

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DANIELLE JACKOWSKI

VARIABILIDADE DO GENE *BCHE* EM AMOSTRA DE AFRO-
DESCENDENTES

CURITIBA
2009

DANIELLE JACKOWSKI

VARIABILIDADE DO GENE *BCHE* EM AMOSTRA DE AFRO-
DESCENDENTES

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Genética da
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Dr. Ricardo L.R. de Souza.
Co-orientadora: Dra Eleidi A. Chautard Freire
Maia.

CURITIBA
2009

"A persistência é o caminho do êxito."

(Charles Chaplin)

AGRADECIMENTOS

A Deus agradeço imensamente por me mostrar teu amor e conhecer verdadeiramente a ti.

Ao Prof. Dr. Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza, meu orientador, obrigada pela confiança, paciência, e apoio científico. Agradeço pela compreensão e amizade nos momentos pessoais difíceis.

À Prof.^a Dr.^a Eleidi Alice Chautard Freire Maia, pelo carinho, paciência e compreensão.

À Prof.^a Maria da Graça Bicalho por fornecer as amostras de DNA.

À Prof.^a Valéria Roxo Sperandio e à Liya Regina Mikami por acompanhar e avaliar esse trabalho com dedicação e atenção.

Aos colegas do mestrado pela convivência divertida e pela amizade, em especial à Ju e Fran e ao Ivan.

Aos colegas do laboratório de Polimorfismos e Ligação, à Thaís Chaves pela ajuda na PCR e SSCA e ao Hugo por me socorrer na genotipagem Taqman.

Ao Jhonatan, que apareceu na minha vida no final dessa empreitada, renovando meu ânimo e me dando força para seguir em frente. Amo você.

A minha família, que mesmo distante, sempre pude contar.

Todos vocês foram de alguma maneira, importantes na minha formação e na minha chegada até aqui.

SUMÁRIO

| | |
|---|------|
| LISTA DE TABELAS..... | VII |
| LISTA DE FIGURAS..... | IX |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | X |
| LISTA DE ABREVIATURAS DOS AMINOÁCIDOS..... | XI |
| RESUMO..... | XII |
| ABSTRACT..... | XIII |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 3 |
| 2.1 COLINESTERASES..... | 3 |
| 2.2 ESTRUTURA DA BChE..... | 4 |
| 2.3 ESTRUTURA DO GENE BCHE..... | 5 |
| 2.4 NOMENCLATURA..... | 6 |
| 2.5 VARIABILIDADE DO GENE BCHE..... | 7 |
| 2.5.1 Variantes não usuais mais frequentes do gene <i>BCHE</i> | 10 |
| 2.5.1.1 Variante <i>-116G>A</i> (rs1126680)..... | 10 |
| 2.5.1.2 Variante <i>D70G</i> (rs1799807)..... | 10 |
| 2.5.1.3 Variante <i>E255D</i> (rs16849700)..... | 11 |
| 2.5.1.4 Variante <i>A539T</i> (rs1803274)..... | 11 |
| 2.5.1.5 Variante <i>1914A>G</i> (rs3495)..... | 12 |
| 2.5.1.6 Variante <i>A184V</i> | 12 |
| 2.5.2 Variantes silenciosas..... | 13 |
| 2.6 ATUAÇÃO FISIOLÓGICA DA BChE..... | 13 |
| 2.6.1 Atuação nas vias colinérgicas..... | 13 |
| 2.6.2 Metabolismo de lipídeos, peso e IMC..... | 13 |
| 2.6.3 Ciclo celular - desenvolvimento embrionário e tumorigênese..... | 14 |
| 2.6.4 Doenças neurodegenerativas..... | 15 |
| 2.7 POPULAÇÃO AFRO-BRASILEIRA..... | 16 |
| 2.7.1 Origem da população brasileira..... | 16 |
| 2.7.2 População Paranaense e Curitibana..... | 16 |
| 2.7.3 Composição alélica dos afro-descendentes brasileiros e paranaenses..... | 17 |
| 3. OBJETIVOS..... | 18 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL..... | 18 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 18 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS..... | 19 |
| 4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS..... | 19 |
| 4.2 METODOLOGIA..... | 19 |
| 4.2.1 Coleta de Sangue Periférico e Extração do DNA..... | 19 |
| 4.2.2 Amplificação por PCR..... | 19 |
| 4.3 ANÁLISE DO DNA AMPLIFICADO..... | 21 |
| 4.3.1 SSCA (Análise Conformacional de Fita Simples)..... | 21 |
| 4.3.2 Coloração do gel..... | 23 |

| | |
|---|----|
| 4.3.3 Sequenciamento de DNA..... | 24 |
| 4.3.3.1 Purificação do produto de PCR..... | 24 |
| 4.3.3.2 Reação de sequenciamento | 24 |
| 4.3.3.3 Purificação do produto de PCR da reação de sequenciamento..... | 25 |
| 4.4 ANÁLISE DO NUCLEOTÍDEO 1914 DO GENE BCHE | 25 |
| 4.4.1 Genotipagem com Taqman | 25 |
| 4.4.2 Amplificação do DNA | 26 |
| 4.5 ANÁLISE DOS DADOS..... | 27 |
| 4.5.1 Frequências alélicas e genotípicas | 27 |
| 4.5.2 Montagem dos haplótipos..... | 27 |
| 4.5.3 Equilíbrio de Hardy-Weinberg, desequilíbrio de ligação e inferência haplotípica..... | 28 |
| 5. RESULTADOS..... | 29 |
| 5.1 EXON 1 | 29 |
| 5.1.1 Nucleotídeo -116..... | 29 |
| 5.2 EXON 2 | 31 |
| 5.2.1 Nucleotídeo 209..... | 31 |
| 5.2.2 Nucleotídeo 765..... | 32 |
| 5.3 EXON 4 | 33 |
| 5.3.1 Nucleotídeo 1615..... | 33 |
| 5.4 ESTRUTURA HAPLOTÍPICA..... | 34 |
| 5.4.1 Haplótipos e desequilíbrio de ligação para as variantes <i>-116G>A</i> , <i>D70G</i> , <i>E255D</i> , <i>A539T</i> e <i>1914A>G</i> | 34 |
| 6. DISCUSSÃO | 36 |
| 6.1 VARIABILIDADE DO GENE BCHE..... | 36 |
| 6.1.1 Exon 1..... | 36 |
| 6.1.1.1 Variante <i>-116G>A</i> | 36 |
| 6.1.2 Exon 2..... | 37 |
| 6.1.2.1 Variante <i>D70G</i> | 37 |
| 6.1.2.2 Variante <i>E255D</i> | 38 |
| 6.1.3 Exon 4..... | 40 |
| 6.1.3.1 Variante <i>A539T</i> | 40 |
| 6.1.3.2 Variante 1914..... | 40 |
| 6.2 DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE AS VARIANTES DO GENE <i>BCHE</i> | 42 |
| 7. CONCLUSÕES..... | 44 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 45 |
| APÊNDICES..... | 55 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Variantes do gene <i>BCHE</i> | 8 |
| Tabela 2. Sequências dos iniciadores utilizados para amplificar os fragmentos de DNA na técnica de SSCA | 21 |
| Tabela 3. Condições das eletroforeses de SSCA para os diferentes fragmentos do gene <i>BCHE</i> | 22 |
| Tabela 4. Par de iniciadores utilizados nas reações de sequenciamento do fragmento referente ao nucleotídeo -116 com suas respectivas sequências de nucleotídeos..... | 24 |
| Tabela 5. Frequências genotípicas e alélicas referentes ao nucleotídeo -116, em amostras de doadores de sangue de Curitiba de origem étnica Afro-descendente..... | 29 |
| Tabela 6. Frequências genotípicas e alélicas, referentes ao nucleotídeo 209, em amostras de doadores de sangue de Curitiba de origem étnica Afro-descendente..... | 31 |
| Tabela 7. Frequências genotípicas e alélicas, referentes ao nucleotídeo 765, em amostras de doadores de sangue de Curitiba de origem étnica Afro-descendente..... | 32 |
| Tabela 8. Frequências genotípicas e alélicas, referentes ao nucleotídeo 1615, em amostras de doadores de sangue de Curitiba de origem étnica Afro-descendente..... | 33 |
| Tabela 9. Frequências genotípicas e alélicas, referentes ao nucleotídeo 1914, em amostras de doadores de sangue de Curitiba de origem étnica Afro-descendente..... | 34 |
| Tabela 10. Valores referentes ao desequilíbrio de ligação entre os 6 SNPs analisados..... | 35 |
| Tabela 11. Estimativas das frequências haplotípicas e do número absoluto dos haplótipos inferidos para as variantes -116, 209, 765, 1615 e 1914..... | 35 |
| Tabela 12. Frequências alélicas e genotípicas referentes ao nucleotídeo 209 em diferentes populações..... | 38 |
| Tabela 13. Dados comparativos de frequências alélicas para a variante 765..... | 38 |
| Tabela 14. Dados comparativos das frequências genotípicas da variante 765..... | 39 |
| Tabela 15. Frequências alélicas e genotípicas referentes ao nucleotídeo 765 em diferentes populações..... | 39 |

Tabela 16. Frequências alélicas e genotípicas referentes ao nucleotídeo 1615 em diferentes populações.....41

Tabela 17. Frequências alélicas e genotípicas referentes ao nucleotídeo 1914 em diferentes populações.....42

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Estrutura esquemática do sítio ativo do monômero da butirilcolinesterase..... | 5 |
| Figura 2 - Desenho esquemático do gene <i>BCHE</i> | 6 |
| Figura 3 - Desenho esquemático da genotipagem com Taqman..... | 26 |
| Figura 4 - Padrões referentes ao fragmento do nucleotídeo -116, após eletroforese SSCA em gel de poliacrilamida..... | 30 |
| Figura 5 - Padrão diferente aos -116GA e -116GG após eletroforese SSCA em gel de poliacrilamida..... | 30 |
| Figura 6 - Padrões referentes ao fragmento do nucleotídeo 209, após eletroforese SSCA em gel de poliacrilamida..... | 31 |
| Figura 7 - Padrões referentes ao fragmento do nucleotídeo 765, após eletroforese SSCA em gel de poliacrilamida:..... | 32 |
| Figura 8 - Padrões referentes ao fragmento do nucleotídeo 1615, após eletroforese SSCA em gel de poliacrilamida..... | 33 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|------------------------|--|
| Aa | Aminoácido |
| Ache | Acetilcolinesterase |
| <i>ACHE</i> | Gene da acetilcolinesterase |
| APOE | Gene da Apoliproteína B |
| BChE | Butirilcolinesterase |
| <i>BCHE</i> | Gene da Butirilcolinesterase |
| <i>CHE2</i> | Gene codificador do complexo C5 da butirilcolinesterase |
| cDNA | Ácido desoxiribonucléico complementar |
| DNA | Ácido desoxiribonucléico |
| EDTA | Ácido etilenoaminotetraacético |
| HEMEPAR | Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná |
| IMC | Índice de Massa Corporal |
| LIGH | Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade |
| Nt | Nucleotídeo |
| PAS | Sítio Aniônico Periférico |
| PCR | Reação em Cadeia da Polimerase |
| RCLB | Tampão de lise de células vermelhas |
| RNA_m | Ácido ribonucléico mensageiro |
| SAP | Shrimp Alkaline Phosphatase |
| SC | Succinilcolina |
| SDS | Dodecil sulfato de sódio |
| SNP | Polimorfismo de nucleotídeo único |
| SSCA | Análise conformacional de fita simples |
| TBE | Tris-ácido bórico –EDTA |
| TEMED | N’N’N’N’ – tetrametiletlenodiamina |
| 5’UTR | Região 5’ transcrita não traduzida |
| 3’UTR | Região 3’ transcrita não traduzida |

LISTA DE ABREVIATURAS DOS AMINOÁCIDOS

| Aminoácido | Abreviação– 3 letras | Abreviação – 1 letra |
|-------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Alanina | Ala | A |
| Arginina | Arg | R |
| Asparagina | Asn | N |
| Ácido aspártico | Asp | D |
| Cisteína | Cys | C |
| Ácido glutâmico | Glu | E |
| Glutamina | Gln | Q |
| Glicina | Gly | G |
| Histidina | His | H |
| Isoleucina | Ile | I |
| Leucina | Leu | L |
| Lisina | Lys | K |
| Metionina | Met | M |
| Fenilalanina | Phe | F |
| Prolina | Pro | P |
| Serina | Ser | S |
| Treonina | Thr | T |
| Triptofano | Trp | W |
| Tirosina | Tyr | Y |
| Valina | Val | V |

RESUMO

A butirilcolinesterase (BChE) é uma enzima sérica, codificada pelo gene *BCHE* (3q26.1-q26.2), produzida no fígado e encontrada em vários tecidos do organismo. O presente estudo investigou a variabilidade genética e haplotípica do gene *BCHE* em uma amostra de origem Afro-descendente, da população de Curitiba, com o objetivo de comparar as frequências encontradas com as de outras populações, a fim de tentar estabelecer a origem das mutações encontradas. As variações nos exons 1 (-116G>A), 2 (D70G e E255D) e 4 (A539T) foram investigadas por PCR-SSCA e a variação 1914A>G foi detectada na Genotipagem por *Taqman*. Os resultados obtidos revelam uma frequência de 4,04% ± 1,28% para a variante -116A; 1,49% ± 0,56% para a variante 209G; 3,62% ± 0,86% para a variante 765C; 19,14% ± 1,81% para a variante 1615A e 38,31% ± 2,33% para a variante 1914G. Comparações das frequências das mutações nos sítios -116 e 255 com as de outros estudos revelaram que estas diferem das encontradas na população de Curitiba. A análise haplotípica revelou os seguintes haplótipos como mais frequentes: [-116G; 209A; 765G; 1615G; 1914A] com 57,34%, [-116G; 209A; 765G; 1615G; 1914G] com 21,56% e [-116G; 209A; 765G; 1615A; 1914G] com 9,17%. As análises de desequilíbrio de ligação possibilitaram concluir que os desequilíbrios encontrados eram semelhantes aos já descritos em outros estudos, com exceção da ausência de desequilíbrio entre as mutações 209A>G e A539T e, analisando esses dados para as variantes dos nucleotídeos 765 e 1615 sugere-se que a mutação 765C tenha surgido em um cromossomo que possuía a variante 1615A.

ABSTRACT

The butyrylcholinesterase (BChE) is a serum enzyme, codified by BCHE gene (3q26.1-q26.2), produced in the liver and met in several organism tissues. The present study analyzed all genetic and haplotypic variability of the *BCHE* gene in a sample of the Curitiba population of African origin, in order to compare the frequency found with those of other population, to try establish the analysed mutations origin. Variants in exons 1 (-116G> A), 2 (D70G and E255D) and 4 (A539T) were investigated by PCR-SSCA and change 1914A> G was detected by *Taqman* genotyping. The results got shows a frequency of 4,04% \pm 1,28% to the variant -116A, 1,49% \pm 0,56% to the variant 209G; 3,62% \pm 0,86% to the 765C variant, 19,14% \pm 1,81% to the 1615A variant and 38,31% \pm 2,33% to the 1914G variant. The frequencies comparison of the -116 and 255 mutations with other studies showed that these differ from the frequency found in the Curitiba population. The haplotype analysis revealed the following most common haplotypes as: [-116G, 209A, 765G, 1615G, 1914A] with 57,34%, [-116G, 209A, 765G, 1615G, 1914G] with 21,56% and [-116G, 209A, 765G, 1615A, 1914G] with 9,17%. The linkage disequilibrium analyses to make possible to conclude that the disequilibrium found were the same those already described in other studies, except the absence of disequilibrium between 209A>G and A539T mutations, and analyzing the data for 765 and 1615 variant is suggested that the 765C mutation arose in a chromosome with the 1615A variant.

1. INTRODUÇÃO

A butirilcolinesterase (BChE), também chamada de colinesterase do soro, é uma enzima sérica, codificada pelo gene *BCHE*, que está localizado no braço longo do cromossomo 3 (3q26.1-q26.2). É produzida no fígado, sendo encontrada em vários tecidos do organismo (KUTTY, 1980; CHATONNET e LOCKRIDGE, 1989).

Embora se conheça o papel da BChE na hidrólise de diversos ésteres de colina, como a acetilcolina e a butirilcolina, essa enzima tem sido correlacionada com diversas vias de metabolismo e desenvolvimento do organismo porém, sua função fisiológica e seu substrato natural não estão totalmente compreendidos. Além de servir como um marcador de função do fígado e intoxicação por organofosforados, a BChE tem relevância clínica devido às variantes genéticas dessa enzima que reduzem a capacidade de hidrolisar relaxantes musculares tais como a succinilcolina, mivacúrio, além de 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). Mutações no gene da BChE têm sido responsáveis pela maioria dos casos de apneia prolongada provocada pela administração de succinilcolina na fase pré-cirúrgica.

O gene *BCHE* é de caráter polimórfico apresentando, até o momento, setenta variantes descritas, muitas das quais são raras e outras com frequência populacional $\geq 1\%$.

Além das variantes do gene *BCHE*, que são os principais fatores genéticos envolvidos na diminuição da atividade da enzima BChE, há vários fatores ambientais associados com alterações na sua atividade, como por exemplo, estrógenos, hepatite, doenças renais, anemias (WHITTAKER, 1980), bem como alimentos da família solanaceae, que contêm inibidores de colinesterases, como solanina e solanidina (HARRIS e WHITTAKER, 1962), sendo que estes fatores levam à diminuição da atividade da BChE. Dentre os principais fatores que influenciam o aumento da atividade enzimática podemos citar: fenótipo CHE2 C5+, produto da interação dos genes *BCHE*

e *CHE2*, idade, sexo, obesidade, hiperlipoproteinemia, psoríase, hipertensão, alcoolismo e esquizofrenia (WHITTAKER, 1980).

Desde a detecção da primeira mutação no gene da *BCHE* (McGUIRE *et al.*, 1989) com base na análise do DNA, novas ferramentas têm melhorado o diagnóstico de deficiência da BChE. Atualmente, a identificação das variantes é feita através de diferentes métodos como PCR-RFLP (Reação em Cadeia de Polimerase - Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição), PCR-SSCA (PCR seguida de Análise Conformacional de Fita Simples) e sequenciamento de DNA. O sequenciamento do gene *BCHE* (ARPAGAUS *et al.*, 1990) possibilitou a análise do DNA, o que vem permitindo a identificação de muitas outras variantes do gene *BCHE*.

No presente estudo foi analisada a variabilidade de partes do gene *BCHE*, em brasileiros afro-descendentes, uma vez que SOUZA (1998) observou que a mutação no nucleotídeo 1615 (*K*) parece ser menos frequente nesse grupo étnico, além de dados de frequência do NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=16849700) que apontam para a possível origem africana da mutação no nucleotídeo 765 (*E255D*). Além disso, foram também obtidas informações sobre a estrutura dos haplótipos e suas frequências e verificou-se o grau de desequilíbrio de ligação entre as variantes analisadas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 COLINESTERASES

As colinesterases (ChEs) são enzimas que desempenham papel chave na neurotransmissão colinérgica e em outras funções fisiológicas. Existem dois tipos de colinesterases nos vertebrados: acetilcolinesterase (AChE, colinesterase verdadeira ou específica, EC 3.1.1.7) e butirilcolinesterase (BChE, pseudocolinesterase, colinesterase do soro; EC 3.1.1.8). A acetilcolinesterase 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 é produzida no fígado e adipócitos, com ampla distribuição no organismo, sendo um dos componentes do plasma, fígado, coração, pâncreas, endotélio vascular, pele, massa branca do cérebro, músculo liso e adipócitos (KUTTY, 1980; CHATONNET e LOCKDRIDE, 1989; ORESKOVIC e KUNEC-VAJIC, 1992; POPOVIC *et al.*, 1998). A BChE hidrolisa 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).

AChE e BChE são enzimas distintas, codificadas por genes diferentes porém relacionados, sendo que diversas similaridades têm sido observadas entre elas, tais como: mecanismo de ação, formas moleculares, natureza do sítio ativo e organização das subunidades (BASTONE *et al.*, 1987; MASSOULIÉ & BON, 1982). Devido a essa similaridade e a comparação das seqüências codificantes das duas enzimas indicarem que elas encontram-se altamente conservadas em vertebrados, tem sido sugerido que os genes podem ter surgido por duplicação de um gene ancestral comum (CHATONNET e LOCKRIDGE, 1989). Contudo suas seqüências de regulação gênica diferem, resultando em expressões discriminadas durante a diferenciação e desenvolvimento tecidual (GNATT *et al.*, 1991; MASSOULIÉ *et al.*, 1993).

A atividade de ChE de plasma humano é representada principalmente pela atividade da BChE, enquanto que plasma de ratos contém aproximadamente iguais quantidades das duas enzimas, AChE e BChE (TRAINA & SERPIETRI, 1984).

Estudos farmacológicos recentes demonstram que, além da função esterásica das colinesterases, as acetilcolinesterases (AChE) desempenham outras funções como: efeitos inibitórios pré-sinápticos, ação direta sobre receptores colinérgicos, ação direta sobre canais, especialmente o de potássio, e ação sobre outros neurotransmissores (ASHFORD *et al.*, 1989). Já as butirilcolinesterases, produzidas em grandes quantidades no fígado e presentes no plasma, parecem ter função desconhecida (CHUBB, 1984). Porém existem hipóteses que as relacionam à proteção da acetilcolinesterase (WHITTAKER, 1980; WHITTAKER, 1986) e ao metabolismo de lipídeos (KUTTY, 1980).

2.2 ESTRUTURA DA BChE

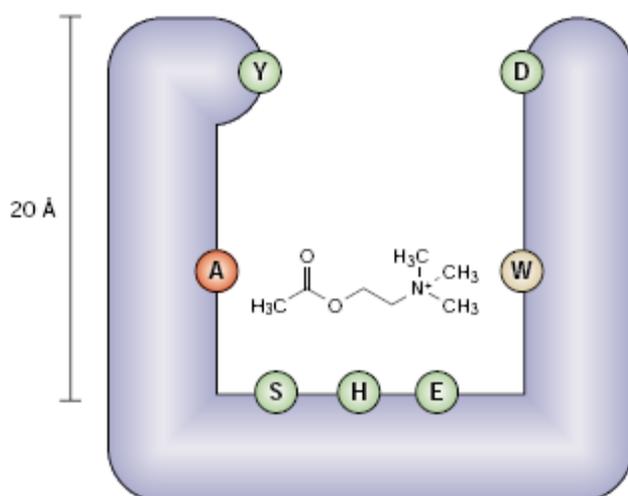
A BChE humana possui 574 aminoácidos e nove cadeias de carboidratos, com peso molecular aproximado de 85 kDa e, além disso, apresenta cinco formas moleculares principais presentes no plasma identificadas através de eletroforese denominadas C₁, C₂, C₃, C₄ (HARRIS *et al.*, 1962) e C₅ (HARRIS *et al.*, 1962; MASSON, 1989). A forma C₁ é um monômero, C₂ é um monômero ligado à albumina sérica, C₃ é um dímero, C₄, que é a forma mais abundante da BChE plasmática, é um tetrâmero e C₅ é um tetrâmero ligado a uma substância ainda não identificada condicionada pelo gene *CHE2*. Cada tetrâmero é formado por um dímero de dímeros, onde cada dímero é constituído por dois monômeros unidos por uma ligação dissulfeto, sendo que os dímeros ligam-se entre si por ligações não covalentes (LOCKRIDGE *et al.*, 1979; 1987; LOCKRIDGE e LA DU, 1982; MASSON, 1989).

SOUZA (1995) descreveu uma nova banda eletroforética com mobilidade igual à da banda C₅, quando o pH do gel de ágar é cerca de 5,3 e com mobilidade igual à da banda C₄, quando o pH é cerca de 6,7. Essa banda foi chamada de banda C_{4/5} e não parece ser determinada por alelo de *CHE2** C₅₊.

A estrutura cristalográfica da BChE foi descrita por NACHON *et al.* (2002). A enzima possui seu sítio ativo em forma de garganta composto por aproximadamente 55 aminoácidos (Figura 1). O sítio aniônico periférico (PAS), localizado na boca da

garganta, é formado pelos aminoácidos D70 (ácido aspártico) e Y332 (tirosina) os quais estão relacionados com a ligação inicial de substratos carregados positivamente. O aminoácido D70 forma uma alça ômega (Ω) 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).

Figura 1 - Estrutura esquemática do sítio ativo do monômero da butirilcolinesterase



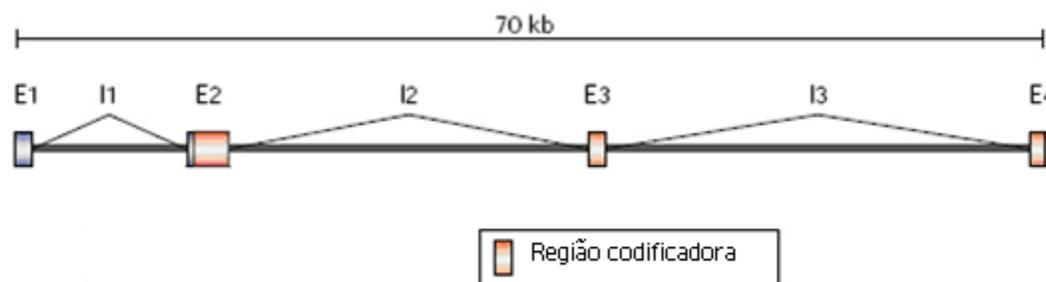
Fonte: Darvesh *et al.*, (2003).

2.3 ESTRUTURA DO GENE *BCHE*

O gene *BCHE* apresenta uma única cópia, sendo constituído por 64.559 pb desde o 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 90% 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 (Arpagaus *et al.*, 1990). O íntron 1 tem 6272 pb, o íntron 2 tem 43205 pb e o íntron 3 tem 12638 pb. A figura 2 mostra um desenho esquemático do gene *BCHE*.

Figura 2 - O gene *BCHE* está localizado no cromossomo 3 (3q26.1-q26.2), tem aproximadamente 65 kb e é composto por 4 exons (E1, E2, E3 e E4) e 3 íntrons (I1, I2 e I3)



Fonte: Darvesh *et al.*, (2003).

2.4 NOMENCLATURA

Recentemente, um sistema de nomenclatura tem sido sugerido para a descrição de alterações nas sequências de DNA e de proteínas (DEN DUNNEN e ANTONARAKIS, 2000).

No presente estudo a nomenclatura segue de acordo com as seguintes recomendações de DEN DUNNEN e ANTONARAKIS (2000):

- É recomendado o uso do código de uma letra do aminoácido;
- As mudanças no aminoácido devem ser descritas no seguinte formato: código do aminoácido alterado; número do aminoácido; código do novo aminoácido. Exemplo: *T24M* denota que o aminoácido 24 (Treonina, T) é substituído por uma metionina (M);
- Códons de término devem ser designados por X.
- As substituições devem ser designadas pelo caracter ">";
- As deleções devem ser designadas por "del" depois do número do aminoácido;

- As inserções devem ser designadas por “ins” depois do número do aminoácido, seguidas pelos aminoácidos inseridos;
- As mudanças na matriz de leitura devem ser designadas por “fs” após o primeiro aminoácido afetado pela mudança.

2.5 VARIABILIDADE DO GENE *BCHE*

A BChE é uma enzima polimórfica codificada pelo gene *BCHE* que apresenta até o momento 70 variantes descritas (Tabela 1). Sua variabilidade genética começou a ser revelada na década de 50, quando se verificou que os indivíduos diferiam na sua capacidade de hidrolisar a succinilcolina, relaxante muscular hidrolisável pela BChE. A primeira variante descrita (atípica, *D70G*) foi descoberta por não ser capaz de hidrolisar esse relaxante, em doses farmacológicas, causando apneia respiratória e paralisia muscular prolongadas nos pacientes.

Pacientes que apresentam variantes do gene *BCHE*, caracterizados pela redução ou deficiência na atividade enzimática, bem como por menor afinidade a substratos positivamente carregados, apresentam sérias dificuldades em hidrolisar o relaxante muscular succinilcolina, desencadeando quadro clínico de apneia prolongada, que pode ser fatal, se não forem tomados os devidos cuidados (LEJUS *et al.*, 1998).

Tabela 1. Variantes do gene *BCHE*

| Nível de DNA ^a | Nome ^b | Referência |
|---------------------------|--------------------|--|
| Exon 1 | | |
| -116; TGC>TAC | | Bartels <i>et al.</i> (1990) |
| Exon 2 | | |
| 9 a 11; CATCAT>CAT | <i>I4del</i> | Maekawa <i>et al.</i> (1997) |
| 16; ATT>TT | <i>I6fs</i> | Bartels <i>et al.</i> (1992b) Primo-Parmo <i>et al.</i> (1996) |
| 35; AAA>AGA | <i>K12R</i> | Mikami <i>et al.</i> (2008) |
| 45; GGG>GGC | <i>G15G</i> | Mikami <i>et al.</i> (2008) |
| 71; ACG>ATG | <i>T24M</i> | Maekawa <i>et al.</i> (1997) |
| 82; TTT>ATT | <i>F28I</i> | Yen <i>et al.</i> (2003) |
| 98; TAT>TGT | <i>Y33C</i> | Primo-Parmo <i>et al.</i> (1996). |
| 109; CCT>TCT | <i>P37S</i> | Primo-Parmo <i>et al.</i> (1996) |
| 208; GAT>CAT | <i>D70H</i> | Boeck <i>et al.</i> (2002) |
| 209; GAT>GGT | <i>D70G (A)</i> | McGuire <i>et al.</i> (1989) |
| 223; GGC>CGC | <i>G75R</i> | Souza <i>et al.</i> (2005) |
| 270; GAA>GAC | <i>E90D</i> | Souza <i>et al.</i> (2005) |
| 286; AAT>TAT | <i>N96Y</i> | Yen <i>et al.</i> (2003) |
| 297; ATT>ATG | <i>I99M</i> | Souza <i>et al.</i> (2005) |
| 298; CCA>TCA | <i>P100S</i> | Maekawa <i>et al.</i> (1997), Takagi <i>et al.</i> (1997), Lu <i>et al.</i> (1997) |
| 318; AAT>AAAT | <i>N106fs</i> | Yen <i>et al.</i> (2003) |
| 344; GGT>GAT | <i>G115D</i> | Primo-Parmo <i>et al.</i> (1997) |
| 351; GGT>GGAG | <i>G117fs</i> | Nogueira <i>et al.</i> (1990) |
| 355; CAA>TAA | <i>Q119X</i> | Sudo <i>et al.</i> (1996) |
| 375; TTA>TTT | <i>L125F</i> | Primo-Parmo <i>et al.</i> (1996) |
| 383; TAT>TGT | <i>Y128C</i> | Hidaka <i>et al.</i> (1997a) |
| 395; GCT>GCTA | <i>A134fs</i> | On-Kei Chan <i>et al.</i> (2005) |
| 424; GTG>ATG | <i>V142M (H)</i> | Jensen <i>et al.</i> (1992) |
| 486; GCT>GCC | <i>A162A</i> | Souza <i>et al.</i> (2005) |
| 510; GAT>GAG | <i>D170E</i> | Primo-Parmo <i>et al.</i> (1996) |
| 514; CAG>TAG | <i>Q172X</i> | Gätke <i>et al.</i> (2001) |
| 551; GCC>GTC | <i>A184V (SC)</i> | Greenberg <i>et al.</i> (1995) |
| 592; AGT>GGT | <i>S198G</i> | Primo-Parmo <i>et al.</i> (1996) |
| 596; GCA>GTA | <i>A199V</i> | Sakamoto <i>et al.</i> (1998) |
| 601; GCA>ACA | <i>A201T</i> | Primo-Parmo <i>et al.</i> (1996) |
| 607; TCA>CCA | <i>S203P</i> | Hidaka <i>et al.</i> (2001) |
| 728; ACG>ATG | <i>T243M (F-1)</i> | Nogueira <i>et al.</i> (1992) |
| 748; ACT>CCT | <i>T250P</i> | Maekawa <i>et al.</i> (1995) |
| 765; GAG>GAC | <i>E255D</i> | Primo-Parmo <i>et al.</i> (1996) |
| 800; AAA>AGA | <i>K267R</i> | Maekawa <i>et al.</i> (1997) |
| 811; GAA>TAA | <i>E271X</i> | Primo-Parmo <i>et al.</i> (1996) |
| 880; GTG >ATG | <i>V294M</i> | Mikami <i>et al.</i> (2008) |
| 920; CTT>CCT | <i>L307P</i> | Manoharan <i>et al.</i> (2006) |

Tabela 1. Variantes do gene *BCHE* (continuação)

| | | |
|---------------------|--------------------|---|
| 943; ACC>AACC | <i>T315fs</i> | Hidaka <i>et al.</i> (1992) |
| 943; ACC>TCC | <i>T315S</i> | Liu <i>et al.</i> (2002) |
| 988; TTA>ATA | <i>L330I</i> | Sudo <i>et al.</i> (1997) |
| 997; GGT>TGT | <i>G333C</i> | Mikami <i>et al.</i> (2008) |
| 1020_1021; GAT>GATA | <i>D340insA</i> | ver Hidaka 1992 |
| 1062_1076; | <i>K355insALU</i> | Muratani <i>et al.</i> (1991) |
| 1093; GGA>CGA | <i>G365R</i> | Hada <i>et al.</i> [1992], Hidaka <i>et al.</i> (1992) |
| 1169; GGT>GTT | <i>G390V (F-2)</i> | Nogueira <i>et al.</i> (1992) |
| 1200; TGC>TGA | <i>C400X</i> | Hidaka <i>et al.</i> (1997b) |
| 1240; CGT>TGT | <i>R386C</i> | Yen <i>et al.</i> (2003) |
| 1253; TTC>TCC | <i>F418S</i> | Maekawa <i>et al.</i> (1995) |
| 1270; CGA>TGA | <i>R424X</i> | Yen <i>et al.</i> (2003) |
| 1273; TCC>CCC | <i>S425P</i> | Gnatt <i>et al.</i> (1990) |
| 1294; GAA>TAA | <i>E432X</i> | Levano <i>et al.</i> (2005) |
| 1303; GGA>AGA | <i>G435R</i> | Dey <i>et al.</i> (1997) |
| 1336; TTT>GTT | <i>F446V</i> | Dey <i>et al.</i> (1998) |
| 1351; GAA>TAA | <i>E451X</i> | Dey <i>et al.</i> (1998) |
| 1378; GAG>AAG | <i>E460K</i> | Yen <i>et al.</i> (2003) |
| 1393; AGA>TGA | <i>R465X</i> | Maekawa <i>et al.</i> (1995) |
| 1408; CGG>TGG | <i>R470W</i> | Mikami <i>et al.</i> (2008) |
| 1411; TGG>CGG | <i>W471R</i> | Primo-Parmo <i>et al.</i> (1996) |
| Intron 2 | | |
| IVS2-8T>G | | Primo-Parmo <i>et al.</i> (1996) |
| Exon 3 | | |
| 1490; GAA>GTA | <i>E497V (J)</i> | Bartels <i>et al.</i> (1992a) |
| 1500; TAT >TAA | <i>Y500X</i> | Bartels <i>et al.</i> (1992b), Primo-Parmo <i>et al.</i> (1996) |
| 1504; TTT>CTT | <i>F474L</i> | On-Kei Chan <i>et al.</i> (2005) |
| 1543; CGT>TGT | <i>R515C</i> | Maekawa <i>et al.</i> (1995) |
| 1553; CAA>CTA | <i>Q518L</i> | Primo-Parmo <i>et al.</i> (1996) |
| Intron 3 | | |
| IVS3-14T>C | | Parmo-Folloni <i>et al.</i> (2008) |
| Exon 4 | | |
| 1615; GCA>ACA | <i>A539T (K)</i> | Bartels <i>et al.</i> (1992b) |
| 1719_1720delT | <i>L574fsX576</i> | Parmo-Folloni <i>et al.</i> (2008) |
| 1914; A>G | | Bartels <i>et al.</i> (1990) |

^a nome comum entre parênteses ^b Glu 1 é o aminoácido N-terminal da BChE madura e o nt 1 corresponde ao primeiro nucleotídeo no códon para Glu 1

2.5.1 Variantes não usuais mais frequentes do gene *BCHE*

2.5.1.1 Variante *-116G>A* (rs1126680)

Esta mutação ocorre no exon 1 na posição -116 , região transcrita mas não traduzida do gene. Esse sítio -116 está localizado na região 5' UTR e, portanto, pode estar associado à regulação da tradução do RNAm da BChE, ou ainda, como supôs NUNES (2007), uma variação nesse sítio poderia interferir na ligação dos fatores de transcrição na molécula de DNA.

A frequência populacional da variante $-116G>A$ descrita por BARTELS *et al.* (1990) é de 8% em norte americanos. Em caucasóides de Curitiba a frequência alélica para $-116G>A$ é de 8,8% (FURTADO-ALLE *et al.*, 2006). Essa variante também se encontra em desequilíbrio de ligação com $1615G>A$.

2.5.1.2 Variante *D70G* (rs1799807)

A forma atípica (*A*; *D70G*), também chamada de resistente à dibucaína, foi a primeira variante genética a ser identificada (KALOW e GENEST, 1957). Foi inicialmente detectada em pacientes submetidos a doses fisiológicas de succinilcolina, utilizada como relaxante muscular pré-operatório. A enzima atípica tem afinidade reduzida por ésteres de colina que normalmente se ligam ao sítio aniônico da enzima. McGUIRE *et al.* (1989) mostraram que o alelo atípico *D70G* resulta de uma mutação de ponto no nucleotídeo 209 (exon2), levando à substituição do ácido aspártico 70 (GAT) por glicina (GGT).

LOCKRIDGE e LA DU (1978) verificaram que a variante *D70G* apresenta afinidade reduzida frente a inibidores e substratos carregados positivamente, enquanto não mostra alteração de afinidade por substratos neutros. Segundo MASSON *et al.* (2001) o resíduo Asp70 é um local de ligação de substrato no sítio aniônico periférico da BchE. Assim, a substituição de um aminoácido de caráter ácido por um aminoácido neutro (Asp→Gly) levaria à diminuição de afinidade por ésteres de colina. Em vista disso, a BChE atípica apresenta redução de 30% na sua atividade, quando comparada

com a enzima usual. Homozigotos para essa mutação apresentam quadro de apneia prolongada após administração de succinilcolina, além de também apresentar efeitos colaterais significantes como depressão, insônia e perda de peso após a ingestão do inibidor de colinesterase piridostigmina (Darvesh, 2003). De acordo com LOEWENSTEIN-LICHTENSTEIN *et al.* (1995) esses efeitos indicam uma relação da mutação com o sistema nervoso central e periférico.

Existem diversas estimativas da frequência populacional da variante atípica da BChE. MCGUIRE *et al.* (1989) estimaram a frequência do alelo *D70G* em população caucasóide em cerca de 2%. MIKAMI (2005) estimou essa frequência em 1,8% em doadores de sangue euro-brasileiros da população de Curitiba.

2.5.1.3 Variante *E255D* (rs16849700)

Caracterizada por uma mutação de ponto no exon 2, nucleotídeo 765 (PRIMO-PARMO *et al.*, 1996), alterando o ácido glutâmico (GAUGU) para ácido aspártico (GAUCU). MIKAMI (2005) encontrou indivíduos com a mutação *765G>C* nos grupos classificados como de atividade alta, média e baixa, sugerindo que essa mutação não altera a atividade da BChE. Esses autores estimaram a frequência dessa variante em doadores de sangue de Curitiba em 0,98%. A mutação *765G>C* também se encontra em desequilíbrio de ligação com *1615G>A*, visto que D' é igual a 65,6% (MIKAMI, 2005).

2.5.1.4 Variante *A539T* (rs1803274)

A variante *A539T*, ou variante K, é caracterizada por uma redução de 33% no número de moléculas circulantes que pode ser devida à diminuição de síntese da enzima ou à sua degradação acelerada (RUBINSTEIN *et al.*, 1978). A variante *A539T* é causada por uma mutação de ponto, no exon 4, que causa a substituição da alanina (GCA) por treonina (ACA) na posição 539 (BARTELS *et al.*, 1992b). BARTELS *et al.*

(1992b) verificaram ainda que a variante *D70G* encontra-se em cis com a variante *A539T* em 89% dos casos da mutação atípica.

Os estudos populacionais, baseados em análise direta de DNA, mostram que o alelo *A539T* é o mais frequente dentre as variantes não-usuais da BChE (SOUZA *et al.*, 1998), nos grupos étnicos europeu, africano e asiático já estudados, variando de cerca de 18% a 20% nessas populações não isoladas.

De forma interessante, essa variante tem sido relacionada ao gene da apolipoproteína E (APOE) na Doença de Alzheimer (AD).

2.5.1.5 Variante 1914A>G (rs3495)

É uma mutação no nucleotídeo 1914, 189 bases após o códon de término no exon 4. A variante não usual *G* apresentou frequência populacional de 26% e encontra-se em desequilíbrio de ligação com *1615G>A* (BARTELS *et al.*, 1990).

2.5.1.6 Variante A184V

Essa variante também chamada de resistente à succinilcolina (SC) apresenta-se como uma mutação de ponto no nucleotídeo 551, no exon 2, o que leva a uma alteração na alanina (GCC) 184 para valina (GTC), condicionando uma enzima com capacidade diminuída em hidrolisar succinilcolina, mas com habilidade normal em hidrolisar outros substratos e resistência normal a inibidores convencionalmente utilizados. Foi primeiramente descrita por GREENBERG *et al.* (1995) em uma paciente norte-americana que possuía significativa redução na capacidade de hidrolisar a succinilcolina e apresentava habilidade normal em hidrolisar outros substratos e resistência normal aos inibidores dibucaína e fluoreto.

2.5.2 Variantes silenciosas

As variantes da BChE que têm atividade inferior a 10% do nível da enzima usual são denominadas de silenciosas (PRIMO-PARMO, 1993) pois não são capazes de catalisar ésteres de colina. Atualmente existem pelo menos 12 mutações silenciosas descritas (PRIMO-PARMO *et al.*, 1996; MANOHARAN *et al.*, 2006; GATKE *et al.*, 2007).

2.6 ATUAÇÃO FISIOLÓGICA DA BChE

2.6.1 Atuação nas vias colinérgicas

MESULAM *et al.* (2002) observaram que em ratos nulizigotos onde o gene da AChE foi desativado (*knockout*), a BChE substituiu a AChE nas junções neuromusculares, passando a modular a transmissão colinérgica e hidrolisando a acetilcolina. Isso sugere que a BChE não apenas funciona como um recurso de segurança, evitando a morte do animal por hiperativação das vias colinérgicas, mas também substitui a AChE contribuindo para o processo de transmissão das vias colinérgicas.

2.6.2 Metabolismo de lipídeos, peso e IMC

O aumento na atividade da BChE está associado ao metabolismo anormal de lipídeos na hiperliproteinemia que é caracterizada pelo aumento na síntese de triglicerídeos e/ou colesterol e excesso de ácidos graxos derivados do metabolismo de carboidratos, obesidade e diabetes (KUTTY, 1980).

CROOK *et al.* (1994) e LEJUS *et al.* (1998) concluíram que existe uma correlação positiva entre a atividade da BChE e as concentrações de triglicerídeos e apolipoproteína B, a qual está presente nas partículas LDL e VLDL.

Indivíduos de fenótipo CHE2 C5+ (caracterizado pela presença de C₅, tetrâmero da BChE ligado a uma substância ainda não identificada) apresentam média de peso (CHAUTARD-FREIRE-MAIA *et al.*, 1991) e de IMC (ALCÂNTARA, 2000) inferiores em

relação a indivíduos de fenótipo CHE2 C5⁻, que não apresentam C₅, sugerindo que a presença do complexo C₅, que eleva em cerca de 25% a atividade da BChE, poderia levar a uma menor estocagem de gordura.

2.6.3 Ciclo celular - desenvolvimento embrionário e tumorigênese

O papel das colinesterases na regulação dos processos de diferenciação e proliferação celular tem sido evidenciado por muitos autores e essas evidências indicam que essas enzimas possam ter alguma influência no processo de tumorigênese. Tanto a BChE quanto a AChE se expressam durante o desenvolvimento embrionário. 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 como uma acetilcolinesterase embrionária e sugere uma 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 da participação dessa enzima no desenvolvimento do sistema nervoso, seja pela sua atividade enzimática ou pela sua capacidade de regular outras proteínas (DARVESH *et al.*, (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. Os mesmos autores 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 *et al.*, 1992).

As evidências de participação no controle da proliferação e diferenciação celular sugerem a influência dessas enzimas no processo de tumorigênese. De fato, já foi mostrado que os genes das colinesterases estão estruturalmente alterados ou se

expressando de maneira aberrante em uma série de tipos tumorais, tais como gliomas (VIDAL, 2005), carcinomas primários de ovário (ZAKUT *et al.*, 1990), leucemias (LAPIDOT *et al.*, 1989) e câncer de pulmão (BRASS *et al.*, 1997). Há relatos ainda de ampliações da região 3q - na qual se situa o gene *BCHE* - em cânceres de próstata (JUNG *et al.*, 2006) e em cânceres de cabeça e pescoço (HIBI *et al.*, 2000), e deleções da região 7q - onde está situado o gene *ACHE* - em leucemias (STEPHENSON *et al.*, 1996). O gene *BCHE* é um dos poucos exemplos de genes que são ativados durante o processo de imortalização celular. Por análise de DNA e de RNAm, tem-se detectado que vários tipos de tumores apresentam o gene *BCHE* amplificado ou com outro tipo de mutação, podendo se expressar anormalmente ou não.

Bernardi (2008) investigou a possível amplificação ou deleção dos genes *BCHE* e *ACHE* em tumores de mama esporádicos e observou que grande parte das pacientes portadoras dessa neoplasia apresentaram os genes das colinesterases alterados nos tecidos tumorais. Além disso, as ampliações e deleções observadas em ambos os genes estavam correlacionadas entre si.

2.6.4 Doenças neurodegenerativas

Vários autores têm investigado a atuação da variante *K* do gene *BCHE* interagindo com o gene *APOE* no aumento da progressão dos danos cognitivos da Doença de Alzheimer (AD).

Déniz-Naranjo *et al.* (2007) concluíram que o alelo *K* está associado ao início do desenvolvimento da doença, sendo que indivíduos portadores desse alelo tendem a apresentar a forma tardia da doença. Isso se deve ao fato de que nos pacientes com AD, a presença da variante *K* associada a uma redução em 30% da atividade da BChE, diminui assim o metabolismo da acetilcolina e, conseqüentemente, uma função cognitiva normal por um longo período, por haver uma menor hidrólise desse neurotransmissor.

Feldman *et al.* (2008) analisaram o efeito conjunto dos genes *APOE* (alelo $\epsilon 4$) e da variante *K* do gene *BCHE* e concluíram que individualmente, apenas aquele foi associado a uma maior progressão da doença, enquanto esse não demonstrou efeito

independente nessa progressão. Porém, em indivíduos portadores de ambos os alelos *APOE ε4* e *BCHE-K* a progressão da AD foi significativamente maior.

2.7 POPULAÇÃO AFRO-BRASILEIRA

2.7.1 Origem da população brasileira

A população brasileira é geneticamente muito diversa resultante da contribuição de três grandes grupos: caucasóides, africanos e ameríndios. A maioria dos caucasóides veio de Portugal, Espanha, Itália e Alemanha. Os africanos foram introduzidos no começo do século XVI e dentre os grupos trazidos para o Brasil, dois foram predominantes: os bantus, vindos de Angola, e os sudaneses, de várias regiões sendo as principais, Costa da Mina e Golfo de Benin. O grupo indígena se originou predominantemente das tribos Tupi e Tapuia (Jê).

Devido ao grande tamanho territorial do Brasil e a diversidade da sua colonização, diferentes regiões do país apresentam predominância maior ou menor de cada um dos grupos étnicos descritos.

2.7.2 População Paranaense e Curitibana

Os três ciclos econômicos (mineração, tropeirismo e agricultura), que ocorreram no Paraná, foram responsáveis pelo povoamento do estado. Curitiba surgiu, inicialmente, da reunião de portugueses, espanhóis e seus descendentes, que vieram da capitania paulista de São Vicente e da Vila de Paranaguá, no litoral paranaense (CULPI, 1981; *apud* MACIEL, 2007, p. 9). A primeira descrição da população paranaense é de 1780. Em 1853 o Paraná emancipou-se da Província de São Paulo e, nessa época, Curitiba era povoada por europeus, principalmente portugueses e espanhóis, índios Guarani, negros africanos escravizados e descendentes desses três grupos.

A partir de 1831 houve uma aceleração da imigração europeia e a composição dos grupos imigrantes foi bastante heterogênea, compreendendo poloneses, alemães, italianos, franceses, suíços, ingleses e outros. A composição étnica da população

paranaense manteve-se semelhante nos diversos períodos sendo predominantemente europeia seguida de uma pequena proporção afro-descendente, asiática e ameríndia. De acordo com dados do Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social (IPARDES, 2008), o estado do Paraná possui 10.284.503 de habitantes.

A população de Curitiba atual é resultado do longo período de colonização e imigração por parte de grupos europeus e de outros grupos étnicos. Sua composição genética está intimamente relacionada às variantes alélicas presentes nas populações fundadoras, que contribuíram para a formação dos primeiros grupos populacionais que habitaram a cidade (efeito fundador).

2.7.3 Composição alélica dos afro-descendentes brasileiros e paranaenses

A contribuição da população africana para as populações atuais brasileiras é encontrada em vários aspectos como a cultura, a religião e a origem genética das populações atuais. Com relação à origem genética, o componente africano miscigenado a outros componentes como o europeu e o ameríndio, é um dos mais marcantes.

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) a população de Curitiba é classificada como 81,7% caucasóides, 15,7% mulatos, 1,7% negros e 0,9% ameríndios e orientais.

Os diversos marcadores genéticos já estudados para a população paranaense indicam para a amostra de afro-descendentes uma contribuição genética estimada em: 40% de europeus, 39% de africanos 21% de ameríndios (MACIEL, 2007). Analisando os alelos *HLA-I*, BRAUN-PRADO *et al.* (2000) concluíram que a contribuição étnica para a população afro-descendente é de 24,8% caucasóide, 74,0% africana e 1,2% ameríndia. Além disso, a contribuição europeia é maior que a africana não apenas nos caucasóides, mas também nos mulatos e, por esse motivo, a população mulata de Curitiba ocupa, como esperado, uma posição intermediária em relação aos caucasóides e aos africanos.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

1 – Estudar a variabilidade do gene *BCHE*, em uma amostra de afro-descendentes, doadores de sangue de Curitiba.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 – Genotipar as variações presentes nos nucleotídeos -116 (exon 1), 209 e 765 (exon 2), 1615 e 1914 (exon 4);
- 2 – Estimar as frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas dessas variações;
- 3 – Comparar os resultados obtidos com os de outras populações;
- 4 – Tentar estabelecer a origem dessas variações.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

A amostra afro-descendente é constituída por 235 indivíduos saudáveis provenientes do banco de doadores voluntários de medula óssea do LIGH. Destes, apenas 151 indivíduos possuíam informações a respeito de idade e sexo, por serem amostras incorporadas mais recentemente ao banco do laboratório; sendo que 71 são do sexo masculino e 80 do sexo feminino, com idade média de $32,09 \pm 8,4$ anos.

A diferenciação étnica foi feita através de questionário com identificação pelos próprios indivíduos baseado em características fenotípicas como cor de pele, cabelos, cor dos lábios, traços do rosto, além da autodenominação.

4.2 METODOLOGIA

4.2.1 Coleta de Sangue Periférico e Extração do DNA

As amostras de sangue foram coletadas pela equipe do LIGH nas dependências do HEMEPAR, no período de 1995 a 2005 e submetidas à extração do DNA a partir do sangue total pelo método de *salting out* segundo BIGNON e FERNANDEZ-VIÑA (1997), com modificações. As amostras de DNA foram armazenadas como solução estoque em freezer a -80°C . Assim que foram doadas pelo LIGH para esse estudo, a concentração das soluções estoques foi determinada por espectrofotometria e, as amostras foram diluídas para uso a uma concentração de $10\text{ng}/\mu\text{L}$ e armazenadas em freezer a -20°C .

4.2.2 Amplificação por PCR

A PCR é uma técnica que possibilita a síntese enzimática “*in vitro*” de várias cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase.

Esta reação se baseia no pareamento e extensão, por ação enzimática, de um par de oligonucleotídeos (moléculas de DNA fita simples), usados como iniciadores e que delimitam a sequência de DNA de fita dupla, alvo da amplificação. Estes iniciadores são sintetizados artificialmente, de maneira que suas seqüências de nucleotídeos são complementares às seqüências específicas que flanqueiam a região alvo. Um ciclo de PCR envolve três etapas: desnaturação, pareamento e extensão. A desnaturação consiste na separação das fitas duplas de DNA, através de elevação da temperatura para 92° até 95°C. Na etapa de pareamento, a temperatura é rapidamente reduzida para cerca de 55°C, dependendo do tamanho e da seqüência do iniciador utilizado, o que irá permitir a hibridação DNA-DNA de cada iniciador com as seqüências complementares que flanqueiam a região alvo. Em seguida, a temperatura é elevada para 72°C para que a enzima DNA polimerase atue na extensão, adicionando nucleotídeos, utilizando como molde a seqüência-alvo, de maneira que se realize uma cópia dessa seqüência (FERREIRA e GATTAPAGLIA, 1998).

As amplificações foram realizadas com 6µl de volume total de reação, contendo 5µl de PCR supermix (Invitrogen - 22mM Tris-HCl pH 8,4; 55mM KCl; 1,65 mM MgCl₂; 200µM dATP; 200µM dTTP; 200µM dCTP; 200µM dGTP; 22 U/mL de Taq DNA polimerase), 1µl de DNA e 10pmoles de cada iniciador. As PCRs foram realizadas em termociclador MJ Research PTC-100 ou Techgene Ftagene2D e os ciclos de amplificação foram os mesmos para cada par de iniciadores utilizados, programados do seguinte modo:

Para o termociclador MJ Research PTC-100: 1) 80°C por um minuto; 2) 94°C por um minuto; 3) 48°C por um minuto; 4) 72°C por um minuto; 5) repetir por 35 ciclos do passo 2 ao 4; 6) 72°C por 10 minutos. Para o termociclador Techgene Ftagene2D: 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.

Os pares de iniciadores utilizados nas amplificações podem ser visualizados na tabela 2, com exceção dos iniciadores referentes aos SNPs de interesse neste estudo.

Tabela 2 - Sequências dos iniciadores utilizados para amplificar os fragmentos de DNA na técnica de SSCA (análise conformacional de fita simples)

| Nome e localização | Sequência do iniciador | Tamanho do fragmento (pb) | Referência |
|---|-----------------------------|---------------------------|------------|
| Exon 1 | | | |
| E1F nt -27 a -8 a montante do exon 1 | CTGCTGCCAACTCTCGCGAG | 203 | 3 |
| E1R nt 8 a 27 a jusante da junção exon1/íntron1 | CGAAGGTGTAAATTCAGAGC | | |
| Exon 2 | | | |
| N25 – nt 155 a 172 | GG TCT GAT ATT TGG AAT G | 428 | 1 |
| E2N33 – nt 516 a 535 | GAA CCC ACT GAA GAG CCA AC | | 2 |
| E2N45 – nt 481 a 501 | GAG GCT CCA GGG AAC ATG GGT | 396 | 1 |
| N53 – nt 859 a 876 | CGG ACC AAA GTT TAC TGA | | 1 |
| Final do íntron 3 e início do exon 4 | | | |
| N45: nt -100 a -81 a montante da junção íntron3/exon4 | CTG TGT AGT TAG AGA AAA TG | 258 | 4 |
| P43: nt 1738 a nt 1759 | GAA AAT ATG TTC TAT AAA GGG | | |

1- SOUZA (2001); 2- MIKAMI (2005); 3- FURTADO (2005); 4- PARMO-FOLLONI (2005).

4.3 ANÁLISE DO DNA AMPLIFICADO

4.3.1 SSCA (Análise Conformacional de Fita Simples)

A técnica de SSCA (*single strand conformational analysis*) foi originalmente descrita por ORITA *et al.* (1989) e consiste na análise da fita simples do produto amplificado, gerada por desnaturação do DNA. Esta técnica permite a detecção de alterações conformacionais no DNA que podem ser geradas por apenas uma mutação de ponto, podendo ser percebidas pela modificação da mobilidade eletroforética do DNA em fita simples.

Após a amplificação por PCR, 6 μ L de cada amostra foram misturados a 6 μ L de solução tamponante (4,75 mL de formamida, 0,0125 g de xilenocianol, 0,0125 g de azul de bromofenol, 125 μ L de EDTA 0,4 M, 16,7 μ L de NaOH 3 M e 108,3 μ L de água bidestilada) e depois, desnaturados a 94°C por 5 minutos. Em seguida as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida, sendo que a concentração do gel, as condições do preparo e o tempo de corrida variaram para cada fragmento analisado (Tabela 3). O gel, para um volume final de 30 mL, foi preparado a partir de uma solução estoque de poliacrilamida 29:1 (29 g de acrilamida, 1 g de bisacrilamida, 5 mL de glicerol e água bidestilada para um volume final de 100 mL) ou de uma solução estoque de poliacrilamida 49:1 (49 g de acrilamida, 1 g de bisacrilamida, 5 mL de glicerol e água bidestilada para um volume final de 100 mL), acrescida de 250 μ L de persulfato de amônio 10% e 30 μ L de TEMED (N, N, N', N' - tetrametiletilenodiamina). A solução para preparo do gel foi de TBE 1X (Tris borato 89 mM e EDTA 0,01 M, pH 8,0) ou de Tris 33 mM, pH 3,66.

Tabela 3 - Condições das eletroforeses de SSCA para os diferentes fragmentos do gene *bche*

| Fragmento (nt) | % T ⁽¹⁾ | % C ⁽²⁾ | pH ⁽³⁾ | Pré-corrída ⁽⁴⁾ | Tempo de corrida |
|--------------------------------------|--------------------|--------------------|-------------------|----------------------------|--|
| Exon 1 | 10 | 2,0 | 8,20 | sim | 21h ⁽⁶⁾ |
| Exon 2 | | | | | |
| 155 a 347 | 9 | 3,4 | 3,66 | sim | 4h ⁽⁷⁾ |
| 659 a 876 | 8 | 2,0 | 8,20 | sim | 24h ⁽⁵⁾ 1 gel por cuba e 28 h (2 géis por cuba) |
| Final do íntron 3 e início do exon 4 | 10 | 2,0 | 8,20 | sim | 22h ⁽⁶⁾ |

(1) Concentração de acrilamida

(2) Proporção de bisacrilamida em relação ao total de acrilamida.

(3) pH da solução de tampão de preparo do gel.

(4) 30 minutos de corrida eletroforética sem a aplicação das amostras de DNA.

(5) Eletroforeses em 140V e 21mA.

(6) Eletroforeses em 120V e 15mA.

(7) Eletroforeses em 250V e 35mA.

4.3.2 Coloração do gel

Para a revelação dos géis foi utilizado o método convencional de coloração pelo nitrato de prata (BUDOWLE *et al.*, 1991), com modificações.

Após a eletroforese retirou-se o gel das placas cuidadosamente colocando-o em uma cuba de vidro, mantendo-o sob agitação seguindo as etapas abaixo:

- Adicionou-se solução de ácido nítrico (1%) por 3 minutos;
- Lavou-se duas vezes com água destilada;
- Adicionou-se solução de nitrato de prata (0,2%), levando ao micro-ondas por 20 segundos;
- Lavou-se duas vezes com água destilada;
- Adicionaram-se 60 mL de solução reveladora (170 mL de solução aquosa de carbonato de sódio 2,96% e 92 µL de formaldeído), agitando-se até que o líquido escurecesse;
- Acrescentou-se o restante da solução reveladora, levando ao micro-ondas por 20 segundos. O gel foi mantido imerso até o aparecimento das bandas;
- Lavou-se duas vezes com água destilada;
- Adicionou-se solução de ácido acético (10%) por 5 minutos;
- Lavou-se duas vezes com água destilada;
- Adicionou-se solução aquosa de glicerol (5 %), por 10 minutos;
- Imergiu-se o gel em solução de metanol (30%) e glicerol (1%);
- O gel foi colocado sobre papel celofane, previamente embebido na mesma solução;
- Realizou-se a digitalização da imagem do gel que foi arquivada em computador;
- Cobriu-se com uma folha de papel filtro e levou-se para prensar e aguardar a secagem.

4.3.3 Sequenciamento de DNA

Os fragmentos que apresentaram um padrão de migração anormal no SSCA tiveram o DNA sequenciado, utilizando-se os pares de iniciadores da tabela 4.

Tabela 4. Par de iniciadores utilizados nas reações de sequenciamento do fragmento referente ao nucleotídeo -116 com suas respectivas sequências de nucleotídeos.

| Nome e localização | Sequência do iniciador | Tamanho do fragmento (pb) | Referência |
|--|------------------------|---------------------------|------------|
| Exon 1 | | | |
| PROF3 região promotora | AATTGTAAAGCATGAATCCTG | 289 | FURTADO |
| E1R nt 8 a 27 a jusante da junção exon1/ítron1 | CGAAGGTGTAAATTCAGAGC | | (2005) |

4.3.3.1 Purificação do produto de PCR

A purificação permite a remoção de fragmentos de DNA indesejáveis, tais como excesso de iniciadores e fragmentos de DNA que não tenham sido totalmente amplificados, para possibilitar posterior sequenciamento. O método de purificação utilizou Exonuclease I (*Exo I*) para digerir excesso de iniciadores e *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP) (GE Healthcare) para degradar o excesso de nucleotídeos provenientes da PCR, de acordo com o seguinte protocolo: para cada reação de PCR utilizaram-se 10 µL do produto de DNA amplificado, 0,8 µL de Exonuclease I (10 unidades/µL em 20 mM Tris.HCl (pH 7,5), 5 mM 2-mercaptoetanol e 50% glicerol), 2 µL de SAP (1 unidade/µL em 25 mM Tris.HCl (pH 7,6); 1 mM MgCl₂; 0,1 mM ZnCl₂; 50% glicerol com 10X *SAP Dilution Buffer* 200 mM Tris pH 8,0; 100 mM MgCl₂).

4.3.3.2 Reação de sequenciamento

As reações de sequenciamento foram preparadas segundo o protocolo do *kit Big Dye Terminator v 3.1* - Applied Biosystems. A reação com um volume final de 10 µL incluiu 1,8 µL de *Big Dye terminator v 3.1* (que contém MgCl₂; dNTPs; dNTPs

marcados com fluorocromos; *AmpliTaq DNA polimerase*), 1,0 µL de um dos oligonucleotídeos (1pmol/µL), produto de PCR purificado e 1,2 µL de água destilada. As reações foram realizadas em termociclador Techgene Ftgene2D. Após uma desnaturação inicial de 6 min a 94°C as amostras foram submetidas a um programa de 25 ciclos de 10 s a 96°C, 5 s a 50°C, 4 s a 60°C e extensão final de 10 min a 60°C.

4.3.3.3 Purificação do produto de PCR da reação de sequenciamento

A purificação do DNA amplificado visa eliminar resíduos de iniciadores, dNTPs e sais, aumentando a qualidade das sequências produzidas. Ao produto da reação de sequenciamento acrescentara-se 10 µL de água ultra pura, 2 µL de acetato de amônio e 65 µL de etanol absoluto e centrifugou-se a mistura a 14.000 rpm durante 15 minutos. Após a remoção do sobrenadante, ao *pellet* obtido foram adicionados 100 µL de etanol a 70% e novamente centrifugado nas mesmas condições. Secou-se a 94°C em termociclador Techgene Ftgene2D por 15 minutos.

Os fragmentos foram encaminhados ao Departamento de Bioquímica e submetidos à leitura no sequenciador automático ABI 377, e as análises dos eletroferogramas foram feitas com o auxílio computacional do programa BioEdit (HALL, 1999).

4.4 ANÁLISE DO NUCLEOTÍDEO 1914 DO GENE *BCHE*

4.4.1 Genotipagem com Taqman

Para genotipagem do SNP do nucleotídeo 1914 foi utilizado o kit *TaqMan SNP* da Applied Biosystems, o qual consiste de 2 iniciadores não marcados e duas sondas (uma para cada alelo) marcadas com fluorescência: VIC, que emite coloração vermelha, sinalizando o alelo *A* e FAM, que emite coloração verde para o alelo *B* (Figura 3). Há também um terceiro fluoróforo (ROX), usado pelo equipamento como referência passiva de fluorescência.

Esta é uma técnica para a detecção e medida de produtos gerados durante cada ciclo da PCR. A emissão dos compostos fluorescentes gera um sinal que aumentará na proporção direta da quantidade de produto da PCR. Ao final da reação, dependendo do genótipo, teremos uma ou outra fluorescência, no caso dos homozigotos, ou ambas nos heterozigotos.

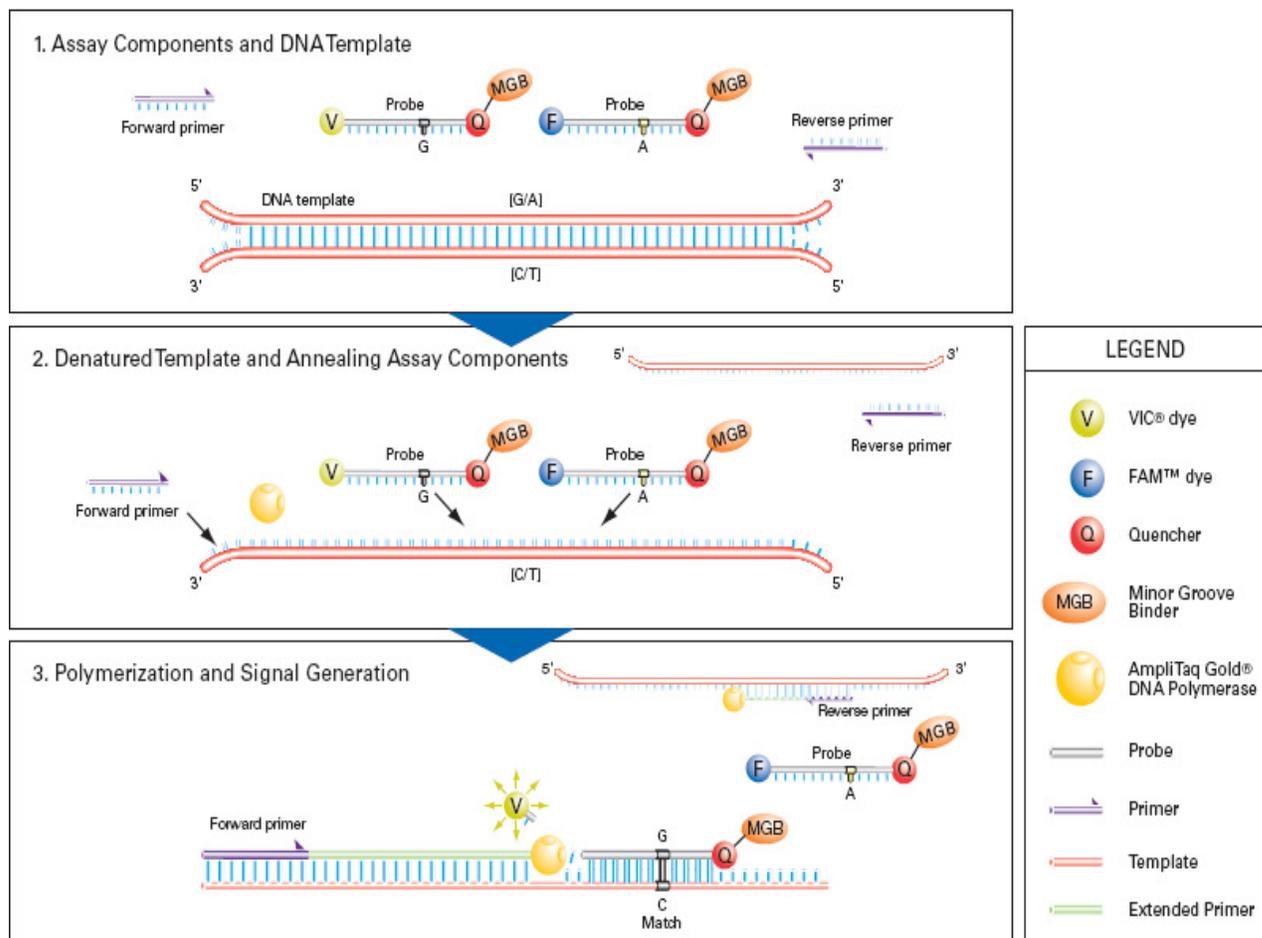


Figura 3. Desenho esquemático da genotipagem com *Taqman*

4.4.2 Amplificação do DNA

Para a realização da PCR foi utilizado o equipamento 7500 *Real-Time PCR System* e placas de PCR de 96 poços (*MicroAmp®Optical 96-WellReaction Plate*), ambos da Applied Biosystems. Para a identificação dos alelos do SNP em questão

foram realizadas reações com um volume final de 10 μL /poço: 5 μL de *Taqman Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems), 1 μL de DNA ($\sim 10\text{ng}$) ou água ultra-pura (nos controles), 0,25 μL de *mix* contendo os dois oligonucleotídeos iniciadores e as sondas, e 3,75 μL de água ultra-pura.

O uso do equipamento 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: 2 minutos a 50°C; 2º: 10 minutos a 95°C; 3º: 15 segundos a 95°C intercalados por 60 segundos a 60°C que foi repetido 45 vezes. 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 seu registro em um gráfico.

4.5 ANÁLISE DOS DADOS

4.5.1 Frequências alélicas e genotípicas

As frequências alélicas e genotípicas foram obtidas através da contagem direta do número de cromossomos e de indivíduos, respectivamente. Para comparar as frequências alélicas e genotípicas desse trabalho com as de outros autores usou-se o software CLUMP (SHAM e CURTIS, 1995) que fornece resultado igual ao do χ^2 , sendo que não há necessidade de utilizar a correção de Yates, quando o esperado é menor que 5.

4.5.2 Montagem dos haplótipos

A escolha dos SNPs tem sua relevância justificada no fato de serem até o momento aqueles mais analisados pelo grupo de pesquisa do nosso laboratório.

Para inferir a respeito da origem das mutações mais frequentes identificadas neste estudo foi também realizada a montagem dos haplótipos de acordo com os alelos observados. Para a construção dos haplótipos, os SNPs foram ordenados de acordo com a ordem em que ocorrem no DNA a partir do telômero. Para a obtenção dos

haplótipos reconstruídos foi utilizado o algoritmo ELB que consta do programa Arlequin versão 3.01 (EXCOFFIER *et al.*, 2005).

4.5.3 Equilíbrio de Hardy-Weinberg, desequilíbrio de ligação e inferência haplotípica

O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi calculado diretamente, a partir dos dados. Os coeficientes de desequilíbrio de ligação absoluto e relativo (D e D') foram estimados pelo programa Arlequin 2005 (EXCOFFIER *et al.*, 2005) através do teste *likelihood ratio* (SLATKIN e EXCOFFIER, 1996).

A inferência da fase haplotípica foi obtida a partir dos dados das frequências genotípicas observadas, baseada no método de máxima verossimilhança do programa Arlequin 2005 (EXCOFFIER, *et al.*, 2005). Quando a frequência haplotípica observada difere da esperada, ou seja, do produto das frequências alélicas individuais, diz-se que os locos estão em desequilíbrio de ligação.

A relevância da análise da estrutura haplotípica se deve ao fato de que, muitas vezes o fenótipo atribuído a uma determinada mutação genética é resultado de uma outra mutação, em desequilíbrio de ligação com a primeira, ou do conjunto das duas. Assim, a parcela genética atribuída aos fenótipos analisados, principalmente em características poligênicas é, em geral, resultado da estrutura haplotípica apresentada pelo indivíduo.

5. RESULTADOS

Foram analisados 5 fragmentos do gene *BCHE*, sendo um referente ao exon 1, dois referentes ao exon 2 e um ao exon 4. As frequências genótípicas e os padrões eletroforéticos estão apresentados nas tabelas e figuras a seguir, respectivamente.

5.1 EXON 1

5.1.1 Nucleotídeo -116

O número total de indivíduos analisados por SSCA para o nucleotídeo -116 do exon 1 foi de 230.

A frequência da variante usual -116G é 96,31% ± 0,88% e de -116A é 3,69% ± 0,88%. A tabela 5 mostra as frequências genótípicas, que estão de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 0,3365$; $p > 0,50$).

Tabela 5. Frequências genótípicas e alélicas referentes ao nucleotídeo -116, em amostras de doadores de sangue de Curitiba de origem étnica afro-descendente.

| Genótipos (%) | | | Alelos (%) | |
|--|--------------------|--------------------|--------------|--------------|
| -116G/-116G | -116G/-116A | -116A/-116A | -116G | -116A |
| 213 (92,61) | 17 (7,39) | 0 (0) | 443 (96,31) | 17 (3,69) |
| Hardy -Weinberg ($\chi^2=0,3365$; $p>0,50$) | | | | |

Os padrões eletroforéticos obtidos são mostrados na figura 4. Foram observados padrões de bandas diferentes aos -116GA e -116GG (Figura 5) em 5 indivíduos e tais amostras (amostras 67, 68, 84, 85 e 86) foram encaminhadas para o sequenciamento, mas o resultado não foi conclusivo e será repetido posteriormente.

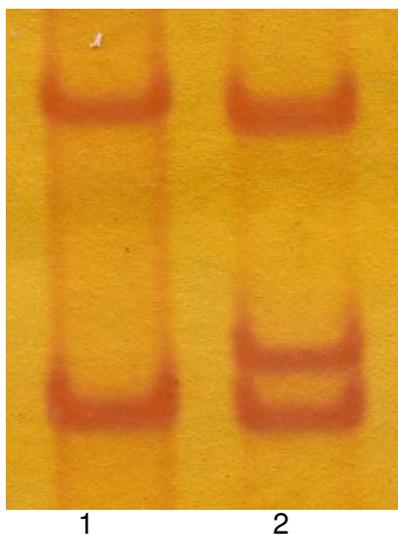


Figura 4. Padrões do exon 1, após eletroforese SSCA em gel de poliacrilamida: 1. -116GG (usual); 2. -116GA.



Figura 5. Padrões do exon 1, após eletroforese SSCA em gel de poliacrilamida: 1. -116GA; 2. -116GG (usual); 3. Padrão diferente aos -116GA e -116GG

5.2 EXON 2

5.2.1 Nucleotídeo 209

A frequência da variante usual *209A* na amostra de 235 indivíduos é de 98,51% \pm 0,56% e da *209G* é 1,49% \pm 0,56%. A distribuição genotípica está de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2=0$; $p>5\%$) conforme mostra a tabela 6.

Exemplo de imagem de gel com os padrões eletroforéticos obtidos são mostrados na figura 6.

Tabela 6. Frequências genotípicas e alélicas, referentes ao nucleotídeo 209, em amostras de doadores de sangue de Curitiba de origem étnica afro-descendente.

| Genótipos (%) | | | n=235 | Alelos(%) | |
|--|------------------|------------------|-------|-------------|-------------|
| <i>209A/209A</i> | <i>209A/209G</i> | <i>209G/209G</i> | | <i>209A</i> | <i>209G</i> |
| 228 (97,02) | 7 (2,98) | 0 (0) | | 463 (98,51) | 7 (1,49) |
| Hardy -Weinberg ($\chi^2=0$; $p>5\%$) | | | | | |

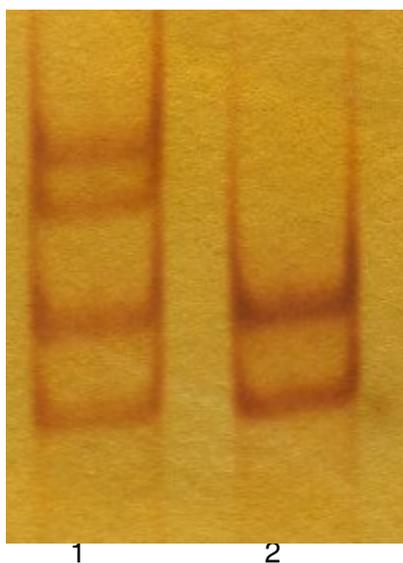


Figura 6. Padrões referentes ao fragmento do nucleotídeo 209, após eletroforese SSCA em gel de poliacrilamida 1. *209AG*; 2. *209AA*.

5.2.2 Nucleotídeo 765

A frequência da variante usual *765G* na amostra de 235 indivíduos é de 96,38% \pm 0,86% e da *765C* é 3,62% \pm 0,86%. A tabela 7 mostra as frequências genotípicas e alélicas, sendo que a distribuição genotípica está de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Exemplo de imagem de gel com os padrões eletroforéticos obtidos referentes à essa análise são mostrados na figura 7.

Tabela 7. Frequências genotípicas e alélicas, referentes ao nucleotídeo 765, em amostras de doadores de sangue de Curitiba de origem étnica afro-descendente.

| Genótipos (%) | | | Alelos (%) | |
|--|------------------|------------------|-------------|-------------|
| 765G/765G | 765G/765C | 765C/765C | 765G | 765C |
| 218 (92,77) | 17 (7,23) | 0 (0) | 453 (96,38) | 17 (3,62) |
| Hardy -Weinberg ($\chi^2=0,0223$; $p>0,80$) | | | n=235 | |

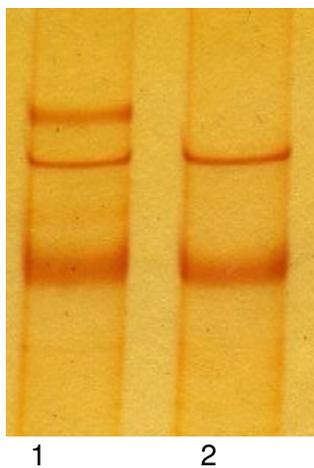


Figura 7. Padrões referentes ao fragmento do nucleotídeo 765, após eletroforese SSCA em gel de poliacrilamida: 1. *765GC*; 2. *765GG* (usual).

5.3 EXON 4

5.3.1 Nucleotídeo 1615

A frequência da variante usual *1615G* na amostra de 235 indivíduos é de 80,86% \pm 1,81%. A frequência de *1615A* é 19,14% \pm 1,81%. A distribuição genotípica está de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 3,2924$; $p > 0,05$). A tabela 8 mostra as frequências genotípicas e alélicas.

Exemplo de imagem de gel com os padrões eletroforéticos obtidos são mostrados na figura 8.

Tabela 8. Frequências genotípicas e alélicas, referentes ao nucleotídeo 1615, em amostras de doadores de sangue de Curitiba de origem étnica afro-descendente.

| Genótipos (%) | | | | Alelos (%) | |
|--|--------------------|--------------------|--------|--------------|--------------|
| 1615G/1615G | 1615G/1615A | 1615A/1615A | | 1615G | 1615A |
| 158 (67,23) | 64 (27,23) | 13 (5,54) | n= 235 | 380 (80,86) | 90 (19,14) |
| Hardy -Weinberg ($\chi^2 = 3,2924$; $p > 0,05$) | | | | | |

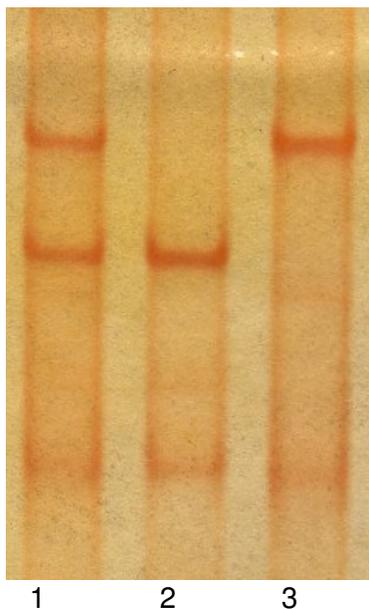


Figura 8. Padrões referentes ao fragmento do nucleotídeo 1615, após eletroforese SSCA em gel de poli-acrilamida 1. *1615GA*; 2. *1615AA*; 3. *1615GG* (usual).

5.3.2 Nucleotídeo 1914

A frequência da variante usual *1914A* na amostra de 218 indivíduos é de 61,69% \pm 2,33% e a frequência de *1914G* é 38,31% \pm 2,33%, conforme mostra a tabela 9 estando a distribuição genotípica de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2=2,068$; $p>0,10$).

Tabela 9. Frequências genotípicas e alélicas, referentes ao nucleotídeo 1914, em amostras de doadores de sangue de Curitiba de origem étnica afro-descendente.

| Genótipos (%) | | | Alelos (%) | |
|--|--------------------|--------------------|--------------|--------------|
| 1914A/1914A | 1914A/1914G | 1914G/1914G | 1914A | 1914G |
| 88 (40,37) | 93 (42,66) | 37 (16,97) | 269 (61,69) | 167 (38,31) |
| Hardy-Weinberg ($\chi^2=2,068$; $p>0,10$) | | | | |

5.4 ESTRUTURA HAPLOTÍPICA

5.4.1 Haplótipos e desequilíbrio de ligação para as variantes *-116G>A*, *D70G*, *E255D*, *A539T* e *1914A>G*

A análise do desequilíbrio de ligação foi feita através do programa Arlequin. Os resultados são mostrados na tabela 10 e as frequências haplotípicas são mostradas na tabela 11.

Para as variantes *-116G>A* e *A539T* o valor de D' foi de 95,72%. As variantes *-116G>A* e *1914A>G* revelaram desequilíbrio absoluto. Já entre as variantes *E255D* e *A539T* o valor foi de 85,99% e, entre as variantes *E255D* e *1914A>G* foi de 91,94%.

Tabela 10. Valores referentes ao desequilíbrio de ligação entre os 6 SNPs analisados

| | SNPs | | | | |
|------------|------------------------|---------------------|-----------------------|----------------------|---------------------|
| | rs1126680 (-116G>A) | rs1799807 (D70G) | rs16849700 (E255D) | rs1803274 (A539T) | rs3495 (1914A>G) |
| rs1126680 | * | | | 0,9572 | 1,000 |
| rs1799807 | | * | | | |
| rs16849700 | | | * | 0,8599 | 0,9194 |
| rs1803274 | p=0,229 | | <0,0001 | * | |
| rs3495 | p=0,158 | | <0,0001 | | * |

Valores de D' em verde e nos casos de valores significativos, p em azul.

Para os cálculos de desequilíbrio de ligação, foram utilizados os valores de D' fornecidos pelo programa Arlequin (EXCOFFIER e cols., 2005). Em caso de valores significativos para o desequilíbrio, estão sendo mostrados os valores de p.

Tabela 11. Estimativas das frequências haplotípicas e do número absoluto dos haplótipos inferidos para as variantes -116G>A, D70G, E255D, A539T e 1914A>G

| | -116 (exon 1) | 209 (exon 2) | 765 (exon 2) | 1615 (exon 4) | 1914 (exon 4) | Frequência haplotípica (%) | Número absoluto do haplótipo |
|----|------------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| 1 | G | A | G | G | G | 21,56 | 94 |
| 2 | G | A | G | G | A | 57,34 | 250 |
| 3 | G | G | G | G | A | 1,15 | 5 |
| 4 | G | A | G | A | G | 9,17 | 40 |
| 5 | G | A | C | G | G | 0,46 | 2 |
| 6 | A | A | G | G | G | 0,46 | 2 |
| 7 | G | A | G | A | A | 2,75 | 12 |
| 8 | G | A | C | A | G | 2,75 | 12 |
| 9 | A | A | G | A | G | 3,67 | 16 |
| 10 | G | A | C | A | A | 0,23 | 1 |
| 11 | G | A | C | G | A | 0,23 | 1 |
| 12 | A | A | C | A | G | 0,23 | 1 |
| | TOTAL | | | | | 100 | 436 |

6. DISCUSSÃO

6.1 VARIABILIDADE DO GENE *BCHE*

6.1.1 Exon 1

6.1.1.1 Variante *-116G>A*

A frequência da variante não usual *-116A*, nos 230 indivíduos do presente estudo (*-116GG* = 213, *-116GA* = 17, *-116AA* = 0) foi $3,69\% \pm 0,88\%$. As frequências alélicas e genotípicas foram contrastadas com os dados da amostra de FURTADO (2005) que estudou uma amostra de doadores de sangue de origem caucasóide de Curitiba e encontrou 65 *-116GG*, 13 *-116GA*, 0 *-116AA*, sendo a frequência do alelo *-116A* de $8,33\% \pm 2,21\%$. As frequências observadas nestes dois estudos diferem entre si ($\chi^2=4,44$; $p<0,05$ para frequência alélica e $\chi^2=5,69$; $p<0,02$ para frequência genotípica).

BARTELS *et al* (1990) estimaram a frequência da variante *-116A* em 8%. Apesar de esses autores não citarem a população da qual esses dados foram obtidos, supomos que esses indivíduos pertençam à população dos Estados Unidos da América. E, comparando tais resultados com o estudo em questão observa-se que as frequências alélicas não diferem entre si ($\chi^2=1,688$; $p>0,20$).

ALVES (2009) propôs, com base nos seus dados de Ameríndios e nos dados do HapMap, que o alelo *-116A* teve sua origem na Europa, uma vez que não aparece em populações africanas, asiáticas e ameríndias. Nossos dados corroboram essa hipótese, uma vez que a frequência nos afro-brasileiros é cerca da metade da frequência da população euro-brasileira e a amostra de afro-brasileiros, utilizada neste estudo, é miscigenada. Como a contribuição europeia é maior que a africana na população mulata de Curitiba, por esse motivo, ela ocupa, como esperado, uma posição intermediária em relação aos caucasóides e aos africanos (BRAUN-PRADO, 2000).

6.1.2 Exon 2

6.1.2.1 Variante *D70G*

A frequência obtida nesse estudo para a variante *209G* (*209A>G*) é $1,49\% \pm 0,56\%$. Comparando com os dados de MIKAMI (2005) que obteve uma frequência de $1,80\% \pm 0,49\%$ para a variante *209G* na população caucasóide de Curitiba, observa-se que as frequências não diferem entre si ($\chi^2 = 0,029$; $p > 0,80$). As frequências genótípicas comparadas também não apresentam diferença significativa ($\chi^2 = 0,170$; $p > 0,90$).

Os dados de frequência apresentados na tabela 12 obtidos no NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=1799807) mostram que essa mutação não está presente em chineses, japoneses e nos Yoruba, da África. Em afro-americanos sua frequência de 2,2%, não difere da estimada no presente estudo ($\chi^2 = 0,139$; $p > 0,70$).

Sabendo-se que a maioria dos ameríndios do Novo Mundo não apresenta a variante *209G*, e que seus raros portadores são resultantes de miscigenação com europeus, os dados desse estudo apontam para uma origem europeia dessa variante.

WHITTAKER (1986) constatou que a variante *209G* ocorre principalmente em populações de origem caucasóide, sendo extremamente rara em asiáticos e africanos. Sabendo-se que a ocorrência dessa variante no continente africano é observada apenas em países do norte da África (Egito, Etiópia, Argélia), onde ocorre miscigenação, principalmente com caucasóides europeus, CHAUTARD-FREIRE-MAIA *et al.*, (1984) inferiu que a mutação *D70G* esteja presente em africanos como consequência de fluxo gênico. Outros dados apontam para essa concordância, já que de acordo com a tabela 12, essa mutação não estaria presente na população africana.

Tabela 12. Frequências alélicas e genóticas referentes ao nucleotídeo 209 em diferentes populações

| População | Grupo étnico | N | Genótipos | | Alelos | |
|---------------|------------------------|----|-----------|-------|--------|-------|
| | | | A/A | A/G | A | G |
| AFD_EUR_PANEL | Europeu | 24 | 0,958 | 0,042 | 0,979 | 0,021 |
| AFD_AFR_PANEL | Afro Americano | 23 | 0,957 | 0,043 | 0,978 | 0,022 |
| AFD_CHN_PANEL | Asiático | 24 | 1,000 | | 1,000 | |
| HapMap-CEU | Europeu | 60 | 0,983 | 0,017 | 0,992 | 0,008 |
| HapMap-HCB | Asiático | 45 | 1,000 | | 1,000 | |
| HapMap-JPT | Asiático | 44 | 1,000 | | 1,000 | |
| HapMap-YRI | Africano Sub-Sahariano | 59 | 1,000 | | 1,000 | |

Nota: CEU – residentes em Utah com ancestralidade do Nordeste e Noroeste europeus.

HCB – população de Beijing, China.

JPT – população de Tóquio, Japão.

YRI – população de Yoruba, Nigéria.

Fonte: NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=1799807)

6.1.2.2 Variante *E255D*

A variante não usual *765C* foi descrita por PRIMO-PARMO *et al.* (1996) em um único indivíduo de uma amostra de 17 indivíduos e foi inferido que se tratava de variação rara. No presente estudo sua frequência é de 3,62% \pm 0,86%. Os resultados de MIKAMI (2005) revelaram uma frequência alélica da variante usual *765G* de 99,02% \pm 0,37% e da variante não usual *765C* de 0,98% \pm 0,37% (Tabelas 13 e 14). Contrastando as frequências obtidas nos dois estudos observa-se que as frequências alélicas e genóticas diferem entre si ($\chi^2=9,97$; $p<0,01$ para frequências alélicas e $\chi^2=10,18$; $p<0,01$ para as frequências genóticas).

Tabela 13: Dados comparativos de frequências alélicas para a variante *E255D* (%)

| | Presente estudo | MIKAMI (2005) |
|-------------|-----------------|---------------|
| 765G | 96,38 | 99,02 |
| 765C | 3,62 | 0,98 |

$\chi^2=9,97$; $p<0,01$, G.L.=1

Tabela 14: Dados comparativos das frequências genóticas da variante *E255D*.

| | Presente estudo | MIKAMI (2005) |
|--------------|-----------------|---------------|
| 765GG | 218 | 351 |
| 765GC | 17 | 7 |
| 765CC | 0 | 0 |

$$\chi^2=10,18; p<0,01, G.L.=2$$

Os dados de frequência apresentados no NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=16849700) (Tabela 15) mostram que a variante não usual está presente apenas em populações africanas ou de ancestralidade africana, sendo a frequência da variante nos nossos dados cerca de metade da frequência encontrada na África.

Tabela 15. Frequências alélicas e genóticas referentes ao nucleotídeo 765 em diferentes populações

| População | Grupo étnico | N | Genótipos | | | Alelos | |
|-------------------------------|------------------------|----|-----------|-------|-----|--------|-------|
| | | | C/C | C/G | G/G | C | G |
| AFD_EUR_PANEL | Europeu | 24 | 1,000 | | | 1,000 | |
| AFD_AFR_PANEL | Afro Americano | 23 | 0,870 | 0,130 | | 0,935 | 0,065 |
| AFD_CHN_PANEL | Asiático | 24 | 1,000 | | | 1,000 | |
| HapMap-CEU | Europeu | 59 | 1,000 | | | 1,000 | |
| HapMap-HCB | Asiático | 44 | 1,000 | | | 1,000 | |
| HapMap-JPT | Asiático | 45 | 1,000 | | | 1,000 | |
| HapMap-YRI | Sub-Sahariano Africano | 60 | 0,850 | 0,150 | | 0,925 | 0,075 |

Nota: CEU – residentes em Utah com ancestralidade Nordeste e Noroeste europeus.

HCB – população de Beijing, China.

JPT – população de Tóquio, Japão.

YRI – população de Yoruba, Nigéria.

Fonte: NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=16849700)

6.1.3 Exon 4

6.1.3.1 Variante A539T

A frequência obtida no presente estudo para a variante usual 1615G é de 80,86% \pm 1,81% e a frequência de 1615A é 19,14% \pm 1,81%. A tabela 16 apresenta dados de frequências alélicas e genotípicas de diferentes populações. Comparando os resultados desse estudo com as amostras africana sub-sahariana e afro americana, constata-se que as frequências alélicas não diferem entre si ($\chi^2=0,202$; $p>0,50$ e $\chi^2=0,546$; $p>0,30$, respectivamente). As frequências genotípicas comparadas também não apresentam diferença significativa ($\chi^2=0,061$; $p>0,95$ e $\chi^2=5,755$; $p>0,05$, respectivamente).

SOUZA (1998) analisou uma amostra de 177 indivíduos da população brasileira, composta por 95 indivíduos caucasóides e 82 indivíduos miscigenados, classificados em mulatos médios, mulatos escuros e negros, de origem caucasóide e africana. Após verificar as respectivas frequências do alelo 1615A de 18,4% \pm 2,8%, 25,0% \pm 6,6%, 14,8% \pm 4,8% e 13,6% \pm 4,2% para caucasóides, mulatos médios, mulatos escuros e negros, respectivamente, sugeriu, de acordo com seus dados, que haveria uma tendência de a mutação no nucleotídeo 1615 (K) ser menos frequente em indivíduos de origem africana.

Com a frequência do alelo 1615A de 19,14% \pm 1,81% obtida nesse estudo, considerando-se que se trata de uma amostra da população brasileira de origem afro-descendente observa-se que a frequência não difere daquela obtida por SOUZA para o conjunto de miscigenados ($\chi^2=0,140$; $p>0,50$) contrariando as expectativas iniciais.

Tabela 16. Frequências alélicas e genótípicas referentes ao nucleotídeo 1615 em diferentes populações

| População | Grupo étnico | N | Genótipos | | | Alelos | |
|---------------|------------------------|-----|-----------|-------|-------|--------|-------|
| | | | A/A | A/G | G/G | A | G |
| HapMap-CEU | Europeu | 120 | 0,017 | 0,317 | 0,667 | 0,175 | 0,825 |
| HapMap-HCB | Asiático | 90 | 0,022 | 0,356 | 0,622 | 0,200 | 0,800 |
| HapMap-JPT | Asiático | 88 | 0,068 | 0,273 | 0,659 | 0,205 | 0,795 |
| HapMap-YRI | Africano Sub-Sahariano | 120 | | 0,333 | 0,667 | 0,167 | 0,833 |
| CHMJ | Asiático | 74 | | | | 0,176 | 0,824 |
| AFD_EUR_PANEL | Europeu | 48 | 0,042 | 0,250 | 0,708 | 0,167 | 0,833 |
| AFD_AFR_PANEL | Afro Americano* | 46 | | 0,304 | 0,696 | 0,152 | 0,848 |
| AFD_CHN_PANEL | Asiático | 48 | | 0,167 | 0,833 | 0,083 | 0,917 |

Nota: CEU – residentes em Utah com ancestralidade do Nordeste e Noroeste europeus.

HCB – população de Beijing, China.

JPT – população de Tóquio, Japão.

YRI – população de Yoruba, Nigéria.

Fonte: NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=1803274)

6.1.3.2 Variante 1914A>G

No presente estudo a frequência da variante usual 1914A é de 61,69% ± 2,33% e a frequência de 1914G é 38,31% ± 2,33%.

Comparando nossos dados com os de afro americanos (tabela 17), notamos uma significativa diferença nas frequências alélicas ($\chi^2=15,251$; $p<0,01$) e genótípicas ($\chi^2=12,144$; $p<0,01$). Observa-se que as populações africanas apresentam uma maior frequência do alelo G, sendo este mais frequente do que o alelo usual no grupo afro americano. Além disso, analisando a referida tabela nota-se uma grande variação nas frequências das populações e, isto talvez se deva ao fato de uma pressão de seleção menor já que a variante 1914 está fora da região codificadora.

Tabela 17. Frequências alélicas e genótípicas referentes ao nucleotídeo 1914 em diferentes populações

| População | Grupo étnico | N | Genótipos | | | Alelos | |
|---------------|----------------|----|-----------|-------|-------|--------|-------|
| | | | A/A | A/G | G/G | A | G |
| AFD_EUR_PANEL | Europeu | 24 | 0,583 | 0,375 | 0,042 | 0,771 | 0,229 |
| AFD_AFR_PANEL | Afro Americano | 22 | 0,045 | 0,591 | 0,364 | 0,341 | 0,659 |
| AFD_CHN_PANEL | Asiático | 24 | 0,542 | 0,458 | | 0,771 | 0,229 |
| CEPH | | 92 | | | | 0,680 | 0,320 |
| POOLED_CEPH | | 94 | | | | 0,321 | 0,679 |

Nota: CEPH – amostra de indivíduos de UTAH (93%), França (4%), e Venezuela (3%)

Fonte: NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=3495)

6.2 DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE AS VARIANTES DO GENE *BCHE*

O haplótipo mais frequente, como pode ser visto na tabela 11, é o haplótipo 2, que é formado pelos alelos mais frequentes de cada mutação. O haplótipo 1 é o segundo mais frequente e difere do anterior apenas pela variante *1914G*, que é a mais frequente do gene *BCHE*. A seguir temos o haplótipo 4, que tem os nucleotídeos A e G nas posições 1615 e 1914, respectivamente, o que é compatível com o resultado de desequilíbrio de ligação desses 2 alelos. O próximo haplótipo, em frequência, é o número 9, que tem os alelos menos frequentes das posições -116, 1615 e 1914, também mostrando o desequilíbrio de ligação entre esses alelos. O haplótipo 8 mostra que provavelmente o alelo C da posição 765 surgiu em um indivíduo com o haplótipo 4, como também foi sugerido por NUNES (2007).

BARTELS *et al.* (1990), ao descreverem variação no nucleotídeo -116 verificaram desequilíbrio de ligação com as variações do nucleotídeo 1615, porém os valores de D e de D' não foram determinados. FURTADO (2005) verificou desequilíbrio de ligação entre as duas variantes e o estimou em D' = 91,2%. NUNES (2007) também verificou desequilíbrio de ligação, sendo D' = 91,18%.

MIKAMI (2005) também detectou desequilíbrio de ligação entre as variantes 765 e 1615, obtendo D' igual a 65,58%, observando a ocorrência da mutação *A539T* em 5

dos 7 indivíduos portadores da mutação *E255D*. Os dados obtidos no presente estudo mostram a ocorrência da mutação *A539T* em 14 dos 17 indivíduos portadores da mutação *E255D* com $D' = 85,99\%$, corroborando os dados anteriores, indicando que estas duas mutações estariam em desequilíbrio de ligação.

Os valores de desequilíbrio de ligação são muito informativos já que, quando se comparam dois valores de D' , o maior deles diz respeito a mutação mais recente e, o menor deles indicaria a mutação mais antiga, supondo-se que para o gene *BCHE* a taxa de permuta genética seja constante. Através da análise dos valores de desequilíbrio de ligação, MIKAMI (2005) considerou que a variante *E255D* é mais antiga que a variante *D70G*. Quando também comparamos os valores de desequilíbrio de ligação entre os nucleotídeos -116 e 1615, em relação ao encontrado entre os nucleotídeos 765 e 1615, o menor valor encontrado neste último, pode indicar que a variante *E255D* é também mais antiga que a variante *-116G*.

Os dados obtidos da população de origem afro-descendente desse estudo corroboram com dados anteriores, de que tanto a variante *-116G* como a *D70G* estão presentes em africanos em razão do fluxo gênico e sugerem que a variante *E255D* realmente tenha uma origem africana.

Em relação às variantes dos nucleotídeos 209 e 1615, vários autores já verificaram o desequilíbrio de ligação; entre eles BARTELS *et al.* (1990). Em estudo do Laboratório de Polimorfismos e Ligação, da UFPR, MIKAMI (2005) verificou desequilíbrio de ligação entre esses dois nucleotídeos, com o valor de $D' = 90,76\%$, sendo que dos haplótipos com a variante *D70G*, 91,2% apresentam a variante *A539T*. No presente estudo essas variantes não apresentaram desequilíbrio de ligação.

7. CONCLUSÕES

1. As frequências das variantes *D70G* e *A539T* não diferiram das encontradas na população de Curitiba devido à origem europeia da variante *D70G*, estando presente em africanos apenas como resultado de fluxo gênico.
2. As frequências das variantes *-116G>A* e *E255D* diferiram das encontradas na população de Curitiba.
3. A frequência da variante *1914A>G* diferiu da encontrada na população afro-americana.
4. Os desequilíbrios de ligação encontrados foram semelhantes aos já descritos em outros estudos, com exceção da ausência de desequilíbrio entre as mutações *D70G* e *A539T*.
5. A variante *E255D* provavelmente surgiu em um cromossomo que continha a variante *A539T*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCÂNTARA, V.M. **Fenótipos da butirilcolinesterase e suas relações com dados antropométricos, bioquímico-hormonais e pressão arterial em obesos e na população geral de Curitiba, PR.** Curitiba, 2000. 230f. Tese (Doutorado em Genética) – 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.

ASHFORD, J.W.; SHERMAN, K.A.; KUMAR, V. Advances in Alzheimer therapy: cholinesterase inhibitors. **Neurol Aging**, v.10, p.95-105, 1989.

BARTELS, C. F.; VAN DER SPEK, A. F. L.; LA DU, B. N. Two polymorphisms in the non coding regions of the *BCHE* gene. **Nucl Acids Res**, v.18, p.6171, 1990.

BARTELS, C. F.; JAMES, K.; LA DU, B. N. DNA mutations associated with the human butyrylcholinesterase J-variant. **Am J Hum Genet**, v.50, p.1104-1114, 1992a.

BARTELS, C. F.; JENSEN, F. S.; LOCKRIDGE, O.; VAN DER SPEK, A. F. L.; RUBINSTEIN, H. M.; LUBRANO, T.; LA DU, B. N. DNA mutation associated with the human butyrylcholinesterase K-variant and its linkage to the atypical variant mutation and other polymorphic sites. **Am J Hum Genet**, v.50, p.1086-1103, 1992b.

BASTONE, A.; FRONTALI, N.; MALLOZZI, C.; SBRACCIA, M.; SETTIMI, L. Cholinesterases in blood plasma and tissues of rats treated with n-hexane or with its neurotoxic metabolite 2,5-hexanedione. **Arch Toxicol**, v.61, p.138-144, 1987.

BERNARDI, C.C. **Estudo sobre amplificação e deleção dos genes BCHE e ACHE em portadoras de câncer de mama esporádico.** Curitiba, 2008. 97f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

BIGNON, J.D.; FERNANDEZ-VIÑA, M.A. Protocols of the 12th International Histocompatibility Workshop for Typing of HLA class II alleles by DNA amplification by the polymerase chain reaction (PCR) and hybridization with sequence specific oligonucleotide probes (SSOP). In CHARRON, D. **HLA – Genetic diversity of HLA: functional and medical implication.** Paris; EDK, 1997.

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.

BRASS, N.; RACZ, A.; HECKEL, D.; REMBERGER, K.; SYBRECHT, G.W.; MEESE, E.U. Amplification of the genes *BCHE* and *SLC2A2* in 40% of squamous cell carcinoma of the lung. **Cancer Research**, v.57, n.11, p.2290-2294, 1997.

BRAUN-PRADO, K.; MION, A. L. V.; PEREIRA, N. F.; CULPI, L.; PETZL-ERLER, M. L. HLA class I polymorphism, as characterised by PCR-SSOP, in a Brazilian exogamic population. **Tissue Antigens**, v.56, n.5, p.417-427, 2000.

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**, v.48, p.137-144, 1991.

CHATTONET, A.; LOCKRIDGE, O. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. **Biochem J**, v.260, p.625-34, 1989.

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

CROOK, M.; HAQ, M.; TUTT, P. Serum lipids, acute phase proteins and serum cholinesterase in normal subjects. **Scand J Lab Invest**, v.54, p.601-603, 1994.

DARVESH, S.; HOPKINS, D.A.; GEULA, C. Neurobiology of butyrylcholinesterase. **Nat Rev Neurosci**, v.4, n.2, p.131-8, 2003

DEN DUNNENN, J.T.; ANTONARAKIS, E. Mutation Nomenclature Extensions and Suggestions to Describe Complex Mutations: A Discussion. **Hum Mut**, v.15, p.7-12, 2000.

DÉNIZ-NARANJO, M.C.; MUÑOZ-FERNÁNDEZ, C.; ALEMANY-RODRÍGUEZ, M.J.; DEL CARMEN PÉREZ-VIEITEZ, M.; ALADRO-BENITO, Y.; IRURITA-LATASA, J.; SÁNCHEZ-GARCÍA, F. Butyrylcholinesterase, ApoE and Alzheimer's disease in a population from the Canary Islands (Spain). **Neurosci Lett**, v.29, Suppl. 427, n.1, p.34-8, 2007

DEY, D. C.; KANNO, T.; SUDO, K.; MAEKAWA, M. Genetic analysis of 6 patients with no detectable butyrylcholinesterase activity – three novel silent genes and heterogeneities of mutations in *BCHE* gene in Japan. **Am J Hum Genet**, v.61, p.2307, 1997.

DEY, D. C.; MAEKAWA, M.; SUDO, K.; KANNO, T. Butyrylcholinesterase genes in individuals with abnormal inhibition numbers and with trace activity: one common mutation and two novel silent genes. **Ann Clin Biochem**, v.5, p.302-310, 1998.

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

FELDMAN, H.H.; LANE, R.; MEYER, J.; HE, Y.; FERRIS, S.H.; NORDBERG, A.; DARREH-SHORI, T.; SOININEN, H.; PIRTTILÄ, T.; FARLOW, M.R.; SFIKAS, N.; BALLARD, C.; GREIG, N.H. Synergistic effect of apolipoprotein E epsilon4 and butyrylcholinesterase K-variant on progression from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease. **Pharmacogenet Genomics**, v.18, n.4, p. 289-98, Apr, 2008.

FERREIRA, M.E.; GATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. **Embrapa-Cenargem**, Brasília, 1998.

FURTADO, L. **Variabilidade genética da butirilcolinesterase e obesidade**. Curitiba, 2005. 174f. Tese (Doutorado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

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. **Genet Mol Biol**, v.29, p.8-13, 2006.

GÄTKE, M.R.; OSTERGAARD, D.; BUNDGAARD, J.R.; VARIN, F.; VIBY-MOGENSEN, J. Response to mivacurium in a patient compound heterozygous for a novel and a known silent mutation in the butyrylcholinesterase gene: genotyping by sequencing. **Anesthesiology**, v.95, n.3, p.600-6. Sep, 2001.

GATKE, M. R.; BUNDGAARD, J. R.; VIBY-MOGENSEN, J. Two novel mutations in the BCHE gene in patients with prolonged duration of action of mivacurium or succinylcholine during anaesthesia. **Pharmacogenet. Genomics** v.17, p.995-999, 2007.

GNATT, A.; PRODY, C. A.; ZAMIR R.; LIEMAN-HURWITZ, J.; ZAKUT, H.; SOREQ, H. Expression of alternatively terminated unusual human butyrylcholinesterase messenger107 RNA transcripts, mapping to chromosome 3q26-ter, in nervous-system tumors. **Cancer Research**, v.50, p.1983-1987, 1990.

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

GREENBERG, C. P.; PRIMO-PARMO, S. L.; PANTUCK, E. J.; LA DU, B. N. Prolonged response to succinylcholine: a new variant of plasma cholinesterase that is identified as normal by traditional phenotyping methods. **Anesth Analg**, v.81, p.419-421, 1995.

HADA, T.; MURATANI, K.; OHUE, T.; IMANISHI, H.; MORIWAKI, Y.; ITO, M.; AMURO, Y.; HIGASHINO, K. A variant serum cholinesterase and a confirmed point mutation at Gly-365 to Arg found in a patient with liver cirrhosis. **Intern Med**, v.31, p.357-362, 1992.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl Acids Symp Ser**, v.41, p.95-98, 1999.

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

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

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

HIBI, K.; TRINK, B.; PATTURAJAN, M.; WESTRA, W.H.; CABALLERO, O.L.; HILL, D.E.; RATOVITSKI, E.A.; JEN, J.; SIDRANSKY, D. AIS is an oncogene amplified in squamous cell carcinoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.97, n.10, p.5462-5467, 2000.

HIDAKA, K.; IUCHI, I.; YAMASAKI, T.; OHHARA, M.; SHODA, T.; PRIMO-PARMO, S. L.; LA DU, B. N. Identification of two different genetic mutations associated with silent phenotypes for human serum cholinesterase in Japanese. **Japan J Clin Pathol**, v.40, p.535- 540, 1992.

HIDAKA, K.; IUCHI, I.; TOMITA, M.; WATANABE, Y.; MINATOGAWA, Y.; IWASAKI, K.; GOTOH, K.; SHIMIZU, C. Genetic analysis of a Japanese patient with butyrylcholinesterase deficiency. **Ann Hum Genet**, v.61, p.491-496, 1997a.

HIDAKA, K.; IUCHI, I.; YAMASAKI, T.; UEDA, N.; HUKANO, K. Nonsense mutation in exon 2 of the butyrylcholinesterase gene: a case of familial cholinesterasemia. **Clin Chim Acta**, v.261, p.27-34, 1997b.

HIDAKA, K.; WATANABE, Y.; TOMITA, M.; UEDA, N.; HIGASHI, M.; MINATOGAWA, Y.; IUCHI, I. Gene analysis of genomic DNA from stored serum by polymerase chain reaction: identification of three missense mutations in patients with cholinesterasemia and ABO genotyping. **Clin Chim Acta**, v.303, p.61-67, 2001.

IPARDES – Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social. Disponível em: <http://www.ipardes.gov.br>. Acesso em: 12/05/2009.

JENSEN, F. S.; BARTELS, C. F.; LA DU, B. N. Structural basis of the butyrylcholinesterase H-variant segregating in two Danish families. **Pharmacogenetics**, v.2, p.234-240, 1992.

JUNG, V.; KINDICH, R.; KAMRADT, J.; JUNG, M.; MÜLLER, M.; SCHULZ, W.A.; ENGERS, R.; UNTEREGGER, G.; STÖCKLE, M.; ZIMMERMANN, R.; WULLICH, B. Genomic and expression analysis of the 3q25-q26 amplification unit reveals *TLOC1/SEC62* as a probable target gene in prostate cancer. **Molecular Cancer Research**, v.4, n.3, p.169-176, 2006 apud BERNARDI, C.C.; RIBEIRO, E.M.S.F.; CAVALLI, I.J.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.; SOUZA, R.L.R. Amplification and deletion of the *ACHE* and *BCHE* cholinesterase genes in sporadic breast cancer. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v.197, p.158-165, 2010.

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

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

LAPIDOT-LIFSON, Y.; PRODY, C.A.; GINZBERG, D.; MEYTES, D.; ZAKUT, H.; SOREQ, H. Coamplification of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase genes in blood cells: correlation with various leukemias and abnormal megakaryocytopoiesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.86, n.12, p.4715-4719, 1989.

LAYER, P. G.; SPORNS, O. Spatiotemporal relationship of embryonic cholinesterases with cell proliferation in chicken brain and eye. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.84, p.284-288, 1987.

LAYER, P.G.; WEIKERT, T.; WILLBOLD, E. Chicken retinospheroids as developmental and pharmacological in vitro models: acetylcholinesterase is regulated by its own and by butyrylcholinesterase activity. **Cell Tissue Res**, v.268, p.409-418, 1992.

LEJUS, C.; BLANLOEIL, Y.; BURNAT, P.; SOURON, R. Les colinestérases. **Ann Fr Anesth Reanim**, v.17, p.1122-1135, 1998.

LEVANO, S.; GINZ, H.; SIEGEMUND, M.; MIODRAG, F.; VORONKOV, E.; URWYLER, A.; GIRARD, T. Genotyping the butyrylcholinesterase in patients with prolonged neuromuscular block after succinylcholine. **Anesthesiology**, v.102, p.531-535, 2005.

LIU, W.; CHENG, J.; IWASAKI, A.; IMANISHI, H.; HADA, T. Novel mutation and multiple mutations found in the human butyrylcholinesterase gene. **Clin Chim Acta**, v.326, p.193-199, 2002.

LOCKRIDGE, O.; LA DU, B.N. Comparison of atypical and usual serum cholinesterase. **J Biol Chem**, v.253, p.361-366, 1978.

LOCKRIDGE, O.; ECKERSON, H.W.; LA DU, B.N. Interchain disulfide bonds and subunit organization in human serum cholinesterase. **J Biol Chem**, v.254, n.17, p.8324-30, Sep, 1979.

LOCKRIDGE, O.; LA DU, B.N. Loss of the interchain disulfide peptide and dissociation of the tetramer following limited proteolysis of native human serum cholinesterase. **J Biol Chem**, v.257, n.20, p.12012-8, Oct, 1982.

LOEWENSTEIN-LICHTENSTEIN, Y.; SCHWARZ, M.; GLICK, D., NØRGAARD-PEDERSEN, B.; ZAKUT, H.; SOREQ, H. Genetic predisposition to adverse consequences of anti-cholinesterases in 'atypical' BCHE carriers. **Nat Med**, v.1, n.10, p.1082-5, Oct, 1995.

LU, W. D.; HADA, T.; FUKUI, K.; IMANISHI, H.; MATSUOKA, N.; IWASAKI, A.; HIGASHINO, K. Familial hypocholinesterasemia fo* in a family and a new confirmed mutation. **Intern Med**, v.36, p.9-13, 1997.

MACIEL, M.E. **Genes do biometabolismo: aspectos populacionais em euro-descendentes e afro-descendentes do sul do Brasil**. Curitiba, 2007. 122f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

MAEKAWA, M.; SUDO, K.; KANNO, T.; KOTANI, K.; DEY, D. C.; ISHIKAWA, J.; IZUME, M.; ETOH, K. Genetic basis of the silent phenotype of serum butyrylcholinesterase in three compound heterozygotes. **Clin Chim Acta**, v.235, p.41-57, 1995.

MAEKAWA, M.; SUDO, K.; KANNO, T.; KOTANI, K.; DEY, D. C.; ISHIKAWA, J.; IZUME, M. Genetic mutations of butyrylcholine esterase identified from phenotypic abnormalities in Japan. **Clin Chem**, v.43, p.924-929, 1997.

MANOHARAN, I.; WIESELER, S.; LAYER, P.G.; LOCKRIDGE, O.; BOOPATHY, R. Naturally occurring mutation Leu307Pro of human butyrylcholinesterase in the Vysya community of India. **Pharmacogenet Genomics**, v.7, p.461-468, 2006.

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 loop on substrate activation of butyrylcholinesterase. **Biochim Bioph Acta**, v.1544, p.166-176, 2001.

MASSOULIÉ, J.; BON, S. The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates. **Ann Ver Neurosci**, v.5, p.57-106, 1982.

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

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**, v.110, p.627- 639, 2002.

MCGUIRE, M. C.; NOGUEIRA, C. P.; BARTELS, C. F.; LIGHTSTONE, H.; HAJRA, A.; VAN DER SPEK, A. F.; LOCKRIDGE, O.; LA DU, B.N. Identification of the structural mutation responsible for the dibucaine-resistant (atypical) variant form of human serum cholinesterase. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.86, n.3, p.953-7, Feb 1989.

MIKAMI, L.R. **Variabilidade dos exons 2 e 4 do gene *BCHE* e sua relação com atividade da butirilcolinesterase**. Curitiba, 2005. 180f. Tese (Doutorado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

MIKAMI, L. R.; WIESELER, S.; SOUZA, R. L. R.; SCHOPFER, L.; NACHON, F.; LOCKRIDGE, O.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, ELEIDI ALICE. Five new naturally occurring mutations of the *BCHE* gene and frequencies of 12 butyrylcholinesterase alleles in a Brazilian population. **Pharmacogenetics and Genomics**, v.18, p.213-218, 2008.

MURATANI, K.; HADA, T.; YAMAMOTO, Y.; KANEKO, T.; SHIGETO, Y.; OHUE, T.; FURUYAMA, J.; HIGASHINO, K. Inactivation of the cholinesterase gene by Alu insertion: possible mechanism for human gene transposition. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.88, p.11315-19, 1991.

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.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI) Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=16849700. Acesso em: 23/03/2009.

NOGUEIRA, C. P.; MCGUIRE, M. C.; GRAESER, C.; BARTELS, C. F.; ARPAGAUS, M.; VAN DER SPEK, A. F. L.; LIGHTSTONE, H.; LOCKRIDGE, O.; LA DU, B. N. Identification of a frameshift mutation responsible for the silent phenotype of human serum cholinesterase, GLY 117 (GGUTU → GGUAGU). **Am J Hum Genet**, v.40, p.934-940, 1990.

NOGUEIRA, C. P.; BARTELS, C. F.; MCGUIRE, M. C.; ADKINS, S.; LUBRANO, T.; RUBINSTEIN, H. M.; LIGHTSTONE, H.; VAN DER SPEK, A. F. L.; LOCKRIDGE, O.; LA DU, B. N. Identification of two different point mutations associated with the fluoride-

resistant phenotype for human butyrylcholinesterase. **Am J Hum Genet**, v.51, p.821-828, 1992.

NUNES, K. Haplótipos do gene *BCHE* da butirilcolinesterase humana e aspectos evolutivos. Curitiba, 2007. 136f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

ON-KEI CHAN, A.; LAM, C. W.; TONG, S. F.; MAN TUNG, C.; YUNG, K.; CHAN, Y. W.; AU, K. M.; YUEN, Y. P.; HUNG, C. T.; NG, K. P.; SHEK, C. C. Novel mutations in the *BCHE* gene in patients with no butyrylcholinesterase activity. **Clin Chim Acta**, v.351, p.155-159, 2005.

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

ORITA, M.; IWAHANA, H.; KANAZAWA, H.; HAYASHI, K.; SEKIYA, T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. **Proc Natl Academ Sci USA**, v.86, p.2766-2770, 1989.

PARMO-FOLLONI, F. **Estudos sobre a mutação IVS3-14T>C do gene *BCHE***. Curitiba, 2005. 25f. Monografia (Bacharel em Biologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

PARMO-FOLLONI, F.; NUNES, K.; LEPIENSKI, L.M.; MIKAMI, L. R.; SOUZA, R.L.; TSUNETO, L. T.; PETZL-ERLER, M. L.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A. Two new mutations of the human *BCHE* gene (IVS3-14T>C and L574fsX576). **Chem Biol Interact**, v.175, n.1-3, p.135-137, 2008.

POPOVIC, L.; ORESKOVIC, K.; ZUPANCIC, B.; PETRUNIC, M.; KUNEC-VAJIC, E. The relation between plasma lipid levels and pseudocholesterase activity in hypothyroidism. **Metab Res**, v.3, p.137-140, 1998.

PRIMO-PARMO, S.L. **Caracterização de nove alelos silenciosos novos da butirilcolinesterase humana a nível de DNA**. Curitiba, 1993. 99f. Tese (Doutorado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

PRIMO-PARMO, S. L.; BARTELS, C. F.; WIERSEMA, B.; VAN DER SPEK, A. F. L.; INNIS, J. W.; LA DU, B. N. Characterization of 12 silent alleles of the human butyrylcholinesterase (*BCHE*) gene. **Am J Hum Genet**, v.58, p.52-64, 1996.

PRIMO-PARMO, S. L.; LIGHTSTONE, H.; LA DU, B. N. Characterization of an unstable variant (BChE115D) of human butyrylcholinesterase. **Pharmacogenetics**, v.7, p.27-34, 1997.

RUBINSTEIN, H.M.; DIETZ, A.A.; LUBRANO, T. E₁^K, another quantitative variant at cholinesterase locus 1. **J Med Genet**, v.15, p.27-29, 1978.

SAKAMOTO, N., HIDAKA, K., FUJISAWA, T., MAEDA, M.; IUCHI, I. Identification of a point mutation associated with a silent phenotype of human serum butyrylcholinesterase - a case of a familial cholinesterasemia. **Clin Chim Acta**, v.274, p.159-166, 1998.

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.

SHAM, P. C.; CURTIS, D. Monte Carlo tests for associations between disease and alleles at highly polymorphic loci. **Annals Hum Genetics**, v.59, p.97-105, 1995.

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

SOUZA, R.L.R.; CASTRO, R.M.V.; PEREIRA, L.; FREUND, A.A.; CULPI, L.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Frequencies of the butyrylcholinesterase K mutation in the Brazilian population of European and African origin. **Hum Biol**, v.70, p.965-970, 1998.

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

SOUZA, R.L.R.; MIKAMI, L.R.; MAEGAWA, R.O.B.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Four new mutations in the *BCHÉ* gene of human butyrylcholinesterase in a Brazilian blood donor sample. **Mol Genet Metab**, v.84, p.349–353, 2005.

STEPHENSON, J.; CZEPULKOWSKI, B.; HIRST, W.; MUFTI, G.J. Deletion of the acetylcholinesterase locus at 7q22 associated with myelodysplastic syndromes (MDS) and acute myeloid leukaemia (AML). **Leukemia Research**, v.20, n.3, p.235-241, 1996.

SUDO, K.; MAEKAWA, M.; KANNO, T.; AKIZUKI, S.; MAGARA, T. Three different point mutations in the butyrylcholinesterase gene of three Japanese subjects with a silent phenotype: Possible Japanese type alleles. **Clin Biochem**, v.29, p.165-169, 1996.

SUDO, K.; MAEKAWA, M.; AKIZUKI, S.; MAGARA, T.; OGASAWARA, H.; TANAKA, T. Human butyrylcholinesterase L330I mutation belongs to a fluoride-resistant gene, by

expression in human fetal kidney cells. **Biochem Bioph Res Comm**, v.240, p.372-375, 1997.

TAKAGI, H.; NARAHARA, A.; TAKAYAMA, H.; SHIMODA, R.; NAGAMINE, T.; MORI, M. A new point mutation in cholinesterase: relationship between multiple mutation sites and enzyme activity. **Int Hepat Comm**, v.6, p.288-293, 1997.

TRAINA, M.E.; SERPIETRI, L.A. Changes in levels and forms of rat plasma cholinesterase during chronic diisopropylphosphofluoridate intoxications. **Biochem Pharmacol**, v.33, p.645-653, 1984.

VIDAL, C.J. Expression of cholinesterases in brain and non-brain tumours. **Chemico-Biological Interactions**, v.15, n.157-158, p.227-232, 2005.

WHITTAKER, M. Plasma cholinesterase variants and the anaesthetist. **Anesthesia**, v.35, p.174-197, 1980.

WHITTAKER, M. **Cholinesterase**. Karger, Basel, New York, p.1-126, 1986.

YEN, T.; NIGHTINGALE, B.N.; BURNS, J.C.; SULLIVAN, D.R.; STEWART, P.M. Butyrylcholinesterase (BChE) genotyping for post-succinylcholine apnea in an Australian population. **Clin Chem**, v.49, p.1297-1308, 2003.

ZAKUT, H.; EHRLICH, G.; AYALON, A.; PRODY, C.A.; MALINGER, G.; SEIDMAN, S.; GINZBERG, D.; KEHLENBACH, R.; SOREQ, H. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase genes coamplify in primary ovarian carcinomas. **The Journal of Clinical Investigation**, v.86, n.3, p.900-908, 1990.

APÊNDICES

1. Genótipos da amostra analisada para as variantes -116, D70G, E255D, A539T, 1914 dos exons 1, 2 e 4.

| Amostra | Sexo | Idade | Éxon 1 | Éxon 2 | | Éxon 4 | |
|---------|------|-------|--------|--------|---------|--------------|------|
| | | | -116 | D70G | E255D | A539T | 1914 |
| 1 | F | 43 | U/U | U/U | U/U | U/U | * |
| 2 | M | 46 | U/U | U/U | U/U | U/U | * |
| 3 | F | 23 | U/U | U/U | U/U | U/U | * |
| 4 | F | 23 | U/U | U/U | U/U | U/U | * |
| 5 | M | 26 | U/U | U/U | U/U | U/U | * |
| 6 | M | 20 | U/U | U/U | U/U | U/U | * |
| 7 | M | 29 | U/U | U/U | U/U | U/U | * |
| 8 | M | 21 | U/U | U/U | U/U | U/U | AG |
| 9 | F | 47 | U/U | U/U | U/U | U/U | * |
| 10 | F | 24 | U/U | U/U | U/U | A539T/ A539T | * |
| 11 | M | 38 | U/U | U/U | U/U | U/ A539T | * |
| 12 | F | 27 | U/U | U/U | U/E255D | U/ A539T | * |
| 13 | F | 29 | U/U | U/D70G | U/U | U/U | * |
| 14 | F | 36 | U/U | U/D70G | U/U | U/U | AG |
| 15 | F | 23 | U/U | U/U | U/U | U/A539T | AG |
| 16 | F | 51 | U/U | U/U | U/E255D | U/U | GG |
| 17 | M | 44 | U/116 | U/U | U/U | U/U | AG |
| 18 | M | 50 | U/U | U/U | U/U | U/U | GG |
| 19 | F | 35 | U/U | U/U | U/U | U/U | GG |
| 20 | F | 24 | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 21 | M | 28 | U/U | U/U | U/E255D | A539T/A539T | AG |
| 22 | M | 33 | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 23 | M | 28 | U/U | U/U | U/U | U/U | AG |
| 24 | F | 30 | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 25 | F | 21 | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 26 | F | 23 | U/U | U/U | U/U | U/A539T | AA |
| 27 | M | 30 | U/U | U/U | U/U | U/U | AG |
| 28 | M | 40 | U/116 | U/U | U/U | U/A539T | GG |
| 29 | M | 38 | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 30 | M | 34 | U/U | U/U | U/U | U/U | AG |
| 31 | F | 36 | U/U | U/U | U/U | U/A539T | AG |
| 32 | F | 35 | U/U | U/U | U/U | U/A539T | AA |
| 33 | F | 29 | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 34 | F | 30 | U/U | U/U | U/U | A539T/A539T | GG |
| 35 | M | 32 | U/U | U/U | U/U | U/U | AG |
| 36 | M | 28 | U/U | U/U | U/U | U/A539T | GG |

| | | | | | | | |
|----|---|----|-------|--------|---------|-------------|----|
| 37 | M | 24 | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 38 | M | 42 | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 39 | F | 41 | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 40 | M | 41 | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 41 | M | 31 | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 42 | M | 31 | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 43 | M | 33 | U/U | U/U | U/U | U/A539T | AG |
| 44 | M | 24 | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 45 | M | 27 | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 46 | F | 36 | U/U | U/U | U/U | U/U | AG |
| 47 | F | 48 | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 48 | F | 37 | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 49 | M | 22 | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 50 | M | 33 | U/U | U/U | U/U | U/U | AG |
| 51 | M | 21 | U/U | U/U | U/U | U/U | AG |
| 52 | M | 40 | U/U | U/U | U/U | U/A539T | GG |
| 53 | F | 28 | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 54 | M | 38 | U/U | U/U | U/U | U/U | AG |
| 55 | F | 42 | U/U | U/U | U/U | U/A539T | AG |
| 56 | M | 31 | U/U | U/U | U/U | U/U | AG |
| 57 | M | 31 | U/U | U/U | U/U | U/U | AG |
| 58 | M | 38 | U/U | U/U | U/U | U/U | GG |
| 59 | M | 26 | U/U | U/U | U/U | A539T/A539T | GG |
| 60 | F | 31 | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 61 | M | 26 | U/U | U/U | U/E255D | U/A539T | AG |
| 62 | M | 27 | U/U | U/U | U/U | U/U | GG |
| 63 | M | 21 | U/116 | U/U | U/U | U/A539T | GG |
| 64 | M | 28 | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 65 | M | 39 | U/U | U/U | U/E255D | U/A539T | GG |
| 66 | M | 48 | U/U | U/U | U/U | U/U | GG |
| 67 | F | 45 | ** | U/U | U/U | U/U | AG |
| 68 | F | 25 | ** | U/U | U/U | U/A539T | AG |
| 69 | F | 51 | U/116 | U/U | U/U | U/A539T | AG |
| 70 | M | 42 | U/U | U/U | U/U | U/U | GG |
| 71 | M | 27 | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 72 | M | 23 | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 73 | F | 33 | U/U | U/U | U/U | A539T/A539T | GG |
| 74 | M | 26 | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 75 | F | 36 | U/U | U/U | U/U | U/U | * |
| 76 | F | 27 | U/U | U/U | U/U | U/A539T | AG |
| 77 | F | 20 | U/U | U/D70G | U/U | U/A539T | AG |
| 78 | F | 52 | U/U | U/U | U/U | U/U | AG |
| 79 | F | 49 | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 80 | F | 21 | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |

| | | | | | | | |
|-----|---|----|-------|--------|---------|-------------|----|
| 81 | M | 24 | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 82 | M | 26 | U/U | U/U | U/U | U/U | AG |
| 83 | F | 46 | U/U | U/U | U/U | U/A539T | GG |
| 84 | F | 31 | ** | U/D70G | U/U | U/U | AA |
| 85 | F | 42 | ** | U/U | U/U | U/A539T | AG |
| 86 | F | 25 | ** | U/U | U/U | U/A539T | AG |
| 87 | F | 37 | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 88 | M | 21 | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 89 | F | 34 | U/U | U/U | U/U | U/U | GG |
| 90 | F | 33 | U/U | U/U | U/U | U/U | AG |
| 91 | M | 29 | U/116 | U/U | U/U | U/A539T | AG |
| 92 | F | 38 | U/U | U/U | U/U | U/U | GG |
| 93 | F | 22 | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 94 | F | 38 | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 95 | F | 30 | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 96 | F | 25 | U/116 | U/U | U/U | A539T/A539T | GG |
| 97 | M | 53 | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 98 | F | 32 | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 99 | F | 34 | U/U | U/U | U/U | U/U | AG |
| 100 | F | 34 | U/116 | U/U | U/U | U/U | GG |
| 101 | M | 34 | U/U | U/U | U/U | U/A539T | AG |
| 102 | M | 27 | U/U | U/U | U/U | U/U | AG |
| 103 | F | 26 | U/U | U/U | U/U | U/A539T | AG |
| 104 | F | 30 | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 105 | F | 23 | U/U | U/U | U/U | U/U | AG |
| 106 | F | 35 | U/U | U/U | U/E255D | U/A539T | AG |
| 107 | F | 36 | U/U | U/U | U/U | U/U | AG |
| 108 | F | 25 | U/U | U/U | U/E255D | U/A539T | AG |
| 109 | M | 29 | U/U | U/U | U/U | U/U | GG |
| 110 | M | 38 | U/U | U/U | U/U | U/A539T | AA |
| 111 | F | 31 | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 112 | M | 40 | U/116 | U/U | U/U | U/A539T | AG |
| 113 | F | 23 | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 114 | M | 40 | U/U | U/D70G | U/U | U/A539T | AG |
| 115 | F | 41 | U/U | U/U | U/U | U/A539T | AG |
| 116 | F | 37 | U/U | U/U | U/U | U/U | GG |
| 117 | F | 24 | U/U | U/U | U/U | U/A539T | AA |
| 118 | M | 33 | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 119 | F | 22 | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 120 | M | 22 | U/116 | U/U | U/U | U/A539T | AG |
| 121 | F | 51 | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 122 | F | 47 | U/U | U/U | U/U | U/U | AG |
| 123 | M | 24 | U/116 | U/U | U/U | A539T/A539T | GG |
| 124 | M | 20 | U/U | U/U | U/U | U/U | AG |

| | | | | | | | |
|-----|---|----|-------|-----|---------|---------|----|
| 125 | F | 39 | U/U | U/U | U/U | U/U | AG |
| 126 | F | 20 | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 127 | M | 20 | U/U | U/U | U/U | U/U | AG |
| 128 | F | 33 | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 129 | M | 23 | U/U | U/U | U/U | U/U | AG |
| 130 | F | 41 | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 131 | F | 35 | U/U | U/U | U/U | U/U | AG |
| 132 | M | 29 | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 133 | M | 25 | U/U | U/U | U/U | U/U | AG |
| 134 | F | 32 | U/U | U/U | U/U | U/U | AG |
| 135 | M | 21 | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 136 | M | 32 | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 137 | F | 26 | U/U | U/U | U/U | U/U | AG |
| 138 | F | 26 | U/U | U/U | U/U | U/U | AG |
| 139 | F | 24 | U/U | U/U | U/U | U/U | AG |
| 140 | F | 34 | U/U | U/U | U/U | U/A539T | GG |
| 141 | M | 37 | U/U | U/U | U/U | U/A539T | * |
| 142 | F | 40 | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 143 | F | 28 | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 144 | M | 42 | U/U | U/U | U/U | U/A539T | AG |
| 145 | M | 34 | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 146 | F | 19 | U/U | U/U | U/U | U/U | AG |
| 147 | M | 35 | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 148 | F | 43 | U/U | U/U | U/U | U/U | AG |
| 149 | F | 21 | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 150 | M | 22 | U/U | U/U | U/E255D | U/A539T | GG |
| 151 | M | 36 | U/U | U/U | U/U | U/U | AG |
| 152 | x | x | U/116 | U/U | U/U | U/A539T | GG |
| 153 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/U | AG |
| 154 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 155 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/U | AG |
| 156 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 157 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/A539T | AG |
| 158 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 159 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 160 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/U | AG |
| 161 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/U | AG |
| 162 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/U | AG |
| 163 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/U | AG |
| 164 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 165 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 166 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/A539T | AA |
| 167 | x | x | U/116 | U/U | U/U | U/A539T | AG |
| 168 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/U | AG |

| | | | | | | | |
|-----|---|---|-------|--------|---------|-------------|----|
| 169 | x | x | U/U | U/D70G | U/U | U/A539T | * |
| 170 | x | x | U/U | U/U | U/E255D | U/A539T | AG |
| 171 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/A539T | AA |
| 172 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/A539T | AA |
| 173 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/A539T | AG |
| 174 | x | x | U/116 | U/U | U/U | A539T/A539T | GG |
| 175 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 176 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 177 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 178 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 179 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 180 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/A539T | AG |
| 181 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 182 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 183 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/U | AG |
| 184 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/U | AG |
| 185 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 186 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 187 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/U | GG |
| 188 | x | x | U/U | U/U | U/E255D | U/U | AA |
| 189 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/U | AG |
| 190 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 191 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/U | GG |
| 192 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 193 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 194 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/U | AG |
| 195 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 196 | x | x | U/U | U/D70G | U/U | U/A539T | AG |
| 197 | x | x | U/U | U/U | U/E255D | U/A539T | GG |
| 198 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/U | AG |
| 199 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/U | AG |
| 200 | x | x | U/U | U/U | U/E255D | U/U | AG |
| 201 | x | x | U/116 | U/U | U/U | A539T/A539T | GG |
| 202 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/U | AG |
| 203 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/A539T | AA |
| 204 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 205 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/U | GG |
| 206 | x | x | U/116 | U/U | U/U | A539T/A539T | GG |
| 207 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/U | AG |
| 208 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 209 | x | x | U/U | U/U | U/E255D | A539T/A539T | GG |
| 210 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/A539T | AG |
| 211 | x | x | U/U | U/U | U/E255D | U/A539T | AG |
| 212 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |

| | | | | | | | |
|-----|---|---|-------|-----|---------|-------------|----|
| 213 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/A539T | GG |
| 214 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/U | AG |
| 215 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/A539T | AA |
| 216 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 217 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/A539T | AA |
| 218 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/U | GG |
| 219 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 220 | x | x | U/U | U/U | U/E255D | A539T/A539T | GG |
| 221 | x | x | U/U | U/U | U/E255D | A539T/A539T | AG |
| 222 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/U | AG |
| 223 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/A539T | AG |
| 224 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/A539T | AG |
| 225 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/A539T | AG |
| 226 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/A539T | AG |
| 227 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/A539T | * |
| 228 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/A539T | AA |
| 229 | x | x | U/116 | U/U | U/E255D | U/A539T | AG |
| 230 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/U | AA |
| 231 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/U | AG |
| 232 | x | x | U/116 | U/U | U/U | U/A539T | AG |
| 233 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/A539T | AG |
| 234 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/A539T | * |
| 235 | x | x | U/U | U/U | U/U | U/U | AG |

^x dados não disponíveis.

* não determinado devido ao pequeno volume da amostra.

** amostras encaminhadas para o sequenciamento, cujos padrões eletroforéticos são diferentes dos padrões de bandas para a variante -116.

