0,085		31	0,337 \pm 0,049	
Total	34			92		
$\chi^2 = 1,163$; p = 0,281						

ESTIMATIVA DE HAPLÓTIPOS PARA OS SNPS ESTUDADOS

Os SNPs utilizados para a inferência dos haplótipos foram ordenados segundo a sua disposição dentro do gene *RAPH1* a partir do centrômero: SNP rs2465520, rs3814365 e rs2246118. As frequências dos haplótipos estimados, com relação aos três SNPs avaliados, no grupo de indivíduos dos fenótipos CHE2 C5+ e CHE2 C5- podem ser observadas na tabela 4. As amostras CHE2 C5+ apresentaram 6 haplótipos enquanto CHE2 C5- apresentou 7. Em ambos os grupos a combinação alélica estimada mais frequente foi CGC com 42,9% em CHE2 C5+ e 43,7% em CHE2 C5-. Após a Correção de Bonferroni foram consideradas diferenças significativas apenas as frequências observadas entre CHE2 C5+ e CHE2 C5- dos haplótipos CAC e CGT.

DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO (DL)

Os resultados dos testes DL entre os SNPs estudados não foram estatisticamente significativos ($p > 0,05$), no grupo de indivíduos CHE2 C5+ ($N = 28$) enquanto no grupo de indivíduos do fenótipo CHE2 C5- ($N = 87$) observou-se resultado significativo entre os SNPs rs3814365 e rs2246118 ($p = 0,000$) e entre os SNPs rs2465520 e rs3814365 um valor estatístico próximo da significância ($p = 0,054$).

Tabela 4. Frequências dos haplótipos estimados e suas comparações (χ^2 ; p) entre os grupos CHE2 C5+ e CHE2 C5-

Haplótipos	CHE2 C5+		CHE2 C5-		χ^2 ; p
	N	%	N	%	
CAC	10	17,9	10	5,7	7,825; 0,005*
CAT	12	21,4	65	37,4	4,826; 0,028
CGC	24	42,9	76	43,7	0,012; 0,914
CGT	7	12,5	2	1,1	11,655; 0,0006*
TGC	0	0	2	1,1	0,649; 0,420
TAT	1	1,8	9	5,2	1,168; 0,279
TAC	2	3,6	10	5,7	0,406; 0,524
Total	56		174		

* Valores estatisticamente significativos

FENÓTIPOS CHE2 C5+ FORTE E FRACO

As amostras do fenótipo CHE2 C5+ foram classificadas como CHE2 C5+forte e CHE2 C5+fraco com base no valor de intensidade da banda C₅ em gel de Agar, obtido pelo programa *KODAK1D Image Analysis Software*. Do total de amostras CHE2 C5+ (N = 34), 16 foram classificadas como CHE2 C5+ forte e 18 como CHE2 C5+ fraco. A figura 1 mostra a reprodução de placas de gel de ágar com amostras do fenótipo CHE2 C5+ forte e CHE2 C5+ fraco.

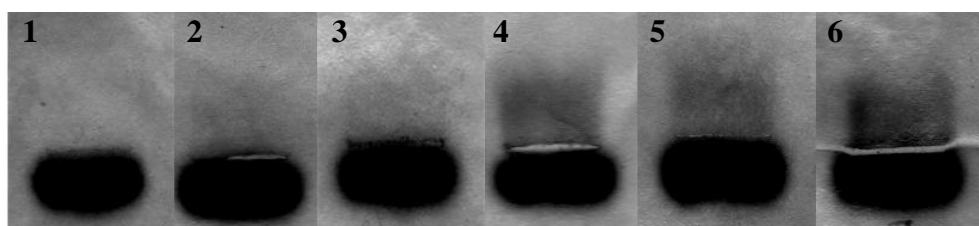


Figura 1. Reprodução de uma placa de gel de ágar 1%, pH 6,2, submetida à eletroforese. Amostra 1: fenótipo CHE2 C5-, amostras 2 e 3 CHE2 C5+ fraco, amostras 4, 5 e 6 fenótipo CHE2 C5+ forte.

VARIANTES DO GENE RAPH1 E FENÓTIPOS CHE2 C5+ FORTE E FRACO

Os indivíduos classificados com os fenótipos CHE2 C5+ forte, CHE2 C5+ fraco e CHE2 C5- foram avaliados quanto às frequências genotípicas e alélicas dos três SNPs do gene *RAPH1*, para os quais as amostras já haviam sido genotipadas (SNP, rs2465520, rs3814365 e rs2246118; Tabelas 5, 6 e 7, respectivamente). As frequências genotípicas encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg nos três grupos fenotípicos avaliados, e as comparações das frequências alélicas e genotípicas entre estes grupos não mostrou diferença estatisticamente significativa. As frequências genotípicas também foram calculadas com os genótipos homocigoto/heterocigoto agrupados, para se testar o possível efeito dominante de um dos alelos sob o outro. Para estas avaliações as frequências observadas entre os grupos, nos três SNPs, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

Tabela 5. Número de indivíduos classificados como CHE2 C5+ forte, CHE2 C5+ fraco e CHE2 C5- para o SNP rs2465520, suas frequências alélicas e genótípicas e a comparação dessas frequências (χ^2 ; p) entre os grupos fenotípicos.

Genótipo	CHE2 C5+ Forte (A)			CHE2 C5+ Fraco (B)			CHE2 C5- (C)			Comparações
	N	Frequência \pm EP	H-W	N	Frequência \pm EP	H-W	N	Frequência \pm EP	H-W	
<i>CC</i>	9	0,818 \pm 0,116	$\chi^2 = 0,11$ p = 0,740	16	0,941 \pm 0,071	$\chi^2 = 0,016$ p = 0,901	67	0,770 \pm 0,045	$\chi^2 = 0,073$; p = 0,787	A x B: - A x C: $\chi^2 = 2,216$; p = 0,897 B x C: $\chi^2 = 2,60$; p = 0,273
<i>CT</i>	2	0,182 \pm 0,116		1	0,059 \pm 0,071		19	0,218 \pm 0,044		
<i>TT</i>	0	-		0			1	0,011 \pm 0,011		
Total	11			17			87			
Alelo										
<i>C</i>	20	0,909 \pm 0,06		33	0,971 \pm 0,029		153	0,879 \pm 0,025		A x B: $\chi^2 = 0,996$; p = 0,318
<i>T</i>	2	0,091 \pm 0,06		1	0,029 \pm 0,029		21	0,121 \pm 0,025		A x C: $\chi^2 = 0,167$; p = 0,683
Total	22			34			174			B x C: $\chi^2 = 2,505$; p = 0,113
Grupos										
<i>CC</i>	9	0,818 \pm 0,116		16	0,941 \pm 0,057		67	0,770 \pm 0,045		A x B: $\chi^2 = 1,06$; p = 0,304
<i>CT+TT</i>	2	0,182 \pm 0,116		1	0,059 \pm 0,057		20	0,230 \pm 0,045		A x C: $\chi^2 = 0,130$; p = 0,719
Total	11			17			87			B x C: $\chi^2 = 2,582$; p = 0,108

Tabela 6. Número de indivíduos classificados como CHE2 C5+ forte, CHE2 C5+ fraco e CHE2 C5- para o SNP rs3814365, suas frequências alélicas e genotípicas e a comparação dessas frequências (χ^2 ; p) entre os grupos fenotípicos.

Genótipo	CHE2 C5+ Forte (A)			CHE2 C5+ Fraco (B)			CHE2 C5- (C)			Comparações
	N	Frequência \pm EP	H-W	N	Frequência \pm EP	H-W	N	Frequência \pm EP	H-W	
AA	2	0,125 \pm 0,081	$\chi^2 = 0,071$ p = 0,790	6	0,333 \pm 0,111	$\chi^2 = 0,18$ p = 0,671	29	0,315 \pm 0,048	$\chi^2 = 0,985$; p = 0,321	A x B: $\chi^2 = 2,29$; p = 0,318 A x C: $\chi^2 = 2,78$; p = 0,249 B x C: $\chi^2 = 0,034$; p = 0,983
AG	8	0,50 \pm 0,125		8	0,445 \pm 0,117		41	0,446 \pm 0,051		
GG	6	0,375 \pm 0,121		4	0,222 \pm 0,098		22	0,239 \pm 0,044		
Total	16			18			92			
Alelo										
A	12	0,375 \pm 0,085		20	0,556 \pm 0,083		99	0,538 \pm 0,036		A x B: $\chi^2 = 2,22$; p = 0,136
G	20	0,625 \pm 0,085		16	0,444 \pm 0,083		85	0,462 \pm 0,036		A x C: $\chi^2 = 2,90$; p = 0,088
Total	32			36			184			B x C: $\chi^2 = 0,037$; p = 0,847
Grupos										
AA	2	0,125 \pm 0,083		6	0,333 \pm 0,111		99	0,315 \pm 0,048		A x B: $\chi^2 = 2,043$; p = 0,153
AG+GG	14	0,875 \pm 0,083		12	0,667 \pm 0,111		85	0,684 \pm 0,048		A x C: $\chi^2 = 2,41$; p = 0,121
Total	16			18			184			B x C: $\chi^2 = 0,023$; p = 0,88

Tabela 7. Número de indivíduos classificados como CHE2 C5+ forte, CHE2 C5+ fraco e CHE2 C5- para o SNP rs2246118, suas frequências alélicas e genotípicas e a comparação dessas frequências (χ^2 ; p) entre os grupos fenotípicos.

Genótipo	CHE2 C5+ Forte (A)			CHE2 C5+ Fraco (B)			CHE2 C5- (C)			Comparações
	N	Frequência \pm EP	H-W	N	Frequência \pm EP	H-W	N	Frequência \pm EP	H-W	
<i>TT</i>	2	0,125 \pm 0,08	$\chi^2 = 0,259$ p = 0,611	4	0,222 \pm 0,098	$\chi^2 = 0,23$ p = 0,891	20	0,217 \pm 0,043	$\chi^2 = 0,844$; p = 0,358	A x B: $\chi^2 = 0,695$; p = 0,706 A x C: $\chi^2 = 1,731$; p = 0,421 B x C: $\chi^2 = 0,23$; p = 0,8912
<i>CT</i>	6	0,375 \pm 0,121		7	0,389 \pm 0,115		41	0,446 \pm 0,052		
<i>CC</i>	8	0,500 \pm 0,125		7	0,389 \pm 0,115		31	0,337 \pm 0,049		
Total	16			18			92			
Alelo										
<i>T</i>	10	0,313 \pm 0,082		15	0,416 \pm 0,082		81	0,440 \pm 0,037		A x B: $\chi^2 = 0,791$; p = 0,374
<i>C</i>	22	0,688 \pm 0,082		21	0,583 \pm 0,082		103	0,560 \pm 0,037		A x C: $\chi^2 = 1,824$; p = 0,177
Total	32			36			184			B x C: $\chi^2 = 0,068$; p = 0,794
Grupos										
<i>TT+CT</i>	8	0,500 \pm 0,125		11	0,611 \pm 0,115		61	0,663 \pm 0,049		A x B: $\chi^2 = 0,424$; p = 0,515
<i>CC</i>	8	0,500 \pm 0,125		7	0,389 \pm 0,115		31	0,337 \pm 0,049		A x C: $\chi^2 = 0,157$; p = 0,210
Total	16			18			92			B x C: $\chi^2 = 0,18$; p = 0,672

ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA BChE

Os valores de média de atividade da BChE foram estimados e avaliados entre os grupos fenotípicos do loco CHE2. Esses resultados podem ser observados na tabela 8.

Tabela 8. Média de atividade da BChE nos indivíduos do fenótipos do loco CHE2, bem como os valores de t referentes às comparações entre esses grupos.

Fenótipo	N	Média ± EP
(A) CHE2 C5+	20	5,09 ± 0,47
(B) CHE2 C5-	40	4,26 ± 0,24
(C) CHE2 C5+ forte	9	5,97 ± 0,83
(D) CHE2 C5+fraco	11	4,37 ± 0,46

A x B: t = 1,744; p = 0,043*
 B x C: t = 2,674; p = 0,005*
 B x D: t = - 0,224; p = 0,412
 C x D: t = 1,772; p = 0,046*

ESTIMATIVA DE HAPLÓTIPOS NOS FENÓTIPOS CHE2 C5+ FORTE E FRACO

As frequências dos haplótipos estimados, com relação aos três SNPs avaliados, no grupo de indivíduos do fenótipo CHE2 C5+ forte, CHE2 C5+ fraco e CHE2 C5- podem ser observadas na tabela 9. Após a Correção de Bonferroni foram consideradas diferenças estatisticamente significativas apenas as frequências observadas entre CHE2 C5+ fraco x CHE2 C5- para o haplótipo CAC e entre CHE2 C5+ forte x CHE2 C5- para o haplótipo CGT.

DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO

Os resultados dos testes de desequilíbrio de ligação entre os SNPs estudados não foram estatisticamente significativos ($p > 0,05$), nos grupos CHE2 C5+ forte e CHE2 C5+ fraco.

Tabela 9. Frequências dos haplótipos estimados e suas comparações (χ^2 ; p) entre os grupos CHE2 C5+ forte, CHE2 C5+ fraco e CHE2 C5-.

Haplótipos	CHE2 C5+ Forte (A)		CHE2 C5+ Fraco (B)		CHE2 C5- (C)		Comparações
	N	%	N	%	N	%	
CAC	2	9,1	8	23,5	10	5,7	A x B: $\chi^2 = 1,898$; p = 0,168 A x C: $\chi^2 = 0,38$; p = 0,538 B x C: $\chi^2 = 11,377$; p = 0,0007*
CAT	3	13,6	10	29,4	65	37,4	A x B: $\chi^2 = 1,865$; p = 0,172 A x C: $\chi^2 = 3,86$; p = 0,049 B x C: $\chi^2 = 0,779$; p = 0,378
CGC	12	54,5	12	35,3	76	43,7	A x B: $\chi^2 = 2,021$; p = 0,155 A x C: $\chi^2 = 0,932$; p = 0,335 B x C: $\chi^2 = 0,819$; p = 0,365
CGT	3	13,6	3	8,8	2	1,1	A x B: $\chi^2 = 0,323$; p = 0,570 A x C: $\chi^2 = 7,742$; p = 0,0054* B x C: $\chi^2 = 4,243$; p = 0,039
TGC	-	-	-	-	2	1,1	A x B: - A x C: $\chi^2 = 0,255$; p = 0,613 B x C: $\chi^2 = 0,395$; p = 0,530

Continua

Haplótipos	CHE2 C5+ Forte (A)		CHE2 C5+ Fraco (B)		CHE2 C5-		Comparações
	N	%	N	%	N	%	
TGT	-	-	1	2,9	-	-	A x B: $\chi^2 = 0,659$; p = 0,417 A x C: $\chi^2 = 1,731$; p = 0,421 B x C: -
TAT	-	-	-	-	9	5,2	A x B: - A x C: $\chi^2 = 1,193$; p = 0,248 B x C: $\chi^2 = 1,838$; p = 0,175
TAC	2	9,1	-	-	10	5,7	A x B: $\chi^2 = 3,205$; p = 0,073 A x C: $\chi^2 = 0,38$; p = 0,538 B x C: $\chi^2 = 2,053$; p = 0,152
Total	22		34		174		

*Diferença estatisticamente significativa, após correção de Bonferroni $\leq 0,006$

DISCUSSÃO

A observação de que o gene que codifica a proteína desconhecida presente no complexo C₅ em indivíduos CHE2 C5+ (*CHE2*; 2q33-35; EIBERG et al., 1989), está localizado na mesma posição cromossômica do gene que codifica a lamelipodina (*RAPH1*; 2q33, NCBI), levou à hipótese de que o loco *CHE2* seja o gene *RAPH1*, e uma mutação estaria alterando o sítio de clivagem de alguma protease, deixando-a com um tamanho maior em relação à lamelipodina que se liga a C₄ (LI et al., 2008). Outra evidência que reforça esta hipótese, vem do trabalho de BENYAMIN et al. (2011), que sugeriu que a associação observada com a atividade da BChE se deve a uma variação presente no gene *RAPH1*, o que concorda com o fato de que a atividade da BChE sofre influência do loco *CHE2* (HARRIS, 1970; PRIMO-PARMO et al., 1986; SUGIMORI, 1986; CHAUTARD-FREIRE-MAIA et al., 1991).

Para testar a hipótese do gene *RAPH1* ser o loco *CHE2* foram avaliadas frequências genotípicas, alélicas e haplotípicas de indivíduos do fenótipo CHE2 C5+ e CHE2C5- de três SNPs do gene *RAPH1* e avaliados quanto à possibilidade de associação com o fenótipo CHE2 C5+. Dois dos SNPs (rs2246118 e rs3814365) são considerados *tagSNPs* por se tratarem de polimorfismos que apresentam desequilíbrio de ligação com muitos outros, possibilitando a investigação de associação com poucos marcadores para avaliar grande parte do gene.

FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS, ALÉLICAS E HAPLOTÍPICAS DOS SNPs DO GENE RAPH1 E FENÓTIPOS DO LOCO CHE2

Não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) na distribuição das frequências alélicas e genotípicas dos três SNPs entre os grupos fenotípicos (tabelas 1, 2 e 3).

Para avaliar se o possível SNP responsável pelo fenótipo CHE2 C5+ poderia estar em desequilíbrio de ligação com alguma combinação alélica dos SNPs estudados, foram realizadas análises haplotípicas (tabela 4). A avaliação das frequências haplotípicas, estimadas para os 6 haplótipos inferidos em CHE2 C5+ e 7 em CHE2 C5-, demonstrou que as combinações alélicas CGT e CAC encontram-se

significativamente mais frequentes no fenótipo CHE2 C5+ que em CHE2 C5- ($p = 0,0006$ e $p = 0,005$, respectivamente). Estes resultados mostram a ocorrência de associação entre haplótipos do gene *RAPH1* e o fenótipo CHE2 C5+, corroborando a hipótese de que o gene *RAPH1* é o loco *CHE2* e, portanto, o SNP responsável pelo fenótipo CHE2 C5+ estaria em desequilíbrio de ligação com os esses haplótipos.

A avaliação de desequilíbrio de ligação (DL) não mostrou valores significativos entre os SNPs avaliados no grupo fenotípico CHE2 C5+. Como foi observado que os haplótipos CGT e CAC encontram-se significativamente mais frequentes nesse grupo, o fato de não ter sido observado desequilíbrio provavelmente é devido ao baixo número amostral ($N = 28$).

FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS, ALÉLICAS E HAPLOTÍPICAS DOS SNPS DO GENE RAPH1 E FENÓTIPOS CHE2 C5+ FORTE, FRACO E CHE2 C5-

A expressividade variável do fenótipo CHE2 C5+ observada através da variação da intensidade da banda C₅ já foi descrita em diversos trabalhos (Harris et al., 1963; Robson et al., 1966, Chautard-Freire-Maia et al., 1984 e 1991, Alcântara, et al., 2001). O trabalho realizado por Chautard-Freire-Maia et al. (1991) classificou o fenótipo CHE2 C5+ em forte e fraco através de uma avaliação visual da banda C₅ em gel de Agar, e observou que a média de atividade da BChE era maior e a de peso menor em CHE2 C5+ forte quando comparado com CHE2 C5+ fraco. Alcântara, et al. (2001) classificou o fenótipo CHE2 C5+ através da atividade média da BChE, obtida por densitometria da banda C₅ e obteve média de IMC no fenótipo CHE2 C5+ forte menor quando comparado com os outros fenótipos (CHE2 C5+ fraco e CHE2 C5-). Considerando que os fenótipos CHE2 C5+ forte e fraco já foram associados a diferenças quanto a atividade da BChE, peso e IMC, o presente trabalho comparou as frequências genotípicas, alélicas e haplotípicas dos SNPs estudados utilizando esta classificação para avaliar se estariam associados a algum desses fenótipos, apontando que a expressividade variável observada seria resultado da heterogeneidade genética da banda.

A avaliação da distribuição das frequências alélicas e genotípicas dos três SNPs, após a reclassificação do fenótipo CHE2 C5+ (tabelas 5, 6 e 7) continuou não

mostrando valores que indicassem associação. Contudo, para o rs3814365 algumas tendências puderam ser observadas: as frequências entre os fenótipos CHE2 C5+ forte e CHE2 C5- aparentam ser mais diferentes que entre CHE2 C5+ forte e CHE2 C5+ fraco, e as mais semelhantes ocorrem entre CHE2 C5+ fraco e CHE2 C5- (tabela 6). Quando a frequência alélica foi avaliada, o alelo G apresentou uma frequência maior em CHE2 C5+ forte enquanto o alelo A em CHE2 C5+ fraco e CHE2 C5-, sendo que a comparação entre os grupos CHE2 C5+ forte e CHE2 C5- apresentou o valor estatístico que mais se aproximou da significância ($p = 0,08$). Outra evidência de que CHE2 C5+ fraco e CHE2 C5- parecem ser grupos fenotípicos mais semelhantes e CHE2 C5+ forte e CHE2 C5- mais diferentes, pode ser observada quando os genótipos são agrupados para avaliar o efeito de dominância de um dos alelos. O grupo AG+GG aparenta ser mais frequente no fenótipo CHE2 C5+ forte, seguido por CHE2 C5- e CHE2 C5+ fraco, sendo que os últimos apresentam frequências muito próximas (87,5%; 68,4%; 66,7%; respectivamente). Ao observar os valores de significância estatística, notou-se que os menores valores de p , que demonstram maior diferença entre os grupos avaliados, ocorrem sempre entre CHE2 C5+ forte e CHE2 C5-, seguido pelos valores observados entre CHE2 C5+ forte e CHE2 C5+ fraco, e os maiores valores de p , vêm das comparações entre os grupos CHE2 C5+ fraco e CHE2 C5-.

Como as frequências genotípicas estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg, apesar do N pequeno devido á reclassificação do fenótipo CHE2 C5+ em forte e fraco, foi possível fazer a inferência da frequência dos haplótipos. O haplótipo CGC foi o mais comum nos três grupos fenotípicos (tabela 9). A comparação das frequências haplotípicas mostrou que a combinação alélica CAC é mais comum em CHE2 C5+ fraco que CHE2 C5- (respectivamente, 23,5% e 5,7%; $p = 0,0007$) e o haplótipo CGT é mais comum no grupo CHE2 C5+ forte que CHE2 C5- (respectivamente, 13,6%; 1,1%; $p = 0,0054$), assim, os dois haplótipos associados ao fenótipo CHE2 C5+, continuaram associados após a reclassificação do fenótipo, um ao CHE2 C5+ forte e o outro ao CHE2 C5+ fraco. Estes resultados, além de corroborarem a hipótese de que o gene *RAPH1* é o loco *CHE2*, indicam que os fenótipos forte e fraco são codificados

por alelos diferentes do gene *RAPH1* e, portanto a expressividade variável observada no fenótipo CHE2 C5+ é resultado, também, da heterogeneidade genética da banda.

ATIVIDADE DA BCHE E FENÓTIPOS CHE2 C5+ FORTE, FRACO E CHE2 C5-

Os resultados obtidos quanto à média da atividade da BChE superior em indivíduos do fenótipo CHE2 C5+ quando comparados com CHE2 C5- (tabela 8) estão de acordo com os dados da literatura (HARRIS, 1970; PRIMO-PARMO et al., 1986; SUGIMORI, 1986; CHAUTARD-FREIRE-MAIA et al., 1991). Além disso, a comparação entre as médias de atividade enzimática dos fenótipos CHE2 C5+ forte, CHE2 C5+ fraco e CHE2 C5-, mostram que a média é maior em CHE2 C5+ forte ($5,97 \pm 0,83$ KU/L) quando comparada com CHE2 C5+ fraco ($4,37 \pm 0,46$; $t = 1,772$; $p = 0,046$) e CHE2 C5- ($4,26 \pm 0,24$; $t = 2,67$; $p = 0,005$), e, que a média de atividade não é diferente entre os grupos CHE2 C5+ fraco e CHE2 C5- ($t = 0,224$; $p = 0,412$). Os resultados observados corroboram com os obtidos por CHAUTARD-FREIRE-MAIA et al. (1991), que observou menor média de atividade da BChE no grupo CHE2 C5+ fraco que CHE2 C5+ forte. O trabalho realizado por Alcântara et al. (2001) no entanto não observou diferença entre as médias de atividade nesses grupos. Segundo a autora, essa diferença entre os resultados pode ser devido aos diferentes procedimentos de classificação da intensidade da banda C5; classificada através da atividade relativa pela autora e, que é diferente da classificação visual, que seria mais correspondente a atividade absoluta da banda C₅, no trabalho realizado por CHAUTARD-FREIRE-MAIA et al. (1991). O método empregado no presente trabalho, assemelha-se ao utilizado por CHAUTARD-FREIRE-MAIA et al. (1991), pois refere-se à classificação quanto a intensidade, baseada na atividade enzimática absoluta da banca C₅.

Os resultados quanto a média de atividade diferente entre os fenótipos forte e fraco corroboram com a hipótese do presente trabalho que indica que estes fenótipos são codificados por alelos diferentes do gene *RAPH1*, sendo que a interação entre Lpd e C₄, formando a banda C₅, aumenta a atividade da BChE apenas nos indivíduos do fenótipo CHE2 C5+ forte.

*FREQUÊNCIA DOS ALELOS CHE2*C5+ FORTE E FRACO*

A frequência observada do fenótipo CHE2 C5+ em amostras de adultos de Curitiba é de $10,23 \pm 0,60\%$ (Chautard-Freire-Maia et al., 1991), baseado neste valor, a frequência estimada para o alelo *CHE2*C5+* é de aproximadamente 5%. Considerando que o presente trabalho apresenta cerca da metade da amostra do fenótipo CHE2 C5+ classificada como CHE2 C5+ forte (N = 16), a frequência dos alelos responsáveis pelo fenótipo forte e fraco deve ser de aproximadamente 0,025.

Com o auxílio do software Haploview (Barrett et. al., 2005), polimorfismos que apresentassem frequências próximas a 3% foram rastreados no gene *RAPH1*. Foram encontrados 23 SNPs dentro do gene, formando um grande bloco de desequilíbrio de ligação. Avaliando cada um destes SNPs, observou-se que todos ocorrem em íntrons ou na região 3' UTR.

Uma hipótese, para que uma mutação que ocorra no íntron do gene *RAPH1* deixe a massa molecular da lamelipodina no complexo C₅ maior que no tetrâmero da BChE, seria a de que ela leve à recomposição alternativa do mRNA imaturo (pré-mRNA), deixando a proteína com um tamanho maior, por incluir um íntron, por exemplo. O trabalho de AST (2004), mostrou a importância das sequências que flanqueiam os íntrons (5'ss e 3'ss) evidenciando a conservação dessa região entre *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *Mus musculus* e humanos. A conservação de sequências que flanqueiam os introns está relacionada com seu envolvimento na regulação do processamento do pré-mRNA. Em seu trabalho de revisão, STAMM et al (2005) comentam sobre a importância da recomposição alternativa como um mecanismo para gerar um grande número de mRNA e isoformas de proteínas, considerando o pequeno número de genes presente no genoma humano. O autor ainda relata que este mecanismo determina as propriedades de ligação, localização intracelular, atividade enzimática, estabilidade de proteínas e modificações pós-traducionais de um grande número de proteínas. Sendo que a dimensão dos efeitos pode variar de uma perda completa de função, à aquisição de uma nova função ou na maioria dos casos uma sutil modulação.

O SNP (rs11675251) do gene *ABI2* observado associado à atividade da BChE BENYAMIN et al. (2011), encontra-se em desequilíbrio de ligação com os SNP do gene

RAPH1 estudados, rs3814365 e rs2465520 (figura 2). Este resultado mostra que ocorre DL entre estes genes, corroborando a hipótese sugerida no trabalho de BENYAMIN et al., 2011, de que o efeito de associação com a atividade da BChE se deve a um SNP no gene *RAPH1*. Uma vez que a atividade da BChE sofre influência do loco *CHE2*, que supomos ser o *RAPH1* é provável que o rs11675251 esteja em DL com o SNP responsável pelo fenótipo CHE2 C5+ forte.

Os resultados obtidos no presente trabalho corroboram a hipótese de que o loco *CHE2* pode ser o gene *RAPH1* e sugerem que a expressividade variável da banda C5 é, pelo menos em parte, devido a sua heterogeneidade genética, que estaria levando ao aumento da atividade da BChE apenas nos indivíduos do fenótipo CHE2 C5+ forte.

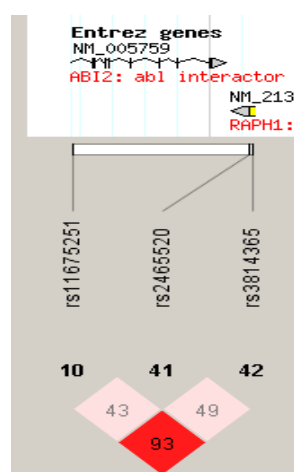


Figura 2. Representação do SNP do gene ABI2 (rs11675251) e SNPs do *RAPH1* em desequilíbrio de ligação. Diagrama obtido dos dados gerados pelo programa Haploview.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Polimorfismos e Ligação do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná. Ao apoio financeiro da Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

BIBLIOGRAFIA

- ALCÂNTARA, V. M.; RODRIGUES, L. C.; OLIVEIRA, L. C. e CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A. Association of the *CHE2* locus with body mass index and butyrylcholinesterase activity. **Hum Biol.**, v. 73, p. 587-595, 2001.
- ALCÂNTARA, V. M.; OLIVEIRA, L. C.; RÉA, R. R.; SUPLYCY, H. L. e CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A. 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.
- ALLDERDICE, P. W.; GARDNER, H. A. R.; GALUTIRA, D.; LOCKRIDGE, O.; LA DU, B.N. e MCALPINE, P.J. The cloned butyrylcholinesterase (*BCHE*) gene maps to a single chromosome site, 3q26. **Genomics**, v.11, p. 452-454, 1991.
- ARPAGAU, M.; KOTT, M.; VATSIS, K. P.; BARTELS, C. F.; LA DU, B. N. e LOCKRIDGE, O. Structure of the gene for human butyrylcholinesterase. Evidence for a single copy. **Biochemistry**, v. 29, p. 124-131, 1990.
- AST, G. How did alternative splicing evolve? **Nature**. v. 5, p. 773-782, 2004.
- AYRES M, AYRES JR M, AYRES DL, SANTOS AAS. BioEstat 5.0. Aplicações Estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas (software), 2007.
- BARRETT, J.C., FRY, B., MALLER, J., DALY, M. J., Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. **Bioinformatics**. v.2 p. 263-5, 2005.
- BENYAMIN B, MIDDELBERG RP, LIND PA, VALLE AM, GORDON S, NYHOLT DR, MEDLAND SE, HENDERS AK, HEATH AC, MADDEN PA, VISSCHER PM, O'CONNOR DT, MONTGOMERY GW, MARTIN NG, WHITFIELD JB. GWAS of butyrylcholinesterase activity identifies four novel loci, independent effects within *BCHE* and secondary associations with metabolic risk factors. **Hum Mol Genet.** v. 22, p. 4504-14, 2011.
- CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A., LOURENÇO, M. A. C. e JUGEND, R. M. Phenotype frequencies of the *CHE2* locus of serum cholinesterase in a sample collected in Curitiba. **Rev. Brasil. Genet.**, v. 4, p. 709-715, 1984.

- CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A.; PRIMO-PARMO, S. L.; PICHETH, G.; LOURENÇO, M. A. C. e VIEIRA, M. M. The C₅ isozyme of serum cholinesterase and adult weight. **Hum. Hered.**, v. 41, p. 330-339, 1991.
- DIETZ AA, RIBINSTEIN HM, LUBRANO T, HODGES LK. Improved method for the differentiation of cholinesterase variants. **Am J Genet** v. 24, p. 58-64, 1972.
- EVANS RT, WROE J. Is serum cholinesterase activity a predictor of succinyl choline sensitivity? An assessment of four methods. **Clin Chem.** v. 24, p. 1762-1766, 1978.
- EIBERG, H.; NIELSEN, L.S.; KLAUSEN, J.; DAHLÉN, M.; KRISTENSEN, M.; BISGGARD, M.L.; MOLLER, N. e MOHR, J. Linkage between serum cholinesterase 2 (CHE2) and crystallin gene cluster (CRYG): assignment to chromosome 2. **Clin. Genet.**, v. 35, p. 313-321, 1989.
- FADEL-PICHETH C. Variabilidade do loco BCHE da butirilcolinesterase e peso do adulto em amostra de Curitiba. Dissertação de Mestrado. Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1991.
- FURTADO-ALLE L, ANDRADE F.A, NUNES K, MIKAMI L.R, SOUZA R.L.R AND CHAUTARD-FREIRE-MAIA E.A Association of variants of the -116 site of the butyrylcholinesterase *BCHE* gene to enzyme activity and body mass index. **Chem Biol Interact.** v. 175, p. 115-118, 2008.
- GAUGHAN, G.; PARK, H.; PRIDDLE, J.; CRAIG, S. Refinement of localization of human butyrylcholinesterase to chromosome 3q26.1-q26.2 using a PCR-derived probe. **Genomics**, v 11, p. 455-458, 1991.
- GUO, S.W.; THOMPSON, E.A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiples alleles. **Biometrics**, v.48, p.361-372, 1992.
- HARRIS, H.; HOPKINSON, D. A e ROBSON, E. B. Two-dimensional electrophoresis of pseudocholinesterase components in human serum. **Nature**, v.196, p. 1296-1298, 1962.
- HARRIS, H.; ROBSON, E. B.; GLEN-BOTT, A. M. e THORNTON, J. A. Evidence for non-allelism between genes affecting human serum cholinesterase. **Nature**, v. 200, p. 1185-1187, 1963.

- HARRIS, H. **The principles of human biochemical genetics**. North Holland Publishing Company, Amsterdam, p. 161, 1970.
- KÁLMÁN, J.; JUHÁSA, A.; RAKONCZAYB, Z.; ÁBRAHÁM, G.; ZANAA, M.; BODAD K.; FARKASE, T.; PENKEF, B. e JANKA, Z. Increased serum butyrylcholinesterase activity in type IIb hyperlipidaemic patients. **Life Sci.**, v. 75, p. 1195–1204, 2004.
- KRAUSE, M., LESLIE, J. D., STEWART, M., LAFUENTE, E.M., VALDERRAMA, F., JAGANNATHAN, R., STRASSER, G.A., RUBINSON, D.A., LIU, H., WAY, M. Lamellipodin, an Ena/VASP ligand, is implicated in the regulation of lamellipodial dynamics. **Dev. Cell** v. 7, p. 571–583, 2004.
- KUTTY, K. M. e PAYNE, R. H. Serum pseudocholinesterase and very-low-density lipoprotein metabolism. **J. Clin. Lab.**, p. 247-50, 1994.
- LAFUENTE, E.M; PUIJENBROEK, A.A.F.L; KRAUSE, M.; CARMAN, C.V. RIAM, an Ena/VASP and Profilin Ligand, Interacts with Rap1-GTP and mediates Rap1. Induced Adhesion. **Dev Cell**, v. 7, p. 585-595, 2004.
- LI, HE; SCHOPFER, L. M. ; MASSON, P.; LOCKRIDGE, O. Lamellipodin proline rich peptides associated with native plasma butyrylcholinesterase tetramers. v. 411, p. 425-432, 2008.
- MASSON, P. Molecular heterogeneity of human plasma cholinesterase. **In Cholinesterases: Structure, Function, Mechanisms, Genetics and Cell Biology**. Massoulié J. et al. eds. Washington DC: American Chemical Society, p. 42-45, 1991.
- PRIMO-PARMO, S. L.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A.; LOURENÇO, M. A. C ; SALZANO, F. M. e MELO e FREITAS, M. J. Studies on sesrum cholinesterase (CHE1 and CHE2) in Brazilian Indian and admixed population. **rev. Brasil. Genet.**, V. 9, p. 467-478, 1986.
- ROBINSON AR, ROBSON M, HARRISON AP, ZUELZER WW. A new technique for differentiation of hemoglobin. **J Lab Clin Med**. v. 50, p. 745-752, 1957.
- SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D. E EXCOFFIER, L. **Arlequin ver. 2.000: A software for population genetics data analysis**. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland, 2000.

- SCOTT, E.M. e POWERS, R.F. Properties of the C5 variant form of human serum cholinesterase. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 26, p. 189-94, 1974.
- SOREQ, H.; ZAMIR, R.; ZEVIN-SONKIN, D.; ZAKUT, H. Human cholinesterase genes localized by hybridization to chromosomes 3 and 16. **Hum. Genet.**, v.77, p. 325-328, 1987.
- SOUZA RLR. Estudos sobre nova banda da butirilcolinesterase humana (C4/5) verificada em eletroforese. Dissertação de Mestrado. Curitiba. Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná, 1995
- SOUZA, R.L.R.; FADEL-PICHETH, C.; ALLEBRANDT, K.V.; FURTADO, L e CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Possible influence of BCHE locus of butyrylcholinesterase on stature and body mass index. **Am. J. Phys. Ant.**, v. 326, p. 329-334, 2005a.
- STAMM, S., BEN-ARI, S., RAFALSKA, I., TANG, Y., ZHANG, Z., TOIBER, D., THANARAJ. T. A.e SOREQ, H. Function of alternative splicing. **Elsevier**, p. 1-20, 2005.
- STUEBER-ODEBRECHT, N.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.; PRIMO-PARMO, S.L. e CARRENHO, J.M.X. 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.
- SUGIMORI, T. Shortened action of succinylcholine in individuals with cholinesterase C5 isoenzyme. **Canad. Anaesth. Soc. J.**, v. 33, p. 321-327, 1986.
- 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.

6. DISCUSSÃO GERAL

A banda eletroforética correspondente à forma C₅ foi observada em gel pela primeira vez em 1962 (Harris et al. 1962). Desde então, a natureza molecular do transcrito do loco *CHE2* foi alvo de estudo. Os resultados desses trabalhos apesar de não responderem completamente a esta questão, indicaram: a posição cromossômica do loco (Eiberg et al., 1989), que se tratava da associação do tetrâmero normal da BChE a uma proteína (SCOTT e POWERS 1974), de aproximadamente 60KDa, além de descartar várias possíveis proteínas (GALLANGO et al., 1969 e Masson 1991). A hipótese de que o produto do loco *CHE2* fosse a Lpd veio do trabalho de LI et al. (2008).

Somados aos dados da literatura, os resultados obtidos da avaliação dos SNPs em haplótipos corroboram a hipótese de que o loco *CHE2* é o gene *RAPH1* e indicam que a proteína desconhecida que se liga ao tetrâmero para formar a banda C₅, é um peptídeo derivado da lamelipodina. Além disso, os resultados obtidos da classificação do fenótipo *CHE2* C₅⁺ em forte e fraco, sugerem que a expressividade variável da banda C₅ é, pelo menos em parte, devido sua heterogeneidade genética, pois estes fenótipos parecem ser codificados por alelos diferentes do gene *RAPH1* e leva ao aumento da atividade da BChE apenas nos indivíduos do fenótipo *CHE2* C₅⁺ forte. Considerando que o trabalho de AKIZUKI et al. (2004) sugeriu que não há relação entre o aumento de atividade da BChE, que é verificado em *CHE2* C₅⁺, e os variantes do gene *BCHE*, já que não foi observado a associação entre variantes do gene *BCHE* e o fenótipo *CHE2* C₅⁺, a responsável pelo aumento da atividade em indivíduos *CHE2* C₅⁺ forte é a Ldp.

O estudo da variabilidade do gene *RAPH1*, mostrou que apenas para o SNP rs3814365 as frequências alélicas estavam diferentes entre os grupos étnicos, sendo o alelo A maior em afro-brasileiros que em euro-brasileiros. A frequência de afro-brasileiros na amostra *CHE2* C₅⁺ foi de 1 indivíduo em 34 (3,0%), quando o fenótipo foi reclassificado este indivíduo foi considerado *CHE2*C₅⁺ forte, representando 6,2% da amostra. Contudo, como para este SNP o genótipo deste indivíduo é GG ele não poderia ser a responsável pelos valores de associação observados.

A busca por SNPs no gene *RAPH1* que apresentassem frequências próximas da esperada para os alelos responsáveis pelos fenótipos CHE2 C5+ forte e fraco, mostrou apenas SNPs presentes em íntrons, sugerindo que se a mutação responsável estiver entre estas candidatas, ela pode estar envolvida com a recomposição alternativa do pré-mRNA, gerando uma proteína de massa molecular maior que a Lpd presente no tetrâmero.

A hipótese de que uma mutação, ocorrendo dentro de um exon, estaria alterando o sítio de clivagem de alguma protease, responsável por clivar a Lpd, deixando-a com um tamanho maior em relação à que se liga a C₄, não pode ser descartada, porém parece menos provável considerando os resultados obtidos no estudo da variabilidade do gene *RAPH1*, que mostram que os exons apresentaram poucas variantes, sendo que as observadas parecem ser polimorfismos antigos considerando sua distribuição geográfica. O estudo da variabilidade do gene *RAPH1* indica que os exons devem estar sobre forte pressão da seleção purificadora, pois, na avaliação do exon 4 não foram observadas variações genéticas, provavelmente porque sua sequencia faz parte do sítio de ligação para proteína Talina, além disso, também foi observado a ausência de SNPs que levem a variação não sinônima nos exons avaliados; a descrição de apenas 3 SNPs ocorrendo nos exons, todos levando a variação sinônima e a conservação da região codificadora entre diferentes espécies.

O fato dos resultados indicarem a lamelipodina como a proteína responsável pelos fenótipos CHE2 C5+ forte e fraco abre caminho para trabalhos futuros, na tentativa de identificar definitivamente os SNPs responsáveis por estes fenótipos, e para o melhor entendimento sobre as possíveis funções da BChE, uma vez que o fenótipo CHE2 C5+ forte é responsável por uma menor média de peso e IMC e uma maior atividade enzimática.

7. CONCLUSÕES

1. O estudo da variabilidade do gene *RAPH1* é o primeiro relato dessa natureza em uma amostra de euro e afro-brasileiros.
2. As frequências alélicas e genotípicas dos SNPs rs2465520 e rs2246118 encontram-se igualmente distribuídas entre os grupos populacionais avaliados e, diferente (alélica) para o rs3814365.
3. A comparação entre as frequências alélicas e genotípicas observadas e as de CEU e YRI para os três SNPs, sugerem um gradiente de frequência entre as populações euro-brasileiras/CEU, afro-brasileiras e YRI.
- 4 O exon 4 do gene *RAPH1* não apresentou variação, levando à hipótese de uma pressão seletiva sobre a região por codificar parte da sequência de um domínio estrutural.
5. A conservação da região codificadora entre diferentes espécies e o baixo número de variantes observadas, indica que os exons do *RAPH1* devem estar sobre forte pressão da seleção purificadora.
6. Os resultados haplotípicos obtidos corroboram a hipótese de que o loco *CHE2* é o gene *RAPH1*.
7. A avaliação haplotípica nos fenótipos *CHE2* C5+ em forte e fraco, sugere que a expressividade variável da banda C₅ é, pelo menos em parte, devido a sua heterogeneidade genética.
8. A interação entre Lpd e C₄ leva ao aumento da atividade da BChE apenas nos indivíduos do fenótipo *CHE2* C5+ forte.
9. A busca por SNPs no gene *RAPH1* com frequências próximas da esperada para os alelos responsáveis pelos fenótipos *CHE2* C5+ forte e fraco, mostrou apenas SNPs presentes em íntrons.

8. REFERÊNCIAS

- AKIZUKI, S.; OHNISHI, A.; KOTANI, K. e SUDO, K. Genetic and immunological analyses of patients with increased serum butyrylcholinesterase activity and its C5 variant form. **Clin. Chem. Lab. Med.**, v. 42, p. 991-996, 2004.
- ALCÂNTARA, V. M.; LOURENÇO, M. A. C.; SALZANO, F. M.; PETZL-ERLER, M. L.; COIMBRA JR., C. E. A.; SANTOS R. V. e CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A. Butyrylcholinesterase polymorphisms (BCHE and CHE2 loci) in Brazilian Indian and admixed populations. **Hum. Biol.**, 1995.
- ALCÂNTARA VM. **Fenótipos da butirilcolinesterase e sua relação com dados antropométricos, bioquímico-hormonais e pressão arterial em obesos e na população geral de Curitiba, PR.** Curitiba, 228p. Tese de Doutorado em Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2000.
- ALCÂNTARA, V. M.; RODRIGUES, L. C.; OLIVEIRA, L. C. e CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A. Association of the *CHE2* locus with body mass index and butyrylcholinesterase activity. **Hum Biol.**, v. 73, p. 587-595, 2001.
- ALCÂNTARA, V. M.; OLIVEIRA, L. C.; RÉA, R. R.; SUPPLY, H. L. e CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A. 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.
- ALLDERDICE, P. W.; GARDNER, H. A. R.; GALUTIRA, D.; LOCKRIDGE, O.; LA DU, B.N. e MCALPINE, P.J. The cloned butyrylcholinesterase (*BCHE*) gene maps to a single chromosome site, 3q26. **Genomics**, v.11, p. 452-454, 1991.
- ALTAMIRANO, C. V., e LOCKRIDGE, O. Conserved Aromatic Residues of the C-Terminus of Human Butyrylcholinesterase Mediate the Association of Tetramers. **Biochemistry**, v. 38, p. 13414-13422, 1999.
- ARPAGAU, M.; KOTT, M.; VATSIS, K. P.; BARTELS, C. F.; LA DU, B. N. e LOCKRIDGE, O. Structure of the gene for human butyrylcholinesterase. Evidence for a single copy. **Biochemistry**, v. 29, p. 124-131, 1990.
- ARPAGAU, M.; CHATONNET, A.; MASSON, P.; NEWTON, M.; VAUGHAN, T.A.; BARTELS, C.F.; NOGUEIRA, C.P.; LA DU, B.N. E LOCKRIDGE, O. Use of the

- polymerase chain reaction for homology probing of butyrylcholinesterase from several vertebrates. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 6966-6974, 1991.
- BAE, Y. E., DING, Z., ZOU, Z., WELLS, A., GERTLER, F., e ROY, P. Loss of Profilin-1 Expression Enhances Breast Cancer Cell Motility by Ena/VASP Proteins. **Journal Of Cellular Physiology.** v. 219, p. 354–364, 2009.
- BALASUBRAMANIAN, A.S. e BHANUMATHY, C.D. Noncholinergic functions of cholinesterases. **FASEB J.**, v. 7, p. 1354-58, 1993.
- BARRETT, J.C., FRY, B., MALLER, J., DALY, M. J., Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. **Bioinformatics.** v.2 p. 263-5, 2005.
- BARTELS, C.F.; VAN DER SPEK, A.F.L. e LA DU, B.N. Two polymorphisms in the noncoding regions of the *BCHE* gene. **Nucleic Acids Res.**, v. 18, p. 6171, 1990.
- BARTELS, C.F.; JAMES, K. e LA DU, B.N. DNA mutations associated with the human butyrylcholinesterase J-variant. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 50, p. 1104-14, 1992a.
- BARTELS, C.F.; JENSEN, F.S.; LOCKRIDGE, O.; VAN DER SPEK, A.F.L.; RUBINSTEIN, H.M.; LUBRANO, T. e 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.**, v. 50, p. 1086-103, 1992b.
- BENYAMIN B, MIDDELBERG RP, LIND PA, VALLE AM, GORDON S, NYHOLT DR, MEDLAND SE, HENDERS AK, HEATH AC, MADDEN PA, VISSCHER PM, O'CONNOR DT, MONTGOMERY GW, MARTIN NG, WHITFIELD JB. GWAS of butyrylcholinesterase activity identifies four novel loci, independent effects within BCHE and secondary associations with metabolic risk factors. **Hum Mol Genet.** v. 22, p. 4504-14, 2011
- BIBEROGLU, K., SCHOPFER, M. L. TACAL, O. e LOCKRIDGE, O. The Proline Rich Tetramerization Peptides in Equine Serum Butyrylcholinesterase. **The FEBS Journal**, 2012.
- BLONG, R. M., BEDOWS E. e LOCKRIDGE O. Tetramerization domain of human butyrylcholinesterase is at the C-terminus. **Biochem. J.**, v. 327, p. 747-757, 1997.
- BOECK, A.T.; FRY, D.L.; SASTRE, A. e LOCKRIDGE, O. Naturally occurring mutation, Asp70His, in human butyrylcholinesterase. **Ann. Clin. Biochem.**, v. 39, p. 154–156, 2002.

- CHANG, C., ADLER, C. E., KRAUSE, M., CLARK, S. G., GERTLER, F. B., LAVIGNE, M T., E BARGMANN, C. I. MIG-10/Lamellipodin and AGE-1/PI3K Promote Axon Guidance and Outgrowth in Response to Slit and Netrin. **Current Biology**. v.16, p. 854–862, 2006.
- CHATTONET, A. e LOCKRIDGE, O. Comparision of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. **Biochem. J.**, v. 260, p. 625-34, 1989.
- CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A.; PRIMO-PARMO, S. L.; PICHETH, G.; LOURENÇO, M. A. C. e VIEIRA, M. M. The C₅ isozyme of serum cholinesterase and adult weight. **Hum. Hered.**, v. 41, p. 330-339, 1991.
- CUCUIANU, M.; POPESCU, T.A. e HARAGUS, ST. Pseudocholinesterase in obese and hyperlipemic subjects. **Clin. Chim. Acta**, v. 22, p. 151-155, 1968.
- DAHL, E., SADR-NABAVI, A., KLOPOCKI, E., BETZ, B., GRUBE, S., KREUTZFELD, R. Systematic identification and molecular characterization of genes differentially expressed in breast and ovarian cancer. **J. of Pathol.**, v. 205p. 21–28, 2005.
- DEY, D. C.; KANNO, T.; SUDO, K. e MAEKAWA, M. Genetic analysis of 6 patients with no detectable butyrylcholinesterase activity—three novel silent genes and heterogeneities of mutations in *BCHE* gene in Japan. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 61, p. 2307, 1997.
- DEY, D. C.; MAEKAWA, M.; SUDO, K. e KANNO, T. Butyrylcholinesterase genes in individuals with abnormal inhibition numbers and with trace activity: one common mutation and two novel silent genes. **Ann. Clin. Biochem.** (Part 2), v. 35, p. 302–310, 1998.
- DRUMMOND AJ, ASHTON B, BUXTON S, CHEUNG M, COOPER A, DURAN C, FIELD M, HELED J, KEARSE M, MARKOWITZ S, MOIR R, STONES-HAVAS S, STURROCK S, THIERER T, WILSON A (2011) Geneious v5.4, Available from <http://www.geneious.com>.
- EIBERG, H.; NIELSEN, L.S.; KLAUSEN, J.; DAHLÉN, M.; KRISTENSEN, M.; BISGGARD, M.L.; MOLLER, N. e MOHR, J. Linkage between serum cholinesterase 2 (CHE2) and crystallin gene cluster (CRYG): assignment to chromosome 2. **Clin. Genet.**, v. 35, p. 313-321, 1989.
- ENSAMBL. Disponível em: <http://www.ensembl.org/index.html>. Acessado em

09/02/2011

- EPPERT, K.; WUNDER, J. S.; ANELIUNAS, V.; TSUI, L.; STEPHEN, W. S. E ANDRULIS L. Altered expression and deletion of *RMO1* in osteosarcoma. **Int. J. Câncer.** v. 114, p. 738–746, 2005.
- FURTADO-ALLE L, ANDRADE F.A, NUNES K, MIKAMI L.R, SOUZA R.L.R AND CHAUTARD-FREIRE-MAIA E.A Association of variants of the -116 site of the butyrylcholinesterase *BCHE* gene to enzyme activity and body mass index. **Chem Biol Interact.** v. 175, p. 115-118, 2008.
- GÄTKE, M. R.; OSTERGAARD, D.; BUNDGAARD, J. R.; VARIN, F. e VIBY-MOGENSEN, J. Response to mivacurium in a patient compound heterozygous for novel and a known silent mutation in the butyrylcholinesterase gene: genotyping by sequencing. **Anesthesiology**, v. 95, p. 600–606, 2001.
- GAUGHAN, G.; PARK, H.; PRIDDLE, J.; CRAIG, S. Refinement of localization of human butyrylcholinesterase to chromosome 3q26.1-q26.2 using a PCR-derived probe. **Genomics**, v 11, p. 455-458, 1991.
- GNATT, A.; PRODY, C. A.; ZAMIR, R.; LIEMAN-HURWITZ, J.; ZAKUT, H. e SOREQ, H. Expression of alternatively terminated unusual human butyrylcholinesterase messenger-RNA transcripts, mapping to chromosome 3q26-ter, in nervous-system tumors. **Cancer Res.**, v. 50, p. 1983-1987, 1990.
- GRAUR D.; LI, W.H; **Fundamentals of molecular evolution.** Sunderland: Sinauer, v. 2, p.67-163,1999.
- GREENBERG, C. P.; PRIMO-PARMO, S. L.; PANTUCK, E. J. e LA DU, B. N. Prolonged response to succinylcholine: a new variant of plasma cholinesterase that is identified as normal by traditional phenotyping methods. **Anesth. Analg.**, v. 81, p. 419-421, 1995.
- GUO, S.W.; THOMPSON, E.A. Performing the exact test of Hardy-Weimberg proportion for multiples alleles. **Biometrics**, v.48, p.361-372, 1992.
- HADA, T.; MURATANI, K.; OHUE, T.; IMANISHI, H.; MORIWAKI, Y.; ITOH, M.; AMURO, Y. e HIGASHINO, K. A variant serum cholinesterase and a confirmed point mutation at Gly-365 to Arg found in a patient with liver cyrrhosis. **Intern. Med.**, v. 31, p. 357-362, 1992.

- HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser.** v. 41, p.95-98, 1999.
- HARRIS, H.; HOPKINSON, D. A e ROBSON, E. B. Two-dimensional electrophoresis of pseudocholinesterase components in human serum. **Nature**, v.196, p. 1296-1298, 1962.
- HARRIS, H.; ROBSON, E. B.; GLEN-BOTT, A. M. e THORNTON, J. A. Evidence for non-allelism between genes affecting human serum cholinesterase. **Nature**, v. 200, p. 1185-1187, 1963.
- HARRIS, H. **The principles of human biochemical genetics**. North Holland Publishing Company, Amsterdam, p. 161, 1970.
- HIDAKA, K.; IUCHI, I.; YAMASAKI, T.; OHHARA, M.; SHODA, T.; PRIMO-PARMO, S.L. e LA DU, B.N. Identification of two different genetic mutations associated with silent phenotypes for human serum cholinesterase in Japanese. **Rinsho Byori**, v. 40, p. 535-40, 1992.
- HIDAKA, K.; IUCHI, I.; TOMITA, M.; WATANABE, Y.; MINATOGAWA, Y.; IWASAKI, K.; GOTOH, K. e SHIMIZU, C. Genetic analysis of a Japanese patient with butyrylcholinesterase deficiency. **Ann. Hum. Genet.**, v. 61, p. 491–496, 1997a.
- HIDAKA, K., IUCHI, I., YAMASAKI, T., UEDA, N. e HUKANO, K. Nonsense mutation in exon 2 of the butyrylcholinesterase gene: a case of familial cholinesterasemia. **Clinica Chimica Acta**, v. 261, p. 27-34, 1997b.
- HIDAKA, K.; WATANABE, Y.; TOMITA, M.; UEDA, N.; HIGASHI, M.; MINATOGAWA, Y. e IUCHI, I. Gene analysis of genomic DNA from stored serum by polymerase chain reaction: identification of three missense mutations in patients with cholinesterasemia and ABO genotyping, **Clin. Chim. Acta**, v. 303, p. 61–67, 2001.
- INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES (IDT). Disponível em: <http://www.idtdna.com/Home/Home.aspx>.
- INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY (IUBMB). Disponível em: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme> . Acessado em 16/08/2009.
- JBILLO, O.; TOUTANT, J. P.; VATSIS, K. P.; CHATONNET, A. e LOCKRIDGE, O. Promoter and transcription start site of human and rabbit butyrylcholinesterase genes. **J. Biol.**

- Chem.**, v. 269, p. 20829-20837, 1994.
- JENSEN, F. S.; BARTELS, C. F. e LA DU, B. N. Structural basis of the butyrylcholinesterase H-variant segregating in two Danish families. **Pharmacogenetics**, v. 2, p. 234-240, 1992.
- KALOW, W. e STARON, N. On distribution and inheritance of atypical forms of human cholinesterase as indicated by dibucaine numbers. **Canad. J. Biochem. Physiol.**, v. 35, p. 1305-20, 1957.
- KOZAK M. Structural features in eukaryotic mRNA that modulate the initiation of translation. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 19867-19870, 1991.
- KRAUSE, M., BEAR, J. E., LOUREIRO, J. J., e GERTLER F. G. The Ena/VASP enigma. **Journal of Cell Science** v. 115, p. 4721-4726, 2002.
- KRAUSE, M., DENT, E. W., BEAR, J. E., LOUREIRO, J. J. e GERTLER, F. B. Ena/VASP proteins: regulators of the actin cytoskeleton e cell migration. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* v. 19, p. 541-564, 2003.
- KRAUSE, M., LESLIE, J. D., STEWART, M., LAFUENTE, E.M., VALDERRAMA, F., JAGANNATHAN, R., STRASSER, G.A., RUBINSON, D.A., LIU, H., WAY, M. Lamellipodin, an Ena/VASP ligand, is implicated in the regulation of lamellipodial dynamics. **Dev. Cell** v. 7, p. 571-583, 2004.
- KREJCI, E., THOMINE S., BOSCHETTI, N., LEGAY, C., SKETELJ, J. e MASSOULIÉ, J. The mammalian gene of acetylcholinesterase-associated collagen. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p 22840-22847, 1997.
- KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA 3.1 Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, v. 5, p.150-163, 2004.
- KUTTY, K.M.; REDHEENDRAN, R. e MURPHY, D. Serum cholinesterase: function in lipoprotein metabolism. **Experientia**, v. 33, p. 420-421, 1977.
- LAFUENTE, E.M; PUIJENBROEK, A.A.F.L; KRAUSE, M.; CARMAN, C.V. RIAM, an Ena/VASP and Profilin Ligand, Interacts with Rap1-GTP and mediates Rap1. Induced Adhesion. **Dev Cell**, v. 7, p. 585-595, 2004.

- LAWRENCE, S.H. e MELNICK, P.J. Enzymatic activity related to human serum beta-lipoprotein: histochemical, imuno-electrophoretic and quantitative studies. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 107, p. 998-1001, 1961.
- LEGAY, C., BON, S., VERNIER, P., COUSSEN, F. e MASSOULIE, J., 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
- LEGG, J. A.; MACHESKY, L. M. MRL proteins: Leading Ena/VASP to Ras GTPases. **Nature Cell Biology**, v. 6 . p.1015-1017, 2004.
- LEVANO, S.; GINZ, H.; SIEGEMUND, M.; FILIPOVIC, M.; VORONKOV, E.; URWYLER, A. e GIRARD, T. Genotyping the butyrylcholinesterase in patients with prolonged neuromuscular block after succinylcholine. **Anesthesiology**, v. 102, p. 531-535, 2005.
- LI, HE; SCHOPFER, L. M. ; MASSON, P.; LOCKRIDGE, O. Lamellipodin proline rich peptides associated with native plasma butyrylcholinesterase tetramers. v. 411, p. 425-432, 2008.
- LIU, W.; CHENG, J.; IWASAKI, A.; IMANISHI, H. e HADA, T. Novel mutation and multiple mutations found in the human butyrylcholinesterase gene. **Clin. Chim. Acta**, v. 326, p. 193–199, 2002.
- LOCKRIDGE, O.; ECKERSON, H.W. e LA DU, B.N. Interchain disulfide bonds and subunit organization in human serum cholinesterase. **J. Biol. Chem.**, v. 254, p. 8324-30, 1979.
- LOCKRIDGE, O. e LA DU, B.N. Loss of the interchain disulfide peptide and dissociation of the tetramer following proteolysis of native human serum cholinesterase. **J. Biol. Chem.**, v. 257, p. 12012-18, 1982.
- LOCKRIDGE, O.; BARTELS, C. F.; VAUGHAN, T. A.; WONG, C. K.; NORTON, S. E. e JOHNSON, L. L. Complete aminoacid sequence of human serum cholinesterase. **J. Biol. Chem.**, v. 262, p. 549-557, 1987a.
- LOCKRIDGE, O.; ADKINS, S. e LA DU, B.N. Location of disulfid bonds within the sequence of human serum cholinesterase. **J. Biol. Chem.**, v. 262 (27), p. 12945-12952, 1987b.

- LOCKRIDGE, O., AND MASSON, P. Pesticides and susceptible populations: people with butyrylcholinesterase genetic variants may be at risk. *Neurotoxicology* v. **21** p. 113-126, 2000.
- LU, W. D., HADA, T., FUKUI, K., IMANISHI, H., MATSUOKA, N., IWASAKI, A. e HIGASHINO, K. Familial hypocholinesterasemia found in a family and a new confirmed mutation. *Internal Medicine*, v. 36, p. 9-13, 1997.
- LYULCHEVA, E., TAYLOR, E., MICHAEL, M., VEHLow, A., TAN, S., FLETCHER, A., KRAUSE, M., E BENNETT, E. Drosophila Pico and Its Mammalian Ortholog Lamellipodin Activate Serum Response Factor and Promote Cell Proliferation. *Developmental Cell*. v. 15 p. 680–690, 2008.
- MAEKAWA, M.; SUDO, K.; KANNO, T.; KOTANI, K.; DEY, D.C.; ISHIKAWA, J.; IZUME, M. e ETOH, K. Genetic basis of the silent phenotype of serum butyrylcholinesterase in three compound heterozygotes. *Clin. Chim. Acta.*, v. 235, p. 41-57, 1995.
- MAEKAWA, M.; SUDO, K.; KANNO, T.; KOTANI, K.; DEY, D.C.; ISHIKAWA, J. e IZUME, M. Genetic mutations of butyrylcholine esterase identified from phenotypic abnormalities in Japan. *Clin. Chem.*, v. 43, p. 924-9, 1997.
- MAEKAWA, M., TANIGUCHI, T., ISHIKAWA, J., TOYODA, S. e TAKAHATA, N. Problem with detection of an insertion-type mutation in the *BCHE* gene in a patient with butyrylcholinesterase deficiency. *Clinical Chemistry.*, v. 50, p. 2410-2411, 2004
- 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. **Molecular heterogeneity of human plasma cholinesterase.** In **Massoulié J. et al. Cholinesterases: structure, function, mechanisms, genetics and cell biology.** eds. Washington DC: American Chemical Society, p. 42-45, 1991.
- MASSON, P., E CLÉRY, C. *in* Enzymes of the Cholinesterase Family (Quinn, D. M., Balasubramanian, A. S., Doctor, B. P. e Taylor, P.) p. 113-121, 1995.
- MASSON, P; XIE, W; FROMENT, M.T e LOCKRIDGE, O. Effects of mutations of active site residues and amino acids interacting with the 6 loop on substrate activation of butyrylcholinesterase. *Biochim. Biophys. Acta.*, v. 1544, p. 166-176, 2001.

- MASSOULIÉ, J. e BON, S. The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates. **Annual Review of Neurosciences**, v. 5, p. 57-106, 1982.
- MASSOULIE, J., PEZZEMENTI, L., BON, S., KREJCI, E. e VALLETTE, F.. Molecular and cellular biology of cholinesterases. **Prog Neurobiol.** v. 41, p. 31-91,1993.
- MCGUIRE, M.C.; NOGUEIRA, C.P.; BARTELS, C.F.; LIGHTSTONE, H.; HAJRA, A.; VAN DER SPEK, A.F.L.; LOCKRIDGE, O. e LA DU, B.N. Identification of the structural mutation responsible for the dibucaine-resistant (atypical) variant form of human serum cholinesterase. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 86, p. 953-57, 1989.
- MICHAEL, M., VEHLow, A., NAVARRO, C., e KRAUSE, M. c-Abl, Lamellipodin, and Ena/VASP Proteins Cooperate in Dorsal Ruffling of Fibroblasts and Axonal Morphogenesis. **Curr Biol.** v. 20, p. 783–791, 2010.
- MIKAMI, L. R., SOUZA, R. L. R., CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A. e LOCKRIDGE, O. New genetic variants of human butyrylcholinesterase in the Brazilian population. **VIII International Meeting on Cholinesterases, Abstract**, v. 60, p. 23, 2004.
- MIKAMI, L. R.; WIESELER, S.; SOUZA, L.R. L.; SCHOPFER, L. M.; NACHON, F.; LOCKRIDGE, O. e CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. Five new naturally occurring mutations of the BCHE gene and frequencies of 12 butyrylcholinesterase alleles in a Brazilian population. **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 18, p. 213–218, 2008.
- MILLARD, C.B. e BROOMFIELD, C.A. A computer model of glycosylated human butyrylcholinesterase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 189, p. 1280-1286, 1992.
- MURATANI, K.; HADA, T.; YAMAMOTO, Y.; KANEKO, T.; SHIGETO, Y.; OHUE, T.; FURUYAMA, J. e HIGASHINO, K. Inactivation of the cholinesterase gene by alu insertion: possible mechanism for human gene transposition. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 88, p. 11315-11319, 1991.
- NAGASE, T.; KIKUNO, R.; HATTORI, A.,KONDO, Y., OKUMURA, K E OHARA, O. Prediction of the Coding Sequences of Unidentified Human Genes. The complete Sequences of 100 New cDNA Clones from Brain Which Code for Large Proteins *in vitro*. **DNA Research** v. 7, p. 347-355, 2000.

- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- NIEBUHR K, EBEL F, FRANK R, REINHARD M, DOMANN E, CARL U. D, WALTER U, GERTLER F. B, WEHLAND J, CHAKRABORTY T A novel proline-rich motif present in ActA of *Listeria monocytogenes* and cytoskeletal proteins is the ligand for the EVH1 domain, a protein module present in the Ena/VASP family. **EMBO J.** v. 16, p. 5433–5444, 1997.
- NICOLET, Y.; LOCKRIDGE, O.; MASSON, P. e FONTECILLA-CAMPS, J.C. Crystal structure of butyrylcholinesterase and of its complexes with substrates and products. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 41141-41147, 2003.
- NOGUEIRA, C.P.; MCGUIRE, M.C.; GRAESER, C.; BARTELS, C.F.; ARPAGAUS, M.; VAN DER SPEK, A.F.L.; LIGHTSTONE, H.; LOCKRIDGE, O. e LA DU, B.N. Identification of a frameshift mutation responsible for the silent phenotype of human serum cholinesterase, Gly 117 (GGT->GGAG). **Am. J. Hum. Genet.**, v. 46, p. 934-42, 1990.
- NOGUEIRA, C.P.; BARTELS, C.F. e MCGUIRE, M.C. Identification of two different point mutations associated with the fluoride-resistant phenotype for human butyrylcholinesterase. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 51, p. 821-8, 1992.
- NUNES, K. **Haplótipos do Gene *BCHE* da Butirilcolinesterase Humana e Aspectos Evolutivos**. Curitiba, 2007. Dissertação de Mestrado. Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná.
- ON-KEI CHAN, A., LAM, C. W., TONG, S. F., MAN TUNG, C., YUNG, K., CHAN, Y. W., AU, K. M., YUEN, Y. P., HUNG, C. T., NG, K. P. e SHEK, C. C. Novel mutations in the *BCHE* gene in patients with no butyrylcholinesterase activity. **Clinica Chimica Acta**, v. 351, p. 155-159, 2005.
- OSTERGAARD, D., VIBY-MOGENSEN, J., HANEL, H. K., AND SKOVGAARD, L. T. Half-life of plasma cholinesterase. **Acta Anaesthesiol. Scand.** v. 32, p. 266-269, 1988.
- PERRIER, A. L., MASSOULIÉ J. e KREJCI E. PRIMA: The membrane anchor of acetylcholinesterase in the brain. **Neuron**, v. 33, p. 275-285, 2002
- PRIMO-PARMO, S. L.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A.; LOURENÇO, M. A. C ; SALZANO, F. M. e MELO e FREITAS, M. J. Studies on sesrum cholinesterase (CHE1

- and CHE2) in Brazilian Indian and admixed population. *rev. Brasil. Genet.*, V. 9, p. 467-478, 1986.
- PRIMO-PARMO, S.L.; BARTELS, C.F.; WIERSEMA, B.; VAN DER SPEK, A.F.L.; INNIS, J.W. e LA DU, B.N. Characterization of 12 silent alleles of the human butyrylcholinesterase (*BCHE*) gene. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 58, p. 52-64, 1996.
- PRIMO-PARMO, S.L.; LIGHTSTONE, H. e LA DU B.N. Characterization of an unstable variant (BChE115D) of human butyrylcholinesterase. *Pharmacogenetics*, v. 7, p. 27-34, 1997.
- PULA, G. e KRAUSE M. **Role of Ena/VASP Proteins in Homeostasis and Disease.** Klussmann, E J. Scott (eds.) *Protein-Protein Interactions as New Drug Targets.* p. 39-65, 2008.
- QUINN, C.C. PFEIL, D.S., CHEN, E., STOVALL, E.L., HARDEN, M. V., GAVIN, M. K., FORRESTER, W. C., RYDER, E. F., SOTO, M e WADSWORTH W. G. UNC-6/netrin and SLT-1/slit guidance cues orient axon outgrowth mediated by MIG-10/RIAM/lamellipodin. *Current. Biol.* v.16, p. 845-853, 2006.
- QUINN, C. C., e WADSWORTH, E W. Axon guidance: asymmetric signaling orients polarized outgrowth. *Cell Press.* v.18, 590-603, 2008.
- Rychlik W. Selection of primers for polymerase chain reaction. *Mol. Biotech.* v.3, p. 129-134, 1995.
- RYHÄNEN, R.J.J.; JAUHIANEN, M.S.; LAITINEN, M.V. e PUHAKAINEN, E.V. The relationships between human serum pseudocholesterase, lipoproteins and apolipoproteins (APOHDL). *Biochem. Med.*, v. 28, p. 241-245, 1982.
- SAKAMOTO, N.; HIDAKA, K.; FUJISAWA, T.; MAEDA, M. e IUCHI, I. Identification of a point mutation associated with a silent phenotype of human serum butyrylcholinesterase - a case of a familial cholinesterasemia. *Clin. Chim. Acta*, v. 274, p. 159-166, 1998
- SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D. E EXCOFFIER, L. **Arlequin ver. 2.000: A software for population genetics data analysis.** Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland, 2000.
- SCOTT, E.M. e POWERS, R.F. Properties of the C5 variant form of human serum cholinesterase. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 26, p. 189-94, 1974.

- SLATKIN, M.; EXCOFFIER L. Testing for linkage disequilibrium in genotypic data using the Expectation-Maximization algorithm. **Heredity**. v. 4, p.377-383, 1996.
- SMALL, V. J., STRADAL, T., VIGNAL, T., E ROTTNER, K. The lamellipodium: where motility begins. **Trends in Cell Biology**,v. 12, p. 112-120, 2002.
- SOREQ, H.; ZAMIR, R.; ZEVIN-SONKIN, D.; ZAKUT, H. Human cholinesterase genes localized by hybridization to chromosomes 3 and 16. *Hum. Genet.*, v.77, p. 325-328, 1987.
- SOUZA, R.L.R.; FADEL-PICHETH, C.; ALLEBRANDT, K.V.; FURTADO, L e CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. 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.; MIKAMI, L.R.; MAEGAWA, R.O.B. e CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Four new mutations in the *BCHE* gene of butyrylcholinesterase in a Brazilian blood donor sample. **Mol. Genet. Metab.**, v. 84, p. 349-353, 2005b.
- SUDO, K.; MAEKAWA, M.; AKIZUKI, S.; MAGARA, T. e KANNO, T. Three different point mutations in the butyrylcholinesterase gene of three Japanese subjects with a silent phenotype. **Clin. Biochem.**, v. 29, p. 165-69, 1996.
- SUDO, K.; MAEKAWA, M.; AKIZUKI, S.; MAGARA, T.; OGASAWARA, H. e TANAKA, T. Human butyrylcholinesterase L3301 mutation belongs to a fluoride-resistant gene, by expression in human fetal kidney cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 240, p. 372-75, 1997.
- SUGIMORI, T. Shortened action of succinylcholine in individuals with cholinesterase C5 isoenzyme. **Canad. Anaesth. Soc. J.**, v. 33, p. 321-327, 1986.
- TAKAGI, H., NARAHARA, A., TAKAYAMA, H., SHIMODA, R., NAGAMINE, T. e MORI, M. A new point mutation in cholinesterase: relationship between multiple mutation sites and enzyme activity. **International Hepatology Communications**, v. 6, p. 288-293, 1997.
- WESCOE, W.C.; HUNT, C.H.; RIKER, W.F. e LITT, I.C. Regeneration rates of serum cholinesterase in normal individuals and in patients with liver damage. **Am. J. Physiol.**, v. 149, p. 549-51, 1947.

YEN, T.; NIGHTINGALE, B.N.; BURNS, J.C.; SULLIVAN, D.R. e STEWART, P.M.
Butyrylcholinesterase (BCHE) Genotyping for Post-Succinylcholine Apnea in an
Australian Population. **Clin. Chem.**, v. 49, p. 1297-1308, 2003.

APÊNDICE 1

Materiais e Métodos

Construção de oligonucleotídeos iniciadores.

Diferentes ferramentas foram utilizadas, na tentativa de superar a dificuldade de construir iniciadores em regiões de DNA repetitivo, muito comum nas sequências do gene *RAPH1*. Os iniciadores utilizados para avaliar a variabilidade do gene *RAPH1* nos exons 17 e 4, através de genotipagem por PCR-SSCA, foram construídos através da ferramenta *primer blast* do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), *OligoAnalyzer* do IDT (*Integrated DNA technologies*) e *primers* do programa Geneious 5.4 (DRUMMOND et al., 2011), sendo que os dois últimos avaliam a possibilidade de formação de estruturas secundárias, a possibilidade de formação de dímeros de um iniciador ou heterodímero,; interações que diminuem a concentração de iniciadores disponíveis na reação, levando à queda no produto final da PCR, (RYCHLIK, 1995). As informações para cada par de iniciador, quanto à ferramenta utilizada, estão expostas nas tabela 1 e 2.

Genotipagem por PCR-SSCA.

A técnica de PCR-SSCA (*polymerase chain reaction - single strand conformational analysis*) consiste na amplificação da sequência de DNA que se pretende analisar e posterior desnaturação do produto amplificado que é, então, submetido à eletroforese para a análise de conformação de DNA em fita simples. Essa técnica permite a detecção de alterações no DNA ainda desconhecidas e que podem ser geradas por apenas uma mutação de ponto, sendo detectadas pela modificação do comportamento eletroforético do DNA em fita simples.

Os pares de iniciadores utilizados para estudar a variabilidade do gene *RAPH1*, bem como suas respectivas condições de PCR e eletroforese estão apresentados na tabela 1 e 2. A amplificação foi realizada utilizando a seguinte reação de mix: 1 µL (100 ng) de DNA genômico, misturada a 9 µL de Supermix (Invitrogen) e a 10 pmoles de cada iniciador. Os ciclos foram programados do seguinte modo para o termociclador MasterCycler – Gradient : Lid:105°C; 1) 95°C /30s.; 2) 95°C /30s.; 3) temperatura de anelamento dos iniciadores específica para cada par, como observado nas tabelas 1 e 2; 4) 72°C /30s.; 5) repetir por 35 vezes do passo 2 ao 4; 6) 72°C /10

min. Após a amplificação, 5 µL do produto foram misturados a 6 µL de corante SSCA (4,75 mL de formamida, 0,0125 g de xilenocianol, 0,0125 g de azul de bromofenol, 125 µL de EDTA - 0,4 M -, 16,7 µL de NaOH 3 M e 108,3 µL de água bidestilada) e depois mantidos a 94°C por 5 minutos. Após a desnaturação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida nas seguintes condições: concentração da solução estoque de poliacrilamida: 50%, concentração de acrilamida mais bisacrilamida: (condições específicas nas tabelas 1 e 2); volume final da solução: 30ml e tampão do gel: TBE 1X.

As características das corridas eletroforéticas utilizadas para cada fragmento analisado estão presentes nas tabelas 1 e 2.

A revelação do gel (BUDOWLE et al., 1991) é realizada em etapas, durante as quais o gel deve ser mantido em agitação. Após a eletroforese, o gel deve ser colocado em um recipiente não metálico e imerso em solução aquosa de ácido nítrico (1 %) durante três minutos. Após duas lavagens com água destilada, o gel é imerso em solução aquosa de nitrato de prata (0,2%) e aquecido por 20 segundos no micro-ondas. Depois de duas novas lavagens com água destilada, o gel é imerso em 60 mL de solução reveladora (170 mL de solução aquosa de carbonato de sódio 2,96 % e 92 µL de formaldeído) até que o líquido escureça. Depois da retirada do líquido escurecido, deve ser acrescentado o restante da solução reveladora e o gel mantido imerso até que as bandas de DNA apareçam no gel. Quando a revelação estiver terminada, lavar o gel duas vezes com água destilada e mantê-lo em solução de ácido acético (10 %) por cinco minutos. Lavar duas vezes o gel com água destilada e acrescentar solução aquosa de glicerol (5 %), na qual o gel deve ser mantido por pelo menos dez minutos. Após estes procedimentos o gel pode ser “scaniado” e então descartado.

O SNP rs3814365 foi identificado através de PCR-SSCA. Após sequenciado, para confirmar a presença de uma variante, as análises prosseguiram através de genotipagem por *TaqMan*, pois os genótipos não estavam separando com suficiente clareza no gel de poliacrilamida. Os iniciadores utilizados para amplificar o fragmento que contém este SNP são: 14f -5 CAGCCCTTAAAGCCTGTCCCAGC e 14f-3 TGCTGGAGTTGCGCTGTGGG; nt 864 à 1165).

Tabela 1. Características dos iniciadores utilizados para amplificar os fragmentos de DNA do exon 17 do gene *RAPH1*, através da técnica PCR-SSCA e suas respectivas condições eletroforéticas.

Características dos iniciadores		Condições eletroforéticas					
Nome e localização	Sequência dos iniciadores (5'→3')	Tamanho do Fragmento	Temperatura de anelamento	⁴ % T	⁵ % C	⁶ V	⁷ Tempo
¹ Lpd 17bF – nt 208 -228 Lpd 17bR – nt 405 – 425	CAATGTTCGTC AAGTACAGC GCACACGGTGCAGGCTTTAG	227 pb	61°C	10	2,0	250	4h
² Lpd 14d-5 – nt 412 – 432 Lpd 14d3 –nt 645 – 665	CTGCACCGTGTGCCCCATCC TTTGCTGGGGGCACTGGAGG	253 pb	61°C	10	2,0	250	4h
² Lpd 14e-5 – nt 616 – 637 Lpd14e-3 – nt 894 – 915	TGACTCAAGCTGCACCACCCA TGCAGGAGGGGACTGTGGAGC	299 pb	61°C	10	2,0	250	4h
³ Lpd 17gF – nt 1109 – 1129 Lpd 17gR – nt 1442 – 1464	GACGTCCAGCCCTGGGGGAA TCCACCCCTCCACCTGAAACA	355 pb	64°C	10	2,0	250	4h e 30min
³ Lpd 17 hF – nt 1401 – 1425 Lpd 17 hR – nt 1720 – 1742	TCCGTGGTGG AATTTCTTCTCCT TGGCTGACCTCAACAGGACACT	341 pb	63°C	10	2,0	250	4h
³ Lpd 17iF – nt 1687 – 1711 Lpd 17iR – nt 2011 – 2036	CCAAATCCAGCCTTAGTGTCCAGC TCACTGCTACAATCAGCTCACCTGA	349 pb	63°C	10	2,0	250	6h

Iniciadores construídos através da ferramenta: ¹ *OligoAnalyzer* do IDT, ² *primer Blast* do NCBI e ³ *primers* do programa Geneious 5.4. O gene *RAPH1* apresenta 17 exons, porém a sequência que gera a isoforma *RAPH1-001*, cuja sequência foi utilizada para construir os iniciadores, possui 14, devido a isso, alguns iniciadores forma nomeados como Lpd14 e outros como Lpd17. ⁴ Concentração de poliacrilamida no gel; ⁵ concentração de bisacrilamida no total de poliacrilamida da solução estoque; ⁶ voltagem aplicada ao gel de poliacrilamida e ⁷ tempo da corrida eletroforética.

Tabela 2. Características dos iniciadores utilizados para amplificar os fragmentos de DNA do exon 4 do gene *RAPH1*, através da técnica PCR-SSCA e suas respectivas condições eletroforéticas.

Características dos Iniciadores				Condições eletroforéticas			
Nome	Sequência dos iniciadores (5'→3')	Temperatura de anelamento	Tamanho do fragmento	¹ %T	² %C	³ V	⁴ Tempo
Exon 4							
³ Lpd 4aF Lpd 4aR	TGCAGAAGCTCTGAATCAGGGAGA ACAGATTGCTGAGCAGCCTCATCC	63,1 °C	303 pb	10	2,0	100	18h
Lpd 4bF Lpd 4bR	ACCTTCCCATGCCAGCTACTCCT ACCTCAGTAATTGGCTGCCCTTGA	65,6 °C	300 pb	8	2,0	250	4h

¹ Concentração de poliacrilamida no gel; ² concentração de bisacrilamida no total de poliacrilamida da solução estoque; ³ Voltagem aplicada ao gel de poliacrilamida e ⁴ tempo da corrida eletroforética. ⁴ Iniciadores construídos através do programa *Geneious* (DRUMMOND et al., 2011).

Genotipagem por TaqMan

Para o SNP rs3814365, a sonda para o alelo “G” está marcada com a fluorescência FAM e para o alelo “A” com a fluorescência VIC. Para o rs2246118 a sonda para o alelo “T” está marcada com a fluorescência FAM e para o alelo “C” com a fluorescência VIC.

O mix para reação de genotipagem por *TaqMan* contém: 5,0 µl de TaqMan Universal PCR Master Mix, 2,5 µl de H₂O ultra pura e 0,5 µl de sonda TaqMan® específica para cada SNP e 2 µl de DNA (20ng/ µl).

Durante a reação de amplificação a DNA Polimerase é responsável por clivar as sondas contendo os fluoróforos que estavam previamente ligadas às fitas de DNA. Ao ser liberado, o fluoróforo de maior energia, Reporter (extremidade 5’), consegue emitir sua fluorescência antes suprimida pelo fluoróforo de menor energia, chamado Quencher (extremidade 3’). Quando o sinal de fluorescência (Rn) aumenta para um nível detectável, ele pode ser capturado por um instrumento de detecção e apresentado por um software apropriado na forma de uma Curva de Amplificação. A quantidade de sinal Reporter é proporcional à quantidade de produto sendo produzido pelas amostras.

O aparelho utilizado foi o Mastercycler® ep *realplex*. O uso do aparelho para este protocolo de genotipagem é realizado em três etapas. A primeira é a chamada pré-leitura, na qual é lida a fluorescência basal da placa antes do processo de amplificação. A segunda é a amplificação em si, realizada para todos os segmentos dentro dos seguintes padrões de PCR: 1º passo de 2 minutos a 50oC; 2º passo de 10 minutos a 95oC; 3º passo repetido 50 vezes de 15 segundos a 95oC e 1 minuto a 62 segundos a 60oC. A terceira etapa é a chamada pós-leitura, que se resume na análise dos dados gerados antes, durante e após a amplificação, resultando no genótipo de cada indivíduo analisado e sua plotagem em um gráfico.

Para melhor visualização dos genótipos de cada SNP estudado, foram feitas planilhas no programa Excel, contemplando os valores de fluorescência para os respectivos fluoróforos presentes na reação (FAM e VIC), e foram plotados gráficos xy para agrupar genótipos semelhantes (figura 1). Para as amostras que se apresentaram em zonas do gráfico que não estivessem contidas nos distintos grupos dos genótipos, a reação deveria ser repetida

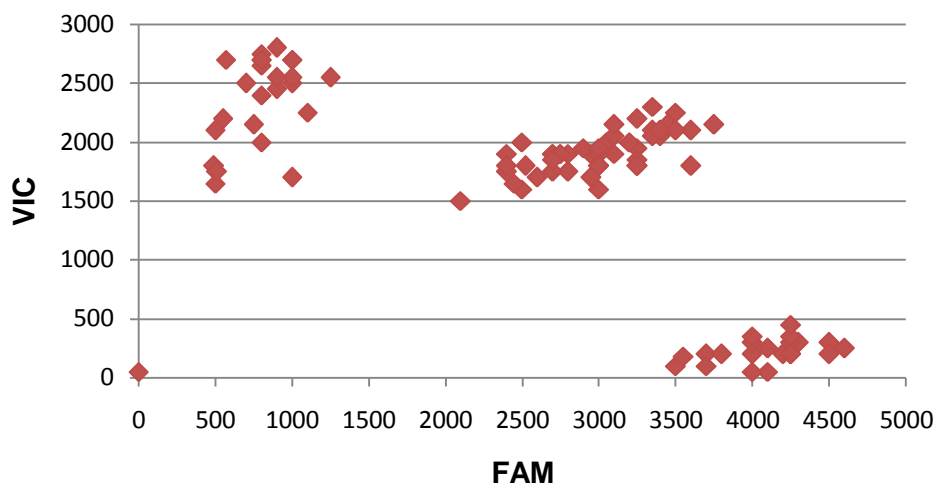


Figura 1. Gráfico exemplificando o método utilizado para inferir os genótipos, indicando valores de pico das fluorescências (FAM e VIC) em cada amostra e os três grupos genotípicos formados.

Sequenciamento de DNA

Quando uma variação no padrão de bandas eletroforéticas era observada, duas amostras eram selecionadas (supostamente uma homozigota e outra heterozigota) para serem sequenciadas, utilizam-se os mesmos iniciadores da genotipagem, para confirmar a presença ou não de um SNP na sequência.

O sequenciamento é realizado em etapas:

- Purificação do DNA: O produto de PCR é purificado com uso das enzimas fosfatase alcalina de camarão e exonuclease I. Nesta técnica, 0,8 µl de exonuclease I e 1,0 µl de fosfatase alcalina de camarão (SAP) são adicionados a 8,0 µl de produto de PCR e incubados a 37°C durante uma hora em termociclador. Em seguida, desnaturam-se as enzimas submetendo as amostras a 80°C por 15 minutos no mesmo termociclador.
- PCR para o *sequenciamento*: Para a reação de sequenciamento, são misturados 1µL do kit de sequenciamento (Bigdye Terminator v 3.1 - Applied Biosystems) acrescido de 0,5µL de um dos oligonucleotídeos iniciadores (5pM/µL) e de 1 a 3,5 µL (30 a 90ng/amostra) do produto purificado da PCR e água MiliQ em quantidade suficiente para completar 5,0 µl de volume total de reação.
- Purificação do produto da PCR: Ao produto da reação de sequenciamento, acrescentam-se 65 µl de álcool absoluto e 10 µl de água miliQ. A solução é agitada e

deixada em repouso por 10 minutos. Em seguida, centrifuga-se a 14 mil rpm por 15 minutos e retira-se o sobrenadante com auxílio de micropipeta. Acrescentam-se 100 μ l de álcool a 70% (feito na hora), agita-se e centrifuga-se, novamente, nas mesmas condições. O sobrenadante é dispensado e o líquido restante é evaporado em termociclador a 105°C durante 10 minutos.

Com as amostras já purificadas, o sequenciamento foi realizado através do sequenciador automático ABI 377, e as análises dos eletroferogramas foram feitas com o auxílio computacional do programa BioEdit (HALL, 1999).

Apêndice 2

Materiais e Métodos

Determinação da atividade da BChE.

Para a determinação da atividade da BChE foi utilizada a técnica de Dietz *et al.* (1972), modificada por Evans e Wroe (1978), cujo princípio é a hidrólise da propioniltiocolina pela butirilcolinesterase, 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 dosagem do produto formado foi realizada em espectrofotômetro ajustado em 410 nm e com todos os reagentes mantidos em banho-maria a 25°C. O tampão fosfato 0,1 M utilizado na reação (pH 7,6) foi preparado pela mistura de duas soluções “a” e “b” até a obtenção do pH adequado. A solução “a” continha 4,73 g de Na₂HPO₄ anidro (PM = 141,96) em 1000 mL de água destilada. A solução “b” continha 13,61 g de KH₂PO₄ anidro (PM = 136,09) em 1000 mL de água destilada. O DTNB (0,423 mM) foi dissolvido em tampão fosfato na proporção de 167 mg por 1000 mL. O substrato (propioniltiocolina 100 mM) foi preparado com 303 mg de iodeto de propioniltiocolina (PM = 303,2) em 10 mL de água destilada. Tubos contendo 2,2 mL de tampão fosfato com DTNB, e outros tubos contendo 50 µL de soro diluídos em 5 mL de água destilada foram mantidos por vinte minutos no banho-maria a 25°C antes da leitura em espectrofotômetro. Após os vinte minutos foram adicionados 250 µL do soro diluído e 50 µL de substrato ao tubo contendo o tampão fosfato com DTNB, iniciando-se assim a leitura. A primeira leitura, chamada A0, era efetuada imediatamente após a colocação dos reagentes na cubeta termostatizada do espectrofotômetro. As leituras A1, A2 e A3 foram efetuadas com um, dois e três minutos a partir da leitura A0. Após as quatro leituras, foi calculado o Δ/minuto (variação de absorbância por minuto). Para a obtenção da atividade (KU/L), Δ/minuto foi multiplicado pelo fator 73,53 e por 1.000.

Fenotipagem do loco CHE2.

Para a fenotipagem do loco *CHE2* foi utilizada a técnica desenvolvida por Robinson *et al.* (1957) para fenotipagem de variantes da hemoglobina, posteriormente

modificada por Van Ros e Vervoort (1973) para aplicação à BChE e com adaptações subsequentes de Fadel Picheth (1991) e Souza (1995).

O gel de ágar foi preparado com uma solução de Bacto ágar (Difco) a 1% p/v em tampão citrato de sódio, pH 6,2 (solução estoque de tampão citrato de sódio 50 mM, pH 6,7; pH ajustado com ácido cítrico 30%) e água destilada. O pH da solução contendo tampão citrato de sódio e água destilada foi ajustado a valores que variaram entre 6,42 e 6,48, e então foi adicionado 0,7 g de Bacto ágar. Esta solução era aquecida até que o ágar fosse totalmente dissolvido, sendo importante não deixar que a solução fervesse. Após o aquecimento a solução era vertida sobre uma placa de vidro de 230 x 160 mm. Quando o gel estivesse completamente resfriado, era colocado na geladeira e mantido em repouso por pelo menos 12 horas a fim de diminuir o efeito da eletroendosse. Após este período de repouso as amostras de plasma eram aplicadas no gel através da extremidade de uma lâmina de metal (5 x 5 x 0,1 mm) onde eram colocados 2 μ L de plasma ou soro. A placa contendo as amostras era então submetida à eletroforese com tampão citrato pH 6,2 nas cubas (diluído em uma proporção de 1/10), por três horas e meia (a 4°C; 75 V e 35 mA).

Após a corrida eletroforética, despejou-se sobre a placa o cromógeno-substrato que era preparado imediatamente antes do uso. A solução cromógeno-substrato foi 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 -naftilacetato 30 mM (2,5% v/v). A placa com o cromógeno-substrato era incubada por cerca de 30 minutos a 37°C. Após a revelação das bandas a placa era lavada com água para retirar o excesso de corante. O gel era 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. A folha de papel filtro era trocada após 10 minutos para retirar o excesso de umidade.

Depois de seco o gel, foi feita uma cópia em *Scanner* e o registro arquivado em computador, para posterior análise pelo programa *KODAK1D Image Analysis Software*.

Avaliação da Intensidade da banda C₅ em gel de Agar.

As amostras do grupo CHE2 C₅⁺ foram selecionadas após a avaliação da intensidade da banda C₅⁺ através do programa *KODAK1D Image Analysis Software*. Após realizar o cálculo de correção (valores de intensidade dividido pelo valor de intensidade média das bandas C₅⁺ controles) buscando homogeneizar as diferenças observadas entre géis quanto a coloração e scanner, obteve-se o valor de porcentagem, do quanto a banda avaliada representava do valor médio de C₅⁺ controle. Os valores obtidos foram ordenados em um gráfico de distribuição de intensidade gerado no Exel (figura 1). Dois critérios foram utilizados para classificar o fenótipo: 1. uma avaliação visual das bandas classificando-as como C₅⁺ ou C₅⁻, e 2. a observação da distribuição das intensidades no gráfico. As amostras com valores baixos ($\leq 0,2$) não apresentavam bandas visíveis no gel, enquanto acima deste valor sim.

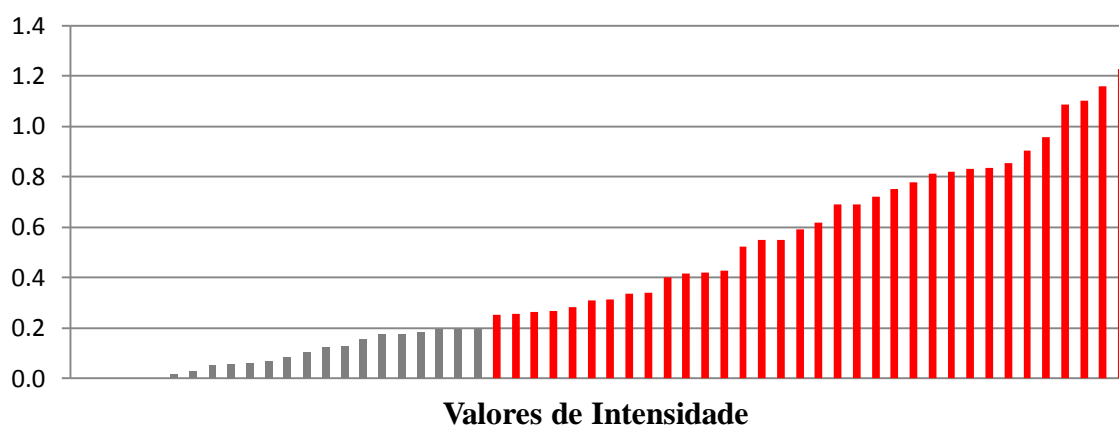


Figura 1. Valores de intensidades da banda C₅ avaliadas através do programa *KODAK1D Image Analysis Software*. Foram consideradas amostras do fenótipo CHE2 C₅⁺ aquelas que possuíam valores de intensidade $> 0,2$; que correspondem no gráfico às colunas de cor vermelha. As amostras com intensidade $\leq 0,2$ não foram incluídas nas análises deste trabalho (colunas cinza).

Classificação do fenótipo CHE2 C5+ em forte e fraco.

Dois critérios foram utilizados para a avaliação dos fenótipos: 1. uma avaliação visual, classificando as bandas em fenótipos fraco e forte; e 2. a observação dos valores de distribuição de intensidade no gráfico (figura 2). As amostras classificadas visualmente como C5+ forte, também tinham valores de intensidade maiores ou iguais a 70% do valor médio da banda C₅ controle.

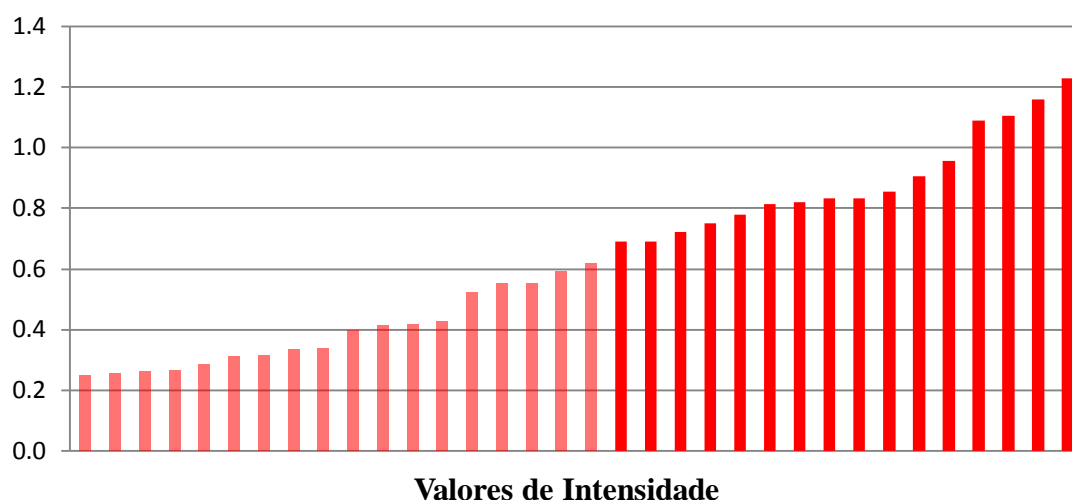


Figura 2. Valores de intensidade da banda C₅ para os fenótipos CHE2 C5+ forte e fraco, obtidos através do programa *KODAK1D Image Analysis Software*. Amostras com valores $\geq 0,7$ foram classificadas como CHE2 C5+ forte (coloração vermelho intenso), enquanto as demais correspondem ao fenótipo CHE2 C5+ fraco (coloração vermelho claro) e apresentam valores $\leq 0,6$.

ANÁLISES ADICIONAIS

Estudo de Ligação entre o Gene RAPH1 e Loco CHE2

Para investigar a probabilidade de ligação genética entre variantes do gene *RAPH1* e o Loco *CHE2 C5+*, foram selecionadas famílias que poderiam contribuir com informações sobre ligação: aquelas que continham pelo menos um dos genitores duplo heterozigoto e apresentavam mais de um filho.

Ao verificar a ocorrência da co-segregação significativa do variante genético e do fenótipo avaliado, dentro das famílias, pode-se concluir que a variante genética avaliada pertence ao gene responsável pela característica ou este terá sua localização nas vizinhanças desse variante. Assim, a observação da co-segregação de variantes do gene *RAPH1* e fenótipo CHE2 C5+ e, as informações disponíveis na literatura, como: a localização do loco *CHE2* e gene *RAPH1* na mesma região do cromossomo 2; que peptídeos ricos em prolina, pertencentes a proteína lamelipodina codificada pelo gene *RAPH1* podem ser encontrados no tetrâmero da BChE (LI et al, 2008); e a associação entre atividade da BChE e o gene *RAPH1* (BENYAMIN et al. (2011), pode-se concluir que o loco *CHE2* é o gene *RAPH1*.

As famílias foram genotipadas para os SNPs rs3814365 e rs2246118, pois para estes SNPs a genotipagem é realizada por *TaqMan*, método que utiliza uma concentração de DNA (20ng/uL) bem menor se comparada a PCR-SSCA (~100ng/uL), considerando que não havia muito DNA disponível para estas amostras. Inicialmente os genitores com fenótipo CHE2 C5+ foram genotipados e quando se observava que não se tratava de um duplo heterozigoto, as genotipagens não continuavam para aquele SNP nos demais integrantes da família.

Foram avaliadas 7 famílias, totalizando 52 indivíduos, como mostrado na tabela 1. A família 1 foi considerada não informativa para o SNPs rs3814364 pois o genitor CHE2 C5+ é também homozigoto para o alelo A. Para o outro SNP não foi possível a genotipagem desse indivíduo. Para as famílias 2 e 3, a análise dos genótipos apontou algumas controvérsias quanto aos genótipos dos indivíduos 11 e 17, 20 e 21 que parecem não ter herdado nenhum dos alelos do genitor genotipado para o rs3814364. Não foi possível obter resultados seguros para a genotipagem do outro SNP (rs2246118), para responder se realmente tratam-se de filhos ilegítimos.

Na família 4, quanto aos genitores do fenótipo CHE2 C5+, não foi possível genotipar o indivíduo 25 para os SNPs de estudo, e o indivíduo 28 foi genotipado apenas para o SNP rs2246118, sendo homozigoto para o alelo C. Nas famílias 5 e 6 os genitores do fenótipo CHE2 C5+ eram também homozigotos para ambos os SNPs avaliados. A família 7 foi considerada informativa para o SNP rs3814365, pois o genitor CHE2 C5+ foi genotipado como heterozigoto.

O próximo passo seria o cálculo do *lod score* máximo, mas, como trata-se de apenas uma família e com uma irmandade pequena, os dados não seria informativos, por isso não foram realizados. Apenas valores iguais ou superiores a +3,000 são indicativos de ligação para dois loci autossômicos. Contudo, nesta família (7), é possível observar que os indivíduos CHE2 C5+ também carregam o alelo G do rs3814365, o mesmo alelo que apresentou uma tendência a estar mais frequente em indivíduos do fenótipo CHE2 C5+ forte e está presente no haplótipo associado a este fenótipo. Porém, para se obter avaliações seguras é necessário um número maior de famílias informativas.

Tabela 1. Famílias selecionadas para o estudo de ligação entre variantes do gene *RAPH1* e loco *CHE2*, genotipadas para os SNPs rs3814365 e rs2246118.

	Indivíduo	Pais	Loco CHE2	rs3814365	rs2246118
Família 1	1		-		
	2		-		
	3	1 e 2	-		
	4		+	AA	
	5	3 e 4	+	AA	
	6	3 e 4	+		
Família 2	7		+		
	8		-	AA	
	9	7 e 8	-		
	10	7 e 8	-	AA	
	11	7 e 8	+	GG	CC
	12		-		CT
	13	7 e 8	-		
	14	11 e 12	-	GG	CC

Continua

	Indivíduo	Pais	Loco CHE2	rs3814365	rs2246118
Família 3	15		-	AA	
	16		+		
	17	15 e 16	+	GG	
	18	15 e 16	+		
	19	15 e 16	+		
	20	15 e 16	+	GG	
	21	15 e 16	-	GG	
	22	15 e 16	+		
Família 4	23		-		
	24	23	-	GG	
	25		+		
	26	23	-		
	27	24	-	AA	
	28		+		CC
	29	25 e 26	-	AA	CT
	30	25 e 26	+	AA	
	31	27 e 28	+		
	32	27 e 28	-		CC
	33	27 e 28	-		
Família 5	34		+	AA	TT
	35		-		
	36	34 e 35	+		
	37	34 e 35	-		
	38	34 e 35	-		
	39	34 e 35	-		
	40	34 e 35	-		
	41	34 e 35	+		
Família 6	42		-		
	43		+	AA	TT
	44	42 e 43	+		
	45	42 e 43	-		
	46	42 e 43	+		
	47	42 e 43	+		
Família 7	48		+	AG	CC
	49		-	AA	TT
	50	48 e 49	+	AG	CT
	51	48 e 49	-	AA	CT
	52	48 e 49	-	AA	CT