

HUGO DA SILVA ALVES

VARIABILIDADE DO GENE *BCHE* EM POPULAÇÕES INDÍGENAS DO PARANÁ

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, na área de concentração em Genética.

Orientador: Ricardo L. R. de Souza

Co-orientadora: Eleidi A. Chautard Freire Maia

Curitiba  
2009

**“Pilitem suas pr3prias cabe7as!”  
Chico Science**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu pai, seu Toninho, pelo amor e interminável dedicação aos seus filhos. À minha mãe, dona Jose, pelo carinho único de uma grande mãe.

À minha filha Íris, pelas infinitas coisas que aprendemos juntos, pelos finais de semana sempre muito divertidos, pelo seu carinho, amor e enorme compreensão. Tudo é por você minha polaca!

Aos índios, pela contribuição na formação da enorme diversidade da população brasileira, e pela colaboração neste e em outros diversos trabalhos acadêmicos.

Ao Ricardo, que no começo era um orientador, e no final se tornou além disso um grande amigo. Obrigado por tudo mesmo Ricardo!

Ao Karam e a Valéria, sou eternamente grato por tudo, pela constante preocupação e pelos empurrões que me embarcaram nesse mundo da genética de populações. À professora Eleidi, pelo carinho e reconhecimento do esforço em prol do laboratório.

À Dellyana, pelo carinho de mãe e pelos ensinamentos dentro e fora do laboratório.

Aos professores Lupe, Eleidi, Iglénir, Iliada e João Carlos, pelo tempo e atenção dedicados ao acompanhamento e avaliação do nosso trabalho. À professora Maria Luiza, pela gentileza ao nos fornecer este material ímpar. E ao Laboratório de Imunogenética do Hospital das Clínicas da UFPR, pelo empréstimo de suas instalações e seu tão útil aparelho de PCR em tempo-real.

Aos meus amigos irmãos: Negão, representante da ancestralidade africana da família; Aline, baixinha nervosa; Paulo, meu irmão mais novo; Dú, irmão do peito; Falcão, sempre parceirasso; Lelo, eterno amigo parnanguara; Thiago, o advogado montanhista; Didi, o homem da lei; Japa, o biólogo; Lê, o homem da soja; Móca, sempre masomenos; Lú, minha irmã catarina; Rogério, o veterinário; Felipão, brother sempre; Jana, minha janoca; Rô: mãe inesquecível do triathlon; Tia Marina: minha segunda mãe; Claudinha, Pati, Carol, Lê e as Fers, amigonas sempre.

A todos os meus alunos, que tornaram minha vida muito mais divertida, ajudando a suportar momentos de aflição com muita conversa e ótimas risadas.

Aos músicos que com sua arte ditaram o ritmo desse trabalho. Obrigado!

A minha Ipanema, que bravamente me leva e traz de TODOS os lugares.

Aos amigos de laboratório por me aturarem por esses longos dois anos: Dani, Delly, Carol, Alejandro, Pati, Átila, Samarina, Henrique, Thais Emi, Thais, Meire e Gleyse. E a galera da genética: Wane, Taynah, Ivan, André, Marcos, Sarah, Giovana, Márcio, Rodrigo, Charuto, Gisele, e vários outros que perdoarão meu esquecimento.

Agradeço muito a todos pelos momentos de companheirismo, alegrias e insanidades. Sem meus amigos eu não seria ninguém.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	vi
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	viii
<b>RESUMO</b> .....	ix
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	3
2.1 AMERÍNDIOS .....	3
2.1.1 O povoamento das Américas .....	3
2.1.2 Estruturação populacional em nativos americanos.....	5
2.1.3 Índios do Brasil .....	6
2.1.4 As populações deste estudo .....	7
2.2 ESTERASES .....	10
2.3 ESTRUTURA DA BChE .....	11
2.4 O GENE <i>BCHE</i> – ESTRUTURA E LOCALIZAÇÃO .....	12
2.5 ATUAÇÃO FISIOLÓGICA DA BChE .....	14
2.6 VARIABILIDADE GENÉTICA DO LOCO <i>BCHE</i> .....	16
2.7 ASPECTOS EVOLUTIVOS DO GENE <i>BCHE</i> .....	19
<b>3 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA</b> .....	21
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	22
4.1 AMOSTRA POPULACIONAL .....	22
4.2 METODOLOGIAS DE TIPAGEM.....	25
4.2.1 PCR-SSCA .....	25
4.2.2 Genotipagem em Tempo-real (TaqMan).....	27
4.3 ANÁLISE DOS DADOS .....	30

<b>5 RESULTADOS</b> .....	31
5.1 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS .....	31
5.1.1 SNPs a montante do gene <i>BCHE</i> .....	33
5.1.2 SNPs dentro do gene <i>BCHE</i> .....	33
5.1.3 SNPs a jusante do gene <i>BCHE</i> .....	34
5.2 EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG .....	34
5.3 FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS, DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO E HETEROZIGOSIDADE .....	35
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	37
6.1 SNPs A MONTANTE DO GENE <i>BCHE</i> .....	37
6.1.1 SNP rs2863381.....	37
6.1.2 SNP rs4440084.....	39
6.2 SNPs DENTRO DO GENE <i>BCHE</i> .....	41
6.2.1 SNP rs1126680 (Mutação -116).....	41
6.2.2 SNP rs1803274 (Mutação K).....	43
6.2.3 SNP rs3495 (Mutação 1914).....	45
6.3 SNPs A JUSANTE DO GENE <i>BCHE</i> .....	47
6.3.1 SNP rs7624915.....	47
6.3.2 SNP rs4387996.....	49
6.4 FREQUÊNCIAS DE HAPLÓTIPOS E DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO.....	51
6.5 HETEROZIGOSIDADE E DISTÂNCIA GENÉTICA.....	58
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	61
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	62

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	MUTAÇÕES DO GENE <i>BCHE</i> .....	18
TABELA 2	POPULAÇÕES COMPARADAS.....	23
TABELA 3	VALORES DE P PARA O TESTE DO $\chi^2$ QUE TESTOU O EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG.....	35
TABELA 4	DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO PARA OS GUARANI (GRC).....	36
TABELA 5	DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO PARA OS KAINGANG (KRC).....	36
TABELA 6	FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO SNP rs2863381....	38
TABELA 7	COMPARAÇÕES DOS GENÓTIPOS DO SNP rs2863381 ENTRE DIFERENTES POPULAÇÕES.....	38
TABELA 8	FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO SNP rs4440084....	40
TABELA 9	COMPARAÇÕES DOS GENÓTIPOS DO SNP rs4440084 ENTRE DIFERENTES POPULAÇÕES.....	40
TABELA 10	FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO SNP rs1126680....	42
TABELA 11	FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO SNP rs1803274....	44
TABELA 12	COMPARAÇÕES DOS GENÓTIPOS DO SNP rs1803274 ENTRE DIFERENTES POPULAÇÕES.....	45
TABELA 13	FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO SNP rs3495 (MUTAÇÃO 1914).....	46
TABELA 14	COMPARAÇÕES DOS GENÓTIPOS DO SNP rs3495 (MUTAÇÃO 1914) ENTRE DIFERENTES POPULAÇÕES.....	46
TABELA 15	FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO SNP rs7624915....	48
TABELA 16	COMPARAÇÕES DOS GENÓTIPOS DO SNP rs7624915 ENTRE DIFERENTES POPULAÇÕES.....	48
TABELA 17	FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO SNP rs4387996....	50
TABELA 18	COMPARAÇÕES DOS GENÓTIPOS DO SNP rs4387996 ENTRE DIFERENTES POPULAÇÕES.....	50
TABELA 19	HAPLÓTIPOS COM A MUTAÇÃO K EM AMERÍNDIOS (SNP rs1803274).....	53

TABELA 20	HAPLÓTIPOS E SUAS FREQUÊNCIAS EM CINCO POPULAÇÕES	54
TABELA 21	HAPLÓTIPOS COM O SNP rs3495 (MUTAÇÃO 1914) EM AMERÍNDIOS .....	55
TABELA 22	DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO PARA OS ASIÁTICOS (JPT+HCB)..	57
TABELA 23	DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO PARA OS EURO-DESCENDENTES (CEU).....	57
TABELA 24	DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO PARA OS NIGERIANOS (YRI).....	57
TABELA 25	COMPARAÇÃO DO DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS SNPs NAS POPULAÇÕES ANALISADAS.....	57
TABELA 26	DISTÂNCIAS GENÉTICAS ENTRE AS POPULAÇÕES.....	59
TABELA 27	HETEROZIGOSIDADE OBSERVADA NAS POPULAÇÕES.....	59

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	ESTRUTURA E LOCALIZAÇÃO DO GENE <i>BCHE</i> .....	13
FIGURA 2	LOCALIZAÇÃO DA RESERVA DE RIO DAS COBRAS.....	24
FIGURA 3	ESQUEMA DE LIGAÇÃO DAS SONDAS FLUORESCENTES.....	28
FIGURA 4	LOCALIZAÇÃO DOS SNPs NO CROMOSSOMO 3.....	29
FIGURA 5	EXEMPLO DE RESULTADO DE UMA CORRIDA ELETROFO- RÉTICA EM GEL DE POLIACRILAMIDA (MUTAÇÃO K).....	32
FIGURA 6	EXEMPLO DE RESULTADO GRÁFICO DA GENOTIPAGEM EM TEMPO-REAL (SNP rs2863381).....	32
FIGURA 7	DENDROGRAMA CONSTRUÍDO ATRAVÉS DO MÉTODO NEIGHBOR-JOINING E BASEADO NA DISTÂNCIA GENÉTICA PADRÃO.....	59



## RESUMO

Kaingang e Guarani constituem os dois maiores grupos de ameríndios que vivem no sul do Brasil. Estes grupos possuem uma origem comum nos paleo-ameríndios que colonizaram a América do Sul. Historicamente compartilham espaços geográficos entre si e mais recentemente estabeleceram contato com grupos europeus e africanos. A BChE é uma enzima colinesterase sérica produzida a partir do gene *BCHE*. Este gene está localizado no cromossomo 3 e possui aproximadamente 70 variantes descritas, sendo a grande maioria muito rara e/ou silenciosa. A BChE não possui uma função muito bem estabelecida, porém está relacionada com diversos aspectos fisiológicos, como: metabolismo de lipídios, co-regulação da neurotransmissão colinérgica, proliferação celular nervosa e proteção contra agentes tóxicos neurais. O presente estudo analisou três SNPs dentro do gene *BCHE* e quatro em torno do gene através de PCR-SSCA e Genotipagem por TaqMan. Foram genotipados 60 Kaingang e 60 M'Byá Guarani, todos da reserva indígena Rio das Cobras no estado do Paraná, Brasil. Os dados obtidos foram comparados com outras populações. Dentro do gene *BCHE*: o alelo mutante -116A está totalmente ausente nos ameríndios, assim como em asiáticos e africanos; o alelo mutante K está presente ancestralmente nos ameríndios; e, finalmente, o alelo mutante 1914 está significativamente menos frequente em ameríndios do que em grupos europeus, asiáticos e africanos. As frequências alélicas e a diversidade haplotípica mostraram que o tempo de divergência entre estes grupos ameríndios, Kaingang e Guarani, foi suficiente para distingui-los geneticamente. O contato entre eles e com grupos não-ameríndios não criou níveis significantes de miscigenação, provavelmente por diferenças culturais e lingüísticas. Em termos gerais há também uma variação gradual do alelo ou haplótipo mais frequente. Nos extremos estão as populações mais afastadas e isoladas geograficamente, as africanas e ameríndias, e em uma condição geralmente intermediária de variação estão as populações asiáticas e européias. Dados do consórcio HapMap apresentam exatamente esta tendência entre o grupo euro-descendente (CEU) e o grupo nigeriano (YRI) para mais de 75% de 3 milhões de SNPs analisados. Adaptações locais e efeitos mais significativos da deriva genética são, por enquanto, as principais justificativas para esta forte variação.

## 1 INTRODUÇÃO

A butirilcolinesterase (BChE) é uma enzima sérica produzida no fígado, sendo amplamente distribuída no organismo. A BChE é codificada pelo gene *BCHE*, que está localizado no braço longo do cromossomo 3 (3q26.1- q26.2). Mais de 70 variantes genéticas deste gene já foram descritas, sendo a maioria rara. O gene *BCHE*, constituído por 64.558 pb, existe como entidade única no genoma, contém 4 exons, sendo que o éxon 2, que codifica a serina do centro ativo e a seqüência líder da enzima, contém 83% da seqüência codificadora da BChE madura (ARPAGAUS *et al.*, 1990). Tanto a estrutura do gene como a da enzima são bastante similares às da acetilcolinesterase (AChE), sugerindo a hipótese de que seus respectivos genes tenham sido derivados de um gene ancestral comum através do processo de duplicação gênica.

A função fisiológica e o substrato natural da BChE permanecem desconhecidos. Várias evidências relacionam a butirilcolinesterase a diversos fatores como: co-regulação da neurotransmissão colinérgica (DARVESH *et al.*, 1998); desenvolvimento do sistema nervoso estimulando a proliferação celular (DARVESH *et al.*, 2003) e por conseqüência envolvimento com doenças neurodegenerativas como Mal de Alzheimer; fatores de risco de acidentes cardiovasculares e fatores relacionados à síndrome metabólica (VALLE *et al.*, 2008); metabolismo de lipídios e conseqüentemente com IMC e obesidade (ALCÂNTARA *et al.*, 2005); proteção contra agentes tóxicos neurais como organofosforados (CHILUKURI *et al.*, 2008); tratamento de dependentes químicos e overdose de cocaína (DUYSEN *et al.*, 2008), etc.

A variabilidade do gene *BCHE* começou a ser estudada na década de 50. As primeiras variantes não-usuais estavam associadas a pessoas que apresentavam apnéia respiratória prolongada após a administração de relaxantes musculares utilizados como anestésicos cirúrgicos, principalmente succinilcolina. Outras variantes foram descobertas através da utilização de técnicas de inibição enzimática e estudos familiares, que falham por somente expor as poucas variantes que alteram a atividade da enzima (VALLE *et al.*, 2006). Mais recentemente, com a evolução das técnicas moleculares de análise do DNA, foi surpreendente a ascensão do número

de mutações novas descobertas (muitas delas consideradas silenciosas, ou seja, com menos de 10% da atividade da enzima usual), principalmente por técnicas como PCR-SSCA, PCR-RFLP e sequenciamento (SOUZA *et al.*, 2005).

As diferentes mutações do gene causam diferentes efeitos na expressão e estrutura da proteína BChE, podendo não haver nenhuma alteração significativa, ou um relevante decréscimo na atividade da enzima (LANDO *et al.*, 2003). Estudos realizados em ameríndios relatam atividade baixa da BChE nesses grupos (PRIMO-PARMO *et al.*, 1986; FURTADO *et al.*, 2006). Os autores atribuem essa baixa na atividade principalmente a hábitos alimentares, tempo de estocagem do plasma, e variantes do gene *BCHE*.

São poucos os estudos analisando a diversidade de variantes do gene *BCHE* em ameríndios. Estes sugerem a hipótese de que algumas variantes estavam presentes nos paleo-ameríndios, e outras encontram-se presentes devido ao fluxo gênico recente com populações europeias, africanas e asiáticas (FURTADO *et al.*, 2006; NUNES *et al.*, 2007).

De maneira mais ampla, este estudo pretende um melhor entendimento da variabilidade do gene *BCHE* e de regiões adjacentes a ele em ameríndios, comparando com os dados de diversas populações mundiais. Outros levantamentos semelhantes estão sendo feitos em nosso laboratório, e futuramente esses dados poderão juntos nos informar mais sobre a história evolutiva deste segmento de DNA e agregar conhecimento sobre a dispersão da espécie humana pela Terra.

Mais especificamente o presente trabalho também objetiva analisar a diversidade deste segmento dentre duas populações indígenas, cujas distintas características nos fornecem um material singular extremamente interessante para estudos genéticos, evolutivos e antropológicos já que, embora estas apresentem uma relação de convivência espaço-temporal muito íntima, divergem geneticamente e culturalmente.

Padrões de diversidade genética e estrutura populacional constituem uma importante fundamentação para muitas áreas de pesquisa em genética humana. Destaca-se a importância destes dados para inferirmos sobre a história evolutiva humana (WANG *et al.*, 2007). Recentemente muitos estudos genéticos estão detalhando estes padrões para várias populações nativas ao redor do mundo, construindo assim uma grande diversidade de dados que quando analisados em conjunto mostram como, quando e por onde passaram nossos ancestrais.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 AMERÍNDIOS

#### 2.1.1 O povoamento das Américas

As Américas foram o último continente a ser ocupado pelos humanos modernos, e sua colonização representa um capítulo muito interessante da evolução da nossa espécie (FAGUNDES *et al.*, 2008). É consenso entre os cientistas a hipótese de que o homem chegou a América através do estreito de Bering, provindo da Sibéria, durante a última glaciação. Esta massa de terra utilizada chama-se Beríngia, e conecta a Ásia às Américas durante períodos onde os oceanos estão abaixo do nível normal (GOEBEL *et al.*, 2008). As principais perguntas, ainda em aberto, concernem à quantidade de ondas migratórias que efetivamente ocorreram, o período de ocorrência da primeira delas e quais rotas teriam sido utilizadas pelos pré-ameríndios (ROGERS *et al.*, 1992; WANG *et al.*, 2007).

As primeiras abordagens sobre todos estes pontos foram por meio da arqueologia, da paleontologia e da lingüística (GOEBEL *et al.*, 2008). Mais recentemente uma outra alternativa está disponível e sendo extremamente utilizada, a genética molecular (SALZANO *et al.*, 2006). Em conjunto, novas hipóteses estão sendo sugeridas quanto aos períodos e maneiras que os humanos colonizaram o Novo Mundo.

Apesar do local por onde houve a entrada do homem nas Américas ser um consenso, o período em que isso aconteceu e o número de vezes não é. Já foram sugeridas, por exemplo, datas como 150.000 anos (IRVING, 1985). Porém a maioria das hipóteses propostas para a migração que originou a maioria dos ameríndios fica entre 10.000 e 24.000 anos atrás. Estas são embasadas principalmente por estudos com DNA mitocondrial, marcadores do cromossomo Y, variabilidade de marcadores autossômicos e análises matemáticas computacionais.

Análises de DNA mitocondrial são amplamente utilizadas para sugerir datações de eventos evolutivos humanos, como migrações, povoamentos e extinções. Horai (1993), utilizando somente amostras ameríndias, propõe quatro migrações da Ásia originando os ameríndios, entre 14.000 e 21.000 anos atrás. Wallace e Torroni (1992), utilizando em conjunto amostras não-ameríndias, sugerem também quatro migrações, sendo a primeira com datação entre 21.000 a 42.000 anos atrás originando os ameríndios da América do Sul, e as outras três seguintes originando os ameríndios da América do Norte.

Em uma outra hipótese propõe-se duas migrações de saída da Ásia, a primeira há aproximadamente 34.000 anos, e a segunda entre 16.000 e 13.000 anos. A maioria dos ameríndios teria se originado desta primeira migração. Enquanto que a segunda teve um estágio de permanência na região da Beríngia, permanecendo os indivíduos em diferentes refúgios no final da última glaciação, diferenciando-se assim nas demais populações ameríndias atuais (STARIKOVSKAYA *et al.*, 1998).

Há um modelo de migração da Ásia para as Américas chamado modelo dos três estágios, sendo o primeiro a migração da Ásia para a Beríngia (entre 43.000 e 36.000 anos atrás), o segundo o isolamento na região da Beríngia (durante aproximadamente 20.000 anos) e o terceiro a entrada nas Américas (aproximadamente 16.000 anos atrás; KITCHEN *et al.*, 2008). Porém há uma grande controvérsia se houve ou não um período onde as populações que migravam da Ásia para as Américas ficaram isoladas na região da Beríngia, Fagundes *et al.* (2008) afirmam que esta informação é equivocada pois amostras não-ameríndias foram utilizadas erroneamente nestas análises de Kitchen *et al.*, 2008.

Com a utilização de modelos matemáticos para estimar o número de indivíduos que teriam vindo da Ásia para as Américas, originando os Ameríndios, sugeriu-se um tamanho da população efetiva de fundadores em torno de 70 indivíduos. Isto representaria 1% da população asiática de origem. Além disso, neste estudo estimou-se a data de chegada destes indivíduos entre 7.000 e 33.000 anos atrás (HEY, 2005). Outro estudo, também com análises matemáticas, sugere uma população efetiva fundadora das Américas de aproximadamente 450 indivíduos que teria migrado há aproximadamente 10.500 anos (FAGUNDES *et al.*, 2008). Independente destas divergências, é evidente o efeito fundador e o forte efeito da deriva genética nas populações ameríndias ancestrais. Consequentemente, o

resultado é uma significativa perda de variabilidade genética durante este processo migratório.

Sijia Wang *et al.* (2007) realizaram uma análise comparando 24 populações nativas americanas em relação à variabilidade de 678 microssatélites autossômicos. Várias conclusões foram tiradas a partir destes dados, como: o padrão genético continental da América é parcimoniosamente melhor explicado por um único evento colonizador a partir da Sibéria; houve uma forte preferência pelas rotas da costa leste (rota dos Andes) e depois através de grandes rios penetrando nos continentes; e um processo de divergência numa escala local devido principalmente a diferenças lingüísticas.

### 2.1.2 Estruturação populacional em nativos americanos

A dispersão dentro do continente americano ocorreu, portanto, no sentido norte-sul. Geneticamente isto é reforçado pelos níveis de heterozigosidade de diversos marcadores moleculares, como microssatélites e haplótipos de genes, que diminuem de maneira gradativa a partir da África até o sul das Américas (SALZANO, 2006; WANG, 2007). Este processo de entrada nas Américas levou a uma perda de variabilidade genética devido aos gargalos populacionais. Salzano & Callegari-Jacques (2006), entretanto, propõem que diferenças dentro do continente e a história recente dos grupos podem ter condicionado diferenças de variabilidade mais amplas entre as populações nativas atuais. Em outro trabalho estes mesmos autores concluem que, mesmo havendo esta perda de variabilidade também durante a colonização da América do Sul, ainda observa-se um valor significativo de variabilidade dentro e entre populações nativas americanas.

Callegari-Jacques *et al.* (2007), baseando-se em dados de haplótipos do gene da  $\beta$ -Globina, sugerem duas principais vias de colonização da América do Sul:

- Dois grupos chegam à América do Sul (provavelmente em tempos diferentes). Um desloca-se por terra, pelas costas leste e oeste em direção ao sul. O segundo, vindo pelas ilhas do Caribe, entra pela Amazônia “empurrando” o primeiro grupo ainda mais para o sul.

- Um grupo chega a América do Sul atravessando o estreito do Panamá, então divide-se em dois: um segue pela costa oeste (rota dos Andes) em direção ao sul, e o outro move-se para leste penetrando na Amazônia.

Os autores também propõem que a clássica dicotomia Andes/não-Andes para a classificação da variabilidade genética da América do Sul deve ser substituída pela divisão em três grupos: Amazônia, Andes e Centro/Sudeste. Esta mesma hipótese de estruturação dos ameríndios, considerando três grupos geográficos, é a mais parcimoniosa estatisticamente, com base na análise da variabilidade do gene *DRD4*, um dos mais variáveis do genoma humano (TOVO-RODRIGUES, 2008).

### 2.1.3 Índios do Brasil

Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) demonstram que a população indígena no Brasil vem aumentando rapidamente nas últimas décadas. Atualmente, as 215 diferentes sociedades totalizam aproximadamente 358 mil pessoas. Considere-se, no entanto, que este dado populacional inclui somente aqueles indígenas que vivem em aldeias, havendo estimativas de que, além destes, há entre 100 e 190 mil vivendo fora das terras indígenas, inclusive em áreas urbanas. Há também indícios da existência de aproximadamente 53 grupos ainda não contatados, além de existirem grupos que estão requerendo o reconhecimento de sua condição indígena junto ao órgão federal indigenista.

Os índios do Brasil falam 180 línguas distintas (as quais pertencem a mais de 30 famílias lingüísticas diferentes). Vivem em diversas regiões do território brasileiro e representam, em termos demográficos, um pequeno percentual da população, aproximadamente 0,2% de cerca de 185 milhões de habitantes. Todavia, são um exemplo concreto e significativo da grande diversidade cultural existente no país. Mais da metade da população indígena está localizada nas regiões Norte e Centro-Oeste do Brasil, principalmente na área da Amazônia Legal. Mas há índios vivendo em todas as regiões brasileiras, em maior ou menor número (ISA: <http://www.socioambiental.org>).

No que diz respeito à identidade étnica, as mudanças ocorridas em várias sociedades indígenas, como o fato de falarem português, vestirem roupas iguais às

dos outros membros da sociedade nacional com a qual estão em contato, utilizarem modernas tecnologias (como câmeras de vídeo, máquinas fotográficas, celulares e aparelhos de fax), não fazem com que percam sua identidade étnica e deixem de ser indígenas (FUNAI: [http://www.funai.gov.br/indios/fr\\_conteudo.htm](http://www.funai.gov.br/indios/fr_conteudo.htm)).

Os seus antepassados contribuíram com muitos aspectos de suas diversificadas culturas para a formação do Brasil: um país de vasta extensão territorial, cuja população é formada pelos descendentes de europeus, africanos, índios e, mais recentemente, também de asiáticos, que mesclaram suas diferentes línguas, religiões e tradições culturais, propiciando a formação de uma nova cultura, fortemente marcada por contrastes. Isto faz não só do Brasil, mas de toda América Latina, um campo de trabalho extremamente rico e diversificado para os geneticistas de populações.

#### 2.1.4 As populações deste estudo

Kaingang e Guarani constituem as duas maiores tribos de ameríndios que vivem no sul do Brasil, podendo também ser encontrados no Paraguai e no norte da Argentina. Estes dois grupos indígenas são culturalmente distintos entre si. Os Guarani pertencem ao grupo lingüístico Tupi, e os Kaingang, ao grupo lingüístico Gê. Os Guarani são nômades e costumam viver próximo a grandes rios, organizando-se em vários subgrupos. Os Kaingang, por sua vez, são seminômades e vivem nos planaltos. A atividade básica das duas tribos se restringe à agricultura, caça e pesca. Atualmente, apesar da redução populacional que sofreram com a colonização, as tribos indígenas sul-brasileiras estão distribuídas em várias reservas administradas pelo governo federal, sendo que muitas delas são compartilhadas pelos Guarani e Kaingang, em diferentes vilas (ALVES, 2006). Embora tenham passado por um intenso processo de aculturação, estes indígenas ainda têm costumes bastante distintos do restante da população brasileira, inclusive a endogamia (UTIYAMA, 2000).

A origem do tronco lingüístico Tupi é estimada em aproximadamente 5.000 anos (URBAN *et al.*, 1996), e a sua separação nos 3 sub-grupos Guarani há aproximadamente 1.800 anos (MARRERO *et al.*, 2007), muito antes do contato com



africanos e europeus. A origem do tronco lingüístico Gê é estimada em aproximadamente 3.000 anos (URBAN *et al.*, 1996), registrando a história um recente e intenso movimento migratório Kaingang em direção ao sul e sudeste do Brasil, fazendo assim contato com colonizadores não-ameríndios, intensificando a sua miscigenação (SCHMITZ & BECKER, 1997).

Os grupos indígenas que atualmente são encontrados no Estado do Paraná (praticamente todos influenciados pelo contato com as outras sociedades) totalizam 10.375 indivíduos, pertencentes a três diferentes etnias indígenas: Guarani (Mbyá e Ñandeva), Kaingang e Xeta (FUNAI, 2008).

Existem aqui populações com relativos altos níveis de não-similaridade vivendo em áreas geográficas comuns. Isto mostra algo comumente discutido em trabalhos de genética de populações, aonde dentro da América do Sul a distância genética entre tribos ameríndias não possui correlação com as distâncias geográficas, mas em partes com diferenças culturais e lingüísticas (PETZL-ERLER *et al.*, 1993; MARRERO *et al.*, 2007).

A população Kaingang utilizada neste trabalho foi anteriormente analisada por Petzl-Erler *et al.* (1993) para a variabilidade do complexo HLA e por Perini *et al.* (2008) quanto à variabilidade do gene *VKORC1*. Petzl-Erler (1993) a comparou com a mesma população Guarani deste estudo (Guarani-Mbyá de Rio das Cobras - PR) e com outra população Kaingang de Ivaí – PR. Perini (2008) a comparou com populações Guarani do Mato Grosso do Sul (Guarani-Kaiowá e Guarani-Ñandeva). Como era esperado, em ambos os trabalhos as maiores distâncias genéticas foram encontradas entre Guarani e Kaingang, e as menores entre subgrupos Guarani.

Petzl-Erler *et al.* (1993), comparando dados de variabilidade do complexo HLA para dez populações nativas da América do Sul, encontrou como sendo as duas maiores distâncias genéticas as obtidas entre grupos Guarani e Kaingang. As populações do presente estudo (GRC: Guarani-Mbyá de Rio das Cobras - PR; e KRC: Kaingang de Rio das Cobras - PR) apresentaram a maior distância genética dentre todas as populações nativas da América do Sul comparadas, sendo algumas de regiões muito distantes, como a Amazônia. Foi proposto que os Guarani possuem 1,4% de mistura Kaingang e estes tem 0,5% de Guarani. Juntas, estas estimativas indicam que ambas as tribos ainda mantém mais de 90% de constituição ancestral ameríndia. Isto foi sugerido também por Callegari-Jacques *et al.* (2007) e Oliveira (2007), indicando várias referências de que os Guarani e os Kaingang, mesmo

vivendo muito próximos por séculos, ainda mantêm fortes diferenças em muitos aspectos culturais e biológicos, inclusive genéticos.

Marrero *et al.* (2007) realizaram, com o uso de dados de variabilidade de DNA mitocondrial e marcadores do cromossomo Y, um grande estudo sobre a demografia e a trajetória evolutiva dos índios Guarani e Kaingang. Eles utilizaram cinco populações: as duas populações deste estudo (GRC e KRC); duas tribos Guarani, sendo uma Guarani-Ñandeva e outra Guarani-Kaiowá, ambas também do estado do Paraná; e outra Kaingang do estado do Rio Grande do Sul. Foram várias as conclusões baseadas neste e outros estudos correlacionados:

- Observou-se que existe um pequeno, mas relevante, grau de miscigenação entre as tribos Guarani e Kaingang de Rio das Cobras, exclusivamente quando analisada a variabilidade do cromossomo Y, herdado exclusivamente do pai. Os responsáveis por esta mistura são: homens não-ameríndios ou de grupos ameríndios diferentes ao migrarem definitiva ou esporadicamente para dentro das aldeias; e as mulheres índias ao engravidarem fora das aldeias.
- Não foi encontrada nenhuma sequência de DNA mitocondrial de origem africana ou europeia nas aldeias Guarani. Porém em Kaingang esta frequência é de 5%.
- Houve uma possível perda de variabilidade intrapopulacional durante a migração Tupi da Amazônia em direção do sul da América, sendo isto possivelmente devido ao efeito de um gargalo de garrafa populacional. Os Guarani tiveram muito sucesso na invasão do sul e sudeste do Brasil, por dominarem muitas técnicas de agricultura e por terem se unido a campanhas de jesuítas, porém isso não foi suficiente para re-estabelecer a diversidade genética pré-migração.
- Comparando de maneira geral os Kaingang e Guarani, foi encontrada uma maior proporção de alelos não-ameríndios em tribos Kaingang, mostrando um maior grau de miscigenação destes, provavelmente devido ao fato dos Guarani serem mais adversos a populações não índias.

## 2.2 ESTERASES

São enzimas que hidrolisam ésteres encontrados em diferentes tipos no plasma de animais. As esterases podem ser divididas em três grandes classes: as esterases aromáticas, as aliesterases e as colinesterases (SMORIN e SKOREPA, 1978). As colinesterases correspondem a uma classe de enzimas ubíquas, que atuam nas vias colinérgicas, sendo representadas nos vertebrados por duas subclasses enzimáticas: a acetilcolinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) e a butirilcolinesterase (BChE, EC 3.1.1.8). A AChE, também chamada de colinesterase verdadeira ou específica, é responsável por catalisar a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina na membrana pós-sináptica na junção neuromuscular. É encontrada também em eritrócitos e no sistema nervoso. A BChE, também chamada de colinesterase do soro, pseudocolinesterase, colinesterase não específica ou colinesterase do tipo S é uma enzima sérica, produzida no fígado, com ampla distribuição no organismo, sendo um dos componentes do plasma, fígado, coração, pâncreas, endotélio vascular, pele, massa branca do cérebro, músculo liso e adipócitos (KUTTY, 1980; CHATONNET e LOCKDRIDE, 1989; ORESKOVIC e KUNEC-VAJIC, 1992). Além da acetilcolina, a BChE também hidrolisa outros ésteres de colina como a butirilcolina, os relaxantes musculares succinilcolina, mivacúrio, ésteres alifáticos que não contêm colina, como o ácido acetilsalicílico e muitas drogas como a cocaína e a procaína (HARRIS, 1980; BOECK et al., 2002).

Certas substâncias têm a propriedade de inibir estas enzimas como os inseticidas organofosforados, que tanto inibem a BChE como a AChE. Devido ao vasto emprego destes compostos, um grande número de pessoas está ocupacionalmente exposto, tanto na sua fase de produção como na de aplicação (SIQUEIRA, 1978). Em humanos, o diagnóstico de exposição aos agentes anticolinesterásicos (organofosforados ou carbamatos) consiste na determinação das atividades sangüíneas de BChE e da AChE, pois estes agentes têm ação imediata nessas enzimas (SILVA, 2004).

As colinesterases são enzimas caracterizadas por grandes flutuações inter e intraindividuais em amplos espectros de normalidade (GUERRA, 2005), tornando difícil o diagnóstico de alterações anormais nas suas concentrações sanguíneas.

## 2.3 ESTRUTURA DA BChE

No plasma, a BChE ocorre predominantemente como um tetrâmero, formado por dímero de dímeros. Na formação de cada dímero, os monômeros estão ligados por pontes de dissulfeto e, ao formar o tetrâmero, os dímeros ligam-se entre si por ligações não covalentes. Outras formas moleculares, como monômeros e dímeros, também estão presentes no plasma em menores proporções. Os monômeros são constituídos de 574 aminoácidos e nove cadeias de carboidratos, com peso molecular aproximado de 85 kDa (LOCKRIDGE et al., 1987a,b).

Análise da BChE do soro ou plasma estocado, após eletroforese em gel de poliacrilamida, revela 12 bandas, das quais oito provavelmente representam formas heterólogas nas quais a BChE se liga a outras substâncias como a albumina, a  $\alpha$  2-macroglobulina, a transferrina e outras moléculas ainda não identificadas (JUUL, 1968; ALCÂNTARA et al., 1999; ALCÂNTARA, 2000). Após eletroforese bi-dimensional, em papel filtro e em gel de amido (pH 8,6), observam-se cinco bandas, que correspondem às cinco formas moleculares principais da BChE: monômero ( $C_1$ ), dímero ( $C_3$ ), tetrâmero ( $C_4$ ), monômero ligado à albumina sérica ( $C_2$ ) e tetrâmero ligado a uma substância ainda não identificada ( $C_5$ ), condicionada pelo gene *CHE2* (HARRIS et al., 1962; MASSON, 1989).

SOUZA et al. (2003) descreveram uma nova banda eletroforética com mobilidade igual à da banda  $C_5$ , quando o pH do gel de ágar é cerca de 5,3 e com mobilidade igual à da banda  $C_4$ , quando o pH é cerca de 6,7. Essa banda foi chamada de banda  $C_{4/5}$  e não parece ser determinada pelo gene *CHE2*.

A BChE possui seu sítio ativo em forma de garganta composto por aproximadamente 55 aminoácidos. O sítio aniônico periférico (PAS), localizado na boca da garganta, é formado pelos aminoácidos D70 (ácido aspártico) e Y332 (tirosina) os quais estão envolvidos na ligação inicial de substratos carregados positivamente. O aminoácido D70 forma uma alça ômega ( $\Omega$ ) com W82 (triptofano), componente do sub-sítio de ligação do sítio ativo (MASSON et al., 2001). A cavidade oxianiónica localizada próxima ao sub-sítio de ligação, inclui os aminoácidos G116 (glicina), G117 e A199 (alanina). O sítio esterásico da BChE é formado pela tríade catalítica dos aminoácidos S198 (serina), H438 (histidina) e E325 (ácido glutâmico), responsáveis pela hidrólise (SHAFFERMAN et al., 1992).

A estrutura cristalográfica da BChE foi descrita por NACHON et al. (2002) a partir de uma BChE humana recombinante, uma vez que o homotetrâmero é altamente glicosilado e os grupamentos de açúcar, de modo geral, perturbam a cristalização.

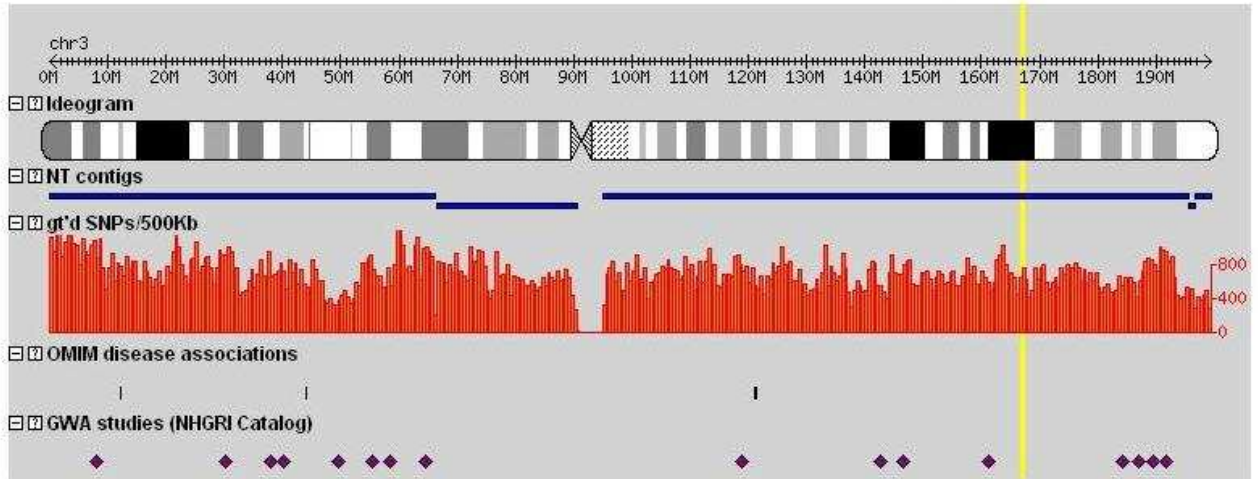
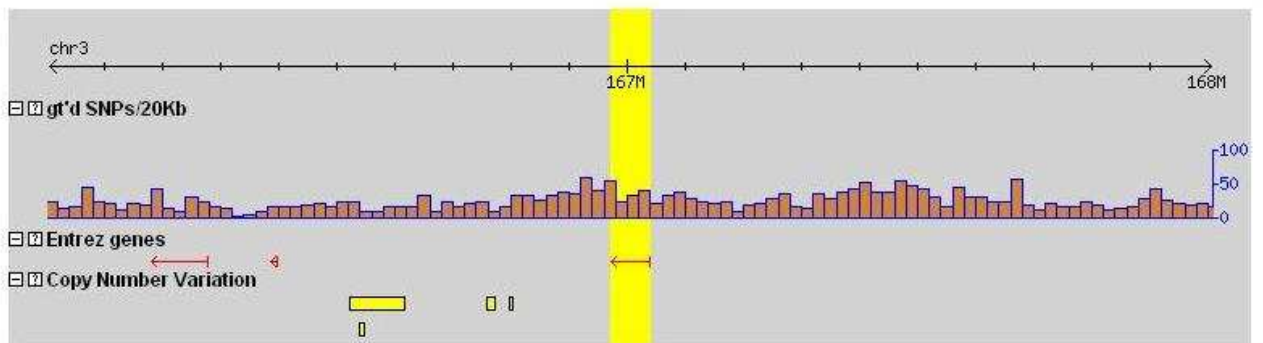
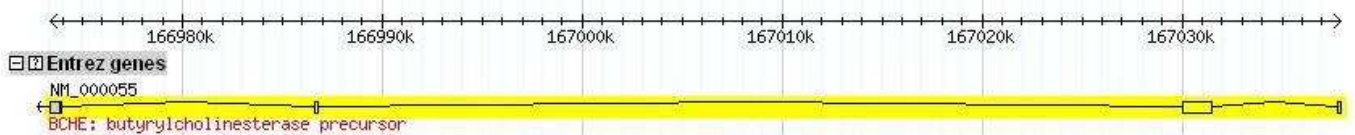
## 2.4 O GENE *BCHE* – ESTRUTURA E LOCALIZAÇÃO

O gene *BCHE* foi atribuído ao braço longo do cromossomo 3 (3q26.1-q26.2; SOREQ et al., 1987; ALLDERDICE et al., 1991; GAUGHAN et al., 1991) e sua estrutura de 4 exons (ver figura 1) e seqüência de nucleotídeos foram estabelecidos por ARPAGAUS et al. (1990). O gene *BCHE* apresenta uma única cópia, sendo constituído por 64.559 pb desde início do exon 1 até o sítio CA de poliadenilação. O exon 1 é formado por 149 pb. O exon 2 possui 1525 pb, codifica o peptídeo líder e contém cerca de 83% da seqüência codificadora da proteína madura, incluindo a extremidade N-terminal e o sítio ativo. O exon 3 tem 167 pb e o exon 4 tem 603 pb, codificando a extremidade C-terminal da proteína e possuindo a região 3' UTR, que contém dois sinais funcionais de poliadenilação.

O promotor do gene *BCHE* é composto por 66% de A e T, não possui elemento TATA ou CAAT, não é rico em GC, sendo que o gene é expresso constitutivamente, apenas regulado durante a diferenciação e o desenvolvimento do organismo. O elemento iniciador do gene *BCHE* tem sido caracterizado como uma seqüência rica em pirimidinas (5'Pi-PiCAlPiPiPiPi-3') onde A é o sítio de início de transcrição. A região flanqueadora 5' tem uma seqüência Alu de 333 pb a qual apresenta uma seqüência repetida direta de sete nucleotídeos (CCTTTTC), em ambas as extremidades (JBILO et al., 1994).

FIGURA 1 ESTRUTURA E LOCALIZAÇÃO DO GENE *BCHE*

## Visão geral do Cromossomo 3

Região do gene da Butirilcolinesterase (*BCHE*)Gene da Butirilcolinesterase (*BCHE*)

Localização e estrutura do gene *BCHE*. A faixa amarela nas três partes da figura representa a área do gene em diferentes perspectivas. Acima, a localização do gene no cromossomo 3q26.1-q26.2. Ao centro, a orientação do gene, do telômero para o centrômero. Abaixo, os 4 exons (retângulos) e os 3 introns (linhas) que constituem o gene *BCHE*.  
 Fonte: Projeto Internacional HapMap ([www.hapmap.org](http://www.hapmap.org)).

## 2.5 ATUAÇÃO FISIOLÓGICA DA BChE

Por muito tempo a função fisiológica da BChE ficou incerta, e a observação feita por Primo-Parmo et al., em 1996, de que indivíduos com a ausência dessa enzima funcional não apresentavam problemas de saúde, só levava a crer que ela era uma enzima “não-essencial”. Entretanto, estudos recentes sugerem que ela tenha uma participação nos mais diversos processos fisiológicos.

A BChE está presente em regiões do cérebro não relacionadas com a presença da enzima AChE, como por exemplo nas células endoteliais dos capilares, nas células da glia e nos neurônios (GRAYBIEL & RAGSDALE, 1982). Li et al. (2000) sugerem que ela possua uma função fisiológica natural em regiões específicas, mas que de uma maneira geral, ela serve como um *backup* para a AChE, mantendo e regulando a transmissão colinérgica quando esta está ausente ou com sua atividade comprometida. Nos estudos de Mesulam et al. (2002), nos quais foram utilizados camundongos *knockout* para a AChE, foi demonstrado que a BChE tem potencial para substituir a AChE, e ainda, que ela pode ter uma função constitutiva na hidrólise da acetilcolina no cérebro normal, e não apenas servir de *backup*.

Tanto a BChE quanto a AChE se expressam durante o desenvolvimento embriológico. Há evidências de que a BChE está presente transitoriamente em algumas células embrionárias, nas quais ela pode estar sendo substituída, em alguns casos, pela AChE. Isso sugere uma função para a BChE de uma colinesterase embrionária e reforça a complementariedade no papel das duas enzimas (CHATONNET & LOCKRIDGE, 1989). Essa expressão transitória se dá em uma grande população de neurônios e também em células não neuronais, e tem sido interpretada como uma evidência na participação dessa enzima no desenvolvimento do sistema nervoso, seja pela sua atividade enzimática ou pela sua habilidade de regular outras proteínas (DARVESH, HOPKINS & GEULA, 2003).

Em estudos de Layer & Sporns (1987), realizados com embriões de galinha, foi observado que, tanto na retina quanto no cérebro, a diminuição da proliferação celular é seguida pela diminuição da quantidade de BChE. Eles também observaram que a BChE é expressa logo no início e durante a mitose, enquanto a AChE é expressa em torno de 11 horas após a divisão celular. Sugere-se, então, a

participação da BChE na regulação da proliferação celular e também na expressão da AChE, além da participação desta última no processo de diferenciação celular (LAYER & WILLBOLD, 1995; LAYER, 1991).

A BChE possui importância toxicológica e farmacológica, pois detoxifica compostos anticolinesterásicos e várias drogas, além de proteger contra o envenenamento por organofosforados (COKUGRAS, 2003; SCHWARZ *et al.*, 1995; BROOMFIELD *et al.*, 1991). Também parece estar envolvida no metabolismo de lipoproteínas (KUTTY & PAYNE, 1994), manutenção da mielina (EARL & THOMPSON, 1952), e no processamento da proteína precursora amilóide (BALASUBRAMANIAN, 2001). Além da hidrólise de ésteres, a BChE apresenta uma atividade de aril acilamidase, que catalisa a hidrólise de acil amidas das aminas aromáticas (GEORGE & BALASUBRAMANIAN, 1981). Essa atividade não possui função fisiológica conhecida, mas proporciona a hidrólise do substrato sintético o-nitroacetanilido em o-nitroanilido e acetato (COKUGRAS, 2003).

Os níveis de BChE no soro são influenciados por uma variedade de condições clínicas e estados fisiológicos (ROBERTSON, 1966). Edwards & Brimijoin (1982) realizaram estudos com ratos hipofisectomizados e observaram que a AChE tem uma regulação tecido específica, enquanto a BChE depende de um tipo de regulação homeostática por todo o corpo. Alterações na sua atividade já foram descritas em casos de anemia severa (FABER, 1943), deficiência renal (SIMON *et al.*, 1969), gravidez (ROBERTSON, 1966), disfunções hepáticas (HADA *et al.*, 1988) e em síndromes metabólicas e obesidade (ALCÂNTARA *et al.*, 2005). Parece também ter uma diferença de atividade de acordo com o sexo e a idade do indivíduo e, em mulheres, sofre influência do ciclo menstrual e do uso de pílula anticoncepcional (SIDELL & KAMINSKIS, 1975; FAIRBROTHER *et al.*, 1989).

Modificações na estrutura da BChE, devidas a alterações nas seqüências de aminoácidos, podem levar à diminuição ou ao acréscimo na capacidade da enzima em reconhecer e hidrolisar seus substratos, bem como podem promover alterações quantitativas graves pela produção de enzimas com baixíssima atividade (silenciosas).

O loco *CHE2* é responsável pela síntese de uma proteína ainda não identificada, constituinte do complexo C<sub>5</sub> da BChE. Apresenta os fenótipos CHE2 C<sub>5</sub><sup>+</sup> e CHE2 C<sub>5</sub><sup>-</sup>, responsáveis pela presença e ausência do complexo C<sub>5</sub>, respectivamente. O fenótipo CHE2 C<sub>5</sub><sup>+</sup> apresenta, em média, 25% a mais de



atividade que o fenótipo CHE2 C5-. A frequência do fenótipo CHE2 C5+ na população do sul do Brasil é de cerca de 10% (CHAUTARD-FREIRE-MAIA *et al.*, 1991).

## 2.6 VARIABILIDADE GENÉTICA DO LOCO *BCHE*

Até o ano de 2006 foram detectadas e descritas mais de sessenta e cinco mutações para o gene *BCHE*, porém este dado necessita de uma revisão, visto a ascendente evolução nos estudos da enzima BChE e do gene *BCHE*.

Anteriormente, alguns fenótipos costumavam ser identificados por testes de inibição enzimática usando alfa naftilacetato ou benzoilcolina como substrato e dibucaína, fluoreto de sódio, DL-propranolol e Ro2-0683 (dimetilcarbamato de brometo de 2-hidroxi-5-fenil-benziltrimetilamônio) como inibidores (KALOW e STARON, 1957; ALCÂNTARA *et al.*, 1991; PICHETH *et al.*, 1994).

Lando *et al.* (2003) procuraram por mutações no gene *BCHE* em doadores de sangue da população italiana, através da técnica PCR-RFLP para mutações conhecidas como as *D70G*, *A539T*, *T243M* e *G390V* e, assim, mutações novas não foram detectadas. Atualmente, além da PCR-RFLP e da PCR-SSCA, outras técnicas são utilizadas para detectar variabilidade genética, como o seqüenciamento e a genotipagem por TaqMan,

Mikami (2005), utilizando a técnica de PCR-SSCA, encontrou cinco novas mutações para o gene *BCHE*, e as condensou em uma tabela juntamente com outras mutações encontradas por outros autores (Tabela 1), classificadas por segmento de DNA. Analisando a tabela percebe-se que os fragmentos com maior variabilidade genética são os seguintes: nt 1194 a 29 (intron 2), nt 155 a 347, nt 304 a 535 e nt 481 a 719, com 9, 8, 7 e 7 variantes diferentes, respectivamente. Pode-se observar que as 5 mutações novas do trabalho representam 25%, 40% e 10% das mutações encontradas nos respectivos fragmentos e 9,1% do total de mutações descritas. A autora analisou 8 regiões do exon 2 e foram encontradas 34 variações, sendo que em cada fragmento analisado quanto ao DNA, encontrou-se, no mínimo, um tipo de mutação. O maior número de variantes diferentes, por segmento, foi 2 e os fragmentos que os apresentaram foram os seguintes: nt -42 a 204 (variantes

*K12R* e *G15G*), nt 659 a 876 (variantes *T243M* e *E255D*) e nt 835 a 1059 variantes (*V294M* e *G333C*).

Hasin et al. (2004), examinando a região codificadora do gene *ACHE* em indivíduos não aparentados de quatro grupos étnicos (48 americanos africanos, 48 judeus Ashkenazim, 48 judeus Sefaradim e 48 árabes israelenses), encontraram 13 SNPs, dos quais três já haviam sido descritos (BARTELS *et al.*, 1993). Considerando os 13 SNPs, seis estão no exon 2 (quatro resultam em substituição de aminoácido), um no intron 2, um sinônimo no exon 3, um não sinônimo no exon 5, e quatro na região 3' não traduzida. Um total de 11 desses SNPs puderam ser examinados quanto à frequência, que variou de 1% a 39,5%, sendo 4 não sinônimos na região codificadora examinada de 1614 nucleotídeos, correspondendo a 1 SNP a cada 400 nucleotídeos (0,25%). No caso do gene *BCHE*, foram encontrados 3 SNPs não sinônimos, com frequência maior ou igual a 1% (*D70G*, *E255D* e *A539T*), correspondendo a 1 SNP por 570 nucleotídeos, considerando-se a região codificadora de 1722 nucleotídeos (0,17%). Com base nessas informações, pode-se concluir que os genes *BCHE* e *ACHE* apresentam frequência semelhante de SNPs não sinônimos na região codificadora, por nucleotídeo (MIKAMI, 2005).

A maior parte das mutações descritas no gene *BCHE* se encontra no exon 2, como pode ser constatado na tabela 1, sendo que 92% das mutações descritas para esse gene apresentam frequência populacional menor que 1%. Estas são algumas variantes não usuais mais frequentes do gene *BCHE*: *c.1615G>A* (p.*A539T*); *c.-116G>A*; *c.209A>G* (p.*D70G*); *c.765G>C* (p.*E255D*) e *c.551C>T* (p.*A184V*).

TABELA 1 MUTAÇÕES DO GENE *BCHE*

Nucleotídeo	Alteração	Nome			
<b>Exon 1</b>				cont. exon 2	
-116	TGC>TAC	-116		920	CTT>CCT L307P
				943	ACC>AACC T315fs
<b>Exon 2</b>				943	ACC>TCC T315S
9-11	CATCAT>CAT	I4del		988	TTA>ATA L330I
16	ATT>TT	I6fs		997	GGT>TGT G333C
35	AAA>AGA	K12R		1020-1021	GAT>GATA D340insA
45	GGG>GGC	G15G		1062-1076	K355insALU
71	ACG>ATG	T24M		1093	GGA>CGA G365R
82	TTT>ATT	F28I		1169	GGT>GTT G390V (F-2)
98	TAT>TGT	Y33C		1200	TGC>TGA C400X
109	CCT>TCT	P37S		1240	CGT>TGT R386C
208	GAT>CAT	D70H		1253	TTC>TCC F418S
209	GAT>GGT	D70G (A)		1270	CGA>TGA R424X
223	GGC>CGC	G75R		1273	TCC>CCC S425P
270	GAA>GAC	E90D		1294	GAA>TAA E432X
286	AAT>TAT	N96Y		1303	GGA>AGA G435R
297	ATT>ATG	I99M		1336	TTT>GTT F446V
298	CCA>TCA	P100S		1351	GAA>TAA E451X
318	AAT>AAAT	N106fs		1378	GAG>AAG E460K
344	GGT>GAT	G115D		1393	AGA>TGA R465X
351	GGT>GGAG	G117fs		1408	CGG>TGG R470W
355	CAA>TAA	Q119X		1411	TGG>CGG W471R
375	TTA>TTT	L125F			
383	TAT>TGT	Y128C		<b>Intron 2</b>	
395	GCT>GCTA	A134fs		IVS2-8	T>G
424	GTG>ATG	V142M (H)			
486	GCT>GCC	A162A		<b>Exon 3</b>	
510	GAT>GAG	D170E		1490	GAA>GTA E497V (J)
514	CAG>TAG	Q172X		1500	TAT>TAA Y500X
551	GCC>GTC	A184V (SC)		1504	TTT>CTT F474L
592	AGT>GGT	S198G		1543	CGT>TGT R515C
596	GCA>GTA	A199V		1553	CAA>CTA Q518L
601	GCA>ACA	A201T			
607	TCA>CCA	S203P		<b>Intron 3</b>	
728	ACG>ATG	T243M (F-1)		IVS3-14	T>C
748	ACT>CCT	T250P			
765	GAG>GAC	E255D		<b>Exon 4</b>	
800	AAA>AGA	K267R		1615	GCA>ACA A539T (K)
811	GAA>TAA	E271X		1719-1720	delT L574fsX576
880	GTG>ATG	V294M		1914	A>G 1914

Fonte: Mikami, 2005.

## 2.7 ASPECTOS EVOLUTIVOS DO GENE *BCHE*

São muitas as semelhanças entre as enzimas AChE e a BChE, dentre elas: apresentam respostas idênticas a diversos inibidores (LOCKRIDGE *et al.*, 1987a); propriedades físico-químicas similares (CHATONNET e LOCKRIDGE, 1989); semelhanças imunológicas (GEORGE *et al.*, 2001) e algumas atividades biológicas adicionais à hidrólise de ésteres de colina, como atividade de aril-acilamidase amino-sensível; crescimento e diferenciação celular; divisão celular e tumorigênese; e interação célula-célula (BALASUBRAMANIAN e BHANUMATHY, 1993).

Baseando-se nestas semelhanças e em análises filogenéticas da expressão da BChE e da AChE, pode-se inferir que essas duas enzimas surgiram a partir de um precursor comum cuja função era hidrolisar a acetilcolina, ou seja, a hipótese mais aceita da origem é por duplicação gênica. Estudos comparativos entre a estrutura do gene *ACHE* e *BCHE* de humanos (*Homo sapiens sapiens*), raias (*Torpedo californica*) e drosófilas (*Drosophila melanogaster*) indicam que a duplicação do gene ancestral ocorreu após o surgimento do sistema colinérgico na linhagem dos deuterostômios (CHATONNET e LOCKRIDGE, 1989; ARPAGAUSS *et al.*, 1990). Contudo, as seqüências de regulação gênica desses dois genes diferem e resultam em expressões diferentes durante a diferenciação e desenvolvimento tecidual (GNATT *et al.*, 1991; MASSOULIÉ *et al.*, 1993). Nunes (2007) analisando as seqüências destes genes em humanos determinou uma identidade nucleotídica de 54,45%.

A evolução de genes duplicados é muito discutida dentro da evolução dos organismos, dando base a várias hipóteses de aumento da variabilidade genética. Uma delas, por exemplo, propõe que estando o gene duplicado, este possui uma cópia de segurança no genoma da espécie, ficando uma delas livre para tentativas de alterações (mutações), sem comprometer o metabolismo geral do indivíduo (OHNO, 1970). Outra hipótese propõe que após a duplicação de um gene ancestral codificador de uma enzima ambígua, os genes descendentes poderiam dividir as funções da enzima ancestral passando a codificar enzimas com especificidade mais restrita.

Uma das maneiras de abordar essa questão é pela comparação por alinhamento das seqüências de nucleotídeos do gene em várias espécies ou das

seqüências gênicas com seus parálogos para obtenção da fração de substituição sinônima por sítio sinônimo ( $K_a$ ) e da fração de substituição não sinônima por sítio não sinônimos ( $K_s$ ), que ocorreram desde a divergência. A razão  $K_a/K_s$  fornece uma medida da pressão seletiva no(s) gene(s) considerado(s). Se a razão  $K_a/K_s$  for igual a 1 significa seleção neutra. Se a razão  $K_a/K_s$  for menor que 1 indica seleção purificadora, ou seja, algumas mutações estão sendo eliminadas pela seleção natural por serem deletérias. Se  $K_a/K_s$  for maior que 1 indica seleção positiva, ou seja, mutações vantajosas estão sendo selecionadas nesse(s) gene(s).

Nunes (2007), em um estudo sobre haplótipos do gene *BCHE* e seus aspectos evolutivos, concluiu que a região codificadora da proteína madura do gene *BCHE* mostrou estar bem conservada entre as espécies comparadas no estudo. Além disso, pela taxa  $K_a/K_s$  foi possível sugerir que essa região está sob pressão seletiva purificadora. Entretanto, a seleção parece apresentar um relaxamento no ramo dos Carnívoros e no ramo do homem e do chimpanzé, supondo que isso possa estar ocorrendo devido a inibidores naturais da BChE presentes em plantas como as da família Solanaceae, comuns na alimentação destes animais. Estes inibidores teriam maior ação sobre a forma usual da enzima, deste modo afetando menos os indivíduos com enzimas 'mutantes' e conseqüentemente levando ao relaxamento desta seleção purificadora.

### 3 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

O gene *BCHE* codifica uma molécula que possui papel fundamental em diversas vias do metabolismo e seus polimorfismos já foram associados ao desenvolvimento de algumas doenças.

Poucas populações foram investigadas para os polimorfismos do gene *BCHE*, e dentre elas estão principalmente populações de ancestralidade não-ameríndia, além do que a maioria destes estudos tem como foco a associação a doenças. Estudos populacionais, além de elucidar a diversidade do gene em diversas populações, podem revelar a origem de seus polimorfismos, os fatores evolutivos a que eles estão sujeitos e até mesmo aspectos das relações entre as populações.

Dados sobre a variabilidade de um gene em ameríndios podem ser importantes para responder questões sobre estimativas de miscigenação da população brasileira, e sobre efeitos de seleção natural e/ou de deriva genética ao longo do povoamento das Américas

O objetivo geral deste trabalho foi analisar polimorfismos do gene *BCHE* e de regiões adjacentes a ele em populações de diferentes ancestralidades, visando auxiliar no entendimento da origem e evolução desses polimorfismos. Foram escolhidos sete SNPs, três dentro do gene *BCHE* e quatro adjacentes.

Os objetivos específicos foram:

- Verificar as frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas destes SNPs.
- Comparar esses resultados com os de outras populações.
- Estabelecer a origem de mutações do gene *BCHE* em ameríndios.
- Estimar as distâncias genéticas entre as populações.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 AMOSTRA POPULACIONAL

Foram utilizadas duas amostras de populações indígenas do estado do Paraná. A primeira é composta por 60 indivíduos da tribo Kaingang e a outra por 60 indivíduos da tribo Guarani-M'Bya. As duas aldeias estão localizadas muito próximas, ambas dentro da Reserva Indígena de Rio das Cobras (25°18'S, 52°32'W), no município de Nova Laranjeiras, no estado do Paraná, Brasil (ver figura 2). Os dados mais atuais fornecidos pela FUNAI são de 2006, disponíveis no site do Instituto Socioambiental ([www.socioambiental.org](http://www.socioambiental.org)). Estes dados totalizam 2.397 índios residindo dentro de uma área total de 18.682 ha, que não possui isolados populacionais. O bioma predominante é Mata Atlântica, tipologia Floresta Ombrófila Mista. Infelizmente, diversas notícias jornalísticas apontam atualmente sérios problemas nutricionais e epidemiológicos, principalmente atingindo o desenvolvimento de crianças e recém-nascidos.

A coleta de sangue e a extração de DNA foram realizadas para projetos anteriores do Laboratório de Genética Molecular Humana da UFPR (PETZL-ERLER *et al.*, 1993; TSUNETO *et al.*, 2003), com aprovações do Comitê Nacional de Ética em Pesquisa – MS. O sangue foi coletado de maneira aleatória dentro de cada população. O DNA foi extraído utilizando-se o método de fenol/clorofórmio (MANIATS *et al.*, 1982, com modificações).

As comparações inter-populacionais envolveram dados de outras populações. Estes foram retirados de artigos do Laboratório de Polimorfismos e Ligação da UFPR, de informações disponíveis principalmente no site do National Center for Biotechnology Information – NCBI ou no site do Projeto HapMap (ver tabela 2).

TABELA 2 POPULAÇÕES COMPARADAS

Abreviatura	População	Referência
GRC	Ameríndios Guarani M'byá de Rio das Cobras no Paraná, Brasil	Presente estudo
KRC	Ameríndios Kaingang de Rio das Cobras no Paraná, Brasil	Presente estudo
GMS	Ameríndios Guarani Kaiowá e Ñandeva do Mato Grosso do Sul, Brasil	Furtado <i>et al.</i> (2006) e Nunes <i>et al.</i> (2008)
GIH	Ameríndios Gujarati do Texas, EUA	HapMap: <a href="http://www.hapmap.org">www.hapmap.org</a>
JPT	Japoneses de Tokio, Japão	HapMap: <a href="http://www.hapmap.org">www.hapmap.org</a>
HCB	Chineses Han de Beijing, China	HapMap: <a href="http://www.hapmap.org">www.hapmap.org</a>
CHN	Norte-americanos descendentes de chineses Han	NCBI: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">www.ncbi.nlm.nih.gov</a>
CEU	Norte-americanos descendentes de europeus ocidentais	HapMap: <a href="http://www.hapmap.org">www.hapmap.org</a>
EUR	Norte-americanos descendentes de europeus.	NCBI: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">www.ncbi.nlm.nih.gov</a>
EUB	Brasileiros descendentes de europeus	Souza <i>et al.</i> (2001)
EUBII	Brasileiros descendentes de europeus	Furtado <i>et al.</i> (2005)
YRI	Africanos Yoruba de Ibadan, Nigéria	HapMap: <a href="http://www.hapmap.org">www.hapmap.org</a>
AFR	Norte-americanos descendentes de africanos	NCBI: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">www.ncbi.nlm.nih.gov</a>
AFB	Brasileiros descendentes de africanos	Souza <i>et al.</i> (1998)
AFBII	Brasileiros descendentes de africanos	Jackowski (2009, no prelo)
MKK	Africanos Maasai de Kinyawa, Quênia	HapMap: <a href="http://www.hapmap.org">www.hapmap.org</a>



FIGURA 2 LOCALIZAÇÃO DA RESERVA DE RIO DAS COBRAS, NO MUNICÍPIO DE NOVA LARANJEIRAS PARANÁ, BRASIL



Referência: <http://www.diaadia.pr.gov.br/dedi/ceei/arquivos/file/mapas/anexo7.pdf>

Círculo laranja destacando a reserva indígena de Rio das Cobras (em verde, ao centro), no município de Nova Laranjeiras (25°18'S, 52°32'W).

## 4.2 METODOLOGIAS DE TIPAGEM

### 4.2.1 PCR-SSCA

A técnica SSCA (análise conformacional de fita simples) baseia-se na amplificação do DNA e posterior desnaturação por calor. As fitas simples resultantes são submetidas a uma corrida eletroforética em gel de poliacrilamida. Cada fita simples assume uma conformação tridimensional diferente, conforme sua sequência específica de nucleotídeos, e isso determina a mobilidade da molécula no gel de poliacrilamida. Esta diferença de mobilidade cria no gel um padrão de bandas específico para cada genótipo da sequência alvo do DNA. Uma simples mutação de ponto pode alterar essa conformação e, conseqüentemente, o padrão de bandas do fragmento. São utilizados controles com mutações não-usuais e controles usuais para comparar os padrões de bandas resultantes das corridas eletroforéticas.

As amplificações foram realizadas com 5µl de volume total de reação, contendo 4,0µl de PCR supermix (Invitrogen- 22mM Tris-HCl pH 8,4; 55mM KCl; 1,65 mM MgCl<sub>2</sub>; 200µM dATP; 200µM dTTP; 200µM dCTP; 200µM dGTP; 22 U/ml Taq DNA polimerase), 1µl de DNA (20ng) e 10pmoles de cada iniciador. As PCRs foram realizadas em termociclador Techgene Ftgene2D ou Eppendorf Mastercycler Gradient, e os ciclos de amplificação são os mesmos para cada par de iniciadores utilizados, programados do seguinte modo: 1) 80°C por 30 segundos; 2) 94°C por 30 segundos; 3) 48°C por 30 segundos; 4) 72°C por 30 segundos; 5) repetir por 35 ciclos do passo 2 ao 4; 6) 72°C por 10 minutos. Após a amplificação, 5 µl do produto foram misturados a 5 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: o gel a 10%, para um volume final de 30ml, é preparado a partir de uma solução estoque de poliacrilamida 49:1 (49g de acrilamida, 1g de bisacrilamida, 5ml de glicerol e água bidestilada para um volume final de 100ml), acrescidas de 250µl de persulfato de amônio 10% e 30µl de

TEMED (N',N',N',N' – tetrametilenodiamina). O tampão para preparo do gel é de TBE 1x pH 8,2 (diluído a partir de TBE 5x: 54 g de Tris; 27,5 g de ácido bórico; 20 ml de EDTA 0,5 M, pH 8,0 e água destilada em quantidade suficiente para completar 1000 ml).

Cada corrida eletroforética foi realizada em duas etapas. A primeira etapa corresponde a pré-corrída, onde durante meia hora o gel, ainda sem amostras, é submetido a uma corrente elétrica igual a da corrida propriamente dita. Na segunda etapa são aplicadas as amostras no gel e submetidas a 22 horas de corrida (120V a 14ma). 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, lava-se o gel duas vezes com água destilada e o mantém em solução de ácido acético (10%) por cinco minutos. Lava-se duas vezes o gel com água destilada e acrescenta-se a solução aquosa de glicerol (5%), na qual o gel deve ser mantido por pelo menos dez minutos. A secagem do gel pode ser realizada logo após o término da revelação e consiste em preparar o gel para um secador a vácuo que permite o armazenamento do gel sem que se quebre ou que ocorra perda de coloração. O gel deve ser embebido em solução aquosa de metanol (30%) e glicerol (5%) e colocado sobre papel celofane, previamente embebido na mesma solução. O gel é digitalizado, e depois de completamente seco pode ser guardado, por tempo indeterminado, sem que ocorra perda de coloração.

#### 4.2.2 Genotipagem em Tempo-real (TaqMan)

Para a genotipagem dos SNPs rs2863381, rs4440084, rs3495 (mutação 1914), rs7624915 e rs4387996 foi utilizado o Kit de Genotipagem TaqMan SNP da Applied Biosystems. Esse *kit* consiste de 2 oligonucleotídeos iniciadores específicos não marcados (comumente chamados “primers”) e duas sondas, que consistem de oligonucleotídeos específicos para cada alelo marcados com diferentes fluorescências, como por exemplo: VIC imitando coloração vermelha sinalizará Alelo A e FAM com a coloração verde sinalizará Alelo B (ver figura 3). Há também um terceiro fluoróforo no *kit*, neste caso: ROX, usado pelo equipamento como referência passiva de fluorescência.

As reações foram feitas em um aparelho de PCR em tempo real modelo 7500 da marca Applied Biosystems. Estes termocicladores são especiais pois permitem a detecção e medida de produtos gerados durante cada ciclo da PCR. A emissão dos compostos fluorescentes gera um sinal que aumenta na proporção direta da quantidade de produto da PCR.

Para nossa aplicação que resume-se na identificação dos alelos presentes em cada SNP para cada indivíduo das duas populações, usamos o seguinte protocolo: preparo do *mix* de reação com volume total de 10 $\mu$ l, sendo destes 5,0 $\mu$ l de TaqMan Universal PCR Master Mix, 1 $\mu$ l de DNA (~20ng), 0,25 $\mu$ l do Kit de Genotipagem TaqMan SNP específico descrito acima e 3,75 $\mu$ l de água ultra-pura.

O uso do aparelho para este protocolo de genotipagem é realizado em 3 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 50°C; 2º passo de 10 minutos a 95°C; 3º passo repetido 45 vezes de 15 segundos a 95°C intercalados por 60 segundos a 60°C. A terceira etapa é a chamada pós-leitura, que se resume à análise dos dados gerados antes, durante e após a amplificação, resultando no genótipo de cada indivíduo analisado e sua plotagem em um gráfico como o da figura 6.

A escolha dos SNPs foi feita da seguinte forma, os SNPs dentro do gene (-116, K e 1914) foram escolhidos por serem os mais frequentes do gene *BCHE*, além

disso, conforme mostra a figura 4, foram escolhidos 2 SNPs a montante do gene (rs2863381, rs4440084) e 2 a jusante (rs7624915, rs4387996). Estes foram escolhidos por serem *tag* SNPs, ou seja, tem alto grau de desequilíbrio de ligação com os SNPs em seu entorno e também foram selecionados por terem a frequência de seus alelos próximas de 0,5 na população caucasóide. Essas informações foram obtidas através dos dados do HapMap, utilizando o programa Haploview (<http://www.hapmap.org>).

FIGURA 3 ESQUEMA DE LIGAÇÃO DAS SONDAS

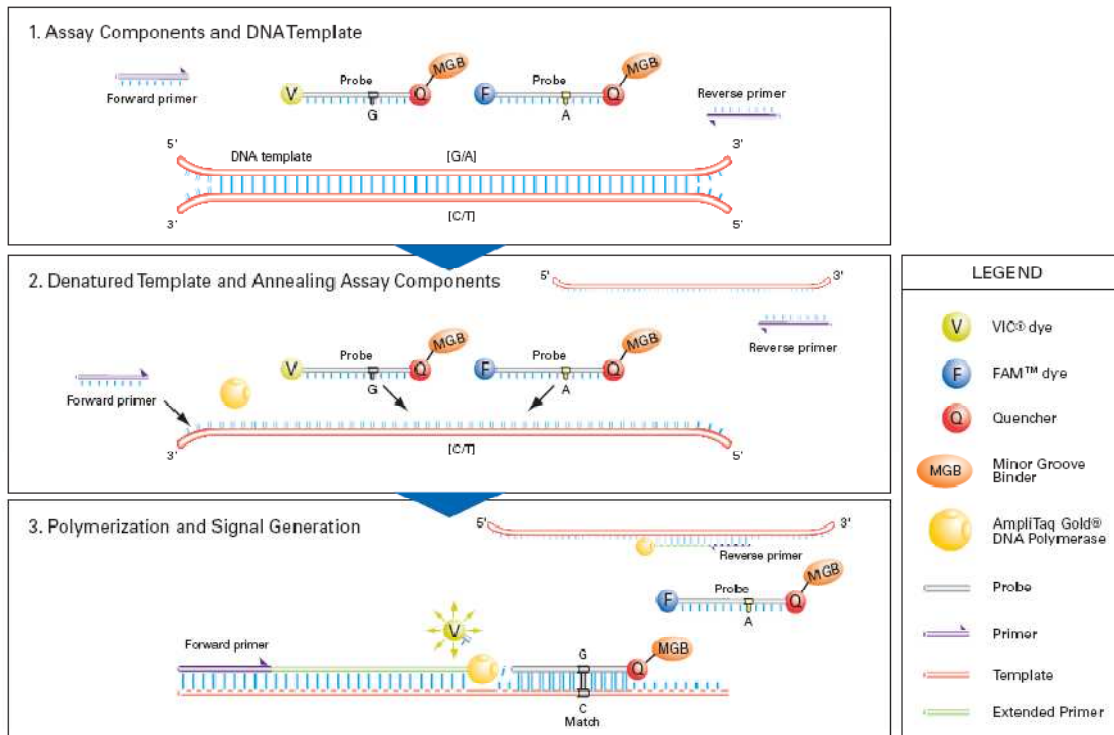
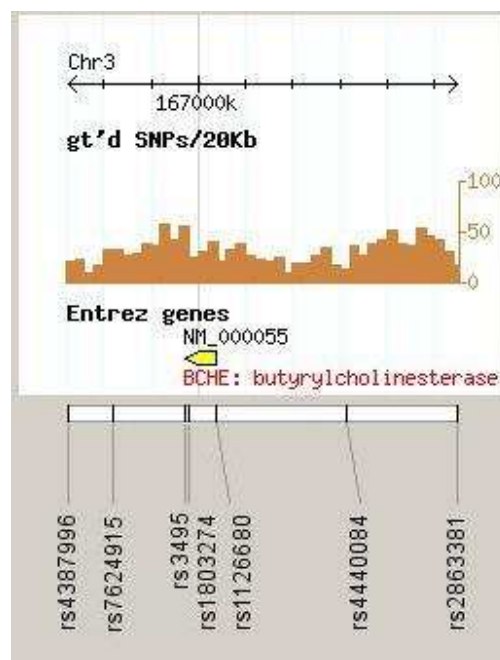


FIGURA 4 LOCALIZAÇÃO DOS SNPs NO CROMOSSOMO 3



rs2863381

rs4440084

rs1126680 (Mutação -116)

rs1803274 (Mutação K)

rs3495 (Mutação 1914)

rs7624915

rs4387996

### 4.3 ANÁLISE DOS DADOS

As frequências alélicas e genótípicas foram obtidas através da contagem direta do número de cromossomos e de indivíduos, respectivamente, e conferidas com o auxílio do pacote de programas ARLEQUIN v. 3.0 (EXCOFFIER et al., 2005). O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi verificado através do algoritmo *random walk*, que utiliza uma versão modificada da cadeia de Markov, também incluído no pacote de programas ARLEQUIN (EXCOFFIER et al., 2005). As frequências haplotípicas foram obtidas através do algoritmo ELB, no pacote de programas ARLEQUIN v. 3.0 (EXCOFFIER et al., 2005). Os haplótipos encontrados foram comparados com os dados do projeto HapMap (<http://www.hapmap.org>). As comparações entre as populações foram realizadas com o auxílio do programa DISPAN (OTA, 1993), sendo os valores de  $P$  abaixo de 0,05 considerados significantes. As distâncias genéticas entre as populações foram estimadas através da distância de Cavalli-Sforza modificada (NEI, TAJIMA e TATENO, 1983), e a partir desses dados foi construído um dendograma utilizando o método *Neighbor-Joining* com o auxílio do programa DISPAN (OTA, 1993). Para o desenho do dendograma foi utilizado o programa TreeView 1.6.6 (PAGE, 1996). Os parâmetros estimados para o desequilíbrio de ligação (valor de  $P$ ,  $D'$  e  $r^2$ ) foram obtidos também com o uso do pacote ARLEQUIN v. 3.0 (EXCOFFIER et al., 2005).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS.

Os resultados de frequências alélicas e genotípicas e o teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg são mostrados em separado por grupos definidos como antes (a montante), dentro e após (a jusante) o gene *BCHE*. Estes são comentados na ordem em que se encontram no cromossomo a partir do telômero (3q), sendo este o sentido do gene *BCHE* (ver figura 4).

Foram feitas comparações entre as duas populações do estudo e também destas com outras populações ameríndias, asiáticas, africanas e européias.

As genotipagens da mutação K (rs1803274) e -116 (rs1126680) foram feitas através da técnica de PCR-SSCA e um resultado dessa técnica pode ser visto na figura 5. Para os demais SNPs foi utilizada a técnica de genotipagem em tempo-real com TaqMan, um exemplo de resultado pode ser visto na figura 6.



FIGURA 5 EXEMPLO DE RESULTADO DE UMA CORRIDA ELETROFORÉTICA EM GEL DE POLIACRILAMIDA (MUTAÇÃO K)

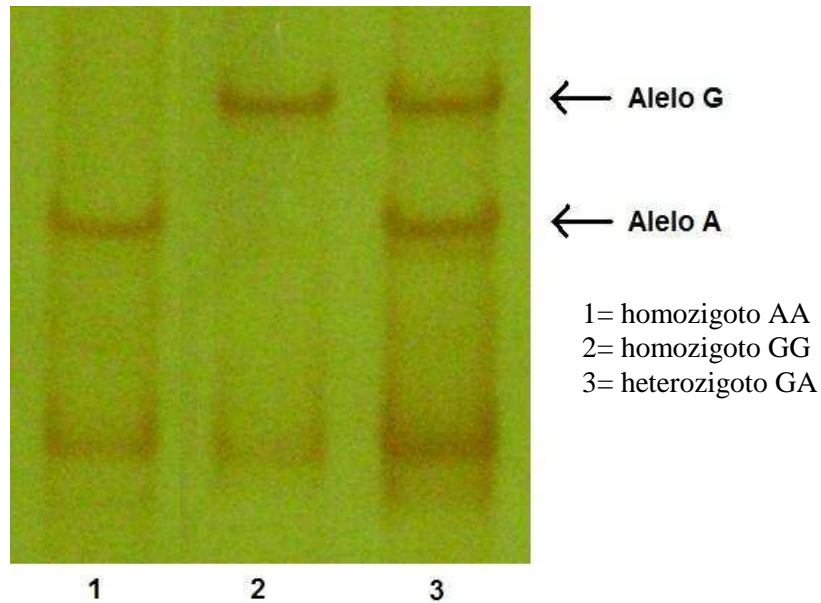
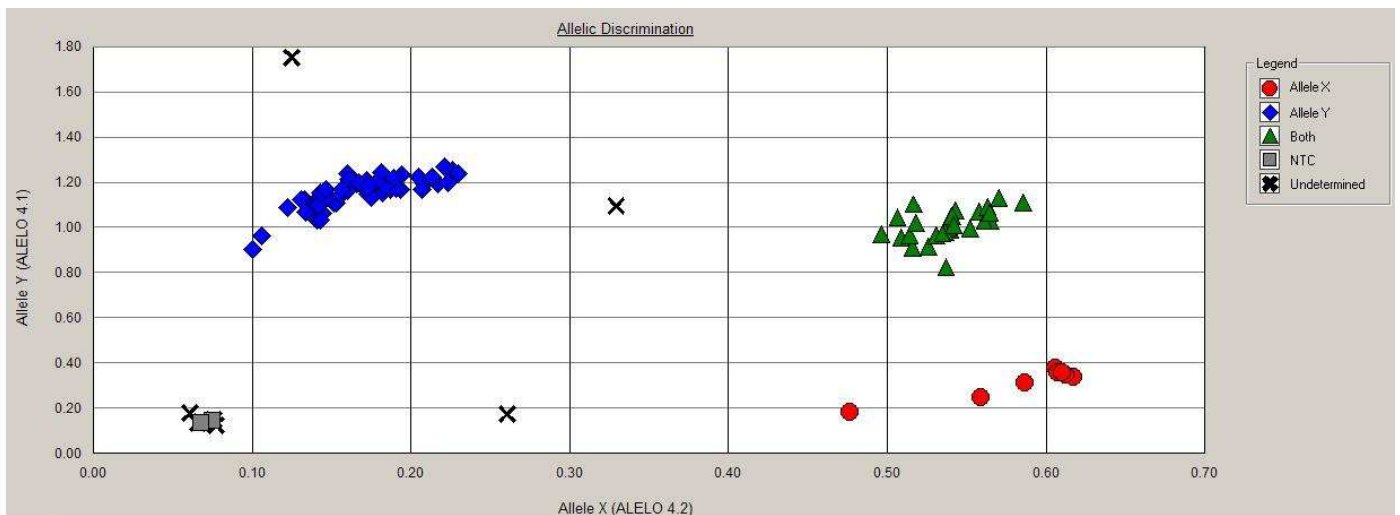


FIGURA 6 EXEMPLO DE RESULTADO GRÁFICO DA GENOTIPAGEM EM TEMPO-REAL (SNP rs2863381)



Losangos azuis (*Allele Y*): homozigotos TT; Círculos vermelhos (*Allele X*): homozigotos CC; Triângulos verdes (*Both*): heterozigotos TC; Quadrados cinzas (*NTC*): Controles negativos; X (*Undetermined*): indeterminados.

### 5.1.1 SNPs a montante do gene *BCHE*

O SNP rs2863381 apresentou nas duas populações ameríndias analisadas uma frequência mais elevada do alelo *T* em relação ao alelo *C*. Na população Guarani (GRC; n=58) obtivemos 63,79% ± 4,46% e na Kaingang (KRC; n=58) 88,98% ± 2,91% de frequência para o alelo *T*. As frequências alélicas entre GRC e KRC (ver tabela 2) são significativamente diferentes ( $P < 0,001$ ). As frequências genotípicas encontradas foram  $TT=0,431$ ,  $TC=0,414$  e  $CC=0,155$  nos Guarani, e  $TT=0,793$ ,  $TC=0,190$  e  $CC=0,017$  nos Kaingang, e entre as duas populações estas diferenças são significativas ( $P < 0,001$ ).

O SNP rs4440084 no grupo Guarani apresentou 43,75% ± 4,73% de frequência do alelo *G* e o grupo Kaingang 52,59% ± 4,64%. As frequências alélicas entre GRC e KRC não são significativamente diferentes ( $P > 0,100$ ). As frequências genotípicas encontradas foram  $GG=0,164$ ,  $GC=0,527$  e  $CC=0,309$  nos Guarani, e  $TT=0,293$ ,  $TC=0,465$  e  $CC=0,241$  nos Kaingang, e entre os grupos estas diferenças não são significativas ( $P > 0,250$ ).

### 5.1.2 SNPs dentro do gene *BCHE*

O SNP rs1126680 corresponde ao nucleotídeo -116 do gene *BCHE*, e está localizado em uma região não transcrita do gene. Sua mutação, chamada -116 ( $G > A$ ), está totalmente ausente nos grupos ameríndios estudados.

O SNP rs1803274 corresponde ao nucleotídeo 1615, localizado no exon 4 do gene *BCHE*. Seu alelo mutante A539T ( $GCA > ACA$ ) é conhecido como mutação K. Neste estudo, as frequências do alelo A539T para a população Guarani (n=54) foi de 14,81% ± 3,42% e para a população Kaingang (n=57) foi de 3,51% ± 1,72%. As frequências alélicas entre GRC e KRC são significativamente diferentes ( $P < 0,010$ ). As frequências genotípicas encontradas foram  $GG=0,704$ ,  $GA=0,296$  e  $AA=0,000$  nos Guarani, e  $GG=0,930$ ,  $GA=0,070$  e  $AA=0,000$  nos Kaingang, sendo estas diferenças significativas entre as duas populações ( $P < 0,010$ ).

O SNP rs3495 corresponde ao nucleotídeo 1914 que está dentro do exon 4 do gene *BCHE*, sendo o alelo G mutante. A frequência do alelo mutante foi para a população Guarani (n=57) de 1,75% ± 1,23% e para a população Kaingang (n=58) de 3,45% ± 1,69%. As frequências alélicas entre GRC e KRC não são significativamente diferentes ( $P>0,300$ ). As frequências genotípicas encontradas foram AA=0,965, AG=0,035 e GG=0,000 nos Guarani e AA=0,931, AG=0,069 e GG=0,000 nos Kaingang, e entre as populações estas diferenças não são significativas ( $P>0,500$ ).

### 5.1.3 SNPs a jusante do gene *BCHE*

O SNP rs7624915 possui frequência do alelo C em Kaingang de 4,23% ± 1,85% e em Guarani de 21,43% ± 3,88%. As frequências alélicas entre GRC e KRC são significativamente diferentes ( $P<0,001$ ). As frequências genotípicas encontradas foram CC=0,036, CA=0,357 e AA=0,607 nos Guarani, e CC=0,000, CA=0,085 e AA=0,915 nos Kaingang, e entre as duas populações tais diferenças são significativas ( $P<0,001$ ).

O SNP rs4387996 apresentou na população Guarani uma frequência do alelo G de 51,82% ± 4,76%. Nos Kaingang este alelo apresentou frequência de 35,09% ± 4,47%. As frequências alélicas entre GRC e KRC são significativamente diferentes ( $P<0,020$ ). As frequências genotípicas encontradas foram GG=0,218, GA=0,600 e AA=0,182 nos Guarani, e GG=0,175, GA=0,351 e AA=0,474 nos Kaingang, e entre as populações estas diferenças são significativas ( $P<0,005$ ).

## 5.2 EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG

As populações Guarani e Kaingang encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg para todos os 7 SNPs analisados no presente estudo, conforme pode ser visto na tabela 3.

TABELA 3 VALORES DE P DO TESTE DO  $\chi^2$  PARA O EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG

	Guarani (GRC)	Kaingang (KRC)
SNP rs2863381	>0,250	>0,500
SNP rs4440084	>0,500	>0,500
SNP rs1126680 (Mutação -116)	>1,000	>1,000
SNP rs3495 (Mutação 1914)	>0,750	>0,750
SNP rs1803274 (Mutação K)	>0,100	>0,750
SNP rs7624915	>0,500	>0,500
SNP rs4387996	>0,100	>0,050

### 5.3 FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS, DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO E HETEROZIGOSIDADE

Os SNPs utilizados para a construção dos haplótipos foram ordenados segundo a própria ordem dos SNPs no DNA a partir do telômero. Esta é a mesma organização utilizada para ordená-los na apresentação do trabalho e a mesma com que estes se encontram antes/dentro/depois do gene *BCHE*.

O SNP rs1126680 (mutação -116) foi retirado de todas as análises haplotípicas, pois não apresenta variação em ameríndios e possui pouquíssima variação mundial. Nas comparações haplotípicas entre as populações ameríndias foi mantida a mutação 1914 (rs3495)(ver tabela 21). Nas comparações haplotípicas entre as diversas populações mundiais, esta mutação foi retirada devido a ausência de dados nas outras populações comparadas (ver tabela 20).

A População Guarani apresentou um total de 16 haplótipos, o dobro do que a população Kaingang com 8 haplótipos. Nos Guarani o mais frequente é o haplótipo 19 (TCGAAA) com 27,5%. O haplótipo 1 (TGGAAA) é o mais comum em Kaingang com 40,7%. Os seis haplótipos mais freqüentes nos ameríndios possuem, além de todos os alelos dentro do gene *BCHE* usuais, o SNP rs7624915 (o primeiro após o gene) sua variante alelo A.

Os valores de Heterozigidade média obtida foram  $0,4122 \pm 0,0492$  nos Guarani (GRC) e  $0,2621 \pm 0,0925$  nos Kaingang (KRC). Os resultados dos testes de desequilíbrio de ligação entre estas populações ameríndias estão nas tabelas 4 e 5.

TABELA 4 DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO PARA OS GUARANI (GRC)

GRC	rs2863383	rs4440084	rs1803274	rs3495	rs7624915	rs4387996
rs2863383	x	0,4959			0,7404	0,2899
rs4440084	<0,0001	x				0,5642
rs1803274			x		0,5455	1,0000
rs3495				x	1,0000	
rs7624915	0,0035		<0,0001	0,0062	x	1,0000
rs4387996	0,0397	<0,0001	<0,0001		<0,0001	x

Sequência de SNPs dos haplótipos. Valores de *P* em amarelo e de *D'* em cinza. Valores ausentes não são significativos.

TABELA 5 DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO PARA OS KAINGANG (KRC)

KRC	rs2863383	rs4440084	rs1803274	rs3495	rs7624915	rs4387996
rs2863383	x	1,0000		1,0000	1,0000	
rs4440084	0,0002	x		1,0000		0,4017
rs1803274			x			
rs3495	<0,0001	0,0312		x	1,0000	1,0000
rs7624915	<0,0001			<0,0001	x	1,0000
rs4387996		0,0011		0,0057	0,0057	x

Sequência de SNPs dos haplótipos. Valores de *P* em amarelo e de *D'* em cinza. Valores ausentes não são significativos.

## 6 DISCUSSÃO



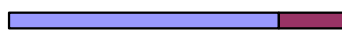









### 6.1 SNPs A MONTANTE DO GENE *BCHE*

#### 6.1.1 SNP rs2863381

Apontado como alelo ancestral deste polimorfismo (NCBI), o alelo *T* apresenta-se mais frequente em todas as populações comparadas (ver tabela 6). A origem africana da espécie humana dá destaque à população da Nigéria (YRI), que mostra-se estatisticamente diferente de todas as outras populações, principalmente devido à elevadíssima frequência do alelo *T*.

É observada uma certa similaridade entre o grupo Guarani e as populações asiáticas, o que não ocorre entre as mesmas e o grupo Kaingang (ver tabela 7). Podemos inferir que esta diferença significativa entre os grupos ameríndios se deva às histórias recentes destes grupos, influenciadas por diferentes efeitos migratórios e de isolamentos populacionais.

TABELA 6 FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO SNP rs2863381.

Características da Amostra			Detalhes dos Genótipos				Frequência Alélica	
População <sup>1</sup>	Grupo	n <sup>2</sup>	TT	TC	CC	HW	T	C
<b>Guarani (GRC)</b>	Ameríndio	58	0,431	0,414	0,155	>0,250	0,6379	0,3621
								
<b>Kaingang (KRC)</b>	Ameríndio	58	0,793	0,190	0,017	>0,500	0,8898	0,1102
								
<b>Japão (JPT)</b>	Asiático	85	0,294	0,494	0,212	>0,950	0,5410	0,4590
								
<b>China (HCB)</b>	Asiático	81	0,272	0,506	0,222	>0,750	0,5250	0,4750
								
<b>Europa (CEU)</b>	Euro-americano	111	0,441	0,477	0,081	>0,250	0,6800	0,3200
								
<b>Nigéria (YRI)</b>	Africano	112	0,955	0,045	0,000	>0,750	0,9780	0,0220
								

<sup>1</sup> GRC e KRC: presente estudo; JPT: japoneses de Tóquio, Japão; HCB: chineses Han de Beijing, China; CEU: residente de Utah (EUA) descendentes de europeus do norte e oeste; YRI: africanos Yoruba de Ibadan, Nigéria (Sub-Sahara). Outros detalhes: ver tabela 2. <sup>2</sup> n = número de indivíduos analisados.

TABELA 7 COMPARAÇÕES DOS GENÓTIPOS DO SNP rs2863381 ENTRE DIFERENTES POPULAÇÕES.

	KRC	JPT	HCB	CEU	YRI
<b>GRC</b>	<b>&lt;0,001</b>	>0,050	>0,100	>0,250	<b>&lt;0,001</b>
<b>KRC</b>		<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,005</b>	<b>&lt;0,010</b>
<b>JPT</b>			>0,900	<b>&lt;0,025</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>HCB</b>				<b>&lt;0,010</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>CEU</b>					<b>&lt;0,001</b>

As probabilidades em negrito indicam diferenças significativas, obtidas através do teste de qui-quadrado. Código das populações ver tabela 6.


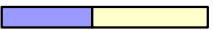










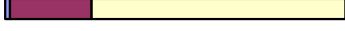
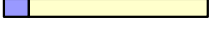
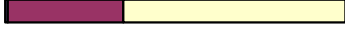
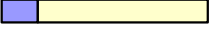
### 6.1.2 SNP rs4440084

As populações ameríndias deste estudo (Guarani e Kaingang) apresentam frequências genótípicas estatisticamente semelhantes às populações asiáticas e à européia (ver tabela 8). O grupo ameríndio Gujarati, do Texas (EUA), mostra em geral diferenças mais significativas em relação às outras populações do que os ameríndios do sul.

As populações africanas mostram-se estatisticamente muito semelhantes entre si, e muito diferentes das demais (ver tabela 9). Dentre as populações asiáticas, européias e ameríndias observamos uma relativa similaridade na variação deste SNP, com exceções do grupo Gujarati. Esta significativa mudança de padrão pode ser devida ao efeito fundador nas populações que saíram da África.



TABELA 8 FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO SNP rs4440084.

Características da Amostra			Detalhes dos Genótipos				Frequência Alélica	
População <sup>1</sup>	Grupo	n <sup>2</sup>	GG	GC	CC	HW	G	C
<b>Guarani (GRC)</b>	Ameríndio	55	0,164	0,527	0,309	>0,500	0,4375	0,5625
								
<b>Kaingang (KRC)</b>	Ameríndio	58	0,293	0,465	0,241	>0,500	0,5259	0,4741
								
<b>Gujarati (GIH)</b>	Ameríndio	88	0,432	0,398	0,170	>0,100	0,6310	0,3690
								
<b>Japão (JPT)</b>	Asiático	86	0,244	0,488	0,267	>0,750	0,5120	0,4880
								
<b>China (HCB)</b>	Asiático	83	0,289	0,470	0,241	>0,500	0,5240	0,4760
								
<b>Europa (CEU)</b>	Euro-americano	111	0,216	0,505	0,279	>0,750	0,4680	0,5320
								
<b>Nigéria (YRI)</b>	Africano	113	0,009	0,239	0,752	>0,250	0,1280	0,8720
								
<b>Quênia (MKK)</b>	Africano	143	0,007	0,343	0,650	<0,050	0,1780	0,8220
								

<sup>1</sup> GRC e KRC: presente estudo; GIH: índios Gujarati em Houston, Texas; JPT: japoneses de Tóquio, Japão; HCB: chineses Han de Beijing, China; CEU: residente de Utah (EUA) descendentes de europeus do norte e oeste; YRI: africanos Yoruba de Ibadan, Nigéria (Sub-Sahara); MKK: africanos Maasai de Kinyawa, Quênia. Outros detalhes: ver tabela 2. <sup>2</sup> n = número de indivíduos analisados.

TABELA 9 COMPARAÇÕES DOS GENÓTIPOS DO SNP rs4440084 ENTRE DIFERENTES POPULAÇÕES.

	KRC	GIH	JPT	HCB	CEU	YRI	MKK
<b>GRC</b>	>0,250	<b>&lt;0,005</b>	>0,500	>0,250	>0,250	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>KRC</b>		>0,100	>0,750	>0,900	>0,750	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>GIH</b>			<b>&lt;0,050</b>	>0,100	<b>&lt;0,005</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>JPT</b>				>0,950	>0,750	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>HCB</b>					>0,900	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>CEU</b>						<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>YRI</b>							>0,100

As probabilidade em negrito indicam diferenças significativas, obtidas através do teste de qui-quadrado. Código das populações ver tabela 8.

## 6.2 SNPs DENTRO DO GENE *BCHE*

### 6.2.1 SNP rs1126680 (Mutação -116)

Este SNP corresponde a mutação -116 do gene *BCHE* e está localizado em uma região não transcrita do gene (exon 1), porém parece ter influência na atividade enzimática da BChE. Provavelmente este efeito está relacionado a probabilidade de ser esta uma região muito importante no ancoramento de fatores gerais de transcrição ou na ligação do RNAm aos ribossomos.

A ausência do alelo A (variante -116A) nas populações ameríndias já era esperada. Nunes *et al.* (2008) analisaram 253 ameríndios da etnia Guarani do estado do Mato Grosso do Sul (Brasil) e constatou a total ausência desta variante naquele grupo.

Esta mutação está também ausente nos grupos africano e asiático comparados (ver tabela 10). O alelo A (mutante) somente está presente nas populações com ascendência europeia e mesmo assim em frequências que não ultrapassam 9%. As duas populações euro-descendentes apresentam diferença não significativa ( $P > 0,050$ ).

Isto nos leva a sugerir a origem desta mutação na Europa, contrariando a sugestão de Nunes *et al.* (2008) que apontam a variante -116A como o tipo ancestral, baseado no fato de que o alelo A é a forma comum em várias outras espécies. Nunes *et al.* (2008) não conseguiu concluir se a variante -116A não estava presente nos paleo-ameríndios, ou se estava e foi perdida por fatores evolutivos. Com os nossos dados, mais os dados da tabela 10, concluímos que sua origem é europeia e relativamente recente, portanto somente estará presente em outras populações caso haja fluxo gênico.

TABELA 10 FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO SNP rs1126680

Características da Amostra			Detalhes dos Genótipos				Frequência Alélica	
População <sup>1</sup>	Grupo	n <sup>2</sup>	GG	GA	AA	HW	G	A
<b>Guarani (GRC)</b>	Ameríndio	60	1,000	0,000	0,000		1,0000	0,0000
<b>Kaingang (KRC)</b>	Ameríndio	60	1,000	0,000	0,000		1,0000	0,0000
<b>Guarani (GMS)</b>	Ameríndio	253	1,000	0,000	0,000		1,0000	0,0000
<b>Japão (JPT)</b>	Asiático	44	1,000	0,000	0,000		1,0000	0,0000
<b>China (HCB)</b>	Asiático	45	1,000	0,000	0,000		1,0000	0,0000
<b>Euro-brasileiros (EUB)</b>	Euro-brasileiro	164	0,829	0,171	0,000	>0,100	0,9146	0,0854
<b>Europa (CEU)</b>	Euro-americano	60	0,900	0,083	0,017	>0,050	0,9420	0,0580
<b>Nigéria (YRI)</b>	Africano	60	1,000	0,000	0,000		1,0000	0,0000

<sup>1</sup> GRC e KRC: presente estudo; GMS: guaranis do Mato Grosso do Sul; EUB: brasileiros descendentes de europeus; JPT: japoneses de Tóquio, Japão; HCB: chineses Han de Beijing, China; CEU: residente de Utah (EUA) descendentes de europeus do norte e oeste; YRI: africanos Yoruba em Ibadan, Nigéria (Sub-Sahara). Outros detalhes: ver tabela 2.

<sup>2</sup> n = número de indivíduos analisados.

### 6.2.2 SNP rs1803274 (Mutação K)

Este SNP corresponde ao nucleotídeo 1615, localizado no exon 4 do gene *BCHE*. O alelo mutante A539T (GCA>ACA) é conhecido como mutação K. Observamos uma frequência relativamente variável desta mutação em diversas populações (ver tabela 11), porém sempre menos frequente do que o alelo usual (alelo G).

Diversos estudos com outros marcadores relatam uma maior identidade entre os sub-grupos Guarani-Ñandeva e Guarani-Kaiowá, estando o terceiro sub-grupo Guarani-M Byá relativamente mais afastado (MARRERO *et al.*, 2007; TSUNETO *et al.*, 2003; FURTADO *et al.*, 2006). Comparando as duas populações ameríndias Guarani-Mbyá (GRC) e Guarani-Ñandeva e Guarani-Kaiowá do Mato Grosso do Sul (GMS), quanto às suas frequências genotípicas (ver tabela 12), observamos uma diferença muito significativa ( $P < 0,001$ ). Com isso nossos dados corroboram essa já relatada diversidade intra-populacional da etnia Guarani.

Comparando-se as quatro populações de ameríndios quanto às suas variações alélica e genotípica, sendo elas: Kaingang (KRC); Gujarati do Texas (GIH) e as duas relatadas acima (GRC e GMS), observamos a formação de dois grupos distintos. Um composto das populações KRC e GMS ( $P > 0,900$ ) com frequência média aproximada de 3,7% deste alelo, e o segundo com frequências superiores a 9% formado pelas populações GRC e GIH ( $P > 0,100$ ). Considerando-se a frequência alélica superior desta mutação em populações não-ameríndias ( $0,205 > q > 0,09$ ) com as quais estes grupos tiveram contato em sua história recente, uma das hipóteses é que o segundo grupo (o qual inclui GRC) possui um maior grau de miscigenação com populações não-ameríndias. Marrero *et al.* (2007) não encontraram nenhum grau de miscigenação ao comparar DNA mitocondrial dentre estes grupos GRC e KRC, porém quando comparados em relação aos marcadores do cromossomo Y, o grupo Kaingang apresentou um maior grau de miscigenação com não-ameríndios do que os Guarani, sendo estes de 42% e 35% respectivamente.

No entanto, a presença desta mutação em diversas populações ameríndias pode indicar sua presença nos paleo-ameríndios fundadores, estando estas variações atualmente presentes relacionadas à ação de fatores evolutivos, em especial à deriva genética.

TABELA 11 FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO SNP rs1803274.

Características da Amostra			Detalhes dos Genótipos				Frequência Alélica	
População <sup>1</sup>	Grupo	n <sup>2</sup>	GG	GA	AA	HW	G	A
Guarani (GRC)	Ameríndio	54	0,704	0,296	0,000	>0,100	0,8518	0,1481
Kaingang (KRC)	Ameríndio	57	0,930	0,070	0,000	>0,750	0,9649	0,0351
Guarani (GMS)	Ameríndio	222	0,932	0,059	0,009	<0,005	0,9617	0,0383
Gujarati (GIH)	Ameríndio	168	0,810	0,190	0,000	>0,250	0,9050	0,0950
Euro-brasileiros (EUB)	Euro-brasileiro	898	0,677	0,291	0,032	>0,750	0,8224	0,1776
Afro-brasileiros (AFB)	Afro-brasileiro	82	0,683	0,293	0,024	>0,750	0,8290	0,1710
Euro-brasileiros (EUBII)	Euro-brasileiro	287	0,658	0,296	0,045	>0,250	0,8066	0,1934
Japão (JPT)	Asiático	44	0,659	0,273	0,068	0,294	0,7950	0,2050
China (HCB)	Asiático	45	0,622	0,356	0,022	0,479	0,8000	0,2000
Europa (CEU)	Euro-americano	60	0,667	0,317	0,017	0,479	0,8250	0,1750
Nigéria (YRI)	Africano	60	0,667	0,333	0,000	0,150	0,8330	0,1670
Quênia (MKK)	Africano	276	0,812	0,188	0,000	>0,100	0,9060	0,0940

<sup>1</sup> GRC e KRC: presente estudo; GMS: guaranis do Mato Grosso do Sul; GIH: índios Gujarati em Houston, Texas; EUB e EUBII: brasileiros descendentes de europeus; AFB: brasileiros descendentes de africanos; JPT: japoneses de Tóquio, Japão; HCB: chineses Han de Beijing, China; CEU: residente de Utah (EUA) descendentes de europeus do norte e oeste; YRI: africanos Yoruba de Ibadan, Nigéria (Sub-Sahara); MKK: africanos Maasai de Kinyawa, Kenya. Outros detalhes: ver tabela 2. <sup>2</sup> n = número de indivíduos analisados.

TABELA 12 COMPARAÇÕES DOS GENÓTIPOS DO SNP rs1803274 ENTRE DIFERENTES POPULAÇÕES.

	KRC	GMS	GIH	JPT	HCB	EUB	EUBII	CEU	AFB	YRI	MKK
<b>GRC</b>	<b>&lt;0,010</b>	<b>&lt;0,001</b>	>0,100	>0,250	>0,500	>0,900	>0,750	>0,750	>0,750	>0,900	>0,250
<b>KRC</b>		>0,900	>0,100	<b>&lt;0,005</b>	<b>&lt;0,005</b>	<b>&lt;0,005</b>	<b>&lt;0,005</b>	<b>&lt;0,005</b>	<b>&lt;0,005</b>	<b>&lt;0,005</b>	>0,100
<b>GMS</b>			<b>&lt;0,005</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,005</b>
<b>GIH</b>				>0,050	>0,050	>0,050	>0,050	>0,100	>0,100	>0,100	>0,999
<b>JPT</b>					>0,250	>0,250	>0,750	>0,250	>0,500	>0,250	<b>&lt;0,010</b>
<b>HCB</b>						>0,500	>0,500	>0,750	>0,750	>0,500	<b>&lt;0,025</b>
<b>EUB</b>							>0,500	>0,500	>0,900	>0,750	<b>&lt;0,025</b>
<b>EUBII</b>								>0,500	>0,500	>0,500	<b>&lt;0,010</b>
<b>CEU</b>									>0,900	>0,750	>0,050
<b>AFB</b>										>0,500	>0,050
<b>YRI</b>											>0,050

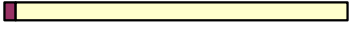
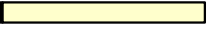
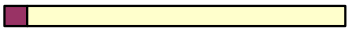
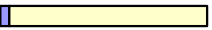
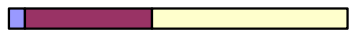
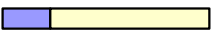
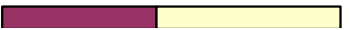
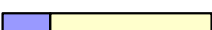

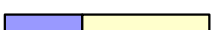


As probabilidades em negrito indicam diferenças significativas, obtidas através do teste de qui-quadrado. Código das populações ver tabela 11.

### 6.2.3 SNP rs3495 (Mutação 1914)

A variante não usual deste SNP consiste na substituição A>G da posição 1914 dentro do exon 4 do gene *BCHE*, conferindo a esta o nome comum de mutação 1914. As populações ameríndias destacam-se por apresentar um relativo alto grau de similaridade ( $P > 0,500$ ) e também por estarem estatisticamente distintas de todas as outras populações comparadas (ver tabela 14). Parte disso é explicado pela frequência do alelo mutante (alelo G) estar significativamente menor em populações ameríndias do que em todas as outras populações, sendo esta de 1,75% nos Guarani e 3,45% nos Kaingang. Sua frequência em outras populações varia desde 22,9% em populações asiáticas e europeias a 65,9% em populações africanas (ver tabela 13).

As populações africanas destacam-se por apresentar uma maior frequência do alelo G, inclusive sendo este mais frequente do que o alelo usual no grupo afro-americano. O alelo G é apontado como sendo o alelo ancestral do SNP (NCBI) e possui uma constante diminuição de sua frequência a partir da África em direção às Américas. Este fenômeno também é observado de maneira muito semelhante aos dois próximos SNPs deste trabalho.

TABELA 13 FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO SNP rs3495 (MUTAÇÃO 1914).

Características da Amostra			Detalhes dos Genótipos				Frequência Alélica	
População <sup>1</sup>	Grupo	n <sup>2</sup>	GG	GA	AA	HW	G	A
Guarani (GRC)	Ameríndio	57	0,000	0,035	0,965	>0,750	0,0175	0,9825
								
Kaingang (KRC)	Ameríndio	58	0,000	0,069	0,931	>0,750	0,0345	0,9655
								
Europa (EUR)	Euro-americano	24	0,042	0,375	0,583	1,000	0,2290	0,7710
								
China (CHN)	Asio-americano	24	0,000	0,458	0,542	0,150	0,2290	0,7710
								
Afro-brasileiros (AFBII)	Afro-brasileiro	218	0,170	0,427	0,404	>0,100	0,3830	0,6170
								
África (AFR)	Afro-americano	22	0,364	0,591	0,045	0,150	0,6590	0,3410
								

<sup>1</sup> GRC e KRC: presente estudo; EUR: americanos descendentes de europeus; AFR: americanos descendentes de africanos; CHN: americanos descendentes de chineses Han; AFBII: brasileiros descendentes de africanos. Outros detalhes: ver tabela 2. <sup>2</sup> n = número de indivíduos analisados.

TABELA 14 COMPARAÇÕES DOS GENÓTIPOS DO SNP rs3495 (MUTAÇÃO 1914) ENTRE DIFERENTES POPULAÇÕES.

	KRC	EUR	AFR	CHN	AFBII
GRC	>0,500	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
KRC		<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
EUR			<b>&lt;0,001</b>	>0,500	>0,100
AFR				<b>&lt;0,005</b>	<b>&lt;0,010</b>
CHN					>0,250

As probabilidades em negrito indicam diferenças significativas, obtidas através do teste de qui-quadrado. Código das populações ver tabela 13.

### 6.3 SNPs A JUSANTE DO GENE *BCHE*

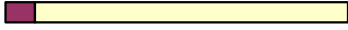
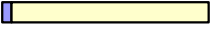
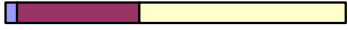
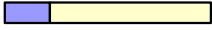

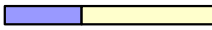



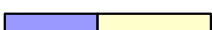




#### 6.3.1 SNP rs7624915

Dentre todos os SNPs analisados neste estudo, este SNP possui a mais brusca inversão de alelo mais frequente ao compararmos populações de diferentes regiões do planeta. As divergências chegam ao ponto de que o genótipo mais frequente em uma população seja totalmente ausente na outra. Isto ocorre justamente entre ameríndios Kaingang (KRC) e africanos da Nigéria (YRI)(ver tabela 15), ou seja, ocorre entre os dois grupos geograficamente mais distantes. Esta característica pode ser utilizada como um marcador informativo de ancestralidade (sigla em inglês: AIM), pois as frequências alélicas do alelo ancestral C variam de  $4,23\% \pm 1,85\%$  em Kaingang a  $98,70\% \pm 3,10\%$  em Nigerianos.

Aproximadamente 80% das comparações genotípicas entre as populações (tabela 16) apresentaram diferenças estatisticamente significativas, e as que não foram significativas são em sua maioria entre populações asiáticas e européias, que apresentam alto fluxo gênico inter-populacional. As populações ameríndias deste estudo demonstraram-se estatisticamente distintas entre si e quando comparadas a todas as outras.



TABELA 15 FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO SNP rs7624915.

Características da Amostra			Detalhes dos Genótipos				Frequência Alélica	
População <sup>1</sup>	Grupo	n <sup>2</sup>	CC	CA	AA	HW	C	A
<b>Kaingang (KRC)</b>	Ameríndio	59	0,000	0,085	0,915	>0,500	0,0423	0,9576
								
<b>Guarani (GRC)</b>	Ameríndio	56	0,036	0,357	0,607	>0,500	0,2143	0,7857
								
<b>Gujarati (GIH)</b>	Ameríndio	88	0,159	0,432	0,409	>0,250	0,3750	0,6250
								
<b>Japão (JPT)</b>	Asiático	86	0,337	0,395	0,267	>0,005	0,5350	0,4650
								
<b>China (HCB)</b>	Asiático	84	0,202	0,488	0,310	>0,900	0,4460	0,5540
								
<b>Europa (CEU)</b>	Euro-americano	113	0,265	0,522	0,212	>0,500	0,5270	0,4730
								
<b>Nigéria (YRI)</b>	Africano	113	0,973	0,027	0,000	>0,750	0,9870	0,0130
								

<sup>1</sup> GRC e KRC: presente estudo; GIH: índios Gujarati em Houston, Texas; JPT: japoneses de Tóquio, Japão; HCB: chineses Han de Beijing, China; CEU: residente de Utah (EUA) descendentes de europeus do norte e oeste; YRI: africanos Yoruba em Ibadan, Nigéria (Sub-Sahara). Outros detalhes: ver tabela 2. <sup>2</sup> n = número de indivíduos analisados.

TABELA 16 COMPARAÇÕES DOS GENÓTIPOS DO SNP rs7624915 ENTRE DIFERENTES POPULAÇÕES

	KRC	GIH	JPT	HCB	CEU	YRI
<b>GRC</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,025</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>KRC</b>		<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>GIH</b>			<b>&lt;0,025</b>	>0,250	<b>&lt;0,010</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>JPT</b>				>0,100	>0,100	<b>&lt;0,001</b>
<b>HCB</b>					>0,250	<b>&lt;0,001</b>
<b>CEU</b>						<b>&lt;0,001</b>

As probabilidades em negrito indicam diferenças significativas, obtidas através do teste de qui-quadrado. Código das populações ver tabela 15.

### 6.3.2 SNP rs4387996

As frequências deste SNP enquadram-se no padrão observado em alguns SNPs anteriores. Neste padrão o chamado alelo ancestral possui uma alta frequência na região de origem da espécie humana e uma gradual diminuição da sua frequência quando se desloca da África em direção às Américas. Para este SNP, o alelo G, indicado como sendo o alelo ancestral na espécie humana, possui uma frequência na região da África de 87,7% e uma frequência significativamente inferior na região das Américas (35,1% e 51,8% respectivamente em KRC e GRC)(ver tabela 17). O grupo Kaingang é o único onde este alelo ancestral G é menos frequente que o alelo A.

Observamos também que as diferenças entre o grupo Guarani e as populações asiáticas não são significativas. Isto também é observado para dois outros SNPs analisados no presente trabalho: um a montante do gene *BCHE* (rs2863381) e outro dentro do gene *BCHE* (rs1803274 ou mutação K)(ver tabela 18).

TABELA 17 FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO SNP rs4387996.

Características da Amostra			Detalhes dos Genótipos				Frequência Alélica	
População <sup>1</sup>	Grupo	n <sup>2</sup>	GG	GA	AA	HW	G	A
<b>Kaingang (KRC)</b>	Ameríndio	57	0,175	0,351	0,474	>0,050	0,3509	0,6491
<b>Guarani (GRC)</b>	Ameríndio	55	0,218	0,600	0,182	>0,100	0,5182	0,4818
<b>Japão (JPT)</b>	Asiático	84	0,357	0,512	0,131	>0,250	0,6130	0,3870
<b>China (HCB)</b>	Asiático	90	0,178	0,644	0,178	<0,010	0,5000	0,5000
<b>Europa (CEU)</b>	Euro-americano	118	0,517	0,466	0,017	<0,010	0,7500	0,2500
<b>Nigéria (YRI)</b>	Africano	118	0,754	0,246	0,000	>0,100	0,8770	0,1230

<sup>1</sup> GRC e KRC: presente estudo; JPT: japoneses de Tóquio, Japão; HCB: chineses Han de Beijing, China; CEU: residente de Utah (EUA) descendentes de europeus do norte e oeste; YRI: africanos Yoruba de Ibadan, Nigéria (Sub-Sahara). Outros detalhes: ver tabela 2. <sup>2</sup> n = número de indivíduos analisados.

TABELA 18 COMPARAÇÕES DOS GENÓTIPOS DO SNP rs4387996 ENTRE DIFERENTES POPULAÇÕES.

	KRC	JPT	HCB	CEU	YRI
<b>GRC</b>	<b>&lt;0,005</b>	>0,100	>0,75	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>KRC</b>		<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>JPT</b>			<b>&lt;0,050</b>	<b>&lt;0,010</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>HCB</b>				<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>CEU</b>					<b>&lt;0,001</b>

As probabilidade em negrito indicam diferenças significativas, obtidas através do teste de qui-quadrado. Código das populações ver tabela 17.

#### 6.4 FREQUÊNCIAS DE HAPLÓTIPOS E DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO

É muito importante salientar que para estas análises foi retirado o SNP do nucleotídeo -116 do gene *BCHE* (rs1126680), visto que todos os indivíduos de ambos os grupos ameríndios são homocigotos usuais (genótipo GG), portanto este SNP não apresenta nenhuma variação que torne sua utilização significativa nestas análises. Nas comparações haplotípicas entre as populações ameríndias foi mantida a mutação 1914 (rs3495)(ver tabela 21). Nas comparações haplotípicas entre as diversas populações mundiais foi retirada esta mutação devido à ausência de dados nas outras populações comparadas (ver tabela 20).

A população Guarani apresentou o dobro do número de haplótipos do que a população Kaingang. Em Guarani existe a dominância do haplótipo 19 (TCGAAA) com 27,5% de frequência (ver tabela 21), seguido do haplótipo 3 (CGGAAG) com 19,4%, sendo que os demais neste grupo não apresentam frequência superior a 10%. Na população Kaingang, o haplótipo 19 é o terceiro mais frequente (16,7%) e junto com outros 3 totalizam quase 88%. O haplótipo 1 (TGGAAA) é o mais comum em Kaingang (40,7%) e possui uma frequência 5,7 vezes menor em Guarani (7,1%). Porém, este haplótipo 1 em relação ao haplótipo mais comum em Guarani (haplótipo 19) a diferença estrutural se limita a uma única troca de base do SNP rs4440084 (G>C), o mais próximo antes do gene *BCHE*. O haplótipo 4 (TCGAAG) é o segundo mais frequente nos Kaingang (19,4%) e possui também alteração estrutural de apenas um nucleotídeo em relação ao haplótipo dominante dos Guarani. O terceiro mais frequente nos Kaingang é o haplótipo mais frequente em Guarani.

Analisando em conjunto, os seis haplótipos mais frequentes nos grupos ameríndios (que totalizam 82,8%) mantém o seu cerne intacto, sendo que a maior variação nestas populações se deve aos SNPs rs4440084 e rs4387996, SNPs a montante e a jusante do gene *BCHE*, respectivamente. O centro dos haplótipos representa as mutações dentro do gene *BCHE* e como visto anteriormente nas frequências de cada SNP, estas mutações são em geral menos frequentes nas populações ameríndias. Isto naturalmente torna também pouco frequente haplótipos que possuam alelos mutantes. Não foi encontrado nenhum haplótipo que inclui duas ou três mutações do gene *BCHE* juntas. Por outro lado, haplótipos que contêm somente alelos usuais para estas mutações na população Guarani foram dez (83,7%

do total) e na população Kaingang foram cinco (94,4% do total). Isto é reflexo principalmente da maior frequência da mutação K na população Guarani.

Em cada população ameríndia o alelo mutante do SNP rs3495 (mutação 1914) é encontrado em um único haplótipo, sendo dos Guarani o haplótipo 11b (TGG**G**CG) com frequência de 2% e dos Kaingang o haplótipo 12 (CCG**G**CG) com frequência de 3,7%. Estes não possuem, nestas populações, haplótipos correspondentes com alelos usuais para esta mutação. É destaque também a baixa frequência alélica observada desta mutação nas populações ameríndias. Isto indica que possivelmente cada um destes haplótipos é resultado de um de fluxo gênico de entrada recente em cada grupo. Considerando a história recente muito próxima do contato entre ameríndios e grupos europeus e africanos durante a colonização do Brasil, sugerimos a total ausência desta mutação nos paleo-ameríndios.

A sugerida ausência desta mutação nos paleo-ameríndios e a sua frequência significativamente mais alta nos grupos não-ameríndios atuais, reforça a idéia contemplada anteriormente do forte processo de alteração de alelo mais frequente, geralmente o ancestral, a partir da África em direção às Américas (ver tabelas 13 e 15).

Na tabela 19 relacionamos os seis haplótipos que possuem a mutação K nas populações deste estudo. Destes, somente o haplótipo 29 (TCAA**G**) é compartilhado entre as duas tribos. Do total de 8 haplótipos observados na população Kaingang (KRC), somente dois deles (29 e 30) apresentam a mutação K e estes não ultrapassam juntos 1,8% de frequência e são exclusivos dos ameríndios. Os indivíduos Kaingang que apresentaram estes haplótipos são heterozigotos para a mutação K (GA), e possuem exatamente o mesmo genótipo para 3 SNPs dos 6 analisados, o que pode nos levar a crer numa origem não ameríndia desta mutação resultado de um fluxo muito recente. Por outro lado, os haplótipos 29 e 30 são variações mutantes K dos dois mais freqüentes haplótipos encontrados no grupo, haplótipos 4 e 1 respectivamente, tornando difícil nossa conclusão sobre esta origem nesta população.

Nos Guarani-Mbyá (GRC) encontramos 5 haplótipos que possuem a mutação K, em uma fração de 14,3% do total (ver tabela 19). Estes haplótipos quando comparados aos seus haplótipos com alelos K usuais (não mutantes), três possuem correspondência com outros três que são frequentes na população, sendo eles 29 com 4, 26 com 3 e 7 com 11a. Por outro lado, o haplótipo 20 (TCA**A**CG) é mais

frequente que o seu haplótipo correspondente com alelo usual nesta população (TC**G**ACG), e também é muito pouco freqüente nas populações mundiais comparadas. O haplótipo 7 (TG**A**CG) é o mais frequente que inclui a mutação K em todas as populações não-ameríndias comparadas. Concluimos, portanto, que a mutação K está ancestralmente presente na população Guarani-Mbyá (GRC).

Analisando em conjunto dados de frequência da mutação K em grupos ameríndios da América do Sul e da América do Norte (ver tabela 11), corroboramos a hipótese já apresentada por outros autores de que esta mutação estava presente nos paleo-ameríndios (FURTADO *et al.*, 2006).

TABELA 19 HAPLÓTIPOS COM A MUTAÇÃO K (SNP rs1803274) EM AMERÍNDIOS

<sup>1</sup> Haplótipos com alelo usual		<sup>1</sup> Haplótipos com alelo mut. K	
<sup>2</sup> KRC			
4	TC <b>G</b> AAG 19,4%	29	TC <b>A</b> AAG 0,9%
1	TG <b>G</b> AAA 40,7%	30	TG <b>A</b> AAA 0,9%
<sup>2</sup> GRC			
4	TC <b>G</b> AAG 6,1%	29	TC <b>A</b> AAG 1,0%
14	TC <b>G</b> ACG 2,0%	20	TC <b>A</b> ACG 8,2%
3	CG <b>G</b> AAG 19,4%	26	CG <b>A</b> AAG 3,1%
2	TG <b>G</b> AAG 1,0%	28	TG <b>A</b> AAG 1,0%
11a	TG <b>G</b> ACG 6,1%	7	TG <b>A</b> ACG 1,0%

<sup>1</sup>Sequência de SNPs: rs2863381, rs4440084, rs1803274 (em negrito), rs3495, rs7624915 e rs4387996. <sup>2</sup> GRC e KRC: Guarani-Mbyá e Kaingang respectivamente, presente estudo.

TABELA 20 HAPLÓTIPOS E SUAS FREQUÊNCIAS EM CINCO POPULAÇÕES

<sup>3</sup> Populações		GRC		KRC		JPT+HCB		CEU		YRI	
<sup>1</sup> No	<sup>2</sup> Haplótipos	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
1	T G G A A	7	7,1	44	40,7	7	3,9	6	5,0	2	1,7
2	T G G A G	1	1,0	12	11,1	6	3,3	8	6,7	0	0,0
3	C G G A G	19	19,4	0	0,0	6	3,3	6	5,0	0	0,0
4	T C G A G	6	6,1	21	19,4	8	4,4	12	10,0	0	0,0
5	C C G A G	0	0,0	0	0,0	10	5,6	10	8,3	0	0,0
6	C G G C G	2	2,0	0	0,0	9	5,0	5	4,2	1	0,8
7	T G A C G	1	1,0	0	0,0	9	5,0	12	10,0	13	10,8
8	T C A C A	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	0,8	0	0,0
9	C C G A A	10	10,2	7	6,5	18	10,0	10	8,3	0	0,0
10	T C G C A	0	0,0	0	0,0	2	1,1	2	1,7	0	0,0
11	T G G C G	8	8,2	0	0,0	15	8,3	21	17,0	75	62,5
12	C C G C G	0	0,0	4	3,7	12	6,7	3	2,5	0	0,0
13	C C G C A	0	0,0	0	0,0	2	1,1	2	1,7	0	0,0
14	T C G C G	2	2,0	0	0,0	7	3,9	8	6,7	15	12,5
15	C G A C A	0	0,0	0	0,0	1	0,6	1	0,8	0	0,0
16	C C A C G	0	0,0	0	0,0	7	3,9	4	3,3	0	0,0
17	C G G A A	2	2,0	0	0,0	10	5,6	1	0,8	0	0,0
18	C G A C G	0	0,0	0	0,0	5	2,8	2	1,7	0	0,0
19	T C G A A	27	27,5	18	16,7	15	8,3	5	4,2	0	0,0
20	T C A C G	8	8,2	0	0,0	3	1,7	1	0,8	2	1,7
21	T G G C A	0	0,0	0	0,0	10	5,6	0	0,0	7	5,8
22	T G A C A	0	0,0	0	0,0	4	2,2	0	0,0	5	4,2
23	C G G C A	0	0,0	0	0,0	7	3,9	0	0,0	0	0,0
24	C C A A G	0	0,0	0	0,0	1	0,6	0	0,0	0	0,0
25	C C A C A	0	0,0	0	0,0	4	2,2	0	0,0	0	0,0
26	C G A A G	3	3,1	0	0,0	1	0,6	0	0,0	0	0,0
27	C C A A A	0	0,0	0	0,0	1	0,6	0	0,0	0	0,0
28	T G A A G	1	1,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
29	T C A A G	1	1,0	1	0,9	0	0,0	0	0,0	0	0,0
30	T G A A A	0	0,0	1	0,9	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	Total	98		108		180		120		120	

<sup>1</sup> Número atribuído a cada haplótipo. <sup>2</sup> Sequência de SNPs: rs2863381, rs4440084, rs1803274, rs7624915 e rs4387996. <sup>3</sup> GRC e KRC: presente estudo; GIH: índios Gujarati em Houston, Texas; JPT: japoneses de Tóquio, Japão; HCB: chineses Han de Beijing, China; CEU: residente de Utah (EUA) descendentes de europeus do norte e oeste; YRI: africanos Yoruba de Ibadan, Nigéria (Sub-Sahara). Outros detalhes: ver tabela 2.

TABELA 21 HAPLÓTIPOS COM A MUTAÇÃO 1914 (SNP rs3495) EM AMERÍNDIOS

<sup>3</sup> Populações		GRC		KRC	
<sup>1</sup> No	<sup>2</sup> Haplótipos	N	%	N	%
1	TGG <b>AAA</b>	7	7,1	44	40,7
2	TGG <b>AAG</b>	1	1,0	12	11,1
3	CGG <b>AAG</b>	19	19,4	0	0,0
4	TCG <b>AAG</b>	6	6,1	21	19,4
6	CGG <b>ACG</b>	2	2,0	0	0,0
7	TGA <b>ACG</b>	1	1,0	0	0,0
9	CCG <b>AAA</b>	10	10,2	7	6,5
11a*	TGG <b>ACG</b>	6	6,1	0	0,0
11b*	TGG <b>GCG</b>	2	2,0	0	0,0
12	CCG <b>GCG</b>	0	0,0	4	3,7
14	TCG <b>ACG</b>	2	2,0	0	0,0
17	CGG <b>AAA</b>	2	2,0	0	0,0
19	TCG <b>AAA</b>	27	27,5	18	16,7
20	TCA <b>ACG</b>	8	8,2	0	0,0
26	CGA <b>AAG</b>	3	3,1	0	0,0
28	TGA <b>AAG</b>	1	1,0	0	0,0
29	TCA <b>AAG</b>	1	1,0	1	0,9
30	TGA <b>AAA</b>	0	0,0	1	0,9
Total		98		108	

<sup>1</sup> Número atribuído a cada haplótipo segundo a tabela 20. <sup>2</sup> Sequência de SNPs: rs2863381, rs4440084, rs1803274, rs3495 (em negrito), rs7624915 e rs4387996. \* Haplótipos correspondentes ao haplótipo 11 da tabela 20 (sem a mutação 1914). <sup>3</sup> GRC e KRC: Guarani-Mbyá e Kaingang respectivamente, presente estudo.



Durante as discussões das frequências alélicas, observamos um fenômeno interessante de inversão do alelo mais frequente entre a África e as Américas. Algo muito semelhante pode ser visualizado nas comparações das frequências haplotípicas. Os haplótipos 7, 11 e 14 possuem uma frequência baixa nos Guarani e igual a zero nos Kaingang, por outro lado uma frequência relativamente mais alta nos nigerianos e intermediária nos grupos europeus e asiáticos. Os haplótipos 1, 3, 4 e 19 apresentam o mesmo padrão, porém invertido, com as maiores frequências nos grupos ameríndios.

Este efeito pode ser explicado por um maior grau de deriva genética nas populações não-africanas, consequência dos reduzidos tamanhos dessas populações, principalmente durante seus eventos migratórios. Em adição, reduções da seleção natural contra mutações deletérias e adaptações locais podem juntas atuar aumentando a frequência de variantes derivadas em populações não-africanas.

Segundo publicações do Consórcio HapMap (The International HapMap Consortium, 2007), dentre os SNPs que mostram um alto grau de diferenciação entre as populações, existe uma forte tendência que o alelo derivado tenha uma frequência maior em populações não-africanas. Este consórcio mostrou, analisando mais de 3 milhões de SNPs, que em 75% das variações sinônimas e 79% das variações não-sinônimas, o alelo derivado é o mais frequente em euro-descendentes (população CEU). Portanto, nossos dados comparando populações ameríndias corroboram esta tendência apresentada por esse grande projeto.

Os valores do desequilíbrio de ligação para as populações ameríndias são mostrados no tópico de resultados (tópico 6.3, tabelas 4 e 5). Os valores do desequilíbrio de ligação para as populações asiática, euro-descendente e africana são mostrados nas tabelas 22, 23 e 24, respectivamente.

A tabela 25 sintetiza os resultados totais entre todas as populações (ameríndias ou não) para o desequilíbrio de ligação de cada par de SNPs comparados. Nesta destacamos o par rs7624915 e rs4387996 que apresenta desequilíbrio de ligação nas cinco populações, e o par rs2863383 e rs4440084 em desequilíbrio de ligação em quatro populações.

TABELA 22 DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO PARA OS ASIÁTICOS (JPT+HCB)

JPT+HCB	rs2863383	rs4440084	rs1803274	rs7624915	rs4387996
rs2863383	x	0,1860			
rs4440084	0,0170	x		0,2771	
rs1803274			x	0,8193	0,3827
rs7624915		0,0006	0,0000	x	0,3127
rs4387996			0,0202	0,0000	x

Sequência de SNPs dos haplótipos. Valores de  $P$  em amarelo e de  $D'$  em cinza. Valores ausentes não são significativos.

TABELA 23 DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO PARA OS EURO-DESCENDENTES (CEU)

CEU	rs2863383	rs4440084	rs1803274	rs7624915	rs4387996
rs2863383	x	0,3402		0,2522	
rs4440084	0,0034	x		0,2992	0,4470
rs1803274			x	1,0000	
rs7624915	0,0298	0,0010	0,0000	x	0,5853
rs4387996		0,0052		0,0003	x

Sequência de SNPs dos haplótipos. Valores de  $P$  em amarelo e de  $D'$  em cinza. Valores ausentes não são significativos.

TABELA 24 DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO PARA OS NIGERIANOS (YRI)

YRI	rs2863383	rs4440084	rs1803274	rs7624915	rs4387996
rs2863383	x				
rs4440084		x			
rs1803274			x		
rs7624915				x	1,0000
rs4387996				0,0001	x

Sequência de SNPs dos haplótipos. Valores de  $P$  em amarelo e de  $D'$  em cinza. Valores ausentes não são significativos.

TABELA 25 COMPARAÇÃO DO DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS SNPs NAS POPULAÇÕES ANALISADAS.

	rs2863383	rs4440084	rs1803274	rs7624915	rs4387996
rs2863383	x	4	0	3	1
rs4440084	80	x	0	2	3
rs1803274	0	0	x	3	2
rs7624915	60	40	60	x	5
rs4387996	20	60	40	100	x

Laranja: número de populações em desequilíbrio de ligação para cada combinação possível de SNPs;  
Azul: porcentagem de populações em desequilíbrio de ligação para cada combinação possível de SNPs.

## 6.5 HETEROZIGOSIDADE E DISTÂNCIA GENÉTICA

Os resultados de distância genética são obtidos por comparações das frequências alélicas dos SNPs, dentro e entre as populações. As comparações anteriores dentro de cada SNP já mostravam diferenças quase sempre significativas entre os grupos africanos e os demais, principalmente em relação aos ameríndios. Isto é confirmado analisando no dendograma (figura 7) a posição isolada do grupo nigeriano (YRI), e também na tabela 26 com os altos valores de distância genética deste grupo.

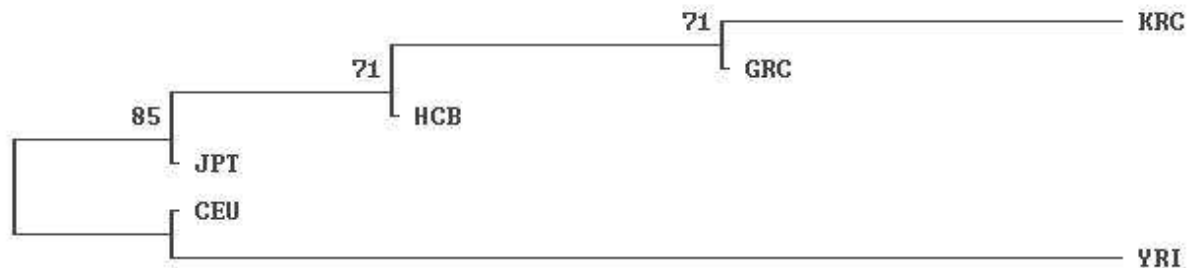
Como também já era esperado, os grupos ameríndios mostraram-se geneticamente próximos, formando um grupo independente e relativamente mais próximo às populações asiáticas. Comparando os ameríndios aos não-ameríndios, o grupo Kaingang (KRC) apresenta uma distância genética maior do que o grupo Guarani (GRC). Uma hipótese para isso é um maior grau de miscigenação do grupo Guarani, o que diminuiria suas distâncias genéticas em relação aos outros grupos. Porém, Salzano & Callegari-Jacques (2006) propõe que diferenças dentro do continente e a história recente dos grupos podem ter condicionado diferenças de variabilidade mais amplas entre as populações nativas atuais, condicionando essas diferenças observadas.

Há certo consenso sobre a perda de variabilidade sofrida pelos paleo-ameríndios ao longo da sua dispersão pela América, principalmente por efeitos fundadores e gargalos populacionais. Porém nossos dados não estão de acordo com essa hipótese. Outro trabalho de Callegari-Jacques (2006) conclui que mesmo havendo esta perda de variabilidade também durante a colonização da América do Sul, ainda observa-se um valor significativo de variabilidade dentro e entre populações nativas americanas. Isto justifica nossos valores de heterozigosidade, que em ameríndios são menores que os das populações asiáticas e européias, porém maiores que os encontrados na população africana (ver tabela 27).

TABELA 26 DISTÂNCIAS GENÉTICAS ENTRE AS POPULAÇÕES

	GRC	KRC	JPT	HCB	CEU
KRC	0.0260 ± 0.0119				
JPT	0.0296 ± 0.0267	0.1061 ± 0.0588			
HCB	0.0153 ± 0.0132	0.0753 ± 0.0412	0.0015 ± 0.0037		
CEU	0.0376 ± 0.0279	0.1074 ± 0.0643	0.0082 ± 0.0061	0.0234 ± 0.0167	
YRI	0.2165 ± 0.1467	0.3156 ± 0.2317	0.1311 ± 0.0534	0.1801 ± 0.0745	0.0872 ± 0.0449

Utilizados os SNPs: rs2863381, rs4440084, rs1126680, rs1803274, rs7624915 e rs4387996. Populações: GRC e KRC: presente estudo; JPT: japoneses de Tóquio, Japão; HCB: chineses Han de Beijing, China; CEU: residente de Utah (EUA) descendentes de europeus do norte e oeste; YRI: africanos Yoruba de Ibadan, Nigéria (Sub-Sahara).

FIGURA 7 DENDROGRAMA CONSTRUÍDO ATRAVÉS DO MÉTODO *NEIGHBOR-JOINING* E BASEADO NA DISTÂNCIA GENÉTICA PADRÃO

NOTA: SNPs e populações segundo a tabela 26.

TABELA 27 HETEROZIGOSIDADE OBSERVADA NAS POPULAÇÕES

População	Heterozigosidade
GRC	0.3435 ± 0.0796
KRC	0.2184 ± 0.0873
JPT	0.3849 ± 0.0817
HCB	0.3879 ± 0.0828
CEU	0.3693 ± 0.0612
YRI	0.1317 ± 0.0498

NOTA: SNPs e populações segundo a tabela 26.

Sijia Wang *et al.* (2007) propõem que principalmente diferenças lingüísticas podem levar a um processo de divergência populacional em uma escala local. Considerando que a estimativa do surgimento dos dois troncos lingüísticos Tupi (ao qual pertence os Guarani) e Gê (ao qual pertence os Kaingang) seja respectivamente de 5.000 e 3.000 anos (URBAN, 1996), podemos deduzir que o tronco dos Guarani está há mais tempo se diferenciando, e conseqüentemente teve mais oportunidades de tentar restabelecer sua diversidade original. Este processo seria favorecido por características sociais, por parte dos Guarani, que permitiriam um maior grau de miscigenação com outros grupos ameríndios ou outros sub-grupos Guarani, compensando, assim, esta perda de diversidade e outros efeitos que os isolados populacionais sofrem. Isto se reflete em vários aspectos populacionais obtidos, como heterozigosidade, desequilíbrio de ligação e diversidade haplotípica, nos quais os Guarani apresentam uma maior proximidade a populações não-ameríndias panmíticas.

A maneira pela qual estes dois troncos surgiram também é relevante nesta análise. Pois, teoricamente, quanto menor o grupo fundador, maior a chance de a amostragem ser menos fiel à constituição genética da população original. Ou seja, quanto menor o grupo fundador, maior a perda de diversidade genética durante este processo. Infelizmente não possuímos dados sobre estes números.

Esta diversidade encontrada entre os dois grupos ameríndios comparados neste trabalho já era esperada. Petzl-Erler *et al.* (1993), comparando dados de variabilidade do complexo HLA para dez populações nativas da América do Sul encontraram as duas maiores distâncias genéticas sendo entre estas populações Guarani e Kaingang. Outro dado interessante é que existe um pequeno, mas relevante, grau de miscigenação via gênero masculino entre estas duas tribos, apontada por Marrero *et al.* (2007).

Concluimos que apesar destas tribos possuírem convivência geográfica comum ao longo das suas dispersões, e de maneira mais intensa nas últimas décadas em especial para estas tribos que dividem a mesma reserva indígena, cada uma mantém um elevado grau de identidade genética, provavelmente mantida por diferenças culturais e sociais entre as etnias Guarani e Kaingang.

## 7 CONCLUSÕES

Os grupos ameríndios demonstraram-se geneticamente distintos das populações mundiais comparadas, e também geneticamente distintos entre si.

Dentre estes, os Guarani apresentaram uma diversidade genética maior e mais próxima de proporções encontradas em asiáticos, culminando em uma distância genética menor entre estes grupos. Os Kaingang mostraram-se mais afastados dos grupos não-ameríndios, e com uma diversidade genética menor. Isto se deve, em parte, ao fato do tronco lingüístico Tupi ser mais antigo do que o tronco Gê, e portanto estar a mais tempo se diferenciando e assim tendo a oportunidade de re-estabelecer parte da sua diversidade genética pré-migração. O tamanho das populações fundadoras e outras diferentes situações que envolveram o surgimento destes grupos também podem ter influenciado esta atual diversidade que cada um possui, além de características sociais principalmente relacionadas a miscigenações de cada um com diferentes sub-populações e sub-grupos ameríndios.

Os ameríndios apresentaram, em geral, frequências mais baixas das mutações analisadas do gene *BCHE*. A mutação -116A é encontrada somente em euro-descendentes, sugerindo sua origem, relativamente recente, na Europa. A mutação K está presente ancestralmente nos paleo-ameríndios, pois é encontrada em todas as populações ameríndias comparadas, e os haplótipos que a inclui possuem frequentes haplótipos correspondentes com alelo usual. A mutação 1914 está significativamente menos frequente em ameríndios, e curiosamente mais frequente que seu alelo usual em afro-americanos.

Os dados das frequências alélicas e haplotípicas revelam uma variação gradual do alelo ou haplótipo mais frequente. Nos extremos estão as populações mais afastadas e isoladas geograficamente, as africanas e ameríndias. As populações asiáticas e européias estão em uma condição geralmente intermediária de variação. Dados do consórcio HapMap apresentam exatamente esta tendência entre o grupo euro-descendente (CEU) e o grupo nigeriano (YRI) para mais de 75% de 3 milhões de SNPs analisados. Adaptações locais e efeitos mais significativos da deriva genética são, por enquanto, as principais justificativas para esta forte variação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCÂNTARA, V.M.; CIPRIANI, T.R.; REA, R.; SUPLICY, H.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Formas moleculares da butirilcolinesterase (BChE) e índice de massa corporal (IMC). *Genet. Mol. Biol.*, v. 22, p. 213, 1999, Suplemento.

ALCÂNTARA, V.M. Fenótipos da butirilcolinesterases e suas relações com dados antropométricos, bioquímico-hormonal e pressão arterial em obesos na população de Curitiba, PR. Curitiba, 2000. 230f. Tese (Doutorado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

ALCÂNTARA, V.M.; OLIVEIRA, L.C.; REA, R.R.; SUPLICY, H.L.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Butyrylcholinesterase activity and metabolic syndrome in obese patients. **Forum of the European Societies of Clinical Chemistry**, Berlin, v.43, n.3, p.285-288, 2005.

ALLDERDICE, P.W.; GARDNER, H.A.R.; GALUTIRA, D.; LOCKRIDGE, O.; LA DU, B.N.; McALPINE, P.J. The cloned butyrylcholinesterase (BCHE) gene maps to a single chromosome site, 3q26. *Genomics*, v.11, p.452-454, 1991.

ALVES, H.S.; Investigações genéticas na Aldeia Caruguá, índios Mbyá Guarani, Piraquara (PR). Curitiba, 2006. Monografia – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

ARPAGAUS, M.; KOTT, M.; VATSIS, K.P.; BARTELS, C.F.; LA DU, B.N.; LOCKRIDGE, O. Structure of the gene for human butyrylcholinesterase. Evidence for a single copy. *Biochemistry*, v. 29, p. 124-131, 1990.

BALASUBRAMAN, A.S.; BHANUMATHY, C.D., Noncholinergic functions of cholinesterases. *FASEB, J.*, v.7, p. 1354-1358, 1993.

BALASUBRAMANIAN, A.S. Amyloid beta peptide, insulin degrading enzyme and butyrylcholinesterase. **Neurochemical Research**, New York, v.26, n.4, p.453-456, 2001.

BOECK, A. T.; FRY, D. L.; SASTRE, A.; LOCKRIDGE, O. Naturally occurring mutation, Asp70His, in human butyrylcholinesterase. *Ann. Clin. Biochem.*, v.39, p. 154-156, 2002.

BROOMFIELD, C.A.; MAXWELL, D.M.; SOLANA, R.P.; CASTRO, C.A.; FINGER, A.V.; LENZ, D.E. Protection by butyrylcholinesterase against organophosphorus poisoning in nonhuman primates. **Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics**, Baltimore, v.259, n.2, p.633-638, 1991.

BUDOWLE, B.; CHAKRABORTY, R.; GIUSTI, A.M.; EISENBERG, A.J.; ALLEN,

R.C. Analysis of the VNTR locus DIS80 by the PCR followed by right-resolution PAGE. **Am. J. Hum. Genet.**, Berlin, v.48, p. 137-144, 1991.

CALLEGARI-JACQUES, S.M.; CROSSETTI, S.G.; KOHLRAUSCH, F.B.; SALZANO, F.M.; TSUNETO, L.T.; PETZL-ERLER, M.L.; HILL, K.; HURTADO, A.M.; HUTZ, H. The  $\beta$ -globin gene cluster distribution revisited-patterns in native american populations. **American Journal of Physical Anthropology**, v.134, p.190-197, 2007.

CHATONNET, A.; LOCKRIDGE, O. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. **Biochem.**, v.260, p. 625-634, 1989.

CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.; PRIMO-PARMO, S.L.; PICHETH, G.; LOURENÇO, M.A.C.; VIEIRA, M.M. The C5 isozyme of serum cholinesterase and adult weight. **Hum. Hered.**, New York, v. 41, p. 330-339, 1991.

CHILUCURI, N. et al., Adenovirus-mediated gene transfer of human butyrylcholinesterase results in persistent high-level transgene *in vivo*. **Chemico-Biological Interactions**, v.175, p. 327-331, 2008.

COKUGRAS, A.N. Butyrylcholinesterase: structure and physiological importance. **Turkish Journal of Biochemistry**, v.28, n.2, p.54-61, 2003.

DARVESH, S.; GRANTHAM, D.L. & HOPKINS, D.A. Butyrylcholinesterase in normal human amygdale and hippocampal formation. **J. Comp. Neurol.** 393, p. 374-390, 1998.

DARVESH, S.; HOPKINS, D.A.; GEULA, C. Neurobiology of butyrylcholinesterase. **Nature Reviews. Neuroscience**, London, v.4, n.2, p.131-138, 2003.

DEN DUNNEN, J. T.; ANTONARAKIS, S. E. Mutation nomenclature extension and suggestions to describe complex mutations: a discussion. **Hum. Mutation**, New York, v. 15, p. 7-12, 2000.

DUYSEN E.G.; LI, B.; CARLSON, M.; LI, Y.; WIESELER, S.; HINRICHS, S.H.; LOCKRIDGE, O. Increased Hepatotoxicity and Cardiac Fibrosis in Cocaine-Treated Butyrylcholinesterase Knockout Mice. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.103, n.6, p.514-521, 2008.

EARL, C.J.; THOMPSON, R.H. Cholinesterase levels in the nervous system in tri-ortho-cresyl phosphate poisoning. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, London, v.7, n.4, p.685-94, 1952.

EDWARDS, J.A.; BRIMIJOIN, S. Divergent regulation of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in tissues of the rat. **Journal of Neurochemistry**, London, v.38, n.5, p.1393-1403, 1982.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v. 1, p. 47-50, 2005.



FABER, M. Serum cholinesterase in disease. **Acta Medica Scandinavica**, Stockholm, v.114, p.59-71, 1943.

FAGUNDES, N.J.R.; KANITZ, R.; BONATTO, S.L. Reevaluation of the native american mtDNA genome diversity and its bearing on the models or early colonization of Beringia. *PloS ONE* 3(9): e3157, 2008.

FAIRBROTHER, A.; WAGNER, S.L.; WELCH, S.; SMITH, B.B. Influence of menstrual cycle on serum cholinesterase. **Environmental Research**, New York, v.49, n.2, p.181-189, 1989.

FUNAI Fundação Nacional do Índio, [www.funai.gov.br](http://www.funai.gov.br) acessado em 23 de agosto de 2008.

FURTADO, L.; SOUZA, R.L.R.; TSUNETO, L.T.; PETZL-ERLER, M.L.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Butyrylcholinesterase genetic variability in Guarani Amerindians from the Brazilian state of Mato Grosso do Sul. *Genetics and Molecular Biology*, v.29, n.1, p. 8-13, 2006.

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. *Genomic*, v.11, p. 455-458, 1991.

GEORGE, S.T.; BALASUBRAMANIAN, A.S. The aryl acylamidases and their relationship to cholinesterases in human serum, erythrocyte and liver. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v.121, n.1, p.177-186, 1981.

GEORGE, K. M.; MONTGOMERY, M. A.; SANDOVAL, L. E.; THOMPSON C. M., Examination of cross-antigenicity of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase using anti-acetylcholinesterase antibodies. *Toxicol Lett.*, v. 126, p. 99-105, 2001.

GNATT, A.; GINZBERG, D.; LIEMAN-HURWITZ, J'; ZAMIR, R.; ZAKUT, H.; SOREQ, H. Human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase are encoded by two distinct genes. *Cell. Mol. Neurobiol.*, v.11, p. 91-104, 1991.

GOEBEL, T.; WATERS, M.R.; O'ROURKE, D.H. The late pleistocene dispersal of modern human in the Americas. *Science*, v.319, p. 1497-1502, 2008.

GRAYBIEL, A.M.; RAGSDALE JR., C.W. Pseudocholesterase staining in the primary visual pathway of the macaque monkey. **Nature**, London, v.299, n.5882, p.439-442, 1982.

GUERRA, MARÍA B; CARGNEL, ELDA G; OSTA, VIVIANA; OSINDE, MARÍA E; SCHKAIR, JUAN C. Determinación de valores de referencia de colinesterasa plasmática e intraeritrocitaria en niños de una población hospitalaria. *Arch. argent. pediatr*;103(6):486-490, dic. 2005. btab.

HADA, T.; OHUE, T.; IMANISHI, H.; NAKAOKA, H.; HIROSAKI, A.; FUJIKURA, M.; AMURO, Y.; HIGASHINO, K. Alteration of serum cholinesterase isozyme in patients with liver cirrhosis. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v.178, n.1, p.111-112, 1988

HARRIS, H. e WHITTAKER, M. differential inhibition of serum cholinesterase phenotypes by solanine and solanidine. *Ann. Hum. Genet.*, v. 26, p. 73-76, 1962.

HARRIS, H. The principles of human biochemical genetics. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biochemical, 1980.

HASIN, Y.; AVIDAN, N.; BERCOVICH, D.; KORCZYN, A.; SILMAN, I.; BECKMAN, J.S.; SUSSMAN, J.L. A paradigm for single nucleotide polymorphism analysis: the case of the acetylcholinesterase gene. **Hum. Mut.**, New York, v. 24, p.408-416, 2004.

HEY, J. On the numbers of New World founders: a population genetic portrait of the peopling of the Americas. **PLoS Biology**, v.3, e193, p.01-11, 2005.

HORAI, S.; KONDO, R.; NAKAGAWA-HATTORI, Y.; HAYASHI, S. SONODA, S.; TAJIMA, K. Peopling of the Americas, founded by four major lineages of mitochondrial DNA. **Molecular Biology and Evolution**, v.10, p.23-47, 1993.

IRVING, W.N. Context and chronology of early man in the Americas. **Annual Reviews of Anthropology**, v.14, p.529-555, 1985 apud SCHANFIELD, M.S. Immunoglobulin Allotypes (GM and KM) indicate multiple founding populations of Native Americans: evidence of at least four migrations to the New World. **Human Biology**, v.64, p.381-402, 1992.

JBILO, O.; TOUTANT, J.P.; VATSIS, K.P.; CHANTONNET, A.; LOCKRIDGE, O. Promoter and transcription start site of human and rabbit butyrylcholinesterase genes., *J. Biol. Chem.*, v.269, p. 20829-20837, 1994.

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

KITCHEN, A.; MIYAMOTO, M.M.; MULLIGAN, C.J. A Three-Stage Colonization Model for the Peopling of the Americas. *PLoS One* 3: e1596, 2008.

KUTTY, K.M. Review: Biological function of cholinesterase. *Clin. Biochem.*, v. 13, p. 239-243, 1980.

KUTTY, K.M.; PAYNE, R.H. Serum pseudocholinesterase and very-low-density lipoprotein metabolism. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, New York, v.8, n.4, p.247-50, 1994.

LAYER, PG; WILLBOLD, E. Novel functions of cholinesterases in development, physiology and disease. **Progress in Histochemistry and Cytochemistry**, Stuttgart, v.29, n.3, p.1-94, 1995.

LAYER, P.G. Cholinesterases during development of the avian nervous system. **Cellular and Molecular Neurobiology**, New York, v.11, n.1, p.7-33, 1991.

LANDO, G.; MOSCA, A.; BONORA, R.; AZZARIO, F.; PENCO, S.; MAROCCHI, A.; PANTEGHINIM, M.; PATROSSO, M.C. Frequency of butyrylcholinesterase gene mutations in individuals with abnormal inhibition numbers: an Italian-population study. *Pharmacogenetics*, London, v. 13, p. 265-270, 2003.

LAYER, P.G.; SPORNS, O. Spatiotemporal relationship of embryonic cholinesterases with cell proliferation in chicken brain and eye. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.84, n.1, p.284-288, 1987.

LI, B.; STRIBLEY, J.A.; TICU, A.; XIE, W.; SCHOPFER, L.M.; HAMMOND, P.; BRIMIJOIN, S.; HINRICHS, S.H.; LOCKRIDGE, O. Abundant tissue butyrylcholinesterase and its possible function in the acetylcholinesterase knockout mouse. **Journal of Neurochemistry**, London, v.75, p.1320-1331, 2000.

LOCKRIDGE, O.; BARTELS, C.F.; VAUGHAN, T.A.; WONG, C.K.; NORTON, S.E.; JOHNSON, L.L. Complete amino acid sequence of human serum cholinesterase. *J. Biol. Chem.*, v. 262, p. 549-557, 1987a.

LOCKRIDGE, O.; ADKINS, S.; LA DU, B.N. Location of disulfide bonds within the sequence of human serum cholinesterase. *J. Biol. Chem.*, v.262, p. 12945-12952, 1987b.

MARRERO, A.R.; SILVA-JUNIOR, W.A.; BRAVI, C.M.; HUTZ, M.H.; PETZL-ERLER, M.L.; RUIZ-LINARES, A.; SALZANO, F.M.; BORTOLINI, M.C. Demographic and evolutionary trajectories of the Guarani and Kaingang Natives of Brazil. *American Journal of Physical Anthropology*, v.132, p.301-310, 2007.

MASSOULIÉ, J.; SUSSMAN, J.; BON, S.; SILMAN, I., Structure and functions of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Prog Brain Res.* v. 98, p. 139-46, 1993.

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

MASSON, P.; XIE, W.; FROMENT, M-T.; LOCKRIDGE O. Effects of mutations of active site residues and amino acids interacting with the  $\Omega$  loop on substrate activation of butyrylcholinesterase. *Biochim. Bioph. Acta*, v. 1544, p 166-176, 2001.

MESULAM, M.M.; GUILLOZET, A.; SHAW, P.; LEVEY, A.; DUYSSEN, E.G.; LOCKRIDGE, O. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. **Neuroscience**, Oxford, v.110, n.4, p.627-639, 2002.

MIKAMI, L.R. Variabilidade dos exons 2 e 4 do gene BCHE e sua relação com a atividade da Butirilcolinesterase. Curitiba, 2005. Tese (Doutorado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

NACHON, F.; NICOLET, Y.; VIGUIE, N.; MASSON, P.; FONTECILLA-CAMPS, J.C.; LOCKRIDGE, O. Engineering of a monomeric and low glycosylated form of human butyrylcholinesterase: expression, purification, characterization and crystalization. *Eur. J. Biochem.*, v. 269, p. 630-637, 2002.

NEI, M.; TAJIMA, F.; TATENO, Y. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. **Journal of Molecular Evolution**, v. 19, p. 153-170, 1983.

NUNES, K. Haplótipos do gene BCHE da Butirilcolinesterase humana e aspectos evolutivos. Curitiba, 2007. Tese (Mestre em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

NUNES, K.; SOUZA, R.L.R.; FURTADO-ALLE, L.; TSUNETO, L.T.; Petzl-Erler, M.L.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Absence of the -116A variant of the butyrylcholinesterase BCHE gene in Guarani Amerindians from Mato Grosso do Sul. *Genetics and Molecular Biology*, v.31, n.1, p.27-28, 2008.

OHNO, S. *Evolution by gene duplication*. Springer Verlag: New York, 1970.

OLIVEIRA, L.A. Diversidade populacional de microssatélites do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) em populações indígenas do Paraná e do Mato Grosso do Sul. Curitiba, 2007. Tese (Mestre em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

ORESKOVIC K.; KUNEC-VAJIC, E. Pseudocholinesterase in aloxan-diabetic rats. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol*, v. 78, p. 117-120, 1992.

OTA, T. **Dispan: genetic distance and phylogenetic analyses**. Institute of Molecular Evolutionary Genetics, Pennsylvania State University, University Park, PA, 1993.

PAGE, R.D.M. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. **Computer Applications in the Biosciences**, v. 12, p.357-358, 1996.

PENA, S.D.J.; SANTOS, F.R.; BIANCHI, N.O.; BRAVI, C.M.; CARNESE, F.R.; ROTHHAMMER, F.; GERELSAIKHAN, T.; MUNKHTUJA, B.; OYUNSUREN, T. A major founder Y-chromosome haplotype in Amerindians. **Nature Genetics**, v.11, p.15-16, 1995.

PERINI, J.A.; PETZL-ERLER, M.L.; TSUNETO, M.L.; SUAREZ-KURTZ, G. *VKORC1* polymorphisms in Amerindian populations of Brazil. **Pharmacogenomics**, v.9(11), p.1623-1629, 2008.

PETZL-ERLER, M.L.; LUZ, R.; SOTOMAIOR, V.S. The HLA polymorphism of two distinctive South American tribes: The Kaingang and the Guarani. **Tissue Antigens**, v.41, p.227-237, 1993.

PRIMO-PARMO, S.L.; BARTELS, C.F.; WIERSEMA, B.; VAN DER SPEK, A.F.; INNIS, J.W.; LA DU, B.N. Characterization of 12 silent alleles of the human

butyrylcholinesterase (BCHE) gene. **American Journal of Human Genetics**, Baltimore, v.58, p.52–64, 1996.

ROBERTSON, G.S. Serum cholinesterase deficiency II: pregnancy. **British Journal of Anaesthesia**, London, v.38, n.5, p.361-369, 1966.

ROGERS, R.A.; ROGERS, L.A.; MARTIN, L.D. How the door opened: the peopling of the new world. **Human Biology**, v.64, p.281-302, 1992.

SALZANO, F.M. & CALLEGARI-JACQUES, S.M. American and nonAmerindian autosome molecular variability – a test analysis. **Genetica**, v.126, p.237-242, 2006.

SCHMITZ, P.I.; BECKER, I.I.B. Os primitivos engenheiros do planalto e suas estruturas subterrâneas: a tradição Taquara. Em: KERN, A.; editor. **Arqueologia pré-histórica do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Mercado Aberto, p.295-330. 1997.

SCHWARZ, M.; GLICK, D.; LOEWENSTEIN, Y.; SOREQ, H. Engineering of human cholinesterases explains and predicts diverse consequences of administration of various drugs and poisons. **Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v.67, n.2, p.283-322, 1995.

SHAFFERMAN, A.; KRONMAN, C.; FLASHNER, Y.; LEITNER, M.; GORSFED, H.; ORDENTLICH, A.; GOZES, Y.; COHEN, S.; ARIEL, N.; BARAK, D.; HARE, M.; SILMAN, I.; SUSSMAN, J.; VELAN, B. Mutagenesis of human acetylcholinesterase. Identification of residues involved in catalytic activity and in polypeptide folding. **J. Bio. Chem.**, v. 267, p. 17640-176448, 1992.

SIDELL, F.R.; KAMINSKIS, A. Influence of age, sex, and oral contraceptives on human blood cholinesterase activity. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v.21, n.10, p.1393-1395, 1975.

SILVA, J.J.O. A utilização das colinesterases na avaliação da exposição humana a agrotóxicos. **Novas perspectivas para antigas ferramentas**. São Paulo, s.n., 2004.

SIMON, N.M.; DEL GRECO, F.; DIETZ, A.A.; RUBINSTEIN, H.M. Serum cholinesterase deficiency in renal failure. **Transactions - American Society for Artificial Internal Organs**, Los Angeles, v.15, p.328-332, 1969.

SIQUEIRA, MARIA ELISA P.B.; FERNÍCOLA, NILDA G.G.; BORGES, EUSTÁQUIO L. Determinação de níveis normais de colinesterase plasmática e eritrocitária. **Rev. Saúde Pública** v.12 n.3 São Paulo sep. 1978

SOMORIN, O.; SKOREPA, J. Aliesterase activity in normal and postheparin human blood sera. **J. Biochem.**, v. 83, p. 617-623, 1978.

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.; FURTADO, L.; DINIZ, A.C.P.; SILVA, A.C.D.; KAISS, J.; PETZL-ERLER, M.L.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Studies on a heterologous complex formed by human butyrylcholinesterase. *Biochem. Genet.*, New York, v. 41, p.141-150, 2003.

SOUZA, R.L.R.; MIKAMI, L.R.; MOEGAWA, O.B.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Four new mutations in the BCHE gene of human butyrylcholinesterase in a Brazilian blood donor sample. ***Molecular Genetics and Metabolism***, v.84, p.349-353, 2005.

STARIKOVSKAYA, Y.B.; SUKERNIK, R.I.; SCHURR, T.G.; KOGELNIK, A.M.; WALLACE, D.C. mtDNA diversity in Chukchi and Siberian Eskimos: implications for the genetic history of Ancient Beringia and the peopling of the New World. ***American Journal of Human Genetics***, v.63, p.1473-1491, 1998.

TOVO-RODRIGUES, L.; CALLEGARI-JACQUES, S.M.; PETZL-ERLER, M.L.; TSUNETO, L.T.; SALZANO, F.M.; HUTZ, M.H. O gene DRD4 revela estruturação populacional em nativos da América do Sul. Resumos do 54º Congresso Brasileiro de Genética, 2008.

TSUNETO, L.T.; PROBST, C.M.; HUTZ, M.H.; SALZANO, F.M.; RODRIGUEZ-DELFIN, L.A.; ZAGO, M.A.; HILL, K.; HURTADO, A.M.; RIBEIRO-DOS SANTOS, A.K.C.; PETZL-ERLER, M.L. HLA class II diversity in seven Amerindian populations. Clues about the origins of the Aché. *Tissue Antigens*, v.62, p.512-526, 2003.

URBAN, G. On the geographical origins and dispersion of Tupian languages. *Rev Antropol*, São Paulo, v.39, p.61-104, 1996.

UTIYAMA et al. Perfil de auto-anticorpos em índios das tribos Kaingang e Guarani do Sul do Brasil. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health* 7(6), 2000.

VALLE, A.M.; RADIC, Z.; RANA, B.K.; WHITFIELD, J.B.; O'CONNOR, D.T.; MARTIN, N.G.; TAYLOR, P. The cholinesterases: Analysis by pharmacogenomics in man. ***Chem Biol Interact***, 2008.

VALLE, A.; O'CONNOR, D.T.; TAYLOR, P.; ZHU, G.; MONTGOMERY, G.W.; SLAGBOOM, P.E.; MARTIN, N.G.; WHITFIELD, J.B. Butyrylcholinesterase: association with the metabolic syndrome and identification of 2 gene loci affecting activity. ***Clin. Chem.***, v.52:6, p.1014-1020, 2006.

WALLACE, D.C.; TORRONI, A. American Indian prehistory as written in the Mitochondrial DNA: a review. ***Human Biology***, v.64, p.403-416, 1992.

WANG, S.; LEWIS, C.M.; JAKOBSSON, M.; RAMACHANDRAN, S.; RAY, N. et al. Genetic variation and population structure in native americans. *PLoS Genet* 3:e185,