

KELLY NUNES

**HAPLÓTIPOS DO GENE *BCHE* DA BUTIRILCOLINESTERASE
HUMANA E ASPECTOS EVOLUTIVOS**

CURITIBA
2007

KELLY NUNES

**HAPLÓTIPOS DO GENE *BCHE* DA BUTIRILCOLINESTERASE
HUMANA E ASPECTOS EVOLUTIVOS**

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

Orientadora: Dra Eleidi A. Chautard
Freire Maia.

Co-orientador: Dr. Ricardo L.R. de
Souza.

CURITIBA
2007

"Se pude enxergar mais longe foi porque
estava sobre os ombros de gigantes"
(Isaac Newton)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as pessoas que Ele tem colocado no meu caminho e que de uma forma ou outra têm contribuído para a minha formação não apenas acadêmica, mas como ser humano.

Aos meus pais Elisa e Edgar, pelo amor incondicional, incentivo e apoio financeiro.

À minha irmã Carla, meu porto seguro.

À professora Eleidi Chautard Freire Maia, pelos ensinamentos ao longo desses anos que contribuíram para minha formação científica, pelos conselhos, e exemplo de ética e dedicação, minha admiração e carinho.

Ao professor Ricardo L. Rodrigues de Souza, pelo constante apoio com os métodos laboratoriais, o uso dos programas computacionais e pela compreensão e paciência com as minhas dificuldades.

Aos colegas do Laboratório de Polimorfismos e Ligação, que acompanharam de perto os erros e acertos desse trabalho, os momentos de tensão e alegria. Em especial à Cris e à Fabi pelos desabafos e longas conversas.

À Liya, pela amizade sincera e constante preocupação com o meu bem estar.

Ao Ben e à Lupe, por sempre me socorrerem, principalmente quando o “negão” me deixou na mão, por me emprestarem o Notebook, sem o qual não teria sido possível terminar a redação dessa dissertação.

Ao professor Diogo Meyer que gentilmente me recebeu no Laboratório de Biologia Evolutiva e Conservação da USP e contribuiu de forma expressiva na finalização desse trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Evolutiva e Conservação, pela receptividade e sugestões para a dissertação. Em especial à Márcia, pela hospedagem e atenção.

À CAPES, pela bolsa nesse último ano.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	V
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	X
LISTA DE ABREVIATURAS DOS AMINOÁCIDOS.....	XI
RESUMO	XII
ABSTRAT	XIII
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 COLINESTERASES.....	3
2.2 ESTRUTURA DA BChE.....	3
2.3 ESTRUTURA DO GENE <i>BCHE</i>	7
2.4 NOMENCLATURA	9
2.5 VARIABILIDADE DO GENE <i>BCHE</i>	11
2.5.1 VARIANTES NÃO USUAIS MAIS FREQUENTES DO GENE <i>BCHE</i>	14
2.5.1.1 VARIANTE NÃO USUAL C. *189A>G.....	15
2.5.1.2 VARIANTE NÃO USUAL C. 1615G>A (P. A539T).....	15
2.5.1.3 VARIANTE NÃO USUAL C. -116G>A.....	16
2.5.1.4 VARIANTE NÃO USUAL C. 209A>G (P. D70G).....	16
2.5.1.5 VARIANTE NÃO USUAL C. 765G>C (P. E255D).....	16
2.5.1.6 VARIANTE NÃO USUAL C. 551C>T (P. A184V).....	17
2.5.2 VARIANTES SILENCIOSAS.....	17
2.6 ATUAÇÃO FISIOLÓGICA DA BChE	17
2.6.1 ATUAÇÃO NAS VIAS COLINÉRGICAS.....	17
2.6.2 METABOLISMO DE LÍPIDES, PESO E IMC	18
2.6.3 CICLO CELULAR - DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E TUMORIGÊNESE	18
2.7 BUTIRILCOLINESTERASE E XENOBIÓTICOS	19
2.7.1 ORGANOFOSFORADOS	19
2.7.2 SUCCINILCOLINA E MIVACÚRIO	20
2.8 FATORES QUE INFLUENCIAM NA ATIVIDADE DA <i>BCHE</i>	21
2.8.1 VARIANTES DA BChE E FENÓTIPO CHE2 C5+	23
2.8.2 IDADE	23
2.8.3 HORMÔNIOS	23
2.8.4 DOENÇAS HEPÁTICAS (HEPATITE VIRAL, HEPATITE AMEBIANA E CIRROSE).....	24
2.8.5 ESTOCAGEM	24
2.9 ASPECTOS EVOLUTIVOS DO GENE <i>BCHE</i>	24
2.9.1 ORIGEM POR DUPLICAÇÃO GÊNICA	24
2.9.2 EVOLUÇÃO DE GENES DUPLICADOS	25
3 OBJETIVOS.....	27
3.1 OBJETIVOS GERAIS	27
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1 MATERIAL	28
4.1.1 AMOSTRA DE DOADORES DE SANGUE	28
4.1.1.1 SELECIONADA POR ATIVIDADE BAIXA DA BChE	28

4.1.1.2 AMOSTRA DE PORTADORES DA MUTAÇÃO <i>c.209A>G (p.D70G)</i>	28
4.1.1.3 AMOSTRA DE PORTADORES DA MUTAÇÃO <i>c.765G>C (p.E255D)</i>	28
4.1.1.4 AMOSTRA DE PORTADORES DA MUTAÇÃO <i>c.IVS3-14T>C</i>	28
4.1.2 AMOSTRA DE AMERÍNDIOS GUARANI DO MATO GROSSO DO SUL	29
4.1.3 SEQUÊNCIAS GENÔMICAS DOS GENES <i>BCHE</i> E <i>ACHE</i>	29
4.2 METODOLOGIA	29
4.2.1 PCR.....	31
4.2.2 ANÁLISE DO DNA AMPLIFICADO.....	31
4.2.2.1 SSCA (ANÁLISE CONFORMACIONAL DE FITA SIMPLES).....	31
4.2.2.2 COLORAÇÃO DO GEL.....	33
4.2.2.3 SEQUENCIAMENTO DE DNA	35
4.2.2.3.1 PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DE PCR COM ACETATO DE AMÔNIO.....	35
4.2.2.3.2 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO.....	36
4.2.2.3.3 PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DE PCR DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO	36
4.2.3 ANÁLISE DOS DADOS	37
4.2.3.1 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS.....	37
4.2.3.2 EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG, DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO E INFERÊNCIA HAPLOTÍPICA	37
4.2.3.3 DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA DO RNAM.....	38
4.2.3.4 DETERMINAÇÃO DOS POSSÍVEIS FATORES DE TRANSCRIÇÃO LIGANTES NO DNA	38
4.2.3.5 ANÁLISES DAS SEQUÊNCIAS DE CDNA	38
4.2.3.5.1 OBTENÇÃO E ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS.....	38
4.2.3.5.2 IDENTIDADE DE NUCLEOTÍDEOS E AMINOÁCIDOS.....	38
4.2.3.5.3 TAXAS E PADRÕES DE SUBSTITUIÇÃO.....	39
4.2.3.5.4 DETECÇÃO DE SELEÇÃO.....	39
4.2.3.5.5 USO DOS CÓDONS	40
4.2.3.5.6 VARIAÇÃO DE AMINOÁCIDOS.....	40
5 RESULTADOS.....	41
5.1 DOADORES DE SANGUE COM ATIVIDADE BAIXA DA <i>BCHE</i>	41
5.1.1 EXON 1	41
5.1.2 EXON 2	42
5.1.2.1 FRAGMENTO DOS NUCLEOTÍDEOS -42 A 204	42
5.1.2.2 FRAGMENTO DOS NUCLEOTÍDEOS 155 A 535	43
5.1.2.3 FRAGMENTO DOS NUCLEOTÍDEOS 481 A 719	44
5.1.2.4 FRAGMENTO DOS NUCLEOTÍDEOS 659 A 876	45
5.1.2.5 FRAGMENTO DOS NUCLEOTÍDEOS 835 A 1059	46
5.1.2.6 FRAGMENTO DOS NUCLEOTÍDEOS 1194 A 29 DO ÍNTRON 2.....	47
5.1.3 EXON 3	47
5.1.4 REGIÃO 3' DO ÍNTRON 3 E INÍCIO DO EXON 4.....	48
5.1.5 ESTRUTURA HAPLOTÍPICA	49
5.1.5.1 GENÓTIPOS DOS SÍTIOS -116, 209 E 1615	49
5.1.5.2 HAPLÓTIPOS E DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO PARA OS SÍTIOS -116, 209 E 1615	50
5.2 DOADORES DE SANGUE COM A MUTAÇÃO <i>c.209A>G (p.D70G)</i> E ANÁLISE DO EXON 1	51
5.3 DOADORES DE SANGUE COM A MUTAÇÃO <i>c.765G>C (p.E255D)</i> E ANÁLISE DO EXON 1	52
5.4 DOADORES DE SANGUE COM A MUTAÇÃO <i>c.344G>A (p.G115D)</i> E ANÁLISE DO ÍNTRON 3 E INÍCIO DO EXON 4	53
5.5 GUARANI DO MATO GROSSO DO SUL E ANÁLISE DO EXON 1	54
5.6 ANÁLISE COMPARATIVA DA REGIÃO TRANSCRITA DO GENE <i>BCHE</i> DE <i>H. SAPIENS</i> COM OUTRAS ESPÉCIES DE ANIMAIS	54
5.6.1 SÍTIOS E AMINOÁCIDOS VARIÁVEIS NOS INDIVÍDUOS DO PRESENTE ESTUDO	54
5.6.2 IDENTIDADE DE NUCLEOTÍDEOS E DE AMINOÁCIDOS	57
5.6.3 TAXAS E PADRÕES DE SUBSTITUIÇÕES	59
5.6.3.1 TAXA DE SUBSTITUIÇÃO DE NUCLEOTÍDEOS	59
5.6.3.2 SUBSTITUIÇÕES NAS REGIÕES UTR	60
5.6.3.3 SUBSTITUIÇÕES SINÔNIMAS E NÃO SINÔNIMAS POR SÍLIO SINÔNIMO.....	60
5.6.4 TESTANDO VARIAÇÃO DE K_A/K_S ENTRE OS RAMOS	61

5.6.5 COMPOSIÇÃO DE NUCLEOTÍDEOS	63
5.6.6 USO DOS CÓDONS	65
5.6.7 VARIAÇÃO DE AMINOÁCIDOS.....	67
5.7 COMPARAÇÃO ENTRE OS GENES <i>ACHE</i> E <i>BCHE</i>	68
6 DISCUSSÃO	71
6.1 VARIABILIDADE DO GENE <i>BCHE</i> EM INDIVÍDUOS COM ATIVIDADE DA BChE \leq 4,00 KU/L.....	71
6.1.1 EXON 1	71
6.1.2 EXON 2	74
6.1.3 EXON 3	75
6.1.4 ÍNTRON 3 E INÍCIO DO EXON 4	76
6.2 DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE AS VARIANTES DO GENE <i>BCHE</i>	77
6.3 ESTRUTURA HAPLOTÍPICA	78
6.3.1 SÍTIOS -116, 209 E 1615	78
6.3.2 SÍTIOS 344, IVS3-14 E 1615.....	79
6.3.3 ESTRUTURA HAPLOTÍPICA E FENÓTIPO.....	79
6.3.3.1 SÍTIOS -116 E 1615.....	80
6.3.3.2 SÍTIOS 344 E IVS3-14	81
6.3.4 ESTRUTURA HAPLOTÍPICA, SEQUÊNCIA EM GENES HOMÓLOGOS E ORDEM CRONOLÓGICA DO APARECIMENTO DAS MUTAÇÕES.....	82
6.4 GUARANI DO MATO GROSSO DO SUL E VARIAÇÃO NO GENE <i>BCHE</i>	85
6.5 ANÁLISE COMPARATIVA DA REGIÃO TRANSCRITA DO GENE <i>BCHE</i> DE <i>H. SAPIENS</i> COM OUTRAS ESPÉCIES DE ANIMAIS	86
6.5.1 IDENTIDADE DE NUCLEOTÍDEOS E DE AMINOÁCIDOS	87
6.5.2 TAXA E PADRÕES DE SUBSTITUIÇÃO DE NUCLEOTÍDEOS	87
6.5.2.1 TESTANDO SELEÇÃO - ANÁLISES DE K_A/K_S	89
6.5.3 COMPOSIÇÃO DE NUCLEOTÍDEOS, USO DOS CÓDONS E VARIAÇÃO DE AMINOÁCIDOS	90
6.5.4 REGIÕES CONSERVADAS E VARIÁVEIS DA BChE	90
6.5.4.1 SÍTIOS E AMINOÁCIDOS VARIÁVEIS NOS INDIVÍDUOS DO PRESENTE ESTUDO	91
6.5.4.2 CONSERVAÇÃO DE AMINOÁCIDOS E ESTRUTURA PROTÉICA	93
6.5.4.3 CONSERVAÇÃO DAS REGIÕES NÃO TRANSCRITAS	95
6.6 ANÁLISE COMPARATIVA DO GENE <i>BCHE</i> E DO GENE <i>ACHE</i>	97
6.6.1 COMPARAÇÃO DA IDENTIDADE DE NUCLEOTÍDEOS E DE AMINOÁCIDOS.....	97
6.6.2 COMPARAÇÃO DE K_A/K_S ENTRE GENES.....	97
6.6.3 COMPOSIÇÃO DE NUCLEOTÍDEOS E USO DOS CÓDONS	98
7 CONCLUSÕES	99
7.1 VARIABILIDADE DO GENE <i>BCHE</i>	99
7.2 ASPECTOS EVOLUTIVOS DO GENE <i>BCHE</i>	100
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101
9 APÊNDICES.....	122
APÊNDICE 9.1. GENÓTIPOS DA AMOSTRA DE DOADORES DE SANGUE DE CURITIBA COM ATIVIDADE \leq 4,00KU/L.....	123
APÊNDICE 9.2. GENÓTIPOS DA AMOSTRA DE INDIVÍDUOS HETEROZIGOTOS PARA A VARIANTE <i>D70G</i>	129
APÊNDICE 9.3. GENÓTIPOS DA AMOSTRA DE GUARANI DO MATO GROSSO DO SUL.....	131

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. VARIANTES DO GENE <i>BCHE</i>	12
TABELA 2. ALGUNS FATORES QUE INFLUENCIAM NO ACRÉSCIMO DA ATIVIDADE DA BUTIRILCOLINESTERASE.	21
TABELA 3. ALGUNS FATORES QUE INFLUENCIAM NO DECRÉSCIMO DA ATIVIDADE DA BUTIRILCOLINESTERASE.	22
TABELA 4. NÚMERO DE INDIVÍDUOS ANALISADOS, DE ACORDO COM O FRAGMENTO DE DNA DO GENE <i>BCHE</i>	30
TABELA 5. SEQÜÊNCIAS DOS INICIADORES UTILIZADOS PARA AMPLIFICAR OS FRAGMENTOS DE DNA NA TÉCNICA DE SSCA (ANÁLISE CONFORMACIONAL DE FITA SIMPLES)	32
TABELA 6. CONDIÇÕES DAS ELETROFORESES DE SSCA PARA OS DIFERENTES FRAGMENTOS DO GENE <i>BCHE</i>	34
TABELA 7. FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS, REFERENTES AO NUCLEOTÍDEO -116, EM AMOSTRAS DE DOADORES DE SANGUE COM ATIVIDADE DA <i>BCHE</i> ≤ 4,00 KU/L.	42
TABELA 8. FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS, REFERENTES À VARIAÇÃO <i>C.344G>A (P.G115D)</i> EM DOADORES DE SANGUE COM ATIVIDADE DA <i>BCHE</i> ≤ 4,00 KU/L.	44
TABELA 9. FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DA VARIAÇÃO <i>C.765G>C</i> EM INDIVÍDUOS COM ATIVIDADE DA <i>BCHE</i> ≤ 4,00 KU/L.	46
TABELA 10. FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DA VARIAÇÃO <i>C.IVS3-14T>C</i> EM INDIVÍDUOS COM ATIVIDADE DA <i>BCHE</i> ≤ 4,00 KU/L.	49
TABELA 11. FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DA VARIAÇÃO <i>1719DELT</i> EM INDIVÍDUOS COM ATIVIDADE DA <i>BCHE</i> ≤ 4,00 KU/L.	49
TABELA 12. GENÓTIPOS, DETECTADOS POR ELETROFORESE SSCA EM GEL DE POLIACRILAMIDA, PARA OS SÍTIOS -116 (<i>-116G>A</i>), 209 (<i>209A>G</i>) E 1615 (<i>1615G>A</i>) EM INDIVÍDUOS COM ATIVIDADE DA <i>BCHE</i> ≤ 4,0 KU/L.	50
TABELA 13. ESTIMATIVAS DAS FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS E DO NÚMERO ABSOLUTO DOS HAPLÓTIPOS INFERIDOS PARA OS SÍTIOS -116, 209 E 1615.	51
TABELA 14. FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS QUANTO AO SÍTIO -116 DO EXON 1, EM INDIVÍDUOS COM A VARIAÇÃO <i>C.209A>G</i> DO EXON 2.	52
TABELA 15. GENÓTIPOS DOS INDIVÍDUOS PORTADORES DA VARIANTE NÃO USUAL <i>C.209A>G</i> , CONSIDERANDO-SE TAMBÉM OS SÍTIOS -116 E 1615.	52
TABELA 16. GENÓTIPOS, DETECTADOS POR ELETROFORESE SSCA EM GEL DE POLIACRILAMIDA, PARA OS SÍTIOS -116, E 1615 DE NOVE INDIVÍDUOS COM GENÓTIPO <i>765GC</i>	53
TABELA 17. GENÓTIPOS, DETECTADOS POR ELETROFORESE SSCA EM GEL DE POLIACRILAMIDA, PARA OS SÍTIOS 344, <i>IVS3-14</i> E 1615.	54

TABELA 18. DADOS NUCLEOTÍDEOS DE *H. SAPIENS*, *P. TROGLODYTES*, *M. MULATTA*, *F. CATUS*, *P. TIGRIS*, *C. FAMILIARIS*, *E. CABALLUS*, *R. NOVERGICUS* *M. MUSCULUS*, E *G. GALLUS*, QUANTO AOS SÍTIOS -116, 35, 209, 344, 486, 551, 728, 765, 997, 1169, 1408, 1615 E 1719 DO GENE *BCHE*. 55

TABELA 19. DADOS DE AMINOÁCIDOS DE *H. SAPIENS*, *P. TROGLODYTES*, *M. MULATTA*, *F. CATUS*, *P. TIGRIS*, *C. FAMILIARIS*, *E. CABALLUS*, *R. NOVERGICUS*, *M. MUSCULUS* E *G. GALLUS*, QUANTO AOS AMINOÁCIDOS 12, 70, 115, 162, 184, 243, 255, 333, 390, 470, 539, 573 DA *BCHE*. 56

TABELA 20. NÚMERO DE NUCLEOTÍDEOS E AMINOÁCIDOS CONSERVADOS E SUAS RESPECTIVAS IDENTIDADES, QUANDO *H. SAPIENS* É COMPARADO COM *P. TROGLODYTES*, *M. MULATTA*, *F. CATUS*, *P. TIGRIS*, *C. FAMILIARIS*, *E. CABALLUS*, *R. NOVERGICUS* *M. MUSCULUS* E *G. GALLUS*, REFERENTES À REGIÃO CODIFICADORA DA PROTEÍNA MADURA DO GENE *BCHE*. 57

TABELA 21. NÚMERO DE NUCLEOTÍDEOS E DE AMINOÁCIDOS CONSERVADOS E SUAS RESPECTIVAS IDENTIDADES, REFERENTES À REGIÃO CODIFICADORA DO PEPTÍDEO SINAL DO GENE *BCHE*, QUANDO *H. SAPIENS* É COMPARADO COM *P. TROGLODYTES*, *M. MULATTA*, *F. CATUS*, *P. TIGRIS*, *C. FAMILIARIS*, *E. CABALLUS*, *R. NOVERGICUS*, *M. MUSCULUS* E *G. GALLUS*. .. 58

TABELA 22. NÚMERO DE NUCLEOTÍDEOS CONSERVADOS NAS REGIÕES 5'UTR E 3'UTR DO GENE *BCHE* E SUAS RESPECTIVAS IDENTIDADES, QUANDO *H. SAPIENS* É COMPARADO COM *P. TROGLODYTES* E *M. MULATTA*. 58

TABELA 23. TAXA DE SUBSTITUIÇÃO DE NUCLEOTÍDEOS (POR ANO) DAS REGIÕES CODIFICADORAS DO GENE *BCHE* ENTRE *H. SAPIENS* E DEMAIS ESPÉCIES. 59

TABELA 24. NÚMERO DE SUBSTITUIÇÕES POR SÍTIO, DESDE A DIVERGÊNCIA, NAS REGIÕES 5'UTR E 3'UTR DO GENE *BCHE* EM RELAÇÃO A *H. SAPIENS*. 60

TABELA 25. COMPARAÇÕES DO NÚMERO DE SUBSTITUIÇÕES SINÔNIMAS E NÃO SINÔNIMAS POR SÍTIO, NA REGIÃO CODIFICADORA DA PROTEÍNA MADURA DO GENE *BCHE* NAS DIFERENTES ESPÉCIES, EM RELAÇÃO A *H. SAPIENS*. 61

TABELA 26. COMPOSIÇÃO DOS 1722 NUCLEOTÍDEOS DA REGIÃO CODIFICADORA DA PROTEÍNA MADURA DO GENE *BCHE* EM *H. SAPIENS*, *P. TROGLODYTES*, *M. MULATTA*, *F. CATUS*, *P. TIGRIS*, *C. FAMILIARIS*, *E. CABALLUS*, *R. NOVERGICUS*, *M. MUSCULUS* E *G. GALLUS*. 64

TABELA 27. COMPOSIÇÃO DOS NUCLEOTÍDEOS DA REGIÃO DO PEPTÍDEO SINAL DO GENE *BCHE* EM *H. SAPIENS*, *P. TROGLODYTES*, *M. MULATTA*, *F. CATUS*, *P. TIGRIS*, *C. FAMILIARIS*, *E. CABALLUS*, *R. NOVERGICUS*, *M. MUSCULUS*, E *G. GALLUS*. 64

TABELA 28. COMPOSIÇÃO DE NUCLEOTÍDEOS DA REGIÃO 5'UTR DO GENE *BCHE* EM *H. SAPIENS*, *P. TROGLODYTES*, *M. MULATTA*, *F. CATUS*, *P. TIGRIS*, *C. FAMILIARIS*, *E. CABALLUS*, *R. NOVERGICUS*, *M. MUSCULUS* E *G. GALLUS*. 65

TABELA 29. COMPOSIÇÃO DE NUCLEOTÍDEOS DA REGIÃO 3'UTR DO GENE *BCHE* EM *H. SAPIENS*, *P. TROGLODYTES* E *M. MULATTA*. 65

TABELA 30. USO DOS CÓDONS REFERENTES À PROTEÍNA MADURA DO GENE *BCHE* EM *H. SAPIENS*, *P. TROGLODYTES*, *M. MULATTA*, *F. CATUS*, *P. TIGRIS*, *C. FAMILIARIS*, *E. CABALLUS*, *M. MUSCULUS*, *R. NOVERGICUS* E *G. GALLUS*. 66

TABELA 31. PROPORÇÃO, EM RELAÇÃO A *H. SAPIENS*, DE AMINOÁCIDOS DIFERENTES E NÚMERO DE SUBSTITUIÇÕES DE AMINOÁCIDOS POR SÍTIO, POR UNIDADE DE TEMPO, NA REGIÃO CODIFICADORA DA PROTEÍNA MADURA DO GENE *BCHE* EM *P. TROGLODYTES*, *M.*

MULATTA, F. CATUS, P. TIGRIS, C. FAMILIARIS, E. CABALLUS, M. MUSCULUS, R. NOVERGICUS E *G. GALLUS*. 67

TABELA 32. PROPORÇÃO, EM RELAÇÃO A *H. SAPIENS*, DE AMINOÁCIDOS DIFERENTES E NÚMERO DE SUBSTITUIÇÕES DE AMINOÁCIDOS POR SÍTIO POR UNIDADE DE TEMPO NA REGIÃO CODIFICADORA DO PEPTÍDEO SINAL DO GENE *BCHE* EM *P. TROGLODYTES, M. MULATTA, F. CATUS, P. TIGRIS, C. FAMILIARIS, E. CABALLUS, M. MUSCULUS, R. NOVERGICUS* E *G. GALLUS*. 68

TABELA 33. IDENTIDADE DE NUCLEOTÍDEOS E AMINOÁCIDOS ENTRE OS GENES *ACHE* E *BCHE*. 68

TABELA 34. ESTIMATIVAS DE K_A/K_S PARA OS GENES *BCHE* E *ACHE*. 70

TABELA 35. CONTRASTE DO CONTEÚDO C+G DA REGIÃO CODIFICADORA DOS GENES *BCHE* E *ACHE*, CORRESPONDENTE À PROTEÍNA MADURA. 70

TABELA 36. CONTRASTE DO CONTEÚDO C+G DOS GENES *BCHE* E *ACHE*, CORRESPONDENTE À TERCEIRA POSIÇÃO DOS CÓDONS RELATIVOS À PROTEÍNA MADURA 70

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. MODELO TRIDIMENSIONAL DA BCHE HUMANA.	5
FIGURA 2. ESTRUTURA ESQUEMÁTICA DO SÍTIO ATIVO DO MONÔMERO DA BUTIRILCOLINESTERASE.	6
FIGURA 3. DESENHO ESQUEMÁTICO DO GENE <i>BCHE</i> , MOSTRANDO OS QUATRO EXONS (E1, E2, E3 E E4) E OS TRÊS INTRONS.	8
FIGURA 4. DESENHO ESQUEMÁTICO DO GENE <i>BCHE</i> , MOSTRANDO OS QUATRO EXONS E O NÚMERO DE PARES DE BASES QUE OS COMPÕEM E VARIANTES MAIS FREQUÊNTES DO GENE	15
FIGURA 5. A) BLOQUEADORES NEUROMUSCULARES MAIS UTILIZADOS NO BRASIL; B) INDICAÇÕES DO USO DE SUCCINILCOLINA.....	21
FIGURA 6. PADRÕES DO EXON 1, APÓS ELETROFORESE SSCA EM GEL DE POLIACRILAMIDA.	41
FIGURA 7. PADRÕES REFERENTES AO FRAGMENTO DO NUCLEOTÍDEO -42 A 155 DO EXON 2, APÓS ELETROFORESE SSCA EM GEL DE POLIACRILAMIDA.....	42
FIGURA 8. PADRÕES DO FRAGMENTO DOS NUCLEOTÍDEOS 155 A 535 DO EXON 2, APÓS ELETROFORESE SSCA EM GEL DE POLIACRILAMIDA.....	43
FIGURA 9. ELETROFEROGRAMA DA AMOSTRA HETEROZIGOTA <i>344GA</i>	43
FIGURA 10. PADRÕES REFERENTES AO FRAGMENTO DOS NUCLEOTÍDEOS 481 A 719 DO EXON 2, APÓS ELETROFORESE SSCA EM GEL DE POLIACRILAMIDA.....	44
FIGURA 11. PADRÕES REFERENTES AO FRAGMENTO DOS NUCLEOTÍDEOS 659 A 876 DO EXON 2, APÓS ELETROFORESE SSCA EM GEL DE POLIACRILAMIDA.....	45
FIGURA 12. ELETROFEROGRAMA DO HETEROZIGOTO <i>765GC</i>	45
FIGURA 13. PADRÕES REFERENTES AO FRAGMENTO DOS NUCLEOTÍDEOS 835 A 1059 DO EXON 2, APÓS ELETROFORESE SSCA EM GEL DE POLIACRILAMIDA.....	46
FIGURA 14. PADRÕES REFERENTES AO FRAGMENTO DOS NUCLEOTÍDEOS 1194 DO EXON 2 A 29 DO ÍNTRON 2, APÓS ELETROFORESE SSCA EM GEL DE POLIACRILAMIDA.	47
FIGURA 15. PADRÃO REFERENTE AO EXON 3, APÓS ELETROFORESE SSCA EM GEL DE POLIACRILAMIDA.....	47
FIGURA 16. PADRÃO REFERENTE À REGIÃO 3' DO ÍNTRON 3 E INÍCIO DO EXON 4, APÓS ELETROFORESE SSCA EM GEL DE POLIACRILAMIDA.....	48
FIGURA 17. ELETROFEROGRAMA DO HETEROZIGOTO <i>IVS3-14TC</i>	48
FIGURA 18. ÁRVORE FILOGENÉTICA DO GENE <i>BCHE</i> E AS RESPECTIVAS TAXAS DE K_A/K_S AO LONGO DOS RAMOS.....	62

FIGURA 19. CÓDONS DA REGIÃO CODIFICADORA DA PROTEÍNA MADURA DO GENE <i>BCHE</i> NA ESPÉCIE HUMANA, SEGUIDOS DA ABREVIÇÃO DO AMINOÁCIDO, DO NÚMERO DE OCORRÊNCIA E EM PARÊNTESES O VALOR DO USO RELATIVO DOS CÓDONS SINÔNIMOS (RSCU).....	66
FIGURA 20. ESTRUTURA SECUNDÁRIA DO MONÔMERO DA <i>BCHE</i>	69
FIGURA 21. ESTRUTURAS SECUNDÁRIAS PARCIAIS DO RNAM DA <i>BCHE</i> : A) COM <i>-116G</i> ; B) COM <i>-116A</i>	73
FIGURA 23. DESENHO ESQUEMÁTICO DO PADRÃO DE DOBRAMENTO DO MONÔMERO DA <i>BCHE</i> , AS MARCAÇÕES INDICAM OS AMINOÁCIDOS ALTERADOS NOS INDIVÍDUOS DO PRESENTE ESTUDO	92
FIGURA 24. DESENHO ESQUEMÁTICO DO PADRÃO DE DOBRAMENTO DO MONÔMERO DA <i>BCHE</i> , AS MARCAÇÕES INDICAM AS QUATRO REGIÕES CONSERVADAS DA <i>BCHE</i> NAS DEZ ESPÉCIES ANALISADAS.....	93
FIGURA 25. COMPARAÇÃO DA CONSERVAÇÃO GENÔMICA DO GENE <i>BCHE</i> . OS NÚMEROS 1, 2, 3 E 4 REPRESENTAM A COMPARAÇÃO DA ESPÉCIE HUMANA COM <i>C. FAMILIARIS</i> , <i>M. MUSCULUS</i> , <i>R. NOVERGICUS</i> E <i>G. GALLUS</i> , RESPECTIVAMENTE.....	96

LISTA DE ABREVIATURAS

Aa	Aminoácido
AChE	Acetilcolinesterase
ACHE	Gene da acetilcolinesterase
BChE	Butirilcolinesterase
BCHE	Gene da Butirilcolinesterase
CHE2	Gene codificador do complexo C₅ da butirilcolinesterase
CHO	Células de ovário de hamster chinês
CBI	Índice Preferencial de Códon
cDNA	Ácido desoxiribonucléico complementar
DNA	Ácido desoxiribonucléico
EDTA	Ácido etilenoaminotetraacético
ENC	Número efetivo de códon
EP	Erro padrão
HEMEPAR	Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná
IMC	Índice de Massa Corporal
K	Número de substituição entre duas seqüências
K_s	Número de substituições sinônimas por sítio sinônimo
K_a	Número de substituições não sinônimas por sítio não sinônimo
M_s	Número de diferenças sinônimas
M_a	Número de diferenças não sinônimas
N_s	Número médio de sítios sinônimos possíveis
N_a	Número médio de sítios não sinônimos possíveis
Nt	Nucleotídeo
PAS	Sítio Aniônico Periférico
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RSCU	Valor do uso relativo dos códon sinônimos
RFLP	Polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição
RNA_m	Ácido ribonucléico mensageiro
Ro2-0683	Dimetilcarbamato do brometo de 2-hidroxi-5-fenil-benziltrimetilamônio
SSCA	Análise conformacional de fita simples
TBE	Tris-ácido bórico –EDTA
TEMED	N’N’N’N’ – tetrametiletilenodiamina
T	Tempo de divergência entre duas espécies
TF	Gene da transferrina
UTR	Região transcrita não traduzida
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, produzida no fígado e adipócitos. É encontrada em diversos tecidos do corpo e parece estar relacionada a várias vias do metabolismo e desenvolvimento do organismo. A BChE é codificada pelo gene *BCHE*, que apresenta mais de sessenta e cinco variantes descritas até o momento. No presente estudo foi examinada parte da variabilidade genética, estrutura haplotípica e aspectos evolutivos do gene *BCHE*. Foram analisadas amostras de DNA de doadores de sangue de Curitiba (165 com atividade da BChE $\leq 4\text{KU/L}$, 51 portadores da mutação *c.209A>G*, sete portadores da mutação *c.765G>C*, quatro portadores da mutação *c.IVS3-14T>C*) e 253 Guarani do Mato Grosso do Sul (148 Guarani-Kaiowá, 83 Guarani-Ñandeva e 22 Guarani Kaiowá-Ñandeva). Sequências de cDNA do gene *BCHE* e do gene *ACHE*, disponíveis no GenBank, referentes à espécie humana e a outras nove espécies foram utilizadas para análises de aspectos evolutivos. Os indivíduos com atividade baixa da BChE apresentaram: 1) Frequência de $18,58\% \pm 2,59\%$ da variante *-116A*, praticamente o dobro da encontrada na população geral, evidenciando sua relação com diminuição de atividade da BChE; 2) Os haplótipos [*-116G; 209A; 1615G*] com $67,05\% \pm 2,80\%$, [*-116A; 209A; 1615A*] com $15,44\% \pm 2,01\%$, [*-116G; 209A; 1615A*] com $11,73\% \pm 1,67\%$ e [*-116G; 209G; 1615A*] com $4,00\% \pm 0,84\%$, como os de maior frequência. Todos os Guarani do Mato Grosso do Sul apresentaram a variante usual *-116G*. As análises de desequilíbrio de ligação e de comparação com outras espécies permitiram estabelecer a seguinte ordem cronológica de aparecimento dos haplótipos mais frequentes: 1º [*-116A; 209A; 344G; IVS3-14T; 1615G*], 2º [*-116G; 209A; 344G; IVS3-14T; 1615G*], 3º [*-116A; 209A; 344G; IVS3-14T; 1615A*], 4º [*-116G; 209A; 344G; IVS3-14T; 1615A*] e 5º [*-116G; 209G; 344G; IVS3-14T; 1615A*]. A região codificadora da proteína madura do gene *BCHE* mostrou estar bem conservada entre as espécies e as taxas K_a/K_s permitem sugerir que essa região está sob pressão seletiva purificadora, sendo a maioria das diferenças com a BChE humana encontrada em aminoácidos da superfície da enzima. As comparações inter-específicas dos genes *ACHE* e *BCHE* mostram: 1) taxas $K_a/K_s < 1$, indicando seleção purificadora sobre esses dois genes, provavelmente mais intensa no caso do gene *ACHE*; 2) Conteúdo C+G significativamente maior no gene *ACHE*, mais evidenciada na terceira posição do códon. Esses dois fatos corroboram a hipótese, apresentada acima, de maior pressão de seleção sobre o gene *ACHE* do que sobre o gene *BCHE*.

ABSTRAT

Butyrylcholinesterase (BChE) is a serum enzyme, produced in the liver and adipose cells. It is found in several body tissues and it seems related to many metabolic and developmental pathways of the organism. BChE is codified by the *BCHE* gene with more than sixty-five alleles described until now. The present study analyzed part of the genetic variability, haplotype structure and evolution aspects of the *BCHE* gene. DNA was examined from blood donors from Curitiba (165 with BChE activity $\leq 4\text{KU/L}$, 51 heterozygotes for the *c.209A>G* mutation, seven heterozygotes for the *c.765G>C* mutation, four heterozygotes for the *c.IVS3-14T>C* mutation) and 253 Guarani from Mato Grosso do Sul (148 Guarani-Kaiowá, 83 Garani-Ñandeva and 22 Guarani Kaiowá-Ñandeva). Sequences of cDNA from the *BCHE* and *ACHE* genes available in the GenBank, referring to the human species and to nine other species were used for the analyses of some aspects of evolution. The individuals with low BChE activity presented: 1) Frequency of $18.58\% \pm 2.59\%$ of the *-116A* variant, almost the double of that found in the general population, evidencing its relation with decreased BChE activity; 2) The [*-116G; 209A; 1615G*] with $67.05\% \pm 2.80\%$, [*-116A; 209A; 1615A*] with $15.44\% \pm 2.01\%$, [*-116G; 209A; 1615A*] with $11.73\% \pm 1.67\%$ and [*-116G; 209G; 1615A*] with $4.00\% \pm 0.84\%$ haplotypes are the more frequent ones. All Guarani from Mato Grosso do Sul presented the *-116G* usual allele. The linkage disequilibrium analyses and the interspecies comparisons allowed to determine the following chronological order of appearance of the more frequent haplotypes: 1° [*-116A; 209A; 344G; IVS3-14T; 1615G*], 2° [*-116G; 209A; 344G; IVS3-14T; 1615G*], 3° [*-116A; 209A; 344G; IVS3-14T; 1615A*], 4° [*-116G; 209A; 344G; IVS3-14T; 1615A*] and 5° [*-116G; 209G; 344G; IVS3-14T; 1615A*]. The coding region of the mature protein of the *BCHE* gene was much conserved in all the species and the ratios K_a/K_s allow to suggest that this region is under purifying selection, being the majority of differences with human BChE found in amino acids of the enzyme surface. The inter species comparisons of the *BCHE* and *ACHE* genes showed: 1) K_a/K_s ratios < 1 , characterizing the action of purifying selection on these two genes, probably more intense in the case of the *ACHE* gene; 2) C+G content significantly greater in the *ACHE* gene, being more evident in the third codon position. These two facts corroborate the hypothesis, presented above, concerning the greater selection pressure on the *ACHE* than on the *BCHE* gene.

1 INTRODUÇÃO

A butirilcolinesterase (BChE), também chamada de pseudocolinesterase, é uma enzima sérica, produzida no fígado, sendo encontrada em vários tecidos do organismo (KUTTY, 1980; CHATONNET e LOCKRIDGE, 1989). Há evidências de sua síntese ocorrer também nos adipócitos (ORES KOVIC e KUNEC-VAJIC, 1992; POPOVIC et al., 1998). Essa enzima tem como substratos conhecidos os ésteres de colina, e também se mostra eficiente em hidrolisar outros ésteres alifáticos que não contêm colina (HARRIS, 1980; BOECK et al., 2002).

O gene *BCHE* está localizado no braço longo do cromossomo 3 (3q26.1- q26.2), constituído por 64.559 pb do início do exon 1 até o sítio CA de poliadenilação, distribuídos em quatro exons, formados por 2.444 pares de bases (GenBank, NC 000003).

Devido à similaridade dos genes *BCHE* e *ACHE*, tem sido sugerido que eles surgiram por duplicação após o surgimento dos sistemas colinérgicos na linhagem dos deuterostômios.

O gene *BCHE* é de caráter polimórfico apresentando, até o momento, mais de sessenta e cinco variantes descritas, muitas das quais são raras e outras com frequência populacional $\geq 1\%$ (euro-brasileiros: *c.1615G>A* com 17,5%, *209A>G* com 1,8%, *c.765G>C* com 1,0%; MIKAMI, 2005).

A BChE é uma enzima alostérica que tem sido correlacionada com diversas vias de metabolismo e desenvolvimento do organismo, contudo sua função fisiológica ainda não está totalmente compreendida. Diversos estudos mostraram associação positiva entre o nível de atividade enzimática e o peso (KALOW e GUNN, 1959; SIMPSON, 1966; CUCUIANU et al., 1968; STUEBER-ODEBRECHT et al., 1985), e IMC (ALCÂNTARA et al., 2002; 2003a, b), o que leva a supor uma atuação da BChE no metabolismo de lípidos.

A atividade da BChE pode ser influenciada por diversos eventos: genéticos e ambientais. Entre os principais fatores genéticos, envolvidos na diminuição da atividade, estão as variantes do gene *BCHE*, podendo estar relacionadas com alterações de síntese, degradação acelerada das moléculas circulantes ou perda de afinidade pelos substratos. Entre outros fatores que levam à diminuição da atividade da BChE, citam-se: 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). Dentre os principais fatores que influenciam o aumento da atividade enzimática citam-se: fenótipo CHE2 C5+, produto da interação dos genes *BCHE* e *CHE2*; idade; sexo; obesidade; hiperlipoproteinemia; psoríase; hipertensão; alcoolismo; esquizofrenia (WHITTAKER, 1980).

Uma das principais complicações clínicas, observada em indivíduos com atividade baixa ou com variantes não usuais da BChE, ocorre durante a anestesia geral. 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 apnéia prolongada, que pode ser fatal, se não forem tomados os devidos cuidados (LEJUS et al., 1998).

No presente estudo foi analisada a variabilidade de partes do gene *BCHE*, em doadores de sangue de Curitiba com atividade baixa da BChE ($\leq 4,00$ KU/L), uma vez que MIKAMI (2005) observou que aproximadamente 79% das variações não usuais no exon 2, que representa a maior parte do gene da *BCHE*, foram em indivíduos nessa categoria de atividade. Além disso, foi examinada uma amostra da população indígena Guarani em relação ao exon 1 do gene *BCHE*.

A comparação de sítios específicos, de um determinado gene homólogo, em diversas espécies tem se mostrado uma ferramenta interessante para sugerir regiões importantes na regulação, funcionamento e estrutura do produto gênico. Além disso, o estudo das estruturas dos haplótipos permite fazer inferência sobre a origem evolutiva das mutações de um determinado gene e de sua distribuição nas populações. No presente estudo foram obtidas informações tanto sobre a estrutura dos haplótipos do gene *BCHE* associados com atividade baixa da BChE ($\leq 4,00$ KU/L), como também referentes a variações em sítios específicos, que apresentaram variação nos indivíduos do presente estudo e que foram comparados com os de outras nove espécies, buscando definir o quão conservados são esses sítios em outras espécies e o estado ancestral dos nucleotídeos e aminoácidos desses sítios. Também foram analisadas identidade de nucleotídeos e aminoácidos, taxas e padrões de substituição, uso dos códons e tipo de seleção através de seqüências interespecíficas de cDNA do gene *BCHE* em dez espécies, bem como o cDNA do gene *ACHE* com intuito de esclarecer como esse gene tem evoluído.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Colinesterases

As colinesterases correspondem a uma classe de enzimas ubíquas, que atuam nas vias colinérgicas, sendo representadas por duas subclasses enzimáticas: a acetilcolinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) e a butirilcolinesterase (BChE, EC 3.1.1.8). A acetilcolinesterase, denominada de esterase verdadeira ou específica, é responsável por catalisar a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina na membrana pós-sináptica na junção neuromuscular. É encontrada também em eritrócitos e no sistema nervoso. A butirilcolinesterase, chamada de colinesterase do soro, pseudocolinesterase, colinesterase não específica ou colinesterase do tipo S é uma enzima sérica, 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). Além da acetilcolina, a BChE também hidrolisa outros ésteres de colina como a butirilcolina, os relaxantes musculares succinilcolina, mivacúrio, ésteres alifáticos que não contêm colina, como o ácido acetilsalicílico e muitas drogas como a cocaína e a procaína (HARRIS, 1980; BOECK et al., 2002).

Produtos de genes distintos dão origem a AChE e a BChE. Em humanos, o gene *ACHE* está situado no braço longo do cromossomo 7 (7q22) e o gene *BCHE*, no braço longo do cromossomo 3 (3q26.1- q26.2). Comparações entre as duas colinesterases indicam que suas seqüências codificantes encontram-se altamente conservadas em vertebrados, indicando que esses 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).

2.2 Estrutura da BChE

No plasma, a BChE ocorre predominantemente como um tetrâmero, formado por dímero de dímeros. Na formação de cada dímero, os monômeros estão ligados por pontes de dissulfeto e, ao formar o tetrâmero, os dímeros ligam-se entre si por ligações não

covalentes. Outras formas moleculares, como monômeros e dímeros, também estão presentes no plasma em menores proporções. Os monômeros são constituídos de 574 aminoácidos e nove cadeias de carboidratos, com peso molecular aproximado de 85 kDa (LOCKRIDGE et al., 1987a,b).

Análise da BChE do soro ou plasma estocado, após eletroforese em gel de poliacrilamida, revela 12 bandas, das quais oito provavelmente representam formas heterólogas nas quais a BChE se liga a outras substâncias como a albumina, a α 2-macroglobulina, a transferrina e outras moléculas ainda não identificadas (JUUL, 1968; ALCÂNTARA et al., 1999; ALCÂNTARA, 2000). Após eletroforese bi-dimensional, em papel filtro e em gel de amido (pH 8,6), observam-se cinco bandas, que correspondem às cinco formas moleculares principais da BChE: monômero (C_1), dímero (C_3), tetrâmero (C_4), monômero ligado à albumina sérica (C_2) e tetrâmero ligado a uma substância ainda não identificada (C_5), condicionada pelo gene *CHE2* (HARRIS et al., 1962; MASSON, 1989). Uma nova banda eletroforética ($C_{4/5}$) foi descrita por SOUZA et al. (1995), cuja mobilidade é semelhante à da banda C_5 , em gel de ágar com pH 5,3, e corresponde à mobilidade da banda C_4 , em gel de ágar com pH 6,7. Atualmente, também se usa outra nomenclatura utilizando as letras G e A para denominar as formas globulares e assimétricas da BChE, respectivamente. Por exemplo: G1, G2, G3, G4, referem se aos monômeros, dímeros, trímeros (decorrentes de degradação) e tetrâmeros (MASSOULIÉ e BON, 1982; PERRIER et al., 2002). No caso da forma heteróloga C_2 , usa-se G1-ALB, evidenciando o monômero ligado à albumina (KREJCI et al., 1997).

A estrutura cristalográfica da BChE foi descrita por NACHON et al. (2002) a partir de uma BChE humana recombinante, uma vez que o homotetrâmero é altamente glicosilado e os grupamentos de açúcar, de modo geral, perturbam a cristalização. Essa enzima recombinante teve quatro dos nove sítios de N-glicosilação removidos (resíduos 17, 455, 481 e 486) e seu domínio de oligomerização deletado. Na Figura 1 pode ser visualizada a estrutura tridimensional da BChE.

A BChE possui seu sítio ativo em forma de garganta composto por aproximadamente 55 aminoácidos (Figura 2). O sítio aniônico periférico (PAS), localizado na boca da garganta, é formado pelos aminoácidos D70 (ácido aspártico) e Y332 (tirosina) os quais estão envolvidos na ligação inicial de substratos carregados positivamente. O

aminoácido D70 forma uma alça ômega (Ω) com W82 (triptofano), componente do sub-sítio de ligação do sítio ativo (MASSON et al., 2001). A cavidade oxaniônica 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).

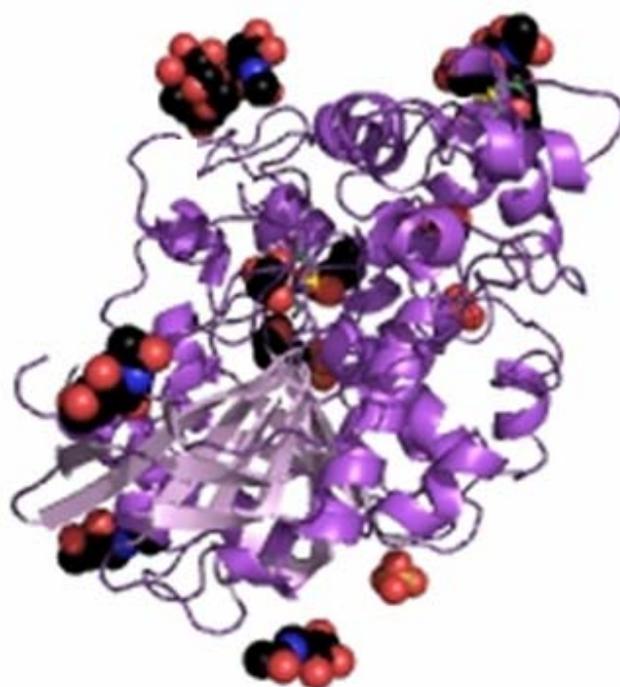


Figura 1. Modelo tridimensional da BChE humana. As estruturas  representam as nove cadeias de carboidratos ligadas a BChE.

FONTE: ESTHER Database, 2006.

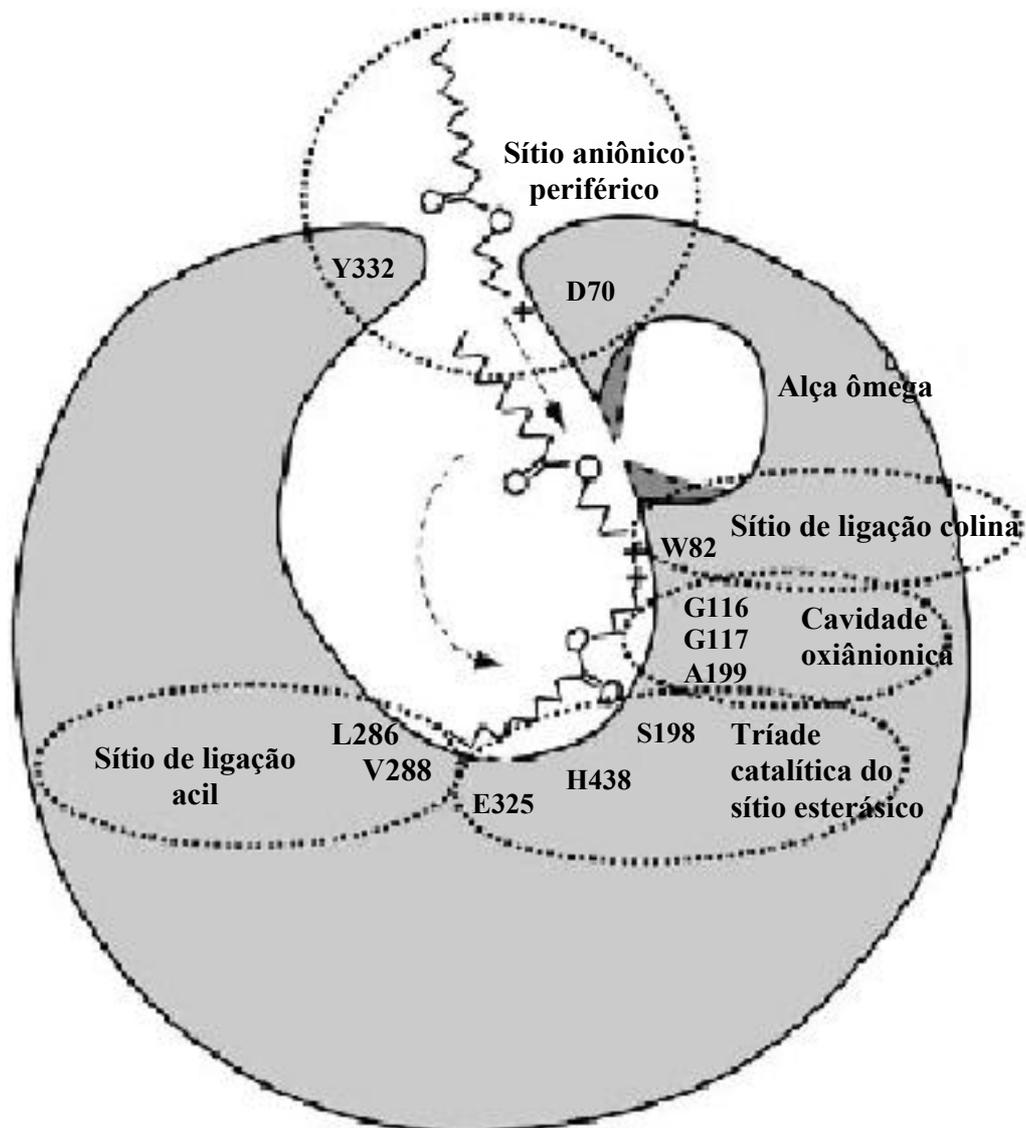


Figura 2. Estrutura esquemática do sítio ativo do monômero da butirilcolinesterase.
 FONTE: ÇOKUĞRAŞ, 2003.

MASSON et al. (1997) propuseram o mecanismo de ativação e hidrólise utilizado pela BChE (Figura 2). A ativação do substrato da BChE envolve diversos domínios na entrada do sítio ativo da enzima, incluindo o sítio aniônico periférico (D70 e Y332), o subsítio de ligação do sítio ativo (W82 e A328), o resíduo E197 e o resíduo N83 da alça ômega. Substratos carregados positivamente, em baixas concentrações, induzem a formação de três complexos enzima-substrato. O primeiro complexo (ES₁) é formado quando o substrato liga-se de modo transitório ao D70 no sítio aniônico periférico (PAS). Esse processo desencadeia uma mudança de conformação no monômero, fazendo com que os dois braços flexíveis da alça ômega se aproximem um do outro e o substrato deslize para o resíduo W82, formando o complexo (ES₂). Os aminoácidos da cavidade oxianiónica auxiliam na rotação do substrato da posição vertical para posição horizontal ideal para a hidrólise feita pela S198 e ligação de sua porção acil no sítio de ligação acil, caracterizando o terceiro complexo (ES₃). O processo de hidrólise ocorre quando o anel imidazol da H438 transmite elétrons de E325 para S198 e a hidroxila da S198 se torna nucleofílica. Ataques nucleofílicos dessa hidroxila nas pontes de ésteres do substrato liberam a porção colina do substrato e a enzima fica temporariamente acilada. Em seguida, o grupo acil é hidrolisado pela S198 por um ataque nucleofílico de uma molécula de água ativada por receber um próton da H438 e o substrato é então liberado da enzima.

2.3 Estrutura do gene *BCHE*

YANG et al. (1984) atribuíram o gene da transferrina (*TF*) ao cromossomo 3. A ligação entre o loco *BCHE* e *TF* já havia sido demonstrada por ROBSON et al. (1966). O gene *BCHE* foi atribuído ao braço longo do cromossomo 3 (3q26.1-q26.2; SOREQ et al., 1987; ALLDERDICE et al., 1991; GAUGHAN et al., 1991) e sua estrutura de 4 exons e seqüência de nucleotídeos foram estabelecidos por ARPAGAUS et al. (1990). O gene *BCHE* apresenta uma única cópia, sendo constituído por 64.559 pb desde início do exon 1 até o sítio CA de poliadenilação. O exon 1 é formado por 149 pb. O exon 2 possui 1525 pb, codifica o peptídeo líder e contém cerca de 83% da seqüência codificadora da proteína madura, incluindo a extremidade N-terminal e o sítio ativo. O exon 3 tem 167 pb e o exon 4 tem 603 pb, codificando a extremidade C-terminal da proteína e possuindo a região 3' UTR, que contém dois sinais funcionais de poliadenilação (Figura 3).

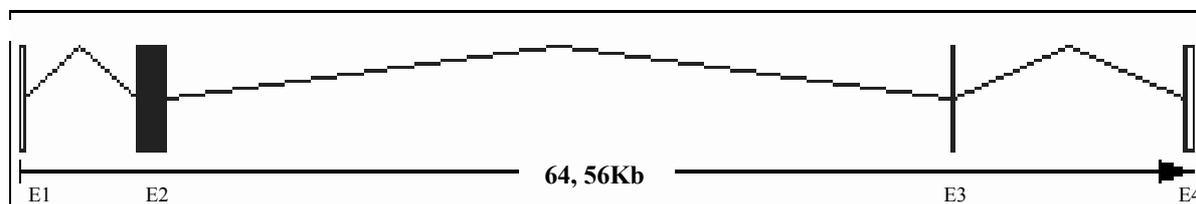


Figura 3. Desenho esquemático do gene *BCHE*, mostrando os quatro exons (E1, E2, E3 e E4) e os três introns. As estruturas  representam as regiões UTR e as estruturas  representam as regiões traduzidas.

O promotor do gene *BCHE* é composto por 66% de A e T, não possui elemento TATA ou CAAT, não é rico em GC, sendo que o gene é expresso constitutivamente, apenas regulado durante a diferenciação e o desenvolvimento do organismo. O elemento iniciador do gene *BCHE* tem sido caracterizado como uma seqüência rica em pirimidinas (5'Pi-PiC*APiPiPiPi*-3') onde A é o sítio de início de transcrição. Foram identificados alguns elementos reguladores na região a montante ao início de transcrição, para AP1 (fator de transcrição codificado por genes das subfamílias Fos e Jun) na posição -71, duas seqüências de ligação de Oct-1 (proteína ligante de octâmero) nas posições -403 e -494 e quatro sítios de ligação de topoisomerases em -235, -610, -851 e -1640. Ainda foram encontrados quatro elementos adicionais nas posições -2169, -2241, -2260, e -1380 contendo uma seqüência GGAAG/A (PEA3) que é similar aos locais de ligação para a classe de oncoproteínas Ets. A região flanqueadora 5' tem uma seqüência Alu de 333 pb a qual apresenta uma seqüência repetida direta de sete nucleotídeos (CCTTTTC), em ambas as extremidades (JBILO et al., 1994).

2.4 Nomenclatura

DEN DUNNEN e ANTONARAKIS (2000, 2001) sugerem um sistema de nomenclatura para a descrição de mudanças em seqüências de DNA, RNA e proteínas. Esse sistema tem sido amplamente aceito e estimulado a ser usado com intuito de uniformizar e evitar equívocos na descrição de alterações nas seqüências.

No presente estudo a nomenclatura segue de acordo com as considerações a seguir:

- **Seqüência de referência:** a descrição das variações do gene *BCHE* estão baseadas na seqüência de referência NM 000055 do GenBank (www.ncbi.org)
- **Discriminação entre os tipos de seqüências:**
 - A letra “c” antecedendo a alteração na seqüência indica descrição da variação baseada na seqüência de cDNA (Exemplo: *c.76A>T*)
 - A letra “p” antecedendo a alteração na seqüência indica descrição da variação baseada na seqüência de aminoácidos- proteína (Exemplo *p.K76A*)
- **Ao nível do DNA**
 - Nucleotídeos são designados pelas bases: A (adenina), C (citosina), G (guanina) e T (timina);
 - Numeração dos nucleotídeos: nucleotídeo +1 é a Guanina do códon do primeiro aminoácido traduzido da BChE (GAA), uma vez que essa numeração é utilizada por todos os grupos que estudam o gene *BCHE*;
 - Em região não codificadora: o nucleotídeo 5’ ao primeiro aminoácido traduzido da BChE é -1; o primeiro nucleotídeo 3’ ao códon de término de tradução é *1.
 - Em nucleotídeos intrônicos:
 - no início do íntron: *IVS* o número do íntron, um sinal de mais, e a posição no íntron (*IVS1+1G*);
 - no final do íntron: *IVS* o número do íntron, um sinal de menos, e a posição a montante no íntron (*IVS2-3T*).
- **Discriminação entre as seqüências variantes:**
 - Variantes usuais: correspondem às encontradas em cada sítio da seqüência de referência (exemplo: *c.76A*)

- Variantes não usuais: correspondem às alterações encontradas em relação à sequência de referência, obedecendo a descrição a seguir:
- Descrição de mudança de nucleotídeo:
 - Substituição: designada pelo caractere “>”;
 - *71C>T* denota que, no nucleotídeo 71, uma C é substituída por uma T;
 - *IVS2-8T>G* denota que a T foi substituída pela G no nucleotídeo – 8 do íntron 2.
 - Deleção: designada por “del” depois do nucleotídeo que flanqueia o sitio da deleção;
 - *9_11delATC* denota deleção ATC do nucleotídeo 9 ao 11;
 - Inserção: designada por “ins” depois do nucleotídeo flanqueando o sitio de inserção, seguido pelo nucleotídeo inserido;
 - *1062_1076insALU* denota que uma sequência ALU foi inserida entre os nucleotídeos 1062 e 1076.

Exemplos de genótipos:

- *209AA* denota homocigoto;
 - *209AG* denota heterocigoto.
- Haplótipos:
 - [*-116A; 209A; 1615G; *189A*] denota que no sitio -116 o haplótipo possui adenina, no sitio 209 apresenta adenina, no sitio 1615 uma guanina e no sitio *189 uma adenina.
 - **Ao nível de proteína:**
 - Códon de término designados por X;
 - Numeração dos aminoácidos: o primeiro aminoácido do início da tradução (ácido glutâmico) é numerado +1, como utilizada por todos os grupos que estudam o gene *BCHE*.

- Descrição de mudança de aminoácido:
 - Substituição:
 - Sentido trocado (missense): *T24M* denota que o aminoácido 24 (Treonina, T) é substituído por uma metionina (M);
 - Sem sentido (nonsense): *Q119X* denota que o aminoácido 119 (Glutamina, Q) foi substituído por um códon de término (X);
 - Mudança na matriz de leitura: designada por “fs” após o primeiro aminoácido afetado pela mudança;
 - *N106fs* mudança na matriz de leitura a partir do aminoácido 106 (Asparagina, N).

2.5 Variabilidade do gene *BCHE*

No gene *BCHE* já foram descritas mais de sessenta e cinco mutações (Tabela 1).

Atualmente, a identificação das variantes é efetuada por análise do DNA, 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 seqüenciamento de DNA.

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

A expressão das mutações pode ser verificada através de mutagênese sítio dirigida, usando-se um plasmídeo como vetor e posterior transfecção em células do epitélio renal humano (293T) ou células de ovário de hamster chinês (CHO) seguida de medida de atividade da BChE em espectrofotometria, segundo método de Ellman (LIU et al., 2002; MIKAMI, 2005).

Tabela 1. Variantes do gene *BCHE*^a

Nível de DNA ^b	Nível de Proteína ^c	Referência
<i>Exon 1</i>		
<i>c.-116G>A</i>		Bartels et al. (1990)
<i>Exon 2</i>		
<i>c.9_11delCAT</i>	<i>p.I4del</i>	Maekawa et al. (1997)
<i>c.16delA</i>	<i>p.I6fs</i>	Bartels et al. (1992b) Primo-Parmo et al. (1996)
<i>c.35^a>G</i>	<i>p.K12R</i>	Mikami et al. (2005)
<i>c.45G>C</i>	<i>p.G15G</i>	Mikami et al. (2005)
<i>c.71C>T</i>	<i>p.T24M</i>	Maekawa et al. (1997)
<i>c.82T>A</i>	<i>p.F28I</i>	Yen et al. (2003)
<i>c.98^a>G</i>	<i>p.Y33C</i>	Primo-Parmo et al. (1996)
<i>c.109C>T</i>	<i>p.P37S</i>	Primo-Parmo et al. (1996)
<i>c.208G>C</i>	<i>p.D70H</i>	Boeck et al. (2002)
<i>c.209^a>G</i>	<i>p.D70G (A)</i>	McGuire et al. (1989)
<i>c.223G>C</i>	<i>p.G75R</i>	Souza et al. (2005)
<i>c.270^a>C</i>	<i>p.E90D</i>	Souza et al. (2005)
<i>c.286^a>T</i>	<i>p.N96Y</i>	Yen et al. (2003)
<i>c.297T>G</i>	<i>p.I99M</i>	Souza et al. (2005)
<i>c.298C>T</i>	<i>p.P100S</i>	Maekawa et al. (1997) Takagi et al. (1997); Lu et al. (1997)
<i>c.318_319insA</i>	<i>p.N106fs</i>	Yen et al. (2003); On-Kei Chan et al. (2005)
<i>c.344G>A</i>	<i>p.G115D</i>	Primo-Parmo et al. (1997)
<i>c.351_353insAG</i>	<i>p.G117fs</i>	Nogueira et al. (1990)
<i>c.355C>T</i>	<i>p.Q119X</i>	Sudo et al. (1996)
<i>c.375A>T</i>	<i>p.L125F</i>	Primo-Parmo et al. (1996)
<i>c.383^a>G</i>	<i>p.Y128C</i>	Hidaka et al. (1997a)
<i>c.424G>A</i>	<i>p.V142M (H)</i>	Jensen et al. (1992)
<i>c.486T>C</i>	<i>p.A162A</i>	Souza et al. (2005)
<i>c.510T>G</i>	<i>p.D170E</i>	Primo-Parmo et al. (1996)
<i>c.514C>T</i>	<i>p.Q172X</i>	Gätke et al. (2001)

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

Nível de DNA ^b	Nível de Proteína ^c	Referência
<i>c.551C>T</i>	<i>p.A184V (SC)</i>	Greenberg et al. (1995)
<i>c.592A>G</i>	<i>p.S198G</i>	Primo-Parmo et al. (1996)
<i>c.596G>T</i>	<i>p.A199V</i>	Sakamoto et al. (1998)
<i>c.601G>A</i>	<i>p.A201T</i>	Primo-Parmo et al. (1996)
<i>c.607 T>C</i>	<i>p.S203P</i>	Hidaka et al. (2001)
<i>c.728C>T</i>	<i>p.T243M (F-1)</i>	Nogueira et al. (1992)
<i>c.748A>C</i>	<i>p.T250P</i>	Maekawa et al. (1995)
<i>c.765G>C</i>	<i>p.E255D</i>	Primo-Parmo et al. (1996)
<i>c.800A>G</i>	<i>p.K267R</i>	Maekawa et al. (1997)
<i>c.811G>T</i>	<i>p.E271X</i>	Primo-Parmo et al. (1996)
<i>c.880G>A</i>	<i>p.V294M</i>	Mikami et al. (2005)
<i>c.920T>C</i>	<i>p.L307P</i>	Manoharan et al. (2006)
<i>c.943_943insA</i>	<i>p.T315fs</i>	Hidaka et al. (1992)
<i>c.943A>T</i>	<i>p.T315S</i>	Liu et al. (2002)
<i>c.988T>A</i>	<i>p.L330I</i>	Sudo et al. (1997)
<i>c.997G>T</i>	<i>p.G333C</i>	Mikami et al. (2004)
<i>c.1062_1076insALU</i>	<i>p.K355insALU</i>	Muratani et al. (1991); Maekawa et al. (2004)
<i>c.1093G>C</i>	<i>p.G365R</i>	Hada et al. (1992); Hidaka et al. (1992)
<i>c.1156C>T</i>	<i>p.R386C</i>	Yen et al. (2003)
<i>c.1169G>T</i>	<i>p.G390V (F-2)</i>	Nogueira et al. (1992)
<i>c.1200C>A</i>	<i>p.C400X</i>	Hidaka et al. (1997b)
<i>c.1253T>C</i>	<i>p.F418S</i>	Maekawa et al. (1995)
<i>c.1270C>T</i>	<i>p.R424X</i>	Yen et al. (2003)
<i>c.1273T>C</i>	<i>p.S425P</i>	Gnatt et al. (1990)
<i>c.1294G>T</i>	<i>p.E432X</i>	Levano et al. (2005)
<i>c.1303G>A</i>	<i>p.G435R</i>	Dey et al. (1997)
<i>c.1336T>G</i>	<i>p.F446V</i>	Dey et al. (1998)

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

Nível de DNA ^b	Nível de Proteína ^c	Referência
<i>c.1351G>T</i>	<i>p.E451X</i>	Dey et al. (1998)
<i>c.1378G>A</i>	<i>p.E460K</i>	Yen et al. (2003)
<i>c.1393A>T</i>	<i>p.R465X</i>	Maekawa et al. (1995)
<i>c.1408C>T</i>	<i>p.R470W</i>	Mikami et al. (2004)
<i>c.1411T>C</i>	<i>p.W471R</i>	Primo-Parmo et al. (1996)
<i>c.1420T>C</i>	<i>p.F474L</i>	On-Kei Chan et al. (2005)
<i>Intron 2</i>		
<i>c.IVS2-8T>G</i>		Primo-Parmo et al. (1996)
<i>Exon 3</i>		
<i>c.1490A>T</i>	<i>p.E497V (J)</i>	Bartels et al. (1992a)
<i>c.1500T>A</i>	<i>p.Y500X</i>	Bartels et al. (1992b); Primo-Parmo et al. (1996)
<i>c.1543C>T</i>	<i>p.R515C</i>	Maekawa et al. (1995)
<i>c.1553A>T</i>	<i>p.Q518L</i>	Primo-Parmo et al. (1996)
<i>Intron 3</i>		
<i>c.IVS3-14T>C</i>		Parmo-Folloni et al. (no prelo)
<i>Exon 4</i>		
<i>c.1615G>A</i>	<i>p.A539T (K)</i>	Bartels et al. (1992b)
<i>c.1719_1720delT</i>	<i>p.L574fsX576</i>	Parmo-Folloni et al. (no prelo)
<i>c.*189 A>G</i>		Bartels et al. (1990)

FONTE: ^aCHAUTARD-FREIRE-MAIA e SOUZA (no prelo); ^bGlu 1 é o amino ácido N-terminal da BChE madura e o nt 1 corresponde ao primeiro nucleotídeo no códon para Glu 1; ^c Nome trivial entre parênteses.

2.5.1 Variantes não usuais mais freqüentes do gene *BCHE*

A maior parte das mutações descritas no gene *BCHE* se encontra no exon 2, como pode ser constatado na tabela 1, sendo que 92% das mutações descritas para esse gene apresentam freqüência populacional menor que 1%. A figura 4 mostra a posição no gene das variantes mais freqüentes da BChE.

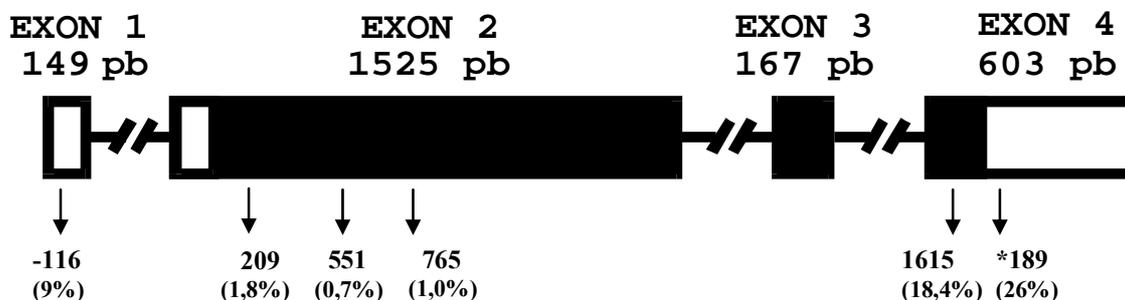


Figura 4. Desenho esquemático do gene *BCHE*, mostrando os quatro exons e o número de pares de bases que os compõem. A região escura corresponde à proteína madura. A parte clara do exon 2 codifica o peptídeo sinal. As flexas indicam o posicionamento das variantes mais frequentes do gene *BCHE* e, entre parênteses, encontra-se a frequência alélica menos frequente.

2.5.1.1 Variante não usual *c.*189A>G*

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).

2.5.1.2 Variante não usual *c.1615G>A (p.A539T)*

A variação é decorrente de uma mutação de ponto no nucleotídeo 1615 do exon 4, levando à alteração do aminoácido alanina (GCA) 539 para treonina (ACA) (BARTELS et al., 1992a). A enzima variante, conhecida como K, foi originalmente associada a uma redução em 33% na atividade, quando comparada com a da BChE usual, podendo essa redução ser devida a menor síntese da enzima ou à aceleração na degradação desta (RUBINSTEIN et al., 1978). Porém, ALTAMIRANO et al. (2000) estudaram a variante K, expressa em células CHO após mutagênese sítio dirigida, e verificaram que é semelhante à enzima usual quanto à atividade, renovação de proteína celular (*turnover*) e formação de tetrâmeros.

A variante *1615G>A* apresentou frequência alélica de 12,8% em caucasóides norte-americanos (BARTELS et al., 1992b), 19,6% em escoceses (GAFFNEY e CAMPBELL, 1994), 17,5% em japoneses (SHIBUTA et al., 1994; IZUMI et al., 1994) e 18% em dinamarqueses (JENSEN et al., 1996). A população euro-brasileira possui 18,4% e a afro-brasileira 17,1% (SOUZA et al., 1998) desta variante não usual.

2.5.1.3 Variante não usual *c.-116G>A*

Esta mutação ocorre no exon 1 na posição -116, região transcrita mas não traduzida do gene. 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*.

2.5.1.4 Variante não usual *c.209A>G* (*p.D70G*)

É resultante de uma mutação de ponto no exon 2, nucleotídeo 209, causando a substituição do ácido aspártico 70 (GAT) por glicina (GGT) (McGUIRE et al., 1989). É conhecida como variante atípica (A), pois foi a primeira variante genética identificada em pacientes que apresentam apnéia prolongada, após serem submetidos a doses fisiológicas de succinilcolina (KALLOW e GENEST, 1957). A variante *209A>G* é incapaz de hidrolisar os relaxantes musculares succinilcolina e mivacúrio, pois a mutação afeta um aminoácido importante na constituição do sítio aniônico periférico (MASSON et al., 1997).

A frequência da variante não usual *c.209A>G* na população européia foi estimada em 1,7% por McGUIRE et al. (1989). Na população do sul do Brasil, essa estimativa foi de 1,8% a partir de dados de análise do DNA (MIKAMI, 2005).

A mutação *209A>G* encontra-se em desequilíbrio de ligação com *1615G>A*, sendo que na população de Curitiba o valor de D' corresponde a 90% (MIKAMI, 2005).

2.5.1.5 Variante não usual *c.765G>C* (*p.E255D*)

Caracterizada por uma mutação de ponto no exon 2, nucleotídeo 765 (PRIMO-PARMO et al., 1996), alterando o ácido glutâmico (GAG) para ácido aspártico (GAC). 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. A autora estimou a frequência populacional 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).

2.5.1.6 Variante não usual $c.551C>T$ ($p.A184V$)

Apresenta-se como uma mutação de ponto no nucleotídeo 551, no exon 2, causando uma alteração na alanina (GCC) 184 para valina (GTC). Também chamada de resistente à succinilcolina (SC). Sua descrição inicial (GREENBERG et al., 1995) foi 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. Sua frequência na população de Curitiba está estimada em 0,7% (MIKAMI, 2005). Não há estudos referentes à frequência dessa mutação em outras populações.

2.5.2 Variantes silenciosas

Têm sido descritas diversas enzimas variantes com atividade reduzida em mais de 90%, em relação à atividade da enzima usual. Assim, várias variantes (Tabela 1) determinantes desse tipo de enzima foram identificadas por análise de DNA, levando a substituição de aminoácidos, alterações na matriz de leitura e formação de códons de terminação. A frequência geral do fenótipo silencioso é estimada em 1 em 100.000 indivíduos.

2.6 Atuação fisiológica da BChE

2.6.1 Atuação nas vias colinérgicas

MESULAM et al. (2002), em estudo realizado em ratos nulizigotos onde o gene da AChE foi desativado, observaram que a BChE passou a modular a transmissão colinérgica, substituindo a AChE nas junções neuromusculares e hidrolisando a acetilcolina. Os autores sugerem que a BChE não apenas funciona como um recurso de segurança, evitando a morte do animal por hiperativação das vias colinérgicas, mas também pode estar normalmente contribuindo para o processo de transmissão das vias colinérgicas.

2.6.2 Metabolismo de lípidos, peso e IMC

Um aumento na atividade da BChE é usualmente observado em condições associadas com o metabolismo anormal de lípidos como na hiperlipoproteinemia, caracterizada pelo aumento na síntese de triglicérides e/ou colesterol e excesso de ácidos graxos derivados do metabolismo de carboidratos, obesidade e diabetes (KUTTY, 1980).

Existe uma correlação positiva entre a atividade da BChE e as concentrações de triglicérides e apolipoproteína B, a qual está presente nas partículas LDL e VLDL (CROOK et al., 1994; LEJUS et al., 1998).

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) significativamente menor ($p < 0,02$ em ambos os casos) do que 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. Esses dados podem ser explicados pela ação que a BChE exerce sobre a grelina, peptídeo endógeno ligante do receptor secretagogo (estimulador de secreção) do hormônio do crescimento, quando em sua forma n-octanoilada na serina 3 (HOSODA et al., 2000). Nessa condição, a grelina é capaz de condicionar aumento de peso, hiperfagia e redução na utilização de gorduras, em roedores (TSCHÖP et al., 2000). No soro humano, DE VRIESE et al. (2004) mostraram que a BChE está envolvida na desoctanoilação da grelina. Assim, espera-se que pessoas com fenótipo CHE2 C5+, associado com maior atividade da BChE, sejam menos susceptíveis ao aumento do peso.

2.6.3 Ciclo celular - desenvolvimento embrionário e tumorigênese

O envolvimento das colinesterases na regulação dos processos de diferenciação e proliferação celular tem sido relatado em alguns trabalhos. LAYER e SPORNS (1987), em estudo realizado com cérebro e retina de galinha, observaram que a expressão da BChE e da AChE eram correguladas. A BChE apresenta atividade mais elevada durante as primeiras mitoses do desenvolvimento celular enquanto as células apresentam-se indiferenciadas, podendo estar relacionada com a proliferação celular. A AChE aumenta sua atividade durante os primeiros sinais de diferenciação do tubo neural, podendo estar

envolvida no processo de diferenciação celular. MARK e ROBITZKI (2000) sugerem que alterações na expressão da BChE afetam a modulação da proliferação e diferenciação celular, assim como os eventos de apoptose durante o processo de neurogênese em aves.

O gene *BCHE* é um dos poucos exemplos de genes que são ativados durante o processo de imortalização celular. Tem-se detectado por análise de DNA e de RNAm que vários tipos de tumores apresentam o gene *BCHE* amplificado ou com outro tipo de mutação, podendo se expressar anormalmente ou não. Além disso, linhagens celulares permanentes transformadas são caracterizadas por apresentarem anomalias cromossômicas na região (3q26.1-q26.2) do gene *BCHE*, que poderiam ser responsáveis pelo aumento na expressão da BChE (SOREQ e ZAKUT, 1990; SOREQ et al., 1991; SÁEZ-VALERO et al., 1996).

2.7 Butirilcolinesterase e xenobióticos

2.7.1 Organofosforados

A BChE e a AChE são inibidas por organofosforados e carbamatos usados como pesticidas. A toxicidade aguda provocada pelos organofosforados usualmente é atribuída à inibição irreversível da acetilcolinesterase. Como resultado ocorre um aumento nas concentrações de acetilcolina nas sinapses colinérgicas do sistema nervoso periférico e central. Este quadro pode desencadear uma crise colinérgica caracterizada por secreções salivares, constrictões bronquiais, bradicardia, enfraquecimento muscular, convulsões, culminando em morte por falha no sistema respiratório (MARTINEZ, 1992).

Alguns estudos revelaram que a BChE confere uma proteção natural contra os organofosforados. A BChE liga-se rapidamente ao organofosforado de maneira irreversível em uma taxa estequiométrica de molaridade de 1:1, inativando o organofosforado e impedindo que este atinja o sítio alvo, que é a acetilcolinesterase nas vias sinápticas nervosas (BROOMFIELD et al., 1991).

Variantes da BChE podem influenciar na eficiência de ação contra os organofosforados. Indivíduos que apresentam fenótipo CHE2 C5- mostraram-se mais susceptíveis à intoxicação por pesticidas do que indivíduos com fenótipo CHE2 C5+ (FONTOURA-DA-SILVA e CHAUTARD-FREIRE-MAIA, 1996). Patologias que

reduzem a atividade enzimática também podem promover um aumento na susceptibilidade aos pesticidas.

2.7.2 Succinilcolina e mivacúrio

A succinilcolina é um medicamento utilizado durante a anestesia geral para causar relaxamento muscular. Foi introduzida na prática médica em 1951 na Suíça e Áustria (BOVET e BOVET-NITTI, 1959) e, a despeito de seus efeitos colaterais, como a hipertermia maligna e apnéia prolongada, continua sendo empregada até os dias de hoje (ALMEIDA, 2002; ALMEIDA, 2004). Normalmente, os efeitos da succinilcolina duram apenas alguns minutos, pois cerca de 90% do medicamento é hidrolisado pela BChE. Para poder manter o relaxamento muscular é necessário injetar continuamente, através de infusão, o composto ao sangue (SUAREZ-KURTZ, 2004). De maneira geral, o bloqueio muscular é inversamente proporcional à atividade da BChE. Em indivíduos com a atividade normal, o relaxante é hidrolisado entre 5 a 10 minutos. Em indivíduos que apresentam alterações na atividade observa-se um aumento no tempo de hidrólise. Em pacientes homocigotos *209GG* a hidrólise pode levar de 90 a 180 minutos e, em casos mais extremos, pode atingir até 245 minutos e em homocigotos *551TT (V184)*, o período de apnéia foi descrito como de 330 minutos (LEJUS et al., 1998). ALMEIDA (2004) constatou que a succinilcolina é o terceiro bloqueador neuromuscular mais utilizado no Brasil (figura 5A) e que um número expressivo de anesthesiologistas brasileiros usa a succinilcolina em casos de indução rápida e em crianças (80 e 25%, respectivamente) como pode ser observado na figura 5B.

Mivacúrio também é utilizado durante o procedimento cirúrgico como relaxante muscular, agindo nas junções neuromusculares e, portanto, sendo análogo à succinilcolina. A relação da BChE com o mivacúrio é menos clara. Porém, há indicações de que algumas variantes do gene *BCHE* têm dificuldade em hidrolisar mivacúrio. Indivíduos homocigotos *209GG* levam de 75 a 480 minutos para hidrolisar esse relaxante, dependendo da dose administrada: 0,075 mg/kg a 0,2 mg/kg, respectivamente (LEJUS et al., 1998).

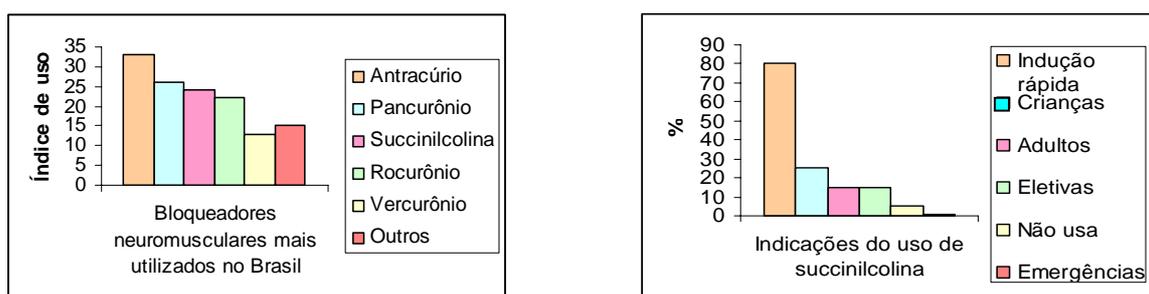


Figura 05. A) Bloqueadores neuromusculares mais utilizados no Brasil; B) Indicações do uso de succinilcolina.

FONTE: ALMEIDA, 2004.

Aparentemente, apenas deficiências acima de 50% modificam significativamente o metabolismo da succinilcolina e do mivacúrio pela BChE. Estudos com 225 pacientes com susceptibilidade a succinilcolina revelaram que 14% destes indivíduos apresentavam alterações genéticas na BChE, os demais pacientes apresentavam algum tipo de patologia que diminuía a atividade da BChE (VIBY-MOGENSEN e HANEL, 1978).

2.8 Fatores que influenciam na atividade da *BChE*

Observou-se que diversos fatores e patologias podem influenciar na atividade da BChE (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2. Alguns fatores que influenciam no acréscimo da atividade da Butirilcolinesterase.

Tipo	Condição
Oligogênico	Fenótipo CHE2 C5+
Multifatorial	Obesidade Hiperlipoproteinemia Psoríase Hipertensão Tirotoxicose Nefrose Alcoolismo Esquizofrenia

FONTE: WHITTAKER, 1980.

Tabela 3. Alguns fatores que influenciam no decréscimo da atividade da Butirilcolinesterase.

Fatores
Variantes do gene <i>BCHE</i>
Último trimestre de gravidez
Período peri-natal e infância
Doenças hepáticas (hepatite aguda, crônica, cirrose, metástases hepáticas)
Infarto do miocárdio
Doenças do colágeno (distrofia muscular progressiva, miotonia congênita, dermatomiosite)
Hiperpirexia
Tuberculose
Infecção aguda
Carcinoma
Choque cirúrgico
Anemia crônica
Má nutrição
Mixoeidema
Terapia por raios-X
Drogas anticâncer
Pílula anticoncepciva
Organofosforados

FONTE: WHITTAKER, 1980.

2.8.1 Variantes da BChE e fenótipo CHE2 C5+

Como descrito anteriormente, modificações na estrutura da BChE, devidas a alterações nas seqüências de aminoácidos, podem levar à diminuição ou ao acréscimo na capacidade da enzima em reconhecer e hidrolisar seus substratos, bem como podem promover alterações quantitativas graves, produzindo variantes silenciosas.

O loco *CHE2* é responsável pela síntese de uma proteína ainda não identificada, constituinte do complexo C₅. Apresenta os fenótipos CHE2 C5+ e CHE2 C5-, responsáveis pela presença e ausência do complexo C₅, respectivamente. O fenótipo CHE2 C5+ apresenta, em média, 25% a mais de atividade que o fenótipo CHE2 C5-. A freqüência do fenótipo CHE2 C5+ na população do sul do Brasil é de cerca de 10% (CHAUTARD-FREIRE-MAIA et al., 1991).

2.8.2 Idade

Mudanças na atividade da BChE têm sido observadas no decorrer da vida humana. Logo após o nascimento, a atividade é relativamente baixa e corresponde a 50% da atividade de um indivíduo adulto saudável. Entre três e seis anos de idade obtém-se um aumento de 30% na atividade, porém os níveis correspondentes aos de adultos só são atingidos durante a puberdade (WHITTAKER, 1980).

2.8.3 Hormônios

Em adultos a atividade da BChE é mais elevada em homens do que em mulheres devido a uma aparente modulação hormonal negativa desencadeada pelo estrógeno. Um decréscimo na atividade foi detectado após a décima semana de gravidez, o qual prossegue por dez dias a seis semanas após o parto. A média da atividade enzimática se reduz 25% durante a gravidez e 33% após o parto (WHITTAKER, 1980).

O uso de contraceptivos orais, cujo princípio ativo seja o estrógeno, provoca uma redução de 20% na atividade, por provável depressão da síntese hepática da BChE causada pela indução do hormônio esteróide (WHITTAKER, 1980).

2.8.4 Doenças hepáticas (hepatite viral, hepatite amebiana e cirrose)

A BChE é sintetizada no fígado, mas os níveis de atividade hepática são baixos, devido ao imediato transporte da enzima para o plasma. Assim, flutuações na atividade plasmática podem ser indicativas de que há uma alteração na taxa de síntese da BChE a qual pode ser desencadeada por doenças hepáticas.

Nos primeiros estágios de hepatite aguda observa-se uma pequena redução na atividade plasmática. Em caso de hepatite crônica e cirrose, a atividade apresenta-se muito reduzida. Em casos de fígado gorduroso (grande), a atividade geralmente mostra-se normal ou mais elevada (BROWN et al., 1981).

2.8.5 Estocagem

Amostras de sangue total, estocadas em banco de sangue por um período de vinte e um dias, a 4° C, retêm 87% da atividade plasmática inicial da BChE. O maior decréscimo na atividade ocorre durante os dois primeiros dias de estocagem e corresponde a 12 %, permanecendo praticamente estável durante as próximas três semanas. Essa queda parece estar relacionada à presença de eritrócitos, uma vez que quando o plasma é separado por centrifugação e estocado a 0°C, a atividade permanece constante por pelo menos cinco dias a várias semanas (EPSTEIN et al., 1980). O plasma pode ficar estocado a -20°C por vários anos, sem perda significativa da atividade enzimática.

MIKAMI (2005) observou que o tempo de estocagem a -20°C é responsável por uma queda de aproximadamente 0,02 KU/L na atividade, por mês. No trabalho de ALCÂNTARA (2000) a estocagem do plasma, de cerca de seis anos, pode ter sido responsável por um decréscimo de 29% na atividade média das amostras.

2.9 Aspectos evolutivos do gene *BCHE*

2.9.1 Origem por duplicação gênica

A AChE e a BChE apresentam respostas idênticas a diversos inibidores (LOCKRIDGE et al., 1987a), propriedades físico-químicas similares (CHATONNET e LOCKRIDGE, 1989), semelhanças imunológicas (GEORGE et al., 2001) e compartilham algumas atividades biológicas adicionais à hidrólise de ésteres de colina, como atividade de

aril-acilamidase amino-sensível, crescimento e diferenciação celular, divisão celular e tumorigênese, e interação célula-célula (BALASUBRAMANIAN e BHANUMATHY, 1993).

Comparações das seqüências de aminoácidos, disponíveis na época, da BChE humana (LOCKRIDGE et al., 1987a) e da AChE de raia (SCHUMACHER et al., 1986), mostraram cerca de 54% de identidade, enquanto que entre a BChE humana e a AChE de *Drosophila* (HALL e SPIERER, 1986) a identidade foi de 38%.

Análises filogenéticas da expressão da BChE e da AChE indicam que essas duas enzimas surgiram a partir de um precursor comum cuja função era hidrolisar a acetilcolina. Em *Drosophila*, um único gene de colinesterase codifica uma enzima que hidrolisa acetilcolina e é homóloga a AChE da raia *Torpedo californica* (HALL e SPIERER, 1986).

Comparações da estrutura do gene *BCHE* humano com a do gene *ACHE* de *Torpedo* e de *Drosophila* mostram que a posição dos íntrons 2 e 3 é a mesma. Em *Torpedo* foi observado um grande exon, que contém a maior porção da seqüência codificadora, e que equivale ao exon 2 em humanos. Essa grande similaridade entre as estruturas dos genes *BCHE* humano e *ACHE* de *Torpedo* sugere que AChE e BChE em vertebrados derivam de um gene ancestral comum. O gene de *Drosophila*, contudo, contém 7 exons na região em que os genes *ACHE* e *BCHE* de vertebrados contêm apenas um (ARPAGAUSS et al., 1990). Isso indica que a duplicação do gene ancestral, que deu origem aos genes *ACHE* e *BCHE*, ocorreu após o surgimento do sistema colinérgico na linhagem dos deuterostômios (CHATONNET e LOCKRIDGE, 1989; ARPAGAUSS et al., 1990). Contudo, as seqüências de regulação gênica desses dois genes diferem e resultam em expressões diferentes durante a diferenciação e desenvolvimento tecidual (GNATT et al., 1991; MASSOULIÉ et al., 1993).

2.9.2 Evolução de genes duplicados

OHNO (1970) formulou a hipótese de que após a duplicação gênica uma cópia do gene seria redundante e assim estaria livre da pressão seletiva e poderia tolerar melhor as novas mutações. Essa cópia poderia se tornar um pseudogene ou ocasionalmente poderia adquirir uma nova função. JENSEN (1976) formulou uma hipótese alternativa ao observar a ambigüidade de substratos de enzimas contemporâneas, propondo que após a duplicação

de um gene ancestral codificador de uma enzima ambígua os genes descendentes poderiam dividir as funções da enzima ancestral passando a codificar enzimas com especificidade mais restrita.

Esse processo parece ter acontecido com a AChE e a BChE. As informações disponíveis sobre AChE e BChE são poucas. HALL e SPIERER (1986) relatam que *Drosophila melanogaster* possui apenas uma colinesterase com propriedades cinéticas e seqüência molecular intermediária a AChE e BChE. Assim, é interessante investigar como essas enzimas estão evoluindo e como a seleção está atuando nesse processo.

Uma das maneiras de abordar essa questão é pela comparação por alinhamento das seqüências de nucleotídeos do gene em várias espécies ou das seqüências gênicas com seus parálogos para obtenção da fração de substituição sinônima por sítio sinônimo (K_a) e da fração de substituição não sinônima por sítio não sinônimos (K_s), que ocorreram desde a divergência. A razão K_a/K_s fornece uma medida da pressão seletiva no(s) gene(s) considerado(s). Se a razão K_a/K_s for igual a 1 significa seleção neutra. Se a razão $K_a/K_s < 1$ indica seleção purificadora, ou seja, algumas mutações estão sendo eliminadas pela seleção natural por serem deletérias. Se $K_a/K_s > 1$ indica seleção positiva, ou seja, mutações vantajosas estão sendo selecionadas nesse(s) gene(s).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

- 1) Estudar a variabilidade de parte do gene *BCHE*, em doadores de sangue de Curitiba com atividade baixa da enzima ($\leq 4,00$ KU/L), contribuindo para completar o banco de dados de genótipos do Laboratório de Polimorfismos e Ligação;
- 2) Utilizar informações do gene *BCHE*, obtidas no presente trabalho sobre variação em alguns sítios e estrutura haplotípica e no GenBank, para verificar aspectos evolutivos desse gene por meio de comparações inter-específicas.

3.2 Objetivos específicos

- 1) Examinar os exons 1, 2, 3 e a extremidade 3' do íntron 3 e início do exon 4, em doadores de sangue com atividade baixa da BChE;
- 2) Determinar o(s) haplótipo(s) associado(s) à atividade baixa;
- 3) Obter informações no que se refere às variações do nucleotídeo -116 (exon 1) em amostras de ameríndios Guarani do Mato Grosso do Sul, com vistas à determinação de haplótipos para futuros estudos comparativos entre populações de diferentes origens étnicas;
- 4) Comparar os sítios do gene *BCHE*, que apresentaram variação no presente trabalho, com os mesmos sítios em outras espécies, com interesse de obter conhecimento sobre a ordem de aparecimento das respectivas mutações;
- 5) Comparar o gene *BCHE* humano com os homólogos em nove outras espécies, bem como com o gene *ACHE*, da acetilcolinesterase, com vistas a estimar parâmetros (identidade, taxas e padrões de substituição, uso de códons), que permitam avaliar a evolução do gene *BCHE*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Amostra de doadores de sangue

4.1.1.1 Selecionada por atividade baixa da BChE

Foram analisados 165 indivíduos que apresentam atividade da enzima BChE $\leq 4,00$ KU/L. Parte dessa amostra já havia sido examinada por MIKAMI (2005) e FURTADO (2005) para alguns segmentos do gene *BCHE*. No presente estudo foi completado o exame de toda a seqüência codificadora desse gene nestes indivíduos, bem como do exon 1, região 3' do íntron 3 e início da parte não codificadora do exon 4.

Essa amostra, pertencente ao banco do Laboratório de Polimorfismos e Ligação, compreende doadores de sangue, euro-brasileiros, do sexo masculino, de idade entre 18 a 30 anos, provenientes do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (HEMEPAR).

4.1.1.2 Amostra de portadores da mutação *c.209A>G (p.D70G)*

Essa amostra, do banco do Laboratório de Polimorfismos e Ligação, é formada por 51 doadores de sangue, provenientes do HEMEPAR, e que apresentam a variante *c.209A>G (209G)*, sendo 47 indivíduos genotipados por SOUZA (2001) e quatro por FURTADO (2005). Esses indivíduos foram examinados no presente estudo para o exon 1.

4.1.1.3 Amostra de portadores da mutação *c.765G>C (p.E255D)*

Foram analisados sete doadores de sangue, do banco do Laboratório de Polimorfismos e Ligação, oriundos do HEMEPAR, que apresentam a mutação *c.765G>C (765C)*, sendo dois indivíduos genotipados por SOUZA (2001) e cinco genotipados por MIKAMI (2005). Esses indivíduos foram genotipados no presente estudo para o exon 1.

4.1.1.4 Amostra de portadores da mutação *c.IVS3-14T>C*

Foram analisados quatro doadores de sangue, do banco do Laboratório de Polimorfismos e Ligação, oriundos do HEMEPAR, que apresentam a mutação *c.IVS3-*

14T>C, dois genotipados por PARMO-FOLLONI et al., (2006) e dois suspeitos portadores dessa mutação identificados por SOUZA (2001). Esses indivíduos foram genotipados para a mutação *c.344G>A* e os de SOUZA também foram confirmados para *c.IVS3-14T>C*.

4.1.2 Amostra de Ameríndios Guarani do Mato Grosso do Sul

Essa amostra é formada por ameríndios dos sub-grupos Guarani-Kaiowá (N = 148; 116 mulheres e 32 homens), Guarani-Ñandeva (N = 83; 58 mulheres e 25 homens) e miscigenados Kaiowá-Ñandeva (N = 22; 19 mulheres e 3 homens), com idade variando de 11 a 72 anos. Esses ameríndios vivem em 18 municipalidades (principalmente de Amambaí, Porto Lindo e Limão Verde, mas também de Campanaria, Campestre, Caraapo, Cerrito, Dourados, Guaimbé, Jacaré, Lagoa Bonita, Miranda, Panambi, Pirajuí, Sapucaia, Sossoro, Tacururu e Taquapiri) do estado do Mato Grosso do Sul nas coordenadas 20°24`S a 23°93`S e 54°58`O para 56°55`O. Essa amostra já havia sido genotipada por FURTADO et al. (2006) para alguns segmentos do gene *BCHE*. No presente estudo foi analisado o exon 1.

4.1.3 Seqüências genômicas dos genes *BCHE* e *ACHE*

Foram utilizadas seqüências de cDNA disponíveis no GenBank (www.ncbi.org) para o gene *BCHE*: *Homo sapiens* (NM 000055), *Pan troglodytes* (XM 516857), *Macaca mullata* (XR 011736), *Equus caballus* (AF 178685), *Felis catus* (NM 001009364), *Pantera tigris* (AF 053484), *Canis familiaris* (XM 545267), *Rattus norvegicus* (NM 022942), *Mus musculus* (NM 009738), *Gallus gallus* (AJ 306928). Para o gene *ACHE*: *Homo sapiens* (NM 000665), *Felis catus* (NM 001009203), *Rattus norvegicus* (NM 172009) e *Mus musculus* (NM 009599).

4.2 Metodologia

As amostras que foram analisadas já haviam passado pelo processo de extração de DNA, segundo LAHIRI e NURNBERGER (1991) e a atividade da BChE já havia sido quantificada pela metodologia de DIETZ et al. (1973), com modificações de EVANS e WROE (1978).

A amostra com indivíduos de atividade baixa foi analisada para o exon 1, segmentos do exon 2, exon 3, final do íntron 3 e início da parte codificadora do exon 4, pela técnica de PCR-SSCA. Os indivíduos que compõem as amostras de doadores de sangue portadores da mutação *c.209A>G*, portadores de *c.765G>C* e ameríndios Guarani foram analisados apenas para o exon 1, sendo os números de indivíduos distribuídos de acordo com a tabela 4.

Tabela 4. Número de indivíduos analisados, de acordo com o fragmento de DNA do gene *BCHE*.

Fragmento analisado	Número de indivíduos	Complementando dados de:
Exon 1	423 ^a	SOUZA (2001), MIKAMI (2005), FURTADO (2005), FURTADO et al. (2006).
Exon 2		
Nucleotídeos -42 a 204	52	FURTADO (2005).
Nucleotídeos 155 a 535	52	FURTADO (2005).
Nucleotídeos 481 a 719	49	FURTADO (2005).
Nucleotídeos 659 a 876	60	SOUZA (2001), MIKAMI (2005), FURTADO (2005).
Nucleotídeos 835 a 1059	52	FURTADO (2005).
Nucleotídeos 1194 a 29 do íntron 2	53	FURTADO (2005).
Exon 3	165	MIKAMI (2005), FURTADO (2005).
Final do íntron 3 e início do exon 4	161	SOUZA (2001), MIKAMI (2005), FURTADO (2005).

^a Inclui Ameríndios (N = 253) e doadores de sangue (N = 170).

4.2.1 PCR

As amplificações foram realizadas com 10µl de volume total de reação, contendo 9µl 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 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 5.

4.2.2 Análise do DNA amplificado

4.2.2.1 SSCA (Análise Conformacional de Fita Simples)

A técnica de SSCA (análise de conformação de fita simples) baseia-se na amplificação do DNA e posterior desnaturação por calor e as fitas simples resultantes são colocadas em gel de poliacrilamida. As fitas simples adquirem conformação tridimensional e podem correr em posições diferentes no gel. Uma simples mutação de ponto pode alterar essa conformação e, conseqüentemente, o padrão de bandas do fragmento.

No presente trabalho, com exceção do fragmento que compreende o exon 3, sempre se usaram controles com mutações não-usuais e controles usuais para comparar os padrões de bandas em géis de poliacrilamida, nas eletroforeses por SSCA.

Tabela 5. 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 (5' → 3')	Tamanho do fragmento (pb)	Referência
Exon 1			
E1F nt -27 a -8 a montante do exon 1	CTGCTGCCAACTCTCGCGAG	203	4
E1R nt 8 a 27 a jusante da junção exon1/intron1 .	CGAAGGTGTAAATTCAGAGC		
Exon 2			
P15 – nt -42 a -23	TGG TTT CTT TTG CTC TGC AT	246	1
E2N13 – NT 185 a 204	GTT CTG ACA GCA AGA ATT TG		3
N25 – nt 155 a 172	GG TCT GAT ATT TGG AAT G	428	2
E2N33 – NT 516 a 535	GAA CCC ACT GAA GAG CCA AC		3
E2N45 – NT 481 a 501	GAG GCT CCA GGG AAC ATG GGT	239	3
P13 – nt 697 a 719	CT AGC TTC ATA AAG AGA TGT TAC		2
P25 – nt 659 a 678	CC ATT CTG CAA AGT GGA TCC	218	2
N53 – nt 859 a 876	CGG ACC AAA GTT TAC TGA		2
E2N65 – NT 835 a 854	GTT GTC CCC TAT GGG ACT CC	225	3
E2N63 – NT 1040 a 1059	ACC TTC CTG AAA TTC TTT TC		3
E2N85 – NT 1194 a 1212	CAT ATG CCC TGC CTT GGA G	269	3
P23M - nt 11 a 29 a jusante da junção exon 2/intron 2	GAG AAC AAT GAC AAA AAA TC		3
Exon 3			
P35 – nt 33 a montante da junção exon3/intron 2	CAA TTT TAC TAT AAT GTC TC	237	1
P33- nt 36 a jusante da junção exon 3/ intron 3	TCT ATT AAA TAA CCA AAC AC		1
Final do Intron 3 e início do Exon 4			
N45: nt -100 a -81 a montante da junção intron3/exon4	CTG TGT AGT TAG AGA AAA TG	258	5
P43: nt 1738 a nt 1759	GAA AAT ATG TTC TAT AAA GGG		

1- HÖHLER et al. (1995); 2- SOUZA (2001); 3- MIKAMI (2005); 4- FURTADO (2005); 5- PARMO-FOLLONI (2005).

Procedimento:

- 1) Misturaram-se 5 μ L de cada produto de PCR a 5 μ L de solução tamponante (4,75mL de formamida; 0,0125g de xilenocianol; 0,0125g de azul de bromofenol; 125 μ L de EDTA 0,4M; 16,7 μ L de NaOH 3M e 108,3 μ L de água bidestilada);
- 2) Manteve-se a 94°C por cinco minutos para desnaturação;
- 3) Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida. O gel, para um volume final de 30mL, foi preparado a partir de uma solução estoque de poliacrilamida 29:1 (29g de acrilamida, 1g de bisacrilamida, 5mL de glicerol e água bidestilada para um volume final de 100mL) ou 49:1 (49g de acrilamida, 1g de bisacrilamida, 5mL de glicerol e água bidestilada para um volume final de 100mL), acrescidas de 250 μ L de persulfato de amônio 10% e 30 μ L de TEMED (N',N',N',N' - tetrametilenodiamina). A solução para preparo do gel era de Tris 33mM pH 3,66 ou TBE 1x pH 8,2;
- 4) Colocou-se a solução entre duas placas de vidro com espaçadores de 0,8mm e deixou-se polimerizar por 30 minutos;
- 5) Colocou-se a placa com o gel em uma cuba eletroforética com tampão TBE 1X (Tris 54g, ácido bórico 27,5g, 20mL de EDTA 0,5M, pH 8,0 e qsp 1000mL de água destilada).

A concentração do gel, o tampão utilizado e o tempo de corrida são variáveis para cada fragmento e podem ser visualizados na tabela 6.

4.2.2.2 Coloração do gel

1. Imergiu-se o gel em um recipiente em solução aquosa de ácido nítrico (1%) por três minutos;
2. Lavou-se duas vezes com água destilada;
3. Imergiu-se o gel em solução aquosa de nitrato de prata (0,2%) durante vinte segundos no microondas;
4. Lavou-se duas vezes com água destilada;
5. Imergiu-se o gel em 60mL de solução reveladora (170mL de solução aquosa de carbonato de sódio 2,96% e 92 μ L de formaldeído) até que o líquido escurecesse;

Tabela 6. 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	20h ⁵
Exon 2					
-42 (íntron 1) a 204	9	3,4	3,66	Sim	6 h
155 a 347	9	3,4	3,66	Sim	7 h
304 a 535	8	3,4	3,66	Sim	6 h
481 a 719	8	3,4	3,66	Sim	7h
659 a 876	10	2,0	8,20	Sim	8 h ⁵
835 a 1059	8	3,4	3,66	Sim	7 h
1000 a 1235	9	3,4	8,20	Sim	6 h
1194 a 29 (íntron 2)	9	3,4	3,66	Sim	6 h
Exon 3	8	3,4	8,2	Sim	20h ⁵
Final do Íntron 3 e início do Exon 4					
	10	2,0	8,2	Sim	22h ⁵

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 15-40 minutos de corrida eletroforética sem a aplicação das amostras de DNA.

⁵ Eletroforeses em 100V e 15mA, demais casos 250V e 35mA.

6. Retirou-se o líquido escurecido e acrescentou-se o restante da solução reveladora no gel, levou-se ao microondas por vinte segundos, retornou-se à bancada e aguardou-se até que as bandas de DNA aparecessem;
7. Lavou-se o gel duas vezes com água destilada;
8. Imergiu-se o gel em solução de ácido acético (10%) por cinco minutos;
9. Lavou-se duas vezes com água destilada;
10. Imergiu-se o gel em solução aquosa de glicerol (5%) por dez minutos;
11. Embebeu-se o gel em solução de metanol (30%) e glicerol (1%) colocou-se sobre papel celofane, e cobriu-se com uma folha de papel filtro e levou-se para prensar e aguardar secagem.

4.2.2.3 Seqüenciamento de DNA

As amostras, cujas variações detectadas por SSCA diferiram dos controles utilizados, tiveram o DNA seqüenciado, com o uso dos mesmos pares de iniciadores já descritos para PCR-SSCA, a partir do procedimento do próximo item.

4.2.2.3.1 Purificação do produto de PCR com acetato de amônio

1. Acrescentou-se acetato de amônio 7,5M, correspondendo a 2/3 do volume do produto de PCR;
2. Acrescentou-se etanol absoluto, correspondendo a duas 2 vezes o volume do produto de PCR e homogeneizou-se bem;
3. Manteve-se em repouso por 10 minutos;
4. Centrifugou-se a 14.000 rpm durante 15 minutos;
5. Descartou-se o sobrenadante;
6. Adicionaram-se 250 μ L de etanol 70%;
7. Centrifugou-se a 14.000 rpm durante 15 minutos;
8. Descartou-se o sobrenadante;
9. Secou-se bem a 94°C por 5 minutos;
10. Ressuspendeu-se em 15 μ L de água miliQ.

Depois de purificado o DNA do produto de PCR foi quantificado comparando com o padrão de massa molecular (Low DNA Mass Ladder - Invitrogen). Essa comparação foi feita aplicando 2 μ L de corante xileno cianol e 2 μ L das amostras em gel de agarose 3% e corrida eletroforética de 1 hora e 30 minutos seguida de coloração em brometo de etideo durante 20 minutos.

4.2.2.3.2 Reação de seqüenciamento

Para a reação de seqüenciamento, foram misturados 1 μ L do kit de seqüenciamento (Big Die Terminator v 3.1 - Applied Biosystems) acrescido de 0,5 μ L de um dos oligonucleotídeos iniciadores (5pM/ μ L) e de 1 a 3,5 μ L (30 a 90ng/amostra) do produto purificado da PCR. A reação foi realizada em 35 ciclos da seguinte forma: 90°C por 30 seg., 48°C por 60 seg. e 60°C por 6 mim em Techgene Ftgene2D.

4.2.2.3.3 Purificação do produto de PCR da reação de seqüenciamento

1. Acrescentaram-se ao produto da reação de seqüenciamento 5 μ L de água ultra pura, 1 μ L de acetato de amônio e 33 μ L de etanol absoluto;
2. Homogenizou-se e deixou-se em repouso por 10 minutos;
3. Centrifugou-se a 14.000 rpm durante 15 minutos;
4. Descartou-se o sobrenadante;
5. Acrescentaram-se 100 μ L de etanol 70%;
6. Centrifugou-se a 14.000 rpm por 15 minutos;
7. Descartou-se o sobrenadante;
8. Secou-se a 94°C em termociclador Techgene Ftgene2D por 5 minutos.

Com as amostras já purificadas, foi feita leitura da seqüência de DNA, através do seqüenciador automático ABI 377, e as análises dos eletroferogramas foram feitas com o auxílio computacional do programa BioEdit (HALL, 1999).

4.2.3 Análise dos dados

4.2.3.1 Freqüências alélicas e genotípicas

As freqüências alélicas e genotípicas foram obtidas através da contagem direta do número de cromossomos e de indivíduos, respectivamente.

O programa CLUMP (SHAM e CURTIS, 1995) foi usado para comparar as freqüências alélicas e genotípicas obtidas no presente trabalho com as de outros autores. O teste dá resultado igual ao do χ^2 , sendo que não há necessidade de utilizar a correção de Yates, quando o esperado é menor que 5. Neste programa, o nível de significância é primeiramente obtido dos dados reais e, em seguida, um grande número de tabelas (1000, no presente estudo) com os mesmos totais marginais dos dados reais é gerado por simulação de Monte Carlo, com base na hipótese nula de que populações diferentes possuem a mesma distribuição de freqüência. O valor da estatística de cada tabela é calculado e uma estimativa empírica do valor de p é a proporção de tabelas simuladas com uma estatística maior ou igual à obtida com os dados reais. A significância das análises realizadas se dá quando o valor de p é $\leq 0,05$.

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

O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi verificado pelo programa Arlequin 2000 (SCHNEIDER et al., 2000) de acordo com o teste de GUO e THOMPSON (1992).

Os coeficientes de desequilíbrio de ligação absoluto e relativo (D e D') também foram estimados pelo programa Arlequin 2000 (SCHNEIDER et al., 2000) através do teste "likelihood ratio" (SLATKIN e EXCOFFIER, 1996).

A inferência da fase haplotípica foi obtida a partir dos dados das freqüências genotípicas observadas, baseada no método de máxima verossimilhança do programa Arlequin 2000 (SCHNEIDER et al., 2000).

4.2.3.3 Determinação da estrutura secundária do RNAm

A estrutura secundária do RNAm contendo as variantes *-116G* e *-116A* foi determinada pelo programa MFOLD (ZUKER, 2003 - www.bioinfo.rpi.edu/applications) o qual baseia-se em modelos termodinâmicos e algoritmos para determinar o mínimo de energia livre necessária para formação de dobras com os nucleotídeos vizinhos. O programa gera várias estruturas de RNAm possíveis e escolhe-se a mais estável.

4.2.3.4 Determinação dos possíveis fatores de transcrição ligantes no DNA

Os possíveis fatores de transcrição que estão se ligando à região do sítio -116 foram determinados através da ferramenta computacional GENOMATIX (CARTHARIUS et al. 2005; www.genomatix.de/matinspector). O aplicativo MatInspector constrói uma matriz de similaridade, após percorrer a seqüência de nucleotídeos de interesse, e indica os possíveis fatores de ligação a essa região. O programa não informa a funcionalidade do sítio de ligação, a qual deve ser testada através de experimentos laboratoriais.

4.2.3.5 Análises das seqüências de cDNA

4.2.3.5.1 Obtenção e alinhamento das seqüências

As seqüências de cDNA das dez espécies analisadas foram obtidas no GenBank (www.ncbi.org) e alinhadas pelo aplicativo CLUSTAL W do programa MEGA 3.1 (KUMAR, TAMURA e NEI, 2004). Esse alinhamento foi verificado e algumas edições manuais foram efetuadas.

4.2.3.5.2 Identidade de nucleotídeos e aminoácidos

A identidade de nucleotídeos e aminoácidos foi obtida pela contagem direta dos sítios (nucleotídeos ou aminoácidos) conservados da seqüência de cDNA da espécie humana, quando comparada par a par com as das demais espécies. O número total de sítios conservados para cada par de comparações foi dividido pelo comprimento total da seqüência.

4.2.3.5.3 Taxas e padrões de substituição

A taxa de substituição de nucleotídeos foi determinada por meio da equação $K/2T$ onde K representa o número de substituições entre duas seqüências e T o tempo de divergência entre elas. O valor de K nas regiões UTR foi obtido baseando-se no modelo de um parâmetro de JUKES e CANTOR (1969), pela equação $K = -3/4 \ln(1 - 4/3p)$ onde p é a proporção de nucleotídeos diferentes entre duas seqüências. A variância de K foi dada por $V(K) = p - p^2 / L(1 - 4/3p)$ onde L é o comprimento das seqüências analisadas.

As substituições sinônimas e não sinônimas foram determinadas pelo programa DNAsp 4.1 (ROZAS et al., 2003) no aplicativo "Substituições sinônimas e não sinônimas" para determinar o número de sítios sinônimos e não sinônimos, o número de diferenças sinônimas (M_s) e o número de diferenças não sinônimas (M_a) observadas entre duas seqüências; o número médio de sítios sinônimos (N_s) e o número médio de sítios não sinônimos possíveis (N_a); o número de substituições sinônimas por sítio sinônimo (K_s) e o número de substituições não sinônimas por sítio não sinônimo (K_a) desde a divergência entre as seqüências baseado em NEI e GOJOBORI (1986).

4.1.3.5.4 Detecção de seleção

Os testes para detecção de seleção foram realizados em duas etapas, sendo que na primeira foram obtidas as taxas K_a/K_s , pela comparação das seqüências de cDNA das nove espécies em relação a *H. sapiens*. A segunda determinou se as taxas K_a/K_s eram iguais entre as espécies. Para isso, foram utilizados modelos de análise de máxima verossimilhança (likelihood), baseados em substituição de códons, através da comparação de seqüências de nucleotídeos, e na árvore filogenética do gene (YANG, 1998). O modelo "one ratio" admite a mesma taxa K_a/K_s para todos os ramos na filogenia. O modelo "free ratio" admite que a taxa K_a/K_s é independente em cada ramo da filogenia. Essas análises foram efetuadas com auxílio do programa PAML (YANG, 1997). Esses modelos foram comparados através de duas vezes a diferença dos log likelihood $2\Delta l = 2.(l_1 - l_2)$, que pode ser comparada com uma distribuição de χ^2 .

4.2.3.5.5 Uso dos códons

Foi utilizado o aplicativo "Uso Preferencial de Códons" do programa DNAsp 4.1 (ROZAS et al., 2003) para analisar como o gene *BCHE* está estruturado em termos de códons. Esse aplicativo calcula o número efetivo de códons usados em um gene (ENC), segundo WRIGHT (1990). Os valores de ENC variam de 20 (apenas um códon é utilizado para cada aminoácido – desvio máximo) a 61 (todos os códons sinônimos são igualmente usados – não há desvio). Também nesse aplicativo é calculado o Índice Preferencial de Códons (CBI; MORTON, 1993) que mensura o desvio do uso ao acaso dos códons sinônimos. Os valores de CBI variam de 0 (todos os códons sinônimos são usados ao acaso) a 1 (apenas um códon é usado para cada aminoácido).

4.2.3.5.6 Variação de aminoácidos

A proporção de aminoácidos diferentes na região traduzida foi obtida por $p = n/L$ onde n é o número de aminoácidos diferentes entre duas espécies e L é o comprimento da seqüência alinhada. O número de substituição de aminoácidos por sítio foi estimado por $d = -\ln(1-p)$ onde p é a proporção de aminoácidos diferentes. A variância de d foi estimada por $V(d) = p/L(1-p)$.

5 RESULTADOS

5.1 Doadores de sangue com atividade baixa da BChE

5.1.1 Exon 1

Os padrões eletroforéticos, referentes à análise do nucleotídeo -116 do exon 1 do gene *BCHE*, são mostrados na figura 6.

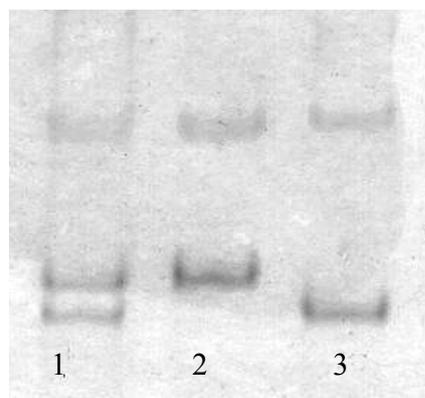


Figura 6. Padrões do exon 1, após eletroforese SSCA em gel de poliacrilamida: 1. -116GA; 2. -116AA; 3 -116GG (usual).

A frequência da variante usual -116G na amostra de 113 indivíduos (APÊNDICE 9.1), cuja atividade $\leq 4,00$ KU/L foi determinada por MIKAMI (2005), é $81,42\% \pm 2,59\%$ e de *c.-116G>A* (-116A) é $18,58\% \pm 2,59\%$. A tabela 7 mostra as frequências genotípicas, sendo que essas frequências estão de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 1,399$; $p > 0,20$).

Tabela 7. Frequências genóticas, referentes ao nucleotídeo -116, em amostras de doadores de sangue com atividade da BChE $\leq 4,00$ KU/L.

Genótipo	Nº de indivíduos	Frequência
-116GG	73	64,60%
-116GA	38	33,63%
-116AA	2	1,77%
Total	113	

Hardy -Weinberg ($\chi^2 = 1,4$; $p > 0,2$)

5.1.2 Exon 2

5.1.2.1 Fragmento dos nucleotídeos -42 a 204

Dos 53 indivíduos analisados, 52 puderam ser genotipados para esse fragmento. Todos os indivíduos examinados apresentaram-se como usuais, não sendo encontrada variação genética neste fragmento. O padrão em eletroforese SSCA pode ser visto na figura 7.

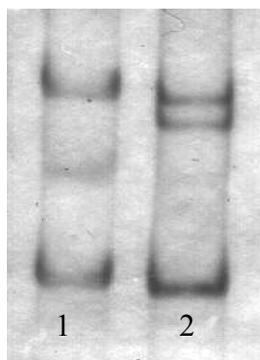


Figura 7. Padrões referentes ao fragmento do nucleotídeo -42 a 155 do exon 2, após eletroforese SSCA em gel de poliacrilamida: 1- homozigoto usual; 2- controle heterozigoto para *c.35A>G* (*p.K12R*).

5.1.2.2 Fragmento dos nucleotídeos 155 a 535

Foram genotipados 52 indivíduos para esse fragmento. Foi observada variação em um indivíduo (amostra 1003) que apresentou padrão eletroforético similar ao da variante não usual $344G>A$ ($344A$) (figura 8). Essa amostra foi seqüenciada e confirmou ser heterozigota $344GA$ (figura 9). A variante usual $344G$ apresentou frequência de $99,04\% \pm 0,95\%$ e a variação não usual $344A$ frequência de $0,96\% \pm 0,95\%$. As frequências genotípicas são mostradas na tabela 8.

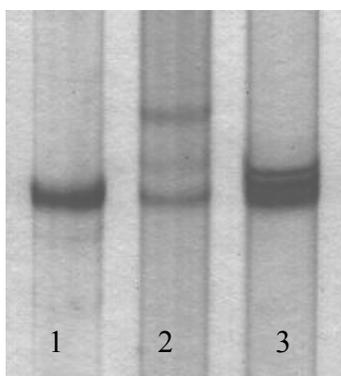


Figura 8. Padrões do fragmento dos nucleotídeos 155 a 535 do exon 2, após eletroforese SCSA em gel de poliacrilamida: 1- homozigoto usual; 2- heterozigoto para $c.344G>A$ ($p.G115D$); 3- controle heterozigoto para $c.209A>G$ ($p.D70G$).

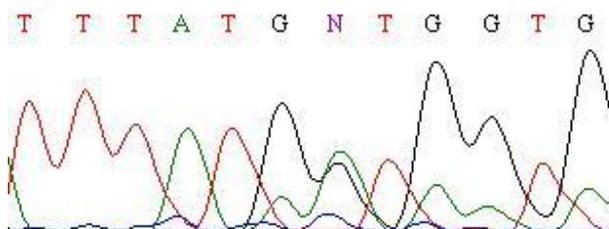


Figura 9. Eletroferograma da amostra heterozigota $344GA$ onde N indica a heterozigose no sítio 344.

Tabela 8. Freqüências genóticas, referentes à variação *c.344G>A* (*p.G115D*) em doadores de sangue com atividade da BChE $\leq 4,00$ KU/L.

Genótipo	Nº de indivíduos	Freqüência
<i>344GG</i>	51	98,08%
<i>344GA</i>	1	1,92%
<i>344AA</i>	0	0,00%
Total	52	

5.1.2.3 Fragmento dos nucleotídeos 481 a 719

Neste fragmento também não foi observada variação. Dos 49 indivíduos genotipados todos apresentaram padrão eletroforético semelhante ao usual (Figura 10).

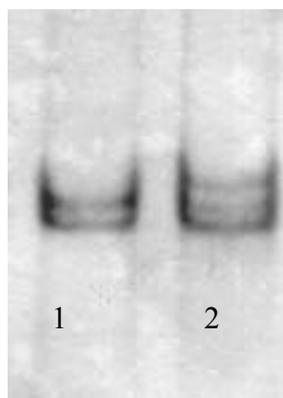


Figura 10. Padrões referentes ao fragmento dos nucleotídeos 481 a 719 do exon 2, após eletroforese SSCA em gel de poliacrilamida: 1- homozigoto usual; 2- controle heterozigoto para *c.551C>T* (*p.A184V*).

5.1.2.4 Fragmento dos nucleotídeos 659 a 876

As análises revelaram que 2 dos 53 indivíduos genotipados apresentam padrão eletroforético similar ao de indivíduos heterozigotos para a variante não usual *c.765G>C* (765C) (Figura 11). Esse resultado foi confirmado pelo seqüenciamento das amostras (Figura 12). A frequência alélica observada da variante usual 765G foi de $98,11\% \pm 1,32\%$ e da variante não usual 765C foi 1,89%. A tabela 9 mostra as frequências genotípicas.

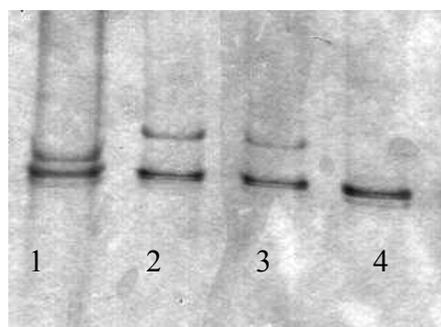


Figura 11. Padrões referentes ao fragmento dos nucleotídeos 659 a 876 do exon 2, após eletroforese SSCP em gel de poliacrilamida: 1- controle heterozigoto para *c.728C>T* (*p.T243M, F-I*); 2 e 3- heterozigoto para *c.765G>C* (*c.E255D*); 4- homozigoto usual.

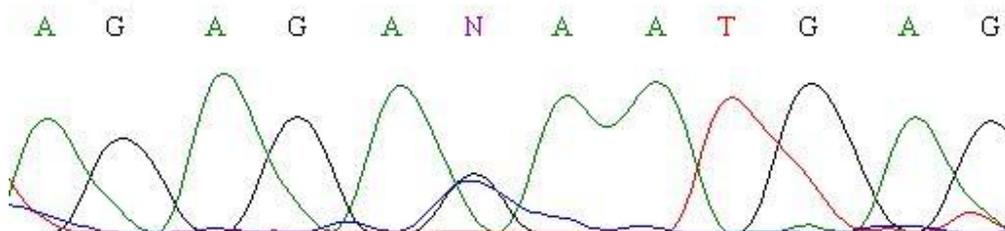


Figura 12. Eletroferograma do heterozigoto 765GC onde N indica a heterozigose do sítio 765.

Tabela 9. Frequências genótípicas da variação *c.765G>C* em indivíduos com atividade da BChE $\leq 4,00$ KU/L.

Genótipo	Nº de indivíduos	Frequência
<i>765GG</i>	51	96,23%
<i>765GC</i>	2	3,77%
<i>765CC</i>	0	0,00%
Total	53	

5.1.2.5 Fragmento dos nucleotídeos 835 a 1059

Também não foi observada variação genética nos 52 indivíduos analisados para este fragmento (Figura 13).

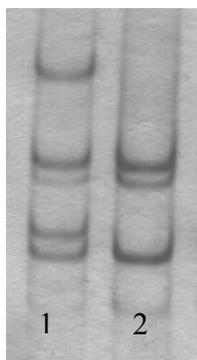


Figura 13. Padrões referentes ao fragmento dos nucleotídeos 835 a 1059 do exon 2, após eletroforese SSCA em gel de poliacrilamida: 1- controle heterozigoto para *c.997G>T* (*p.G333C*); 2- homozigoto usual.

5.1.2.6 Fragmento dos nucleotídeos 1194 a 29 do íntron 2

Os 53 indivíduos analisados não apresentaram variação genotípica (Figura 14).

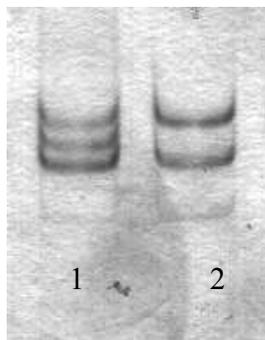


Figura 14. Padrões referentes ao fragmento dos nucleotídeos 1194 do exon 2 a 29 do íntron 2, após eletroforese SSCA em gel de poliacrilamida: 1- controle heterozigoto para *c.1408C>T (p.R470W)*; 2- homozigoto usual.

5.1.3 Exon 3

Foram analisados 165 indivíduos para o exon 3, e não foi verificada variação. O padrão em eletroforese SSCA pode ser visualizado na figura 15.

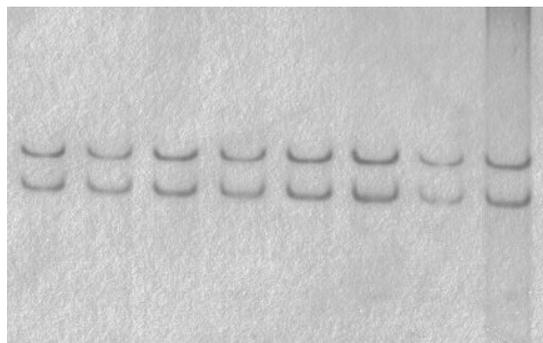


Figura 15. Padrão referente ao exon 3, após eletroforese SSCA em gel de poliacrilamida.

5.1.4 Região 3' do íntron 3 e início do exon 4

Foram analisados 161 indivíduos e duas variantes não usuais diferentes foram observadas (Figura 16). Uma no íntron 3, *c.IVS3-14T>C* (*IVS3-14C*, amostras 1003, 1405 e 2603), e outra na porção final da região codificadora do exon 4, *c.1719delT* (amostra 377). A figura 17 mostra eletroferograma de um indivíduo *IVS3-14TC*.

A frequência da variação usual *IVS3-14T* é de $99,07\% \pm 0,54\%$ e da variante não usual *IVS3-14C* é $0,93\% \pm 0,54\%$. Na tabela 10 são mostradas as frequências genotípicas.

A frequência alélica da variante não usual *1719delT* foi de $0,31\% \pm 0,31\%$. Na tabela 11 se encontram as frequências genotípicas.

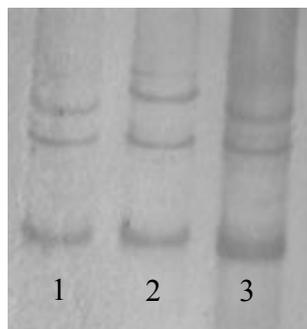


Figura 16. Padrão referente à região 3' do íntron 3 e início do exon 4, após eletroforese SSCA em gel de poliacrilamida. 1- homozigoto usual; 2- heterozigoto *c.IVS3-14T>C*; 3 heterozigoto *c.1719delT*.

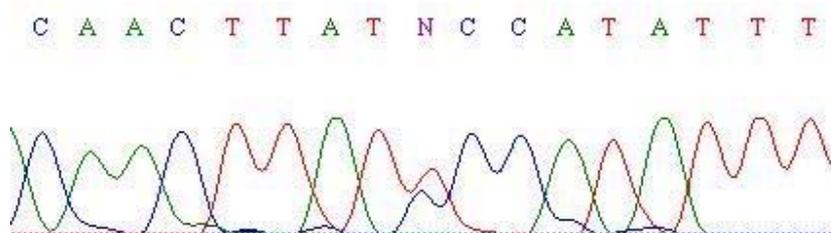


Figura 17. Eletroferograma do heterozigoto *IVS3-14TC* onde N indica a heterozigose.

Tabela 10. Frequências genótípicas da variação *c.IVS3-14T>C* em indivíduos com atividade da BChE $\leq 4,00$ KU/L.

Genótipo	Nº de indivíduos	Frequência
<i>IVS3-14TT</i>	158	98,14%
<i>IVS3-14TC</i>	3	1,86%
<i>IVS3-14CC</i>	0	0,00%
Total	161	

Tabela 11. Frequências genótípicas da variação *1719delT* em indivíduos com atividade da BChE $\leq 4,00$ KU/L.

Genótipo	Nº de indivíduos	Frequência
<i>1719TT</i>	159	99,38%
<i>1719TdelT</i>	1	0,62%
<i>1719delTdelT</i>	0	0,00%
Total	160	

5.1.5 Estrutura haplotípica

5.1.5.1 Genótipos dos sítios -116, 209 e 1615

A tabela 12 mostra o número de indivíduos e a frequências relativa dos genótipos estudados na amostra de doadores de sangue com atividade da BChE $\leq 4,0$ KU/L. Os dados do presente estudo mais os de FURTADO (2005), mostrados na tabela 12, foram reunidos para estimar as frequências haplotípicas. Essas frequências foram estimadas após se verificar que os genótipos referentes aos sítios -116, 209 e 1615, quando analisados em separado, encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p = 0,42$; $p = 1,00$; $p = 1,00$, respectivamente).

Tabela 12. Genótipos, detectados por eletroforese SSCA em gel de poliacrilamida, para os sítios -116 (-116G>A), 209 (209A>G) e 1615 (1615G>A) em indivíduos com atividade da BChE $\leq 4,0$ KU/L.

Genótipos	N de indivíduos genotipados apenas no presente estudo (frequência relativa dos genótipos %)	N de indivíduos genotipados no presente estudo somados aos de FURTADO (2005) (frequência relativa dos genótipos %)
[-116GG; 209AA; 1615GG]	47 (42,73)	72 (44,72)
[-116GG; 209AA;1615GA]	15 (13,64)	22 (13,66)
[-116GG; 209AA;1615AA]	3 (2,73)	5 (3,11)
[-116GG; 209AG;1615GG]	1 (0,91)	1 (0,62)
[-116GG; 209AG;1615GA]	7 (6,36)	10 (6,21)
[-116GA; 209AA;1615GG]	3 (2,73)	3 (1,86)
[-116GA; 209AA;1615GA]	23 (20,91)	36 (22,36)
[-116GA; 209AA;1615AA]	5 (4,54)	5 (3,11)
[-116GA; 209AG;1615GA]	1 (0,91)	1 (0,62)
[-116GA; 209AG;1615AA]	3 (2,73)	3 (1,86)
[-116AA; 209AA;1615AA]	2 (1,82)	3 (1,86)
TOTAL	110	161

5.1.5.2 Haplótipos e desequilíbrio de ligação para os sítios -116, 209 e 1615

A análise de desequilíbrio de ligação foi feita a partir dos dados da tabela 13.

As variações dos sítios -116 e 1615 mostram-se em desequilíbrio de ligação ($\chi^2 = 118,11$ e $p < 10^{-4}$), sendo $D' = 91,87\%$, com a estimativa de 51 haplótipos [-116A; 1615A] no total de 54 haplótipos com -116A, correspondendo a 94,4% desses haplótipos.

Para os sítios -116 e 209, o valor de D' foi de 60,25%, porém o valor de p não mostra significância ($\chi^2 = 1,15$ e $p = 0,28$). Neste caso, foram estimados 14 haplótipos [-116G; 209G], num total de 15 haplótipos com 209G.

Para os sítios 209 e 1615, o desequilíbrio de ligação foi de $D' = 90,24\%$ ($\chi^2 = 27,63$ e $p < 10^{-4}$). Foram estimados 14 haplótipos [*209G*; *1615A*], num total de 15 haplótipos com *209G*.

Tabela 13. Estimativas das frequências haplotípicas e do número absoluto dos haplótipos inferidos para os sítios -116, 209 e 1615.

-116 (exon 1) G>A	209 (exon 2) A>G	1615 (exon 4) G>A	Frequência estimada \pm EP (%)	Estimativa do número absoluto do haplótipo
<i>G</i>	<i>A</i>	<i>G</i>	67,05 \pm 2,80	216
<i>G</i>	<i>A</i>	<i>A</i>	11,73 \pm 1,67	38
<i>G</i>	<i>G</i>	<i>G</i>	0,46 \pm 0,39	1
<i>G</i>	<i>G</i>	<i>A</i>	4,00 \pm 0,84	13
<i>A</i>	<i>A</i>	<i>G</i>	1,13 \pm 0,38	3
<i>A</i>	<i>A</i>	<i>A</i>	15,44 \pm 2,01	50
<i>A</i>	<i>G</i>	<i>G</i>	0	0
<i>A</i>	<i>G</i>	<i>A</i>	0,20 \pm 0,35	1
Total			100	322

5.2 Doadores de sangue com a mutação *c.209A>G* (*p.D70G*) e análise do exon 1

Partindo do conhecimento prévio de desequilíbrio de ligação dos sítios -116 e 209 com o sítio 1615, quando analisados em separado, torna-se interessante determinar qual a relação entre os sítios -116 e 209. As frequências populacionais das variantes *-116A* e *209A>G* são baixas (cerca de 9% e 2%, respectivamente). Assim, para obter um D' significativo seria necessária uma amostra populacional muito grande. Desta forma, para poder entender a relação entre os sítios -116 e 209 foram examinados os genótipos de 51 indivíduos (APÊNDICE 9.2), selecionados por serem portadores da mutação *c.209A>G* (exon 2), tendo sido previamente genotipados no Laboratório de Polimorfismos e Ligação para o sítio 1615.

A frequência alélica da variação usual *-116G* foi 93,14% \pm 2,50% e da variante não usual *-116A* foi 6,86% \pm 2,50%. As frequências genotípicas, para este grupo de indivíduos, podem ser visualizadas na tabela 14. Os valores encontrados também estão de acordo com

o equilíbrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 0,369$; $p > 0,50$). A tabela 15 mostra os genótipos dos indivíduos portadores da variante não usual *c.209A>G*, considerando-se também os sítios -116 e 1615.

Tabela 14. Frequências genóticas quanto ao sítio -116 do exon 1, em indivíduos com a variação *c.209A>G* do exon 2.

Genótipo	Nº de indivíduos	Frequência
-116GG	44	88,58%
-116GA	7	11,07%
-116AA	0	0,34%
Total	51	

Hardy Weinberg ($\chi^2 = 0,20$; $p > 0,5$)

Tabela 15. Genótipos dos indivíduos portadores da variante não usual *c.209A>G*, considerando-se também os sítios -116 e 1615.

-116	Sítios		Número de indivíduos
	209 ^a	1615 ^a	
GG	AG	GG	9
GG	AG	GA	32
GG	AG	AA	3
GG	AA	GA	1
GA	AG	GA	1
GA	AG	AA	5
TOTAL			51

^a Dados de SOUZA (2001), FURTADO (2005) e MIKAMI (2005).

5.3 Doadores de sangue com a mutação *c.765G>C* (*p.E255D*) e análise do exon 1

Com o intuito de esclarecer a relação entre os sítios -116 e 765 foram examinados quanto ao exon 1, além dos dois indivíduos descritos no presente estudo para a variante não usual *c.765G>C*, mais sete indivíduos detectados em outros estudos (dois por SOUZA, 2001 e cinco por MIKAMI, 2005). Na tabela 16, encontram-se os genótipos apresentados por esses indivíduos para os sítios -116, 765 e 1615.

No caso de *765C* percebe-se, com certeza, a ocorrência de sete haplótipos [*-116G*; *765C*] e um haplótipo [*-116A*; *765C*]. Como o número de indivíduos é baixo ($N = 9$), se faz necessária uma amostra maior para se calcular desequilíbrio de ligação. Entretanto, parece existir uma ocorrência preferencial de *765C* com *-116G*.

Tabela 16. Genótipos, detectados por eletroforese SSCA em gel de poliacrilamida, para os sítios -116, e 1615 de nove indivíduos com genótipo *765GC*.

-116	Sítios		Número de indivíduos (frequência relativa)
	765	1615	
GG	GC	GG	2 (22,22%)
GG	GC	GA	5 (55,55%)
GA	GC	AA	1 (11,11%)
AA	GC	AA	1 (11,11%)
TOTAL			9

5.4 Doadores de sangue com a mutação *c.344G>A* (*p.G115D*) e análise do íntron 3 e início do exon 4

O indivíduo identificado no presente estudo com a mutação *c.344G>A* em heterozigose, é *IVS3-14TC*. Para verificar possível evidência de desequilíbrio de ligação entre esses dois sítios, foram analisados indivíduos genotipados em outros estudos: dois *344GA* de SOUZA (2001), um *344GA*, *IVS3-14TC* e um *IVS3-14TC* de PARMO-FOLLONI (comunicação pessoal). A tabela 17 mostra os genótipos desses indivíduos. Todos os indivíduos analisados que possuem a variante não usual *c.344G>A* também são heterozigotos para a mutação *c.IVS3-14T>C*, o que sugere forte desequilíbrio de ligação ou até mesmo desequilíbrio máximo entre elas.

Tabela 17. Genótipos, detectados por eletroforese SSCA em gel de poliacrilamida, para os sítios 344, IVS3–14 e 1615.

344	Sítios		Número de indivíduos (identificação)
	IVS3–14	1615	
GA	TC	GG	2 (535 e 1003)
GA	TC	GA	2 (201 e 709)
GG	TC	GG	1 (2603)
GG	TC	GA	2 (227 e 1405)
TOTAL			7

5.5 Guarani do Mato Grosso do Sul e análise do exon 1

Os ameríndios Guarani do Mato Grosso do Sul (APÊNDICE 9.3) foram genotipados para o exon 1 e todos os indivíduos (148 Kaiowá, 83 Nãndeva e 22 Kaiowá-Nãndeva) apresentaram o genótipo usual. Portanto, todos os indivíduos analisados são $-116GG$ e a frequência da variante usual $-116G$ é 100% nesta amostra.

5.6 Análise comparativa da região transcrita do gene *BCHE* de *H. sapiens* com outras espécies de animais

5.6.1 Sítios e aminoácidos variáveis nos indivíduos do presente estudo

A tabela 18 mostra a comparação de *H. sapiens* com outras espécies de animais quanto às variações nucleotídicas que os indivíduos aqui estudados, mostraram no presente estudo e/ou em outros estudos (MIKAMI, 2005; FURTADO, 2005). A tabela 19 mostra as respectivas variações nos aminoácidos.

A comparação mostra que os sítios 209, 344, 551, 728 e 997 estão conservados em todas as dez espécies analisadas. Levando-se em conta essas espécies, os sítios 35, 1169, 1615 e 1719 apresentam duas variações e os sítios -116 (sem informação para *E. caballus*), 486 e 1408 apresentam três variações. O sítio 765 é o mais variável de todos, sendo encontrado com os quatro nucleotídeos possíveis.

Tabela 18. Dados nucleotídeos de *H. sapiens*, *P. troglodytes*, *M. mulatta*, *F. catus*, *P. tigris*, *C. familiaris*, *E. caballus*, *R. novergicus*, *M. musculus*, e *G. gallus*, quanto aos sítios -116, 35, 209, 344, 486, 551, 728, 765, 997, 1169, 1408, 1615 e 1719 do gene *BCHE*.

Espécies	Sítios (variações em humanos)												
	-116 (G>A)	35 (A.>G)	209 (A>G)	344 (G>A)	486 (T>C)	551 (C>T)	728 (C>T)	765 (G>C)	997 (G>T)	1169 (G>T)	1408 (C>T)	1615 (G>A)	1719 (delT)
<i>H. sapiens</i>	G (91,7%) ^a	A (99,86%) ^b	A (99,20%) ^b	G (99,32%) ^b	T (90,86%) ^b	C (99,30%) ^b	C (99,72%) ^b	G (99,02%) ^b	G (99,86%) ^b	G (99,72%) ^b	C (99,86%) ^b	G (82,20%) ^c	T (99,62) ^d
<i>P. troglodytes</i>	A	A	A	G	T	C	C	G	G	G	C	G	T
<i>M. mulatta</i>	A	A	A	G	T	C	C	T	G	A	C	G	T
<i>E. caballus</i>	-	A	A	G	A	C	C	C	G	A	C	G	T
<i>F. catus</i>	A	A	A	G	A	C	C	A	G	A	T	G	T
<i>P. tigris</i>	A	A	A	G	A	C	C	A	G	A	T	G	T
<i>C. familiaris</i>	A	A	A	G	C	C	C	A	G	A	T	G	T
<i>R. novergicus</i>	C	G	A	G	T	C	C	G	G	A	A	A	T
<i>M. musculus</i>	C	G	A	G	T	C	C	A	G	A	A	A	T
<i>G. gallus</i>	G	G	A	G	T	C	C	C	G	A	T	G	del ^e

^aFURTADO-ALLE et al., 2006; ^bMIKAMI, 2005; ^cSOUZA, 2001; ^dPARMO-FOLLONI et al. (no prelo).

^e del corresponde a deleção.

Tabela 19. Dados de aminoácidos de *H. sapiens*, *P. troglodytes*, *M. mulatta*, *F. catus*, *P. tigris*, *C. familiaris*, *E. caballus*, *R. novergicus*, *M. musculus* e *G. gallus*, quanto aos aminoácidos 12, 70, 115, 162, 184, 243, 255, 333, 390, 470, 539, 573 da BChE.

Aminoácidos (variações em humanos)	12 (K12R)	70 (D70G)	115 (G115D)	162 (A162A)	184 (A184V)	243 (T243M)	255 (E255D)	333 (G333C)	390 (G390V)	470 (R470W)	539 (A539T)	573 (L574fsX576)
<i>H. sapiens</i>	K	D	G	A	A	T	E	G	G	R	A	G
<i>P. troglodytes</i>	K	D	G	A	A	T	E	G	G	R	A	G
<i>M. mulatta</i>	K	D	G	A	A	T	D	G	D	R	A	G
<i>E. caballus</i>	K	D	G	A	A	T	D	G	D	R	A	D
<i>F. catus</i>	K	D	G	V	A	T	E	G	D	Y	A	G
<i>P. tigris</i>	K	D	G	I	A	T	E	G	D	Y	A	G
<i>C. familiaris</i>	K	D	G	A	A	T	E	R	D	Y	A	G
<i>R. novergicus</i>	R	D	G	A	A	T	E	G	D	T	R	D
<i>M. musculus</i>	R	D	G	A	A	T	E	G	D	T	T	A
<i>G. gallus</i>	R	D	G	V	S	T	S	G	D	Y	A	G

5.6.2 Identidade de nucleotídeos e de aminoácidos

A tabela 20 mostra as proporções de identidade de nucleotídeos e de aminoácidos da região codificadora do gene *BCHE* de *H. sapiens*, quando comparado com outras nove espécies. As proporções de identidade referentes ao peptídeo sinal e às regiões 5'UTR e 3'UTR podem ser verificadas nas tabelas 21 e 22, respectivamente. Para as regiões 5'UTR e 3'UTR calculamos a identidade apenas entre os primatas, visto que essas regiões nem sempre se encontram completas nas seqüências de cDNA das outras espécies aqui analisadas.

Tabela 20. Número de nucleotídeos e aminoácidos conservados e suas respectivas identidades, quando *H. sapiens* é comparado com *P. troglodytes*, *M. mulatta*, *F. catus*, *P. tigris*, *C. familiaris*, *E. caballus*, *R. novergicus*, *M. musculus* e *G. gallus*, referentes à região codificadora da proteína madura do gene *BCHE*.

Espécies	Nucleotídeos conservados em 1722 nt	Identidade de nucleotídeos (%)	Aminoácidos conservados em 574 aa	Identidade de aminoácidos (%)
<i>P. troglodytes</i>	1713	99,48	569	99,13
<i>M. mulatta</i>	1672	97,09	549	95,64
<i>E. caballus</i>	1569	91,11	519	90,42
<i>F. catus</i>	1546	89,78	504	87,80
<i>P. tigris</i>	1541	89,49	502	87,45
<i>C. familiaris</i>	1544	89,66	502	87,45
<i>R. novergicus</i>	1404	81,53	459	79,96
<i>M. musculus</i>	1397	81,12	464	80,83
<i>G. gallus</i>	1264	73,40	414	72,12

Tabela 21. Número de nucleotídeos e de aminoácidos conservados e suas respectivas identidades, referentes à região codificadora do peptídeo sinal do gene *BCHE*, quando *H. sapiens* é comparado com *P. troglodytes*, *M. mulatta*, *F. catus*, *P. tigris*, *C. familiaris*, *E. caballus*, *R. novergicus*, *M. musculus* e *G. gallus*.

Espécie	Nucleotídeos conservados em 84 nt	Identidade de nucleotídeos (%)	Aminoácidos conservados em 28 aa	Identidade de aminoácidos (%)
<i>P. troglodytes</i>	84	100	28	100
<i>M. mulatta</i>	82	97,62	27	96,43
<i>E. caballus</i>	66	78,57	19	67,86
<i>F. catus</i>	69	82,14	20	71,43
<i>P. tigris</i>	69	82,14	20	71,43
<i>C. familiaris</i>	68	80,95	20	71,43
<i>R. novergicus</i>	59*	67,82	16*	55,17
<i>M. musculus</i>	58*	66,67	15*	51,17
<i>G. gallus</i>	47	55,95	12	42,86

* O peptídeo sinal de *R. novergicus* e *M. musculus* possui 87 nt e 29 aa.

Tabela 22. Número de nucleotídeos conservados nas regiões 5'UTR e 3'UTR do gene *BCHE* e suas respectivas identidades, quando *H. sapiens* é comparado com *P. troglodytes* e *M. mulatta*.

Espécie	Nucleotídeos conservados nos 157 nt da região 5'UTR	Identidade de nucleotídeos (%) na região 5'UTR	Nucleotídeos conservados na região 3'UTR/ tamanho da seqüência	Identidade de nucleotídeos (%) na região 3'UTR
<i>P. troglodytes</i>	155	98,73	483/489	98,77
<i>M. mulatta</i>	149	94,90	467/491	95,11

5.6.3 Taxas e padrões de substituições

5.6.3.1 Taxa de substituição de nucleotídeos

A tabela 23 mostra a taxa de substituição de nucleotídeos, por ano, na região codificadora da proteína madura e 5' e 3'UTR do gene *BCHE*.

Tabela 23. Taxa de substituição de nucleotídeos (por ano) das regiões codificadoras do gene *BCHE* entre *H. sapiens* e demais espécies.

Espécie	Tempo de divergência (milhões de anos)	Taxa de substituição de nucleotídeos por ano (multiplicada por 10 ⁹)			
		Sinônima na região codificadora da proteína madura	Não sinônima na região codificadora da proteína madura	Região 5'UTR	Região 3'UTR
<i>P. troglodytes</i>	5 ^a	1	0,38	1	1
<i>M. mulatta</i>	25 ^b	1	0,39	1	1
<i>E. caballus</i>	54 ^a	2	0,44	-	-
<i>F. catus</i>	74 ^a	2	0,42	-	-
<i>P. tigris</i>	74 ^a	2	0,43	-	-
<i>C. familiaris</i>	74 ^a	2	0,42	-	-
<i>R. norvegicus</i>	80 ^c	4	0,69	-	-
<i>M. musculus</i>	80 ^c	4	0,66	-	-
<i>G. gallus</i>	310 ^c	2	0,28	-	-

^a KUMAR e HEDGES, 1998; ^b BEGUN, 2006; ^c GRAUR e LI, 1999.

5.6.3.2 Substituições nas regiões UTR

Para compreender como os nucleotídeos estão sendo substituídos ao longo da sequência transcrita do gene *BCHE*, analisamos separadamente a região codificadora da proteína madura e as regiões 5'UTR e 3'UTR.

Os números de substituições por sítio desde a divergência entre os primatas, para as regiões UTR são apresentados na tabela 24.

Tabela 24. Número de substituições por sítio, desde a divergência, nas regiões 5'UTR e 3'UTR do gene *BCHE* em relação a *H. sapiens*.

Espécie	N de substituições por sítio desde a divergência (K) 5'UTR	N de substituições por sítio desde a divergência (K) 3'UTR	Variância de K (multiplicada por 10 ⁴) 5'UTR	Variância de K (multiplicada por 10 ⁴) 3'UTR
<i>P. troglodytes</i>	0,014	0,0124	0,87	0,25
<i>M. mulatta</i>	0,053	0,050	3,3	1,0

5.6.3.3 Substituições sinônimas e não sinônimas por sítio sinônimo

As comparações entre o número de substituições sinônimas e não sinônimas, desde a divergência, de *H. sapiens* com as outras espécies, podem ser observadas na tabela 25. O número de substituições sinônimas por sítio sinônimo variou de 0,01 em *P. troglodytes* a 1,54 em *G. gallus* e o número de substituições não sinônimas por sítios não sinônimos variou de 0,003 em *P. troglodytes* a 0,17 em *G. gallus*.

A razão entre o número de substituições não sinônimas (K_a) e o número de substituições sinônimas (K_s) variou de 0,36 em *P. troglodytes* a 0,11 em *G. gallus*. O fato de K_s ser $< K_a$ indica a possível ocorrência de seleção purificadora na região codificadora da proteína madura do gene *BCHE*.

Tabela 25. Comparações do número de substituições sinônimas e não sinônimas por sítio, na região codificadora da proteína madura do gene *BCHE* nas diferentes espécies, em relação a *H. sapiens*.

<i>H. sapiens</i> versus	M _s	N _s	K _s	M _a	N _a	K _a	K _a /K _s
<i>P. troglodytes</i>	4,00	379,75	0,0106	5,00	1336,25	0,0038	0,36
<i>M. mulatta</i>	24,00	380,83	0,0658	25,00	1335,17	0,0190	0,29
<i>E. caballus</i>	90,33	382,08	0,2840	61,67	1333,92	0,0477	0,17
<i>F. catus</i>	96,83	384,25	0,3071	79,17	1331,75	0,0619	0,20
<i>P. tigris</i>	98,83	383,58	0,3157	82,17	1332,42	0,0644	0,20
<i>C. familiaris</i>	98,00	385,33	0,3106	80,00	1330,67	0,0627	0,20
<i>R. norvegicus</i>	178,75	385,25	0,7230	135,25	1330,75	0,1118	0,15
<i>M. musculus</i>	190,75	381,92	0,8223	132,25	1334,08	0,1063	0,13
<i>G. gallus</i>	250,17	382,50	1,5420	206,83	1333,50	0,1738	0,11

M_s = Número de diferenças sinônimas observadas; N_s = Número médio de sítios sinônimos possíveis; K_s = Número de substituições sinônimas por sítio sinônimo desde a divergência entre as seqüências; M_a = Número de diferenças não sinônimas observadas; N_a = Número médio de sítios não sinônimos possíveis; K_a = Número de substituições não sinônimas por sítio não sinônimo desde a divergência entre as seqüências.

5.6.4 Testando variação de K_a/K_s entre os ramos

Frente a diferentes taxas K_a/K_s das comparações das seqüências das nove espécies com *H. sapiens*, achamos conveniente testar se as taxas K_a/K_s diferem entre os ramos da árvore filogenética que abrigam essas dez espécies. Para tanto foram utilizados modelos baseados na probabilidade do uso dos códons, desenvolvidos por YANG (1998). A comparação do modelo "one ratio", que determina a mesma taxa K_a/K_s ao longo da árvore, com o modelo "free ratio", que determina taxas diferenciadas entre os ramos da árvore, permite testar a heterogeneidade de K_a/K_s ao longo da árvore pelo teste de "likelihood ratio".

O valor de lnL encontrado para o modelo "one ratio" foi -6644,046417 e para o modelo "free ratio", foi -6627,241206. A diferença entre esses dois valores é significativa (2Δl= 39.61; p < 0,01), indicando heterogeneidade de K_a/K_s nos ramos da árvore. A figura 18 mostra a árvore filogenética das dez espécies analisadas para o gene *BCHE* e as respectivas taxas K_a/K_s ao longo dos ramos.

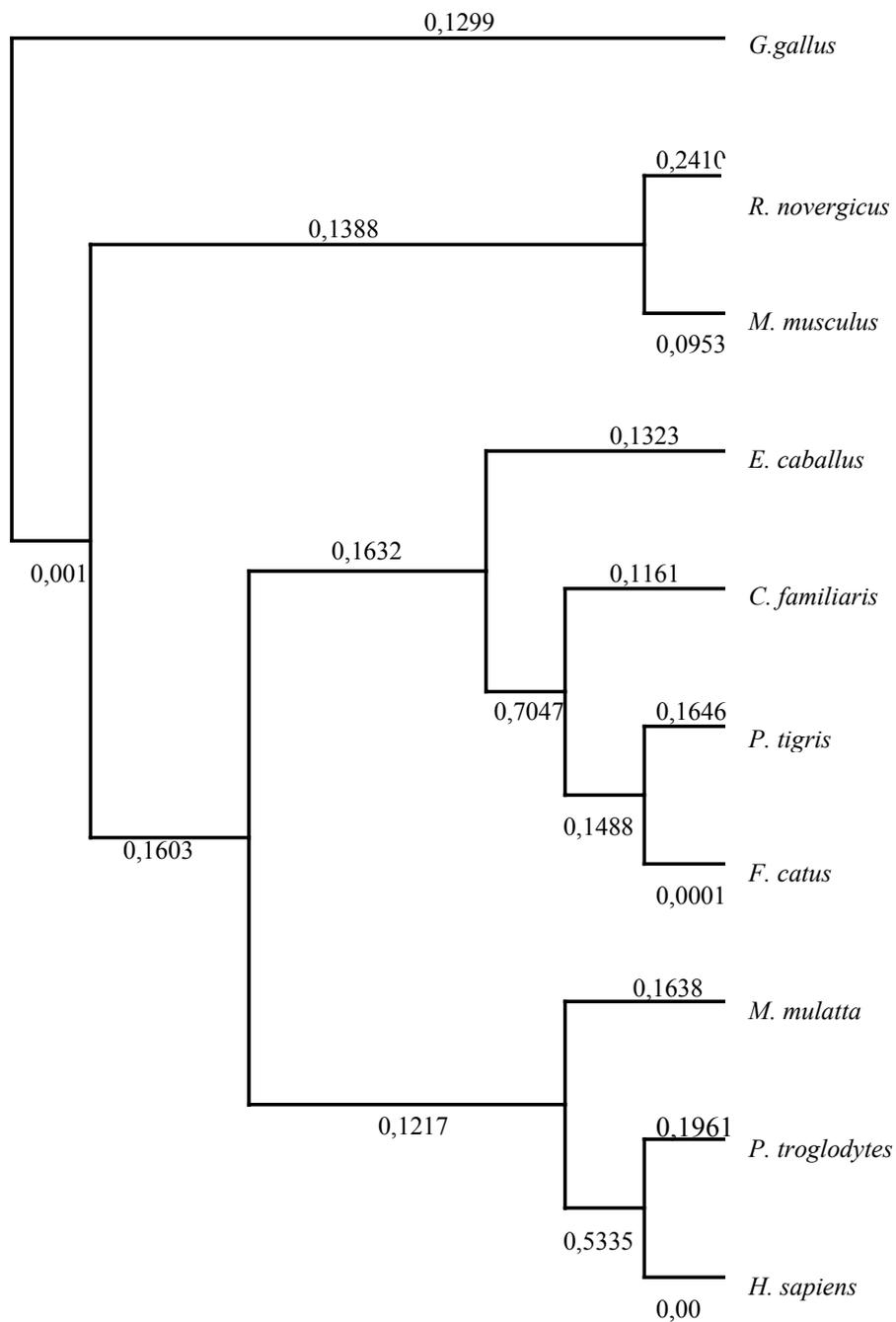


Figura 18. Árvore filogenética do gene *BCHE* e as respectivas taxas de K_a/K_s ao longo dos ramos.

5.6.5 Composição de nucleotídeos

Frente à taxa de substituição e a pressão seletiva diferenciada entre as espécies analisadas, torna-se relevante analisar se a composição de nucleotídeos é similar e/ou está alterando o uso dos codons e consequentemente a composição dos aminoácidos da BChE.

As composições de nucleotídeos da região codificadora da proteína madura, do peptídeo sinal e das regiões 5'UTR e 3'UTR são mostradas nas tabelas 26, 27, 28 e 29, respectivamente. Para a região codificadora da proteína madura e do peptídeo sinal, foram analisadas 10 seqüências de organismos diferentes. Para a região 5'UTR oito seqüências foram analisadas, pois não havia informação a respeito dessa região para *C. familiaris* e *E. caballus*. E para a região 3'UTR apenas três seqüências foram analisadas (*H. sapiens*, *P. troglodytes* e *M. mulatta*), pois as demais seqüências não apresentavam informação suficiente para as análises. No caso da região 5' UTR não foram calculados média e desvio padrão das distribuições dos nucleotídeos, uma vez que as seqüências disponíveis são de tamanho diferente.

Análises comparativas mostram que as distribuições dos nucleotídeos são homogêneas entre as espécies, não havendo diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,95$; $p > 0,80$; $p > 0,80$; $p > 0,99$ para a região codificadora da proteína madura, do peptídeo sinal, regiões 5'UTR e 3'UTR, respectivamente).

A comparação do conteúdo C+G e A+T nas quatro diferentes regiões do gene *BCHE* em *H. sapiens* revelou que estatisticamente elas diferem entre si ($\chi^2_{(3)} = 26,89$; $p < 0,001$). Refazendo-se a análise, apenas com a exclusão da região 3'UTR, verificamos que as demais três regiões não diferem entre elas quanto ao conteúdo C+G e A+T ($\chi^2_{(2)} = 0,475$ $p > 0,80$).

Tabela 26. Composição dos 1722 nucleotídeos da região codificadora da proteína madura do gene *BCHE* em *H. sapiens*, *P. troglodytes*, *M. mulatta*, *F. catus*, *P. tigris*, *C. familiaris*, *E. caballus*, *R. novergicus*, *M. musculus* e *G. gallus*.

Espécie	N (%)			
	A	C	G	T
<i>H. sapiens</i>	540 (31,36)	306 (17,77)	387 (22,47)	489 (28,40)
<i>P. troglodytes</i>	540 (31,36)	305 (17,71)	387 (22,47)	490 (28,46)
<i>M. mulatta</i> ^a	537 (31,20)	309 (17,95)	385 (22,37)	490 (28,47)
<i>E. caballus</i>	544 (31,59)	326 (18,93)	378 (21,95)	474 (27,53)
<i>F. catus</i>	545 (31,65)	327 (18,99)	373 (21,66)	477 (27,70)
<i>P. tigris</i>	541 (31,42)	329 (19,11)	377 (21,89)	475 (27,58)
<i>C. familiaris</i>	535 (31,07)	342 (19,86)	377 (21,89)	468 (27,18)
<i>R. novergicus</i>	528 (30,66)	350 (20,33)	382 (22,18)	462 (26,63)
<i>M. musculus</i>	514 (29,85)	358 (20,79)	389 (22,59)	461 (26,77)
<i>G. gallus</i> ^b	536 (31,14)	332 (19,29)	396 (23,01)	457 (26,55)
Média (± DP)	536 (± 9,14)	328,4 (± 18,18)	383,1 (± 6,98)	474,3 (± 12,40)

$\chi^2_{(27)} = 14,523$; $p > 0,95$. ^a Deleção no nt 1233. ^b Deleção no nt.1719.

Tabela 27. Composição dos nucleotídeos da região do peptídeo sinal do gene *BCHE* em *H. sapiens*, *P. troglodytes*, *M. mulatta*, *F. catus*, *P. tigris*, *C. familiaris*, *E. caballus*, *R. novergicus*, *M. musculus*, e *G. gallus*.

Espécie	N (%)			
	A	C	G	T
<i>H. sapiens</i>	21 (25,00)	17 (20,24)	14 (16,67)	32 (38,10)
<i>P. troglodytes</i>	21 (25,00)	17 (20,24)	14 (16,67)	32 (38,10)
<i>M. mulatta</i>	23 (27,38)	17 (20,24)	13 (15,48)	31 (36,90)
<i>E. caballus</i>	18 (21,43)	20 (23,81)	19 (22,62)	27 (32,14)
<i>F. catus</i>	20 (23,81)	20 (23,81)	20 (23,81)	24 (28,57)
<i>P. tigris</i>	20 (23,81)	20 (23,81)	20 (23,81)	24 (28,57)
<i>C. familiaris</i>	17 (20,24)	22 (26,19)	21 (25,00)	24 (28,57)
<i>R. novergicus</i> ^a	20 (22,99)	25 (28,74)	15 (17,24)	27 (31,03)
<i>M. musculus</i> ^a	22 (25,29)	27 (31,03)	15 (17,24)	23 (26,44)
<i>G. gallus</i>	15 (17,86)	15 (17,86)	23 (27,38)	31 (36,90)
Média (± DP)	19,7 (± 2,40%)	20 (± 3,80%)	17,4 (± 3,56%)	27,5 (± 3,69%)

$\chi^2_{(27)} = 19,964$; $p > 0,80$. ^a O peptídeo sinal de *R. novergicus* e *M. musculus* possui 87 nt.

Tabela 28. Composição de nucleotídeos da região 5'UTR do gene *BCHE* em *H. sapiens*, *P. troglodytes*, *M. mulatta*, *F. catus*, *P. tigris*, *C. familiaris*, *E. caballus*, *R. novergicus*, *M. musculus* e *G. gallus*.

Espécie	N (%)			
	A	C	G	T
<i>H. sapiens</i>	44 (28,03)	35 (22,29)	30 (19,11)	48 (30,57)
<i>P. troglodytes</i>	44 (28,03)	36 (22,93)	29 (18,47)	48 (30,57)
<i>M. mulatta</i>	45 (28,66)	33 (21,02)	31 (19,74)	48 (30,57)
<i>F. catus</i>	21 (23,86)	23 (26,14)	13 (14,77)	31 (35,23)
<i>P. tigris</i>	21 (24,14)	22 (25,29)	13 (14,94)	31 (35,63)
<i>R. novergicus</i>	18 (27,27)	18 (27,27)	10 (15,15)	20 (30,30)
<i>M. musculus</i>	29 (25,00)	37 (31,90)	24 (20,69)	26 (22,41)
<i>G. gallus</i>	38 (26,95)	27 (19,15)	32 (22,70)	44 (31,21)

$$\chi^2_{(21)} = 14,099; p > 0,80$$

Tabela 29. Composição de nucleotídeos da região 3'UTR do gene *BCHE* em *H. sapiens*, *P. troglodytes* e *M. mulatta*.

Espécie	N (%)			
	A	C	G	T
<i>H. sapiens</i>	178 (36,40)	79 (16,16)	56 (11,45)	176 (35,99)
<i>P. troglodytes</i>	176 (35,99)	80 (16,36)	58 (11,86)	175 (35,79)
<i>M. mulatta</i>	178 (36,25)	78 (15,89)	54 (11,00)	181 (36,86)

$$\chi^2_{(6)} = 0,2941; p > 0,99$$

5.6.6 Uso dos códons

A tabela 30 mostra dados referentes ao número efetivo de códons utilizados e o índice de uso dos códons dentro de cada espécie. Essa tabela mostra que nem todos os códons estão sendo usados ao acaso. Cada códon foi analisado em separado, e apenas os códons para tirosina, glutamina, asparagina, cisteína, valina e serina estão sendo usados ao acaso (p varia de $>0,05$ a $> 0,85$), para os demais ocorre desvio estatisticamente significativo ($p < 0,05$), mostrando uso preferencial. A análise também mostra que os códons mais utilizados são os ricos em adenina e timina, como pode ser visualizado na figura 19 e na tabela 30.

Examinou-se a utilização dos códons pelas diferentes espécies (dados não apresentados). Para isso compararam-se os códons utilizados para cada aminoácido em separado, considerando-se todas as espécies e, depois, cada espécie em relação a *H. sapiens*

e constatou-se, pelo resultado do χ^2 , que não há diferenças estatisticamente significativas em nenhuma das situações (p varia de 0,99 a 0,10). Desta forma, é mostrado que a distribuição do uso dos códons ocorre da mesma forma nas espécies analisadas.

Tabela 30. Uso dos códons referentes à proteína madura do gene *BCHE* em *H. sapiens*, *P. troglodytes*, *M. mulatta*, *F. catus*, *P. tigris*, *C. familiaris*, *E. caballus*, *M. musculus*, *R. norvegicus* e *G. gallus*.

Espécie	Número efetivo de códons	Índice de uso dos códons ^a	Conteúdo C+G na terceira base	Conteúdo G+C na seqüência
<i>H. sapiens</i>	50,393	0,313	0,308	0,402
<i>P. troglodytes</i>	49,898	0,308	0,306	0,402
<i>M. mulatta</i>	49,720	0,335	0,302	0,403
<i>E. caballus</i>	53,476	0,302	0,325	0,409
<i>F. catus</i>	50,458	0,337	0,313	0,407
<i>P. tigris</i>	50,552	0,318	0,322	0,410
<i>C. familiaris</i>	49,724	0,313	0,335	0,418
<i>R. norvegicus</i>	54,946	0,236	0,356	0,425
<i>M. musculus</i>	54,751	0,232	0,368	0,434
<i>G. gallus</i>	51,414	0,230	0,357	0,422

^a Varia de zero a 1, quando todos os códons possíveis são usados igualmente até o uso mínimo de um códon para cada aminoácido, respectivamente.

UUU-F 27 (1,38)	UCU-S 7 (1,14)	UAU-Y 14 (1,40)	UGU-C 5 (1,25)
UUC-F 12 (0,62)	UCC-S 5 (0,81)	UAC-Y 6 (0,60)	UGC-C 3 (0,75)
UUA-L 9 (1,08)	UCA-S 9 (1,46)	UAA-* 0 (0,00)	UGA-* 0 (0,00)
UUG-L 15 (1,80)	UCG-S 0 (0,00)	UAG-* 0 (0,00)	UGG-W 18 (1,00)
CUU-L 12 (1,44)	CCU-P 12 (1,60)	CAU-H 7 (1,75)	CGU-R 2 (0,52)
CUC-L 4 (0,48)	CCC-P 3 (0,40)	CAC-H 1 (0,25)	CGC-R 1 (0,26)
CUA-L 4 (0,48)	CCA-P 13 (1,73)	CAA-Q 11 (1,10)	CGA-R 3 (0,78)
CUG-L 6 (0,72)	CCG-P 2 (0,27)	CAG-Q 9 (0,90)	CGG-R 2 (0,52)
AUU-I 12 (1,33)	ACU-T 12 (1,37)	AAU-N 26 (1,30)	AGU-S 9 (1,46)
AUC-I 4 (0,44)	ACC-T 6 (0,69)	AAC-N 14 (0,70)	AGC-S 7 (1,14)
AUA-I 11 (1,22)	ACA-T 14 (1,60)	AAA-K 26 (1,49)	AGA-R 13 (3,39)
AUG-M 11 (1,00)	ACG-T 3 (0,34)	AAG-K 9 (0,51)	AGG-R 2 (0,52)
GUU-V 10 (1,25)	GCU-A 11 (1,29)	GAU-D 17 (1,42)	GGU-G 17 (1,48)
GUC-V 6 (0,75)	GCC-A 10 (1,18)	GAC-D 7 (0,58)	GGC-G 5 (0,43)
GUA-V 8 (1,00)	GCA-A 12 (1,41)	GAA-E 26 (1,41)	GGA-G 18 (1,57)
GUG-V 8 (1,00)	GCG-A 1 (0,12)	GAG-E 11 (0,59)	GGG-G 6 (0,52)

Figura 19. Códons da região codificadora da proteína madura do gene *BCHE* na espécie humana, seguidos da abreviação do aminoácido, do número de ocorrência e em parênteses o valor do uso relativo dos códons sinônimos (RSCU).

5.6.7 Variação de aminoácidos

As proporções de aminoácidos diferentes e o número de substituições de aminoácidos por sítio, por unidade de tempo, na região codificadora do gene *BCHE* correspondente à proteína madura, são apresentados na tabela 31. A proporção de aminoácidos diferentes variou de 0,009 em *P. troglodytes* a 0,279 em *G. gallus*. O número de aminoácidos substituídos variou de 0,009 em *P. troglodytes* a 0,327 em *G. gallus*.

A tabela 32 mostra a proporção de aminoácidos diferentes e o número de substituições de aminoácidos por sítio, por unidade de tempo, na região codificadora correspondente ao peptídeo sinal. A proporção de aminoácidos diferentes varia de zero em *P. troglodytes* a 0,44 em *G. gallus*.

A figura 20 apresenta a conservação dos aminoácidos e a respectiva estrutura do monômero da BChE humana.

Tabela 31. Proporção, em relação a *H. sapiens*, de aminoácidos diferentes e número de substituições de aminoácidos por sítio, por unidade de tempo, na região codificadora da proteína madura do gene *BCHE* em *P. troglodytes*, *M. mulatta*, *F. catus*, *P. tigris*, *C. familiaris*, *E. caballus*, *M. musculus*, *R. norvegicus* e *G. gallus*.

Espécie	Proporção de aa.diferentes	Número de aa. substituídos por códon	Variância do número aa. substituídos por sítio ($\times 10^5$)
<i>P. troglodytes</i>	0,0087	0,0087	1,5
<i>M. mulatta</i>	0,0435	0,0445	8
<i>E. caballus</i>	0,0958	0,1007	18
<i>F. catus</i>	0,1219	0,1300	24
<i>P. tigris</i>	0,1254	0,1340	25
<i>C. familiaris</i>	0,1254	0,1340	25
<i>R. norvegicus</i>	0,2003	0,2235	43
<i>M. musculus</i>	0,1916	0,2127	41
<i>G. gallus</i>	0,2787	0,3267	67

Tabela 32. Proporção, em relação a *H. sapiens*, de aminoácidos diferentes e número de substituições de aminoácidos por sítio por unidade de tempo na região codificadora do peptídeo sinal do gene *BCHE* em *P. troglodytes*, *M. mulatta*, *F. catus*, *P. tigris*, *C. familiaris*, *E. caballus*, *M. musculus*, *R. novergicus* e *G. gallus*.

Espécie	Proporção de aminoácidos diferentes	Número de aminoácidos substituídos por sítio	Variância do número de aminoácidos substituídos por sítio
<i>P. troglodytes</i>	0	0	0
<i>M. mulatta</i>	0,0238	0,0241	0,0003
<i>E. caballus</i>	0,2143	0,2412	0,0032
<i>F. catus</i>	0,1786	0,1967	0,0026
<i>P. tigris</i>	0,1786	0,1967	0,0026
<i>C. familiaris</i>	0,1905	0,2113	0,0028
<i>R. novergicus</i>	0,3218	0,3883	0,0054
<i>M. musculus</i>	0,3334	0,4055	0,0057
<i>G. gallus</i>	0,4405	0,5807	0,0094

5.7 Comparação entre os genes *ACHE* e *BCHE*

Os genes *ACHE* e *BCHE* apresentam em média 54,45% de identidade nucleotídica e 51,63% de identidade de aminoácidos (Tabela 33). Na tabela 34, as estimativas de K_a/K_s para esses dois genes sugerem que ambos têm sofrido a ação da seleção purificadora, sendo que esta parece ser maior no caso do gene *ACHE*. Esses genes diferem significativamente no conteúdo C+G ($\chi^2 = 9,236$; $p < 0,05$), como mostrado na tabela 35, sendo que o gene *ACHE* possui um conteúdo muito maior de C+G. A diferença entre esses conteúdos encontra-se principalmente na composição da terceira posição do códon (Tabela 36).

Tabela 33. Identidade de nucleotídeos e aminoácidos entre os genes *ACHE* e *BCHE*.

Espécie	Identidade de nucleotídeo (%)	Identidade de aminoácido (%)
<i>H. sapiens</i>	53,79	52,07
<i>F. catus</i>	54,65	51,37
<i>R. novergicus</i>	54,94	51,72
<i>M. musculus</i>	54,42	51,37
Média	54,45	51,63

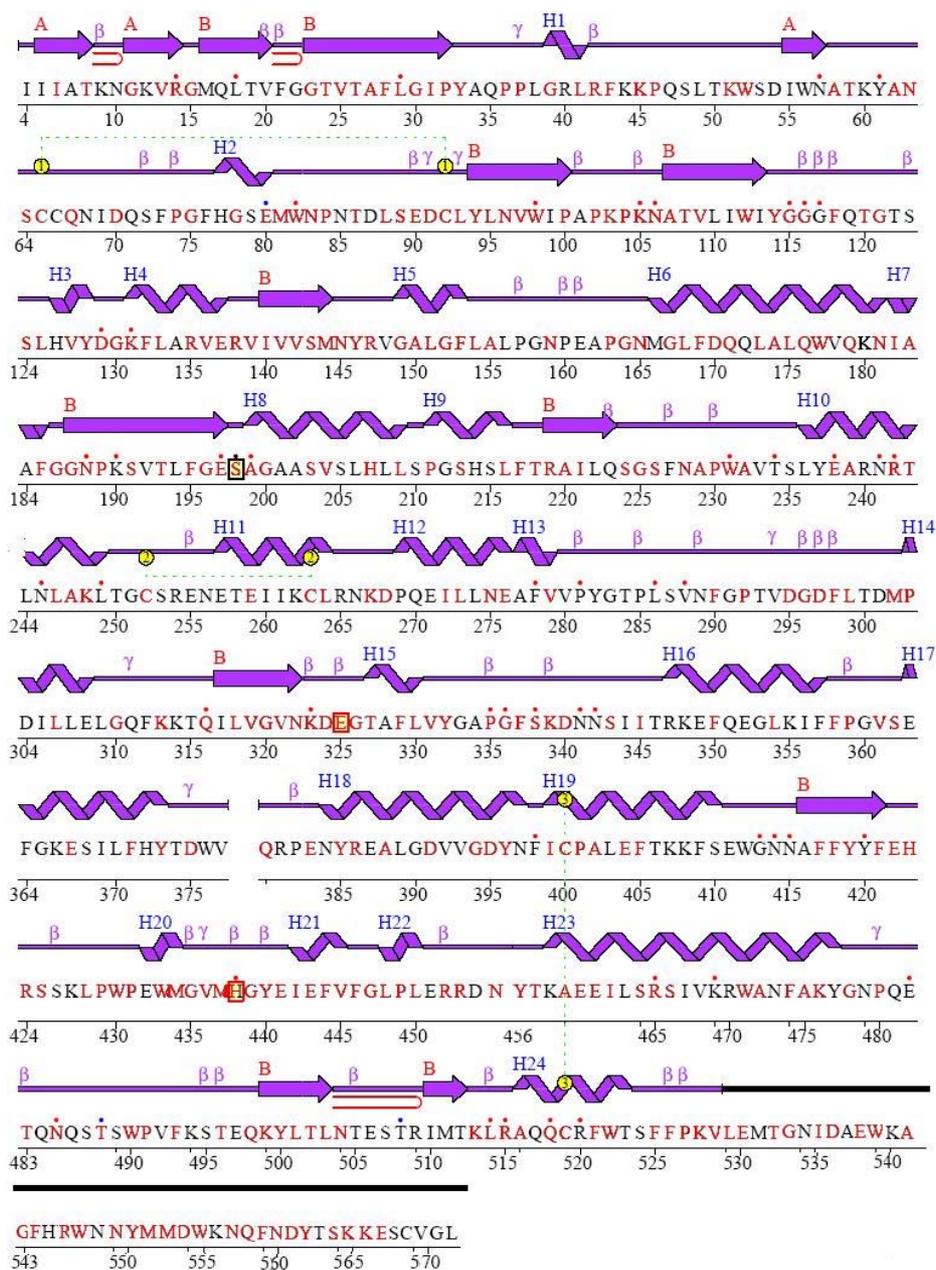


Figura 20. Estrutura secundária do monômero da BChE: as letras em vermelho representam os sítios 100% conservados nas dez espécies analisadas no presente estudo,  representa fita beta pregueada  representa alfa hélices e , dobramentos aleatórios;  resíduos catalíticos;  interação do resíduo com metal;  interação do resíduo com ligante. A partir do aminoácido 529 não dispomos de informações a respeito da estrutura. Figura modificada de ESTHER Database, 2006.

Tabela 34. Estimativas de K_a/K_s para os genes *BCHE* e *ACHE*.

Comparação com <i>H. sapiens</i>	K_a/K_s (gene <i>BCHE</i>)	K_a/K_s (gene <i>ACHE</i>)
<i>F. catus</i>	0,20	0,07
<i>R. novergicus</i>	0,15	0,09
<i>M. musculus</i>	0,13	0,09

Tabela 35. Contraste do conteúdo C+G da região codificadora dos genes *BCHE* e *ACHE*, correspondente à proteína madura.

Espécie	Conteúdo C+G (%) gene <i>BCHE</i>	Conteúdo C+G (%) gene <i>ACHE</i>
<i>H. sapiens</i>	693 (40,24)	1126 (64,71)
<i>F. catus</i>	700 (40,65)	1110 (63,97)
<i>R. novergicus</i>	732 (42,51)	1023 (58,79)
<i>M. musculus</i>	747 (43,38)	1030 (59,20)

$$\chi^2 = 9,236; p < 0,05.$$

Tabela 36. Contraste do conteúdo C+G dos genes *BCHE* e *ACHE*, correspondente à terceira posição dos códons relativos à proteína madura

Espécie	Conteúdo C+G (%) gene <i>BCHE</i>	Conteúdo C+G (%) gene <i>ACHE</i>
<i>H. sapiens</i>	177 (30,8)	449 (77,5)
<i>F. catus</i>	180 (31,3)	426 (73,5)
<i>R. novergicus</i>	204 (35,6)	377 (65,0)
<i>M. musculus</i>	205 (35,7)	382 (65,9)

$$\chi^2 = 10,36; p < 0,05$$

6 DISCUSSÃO

6.1 Variabilidade do gene *BCHE* em indivíduos com atividade da BChE $\leq 4,00$ KU/L

6.1.1 Exon 1

Nos 113 doadores de sangue analisados para o exon 1 (sítio -116), apenas um tipo de variante não usual foi encontrada (-116A). As frequências alélicas e genotípicas foram contrastadas com os dados de atividade baixa ($\leq 4,00$ UK/L) da amostra de FURTADO-ALLE et al. (2006), incluindo obesos e indivíduos de peso normal: -116GG = 47, -116GA = 22, -116AA = 1; -116A = 17,14% \pm 3,19%. Para tanto, sete indivíduos foram retirados da amostra do presente estudo, para não haver duplicação de amostras. Assim, a frequência considerada para a variante não usual -116A, nos 106 indivíduos do presente estudo (-116GG = 68, -116GA = 36, -116AA = 2) foi 18,87% \pm 2,69%. As frequências observadas nestes dois estudos não diferem entre si ($\chi^2 = 0,169$; $p > 0,5$ para frequência alélica e $\chi^2 = 0,192$; $p > 0,5$ para frequência genotípica).

A variante não usual -116A foi descrita por BARTELS et al. (1990), que estimaram sua frequência em 8%. Esses autores não citam a população da qual esses dados foram obtidos. Supomos que esses indivíduos pertençam à população dos Estados Unidos da América. FURTADO-ALLE et al. (2006) estudaram a variante não usual -116A em uma amostra de homens euro-brasileiros doadores de sangue de Curitiba, composta por 145 obesos (IMC ≥ 30) e 147 de IMC normal ($20 \leq \text{IMC} \leq 25$). A frequência alélica observada foi de 8,3% \pm 1,6% em obesos e 8,8% \pm 1,6% em indivíduos com IMC normal. Quando se comparam as frequências alélicas dos indivíduos do presente estudo (18,87%; atividade $\leq 4,00$ KU/L) com as de obesos e de homens com IMC normal, observa-se que a frequência é significativamente mais alta no grupo de atividade baixa ($\chi^2 = 12,352$, sendo $p = 0,0004$ e $\chi^2 = 10,913$, sendo $p = 0,0012$, respectivamente).

O sítio -116 está localizado na região 5' UTR e, portanto, pode estar associado à regulação da tradução. A região 5' UTR do gene *BCHE* é caracterizada por apresentar uma estrutura em forma de grampo, constituída por nove pares de bases, localizada 17 nucleotídeos a jusante do sítio de revestimento 7-MG (7-metil guanosina). Essa estrutura

tem sido descrita na literatura como importante reguladora da tradução. Contudo, no RNAm da BChE, ela desempenha efeito secundário pois: apresenta baixa estabilidade termodinâmica (-7,1 kcal/mol) e, por sua localização, não inibe a ligação do ribossomo (JBILO et al., 1994). Assim, outras estruturas ou regiões devem ajudar na regulação da tradução do RNAm da BChE. WILKIE et al. (2003) relatam a existência de proteínas reguladoras que interagem com elementos específicos da região 5'UTR. Pouco se sabe a respeito do controle da regulação da tradução da BChE o que dificulta determinar o papel do sítio -116. Assim, especulamos que a variante não usual -116A poderia afetar a regulação da tradução do RNAm do gene *BCHE*, interferindo na ligação de proteínas reguladoras da tradução. Desta forma, indivíduos que apresentassem essa variante teriam um menor número de moléculas circulantes da BChE e, conseqüentemente, menor atividade da BChE.

Preliminarmente, para testar essa hipótese determinamos a estrutura secundária do RNAm das duas variantes quanto ao sítio -116 (Figura 21), com auxílio do programa MFOLD (www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold). O programa gerou, além do grampo descrito por JBILO et al (1994), uma outra estrutura mais complexa e estável (-30K/mol), porém também não o suficiente para impedir a movimentação do ribossomo, uma vez que para isso se faz necessária estabilidade da estrutura acima de -50 kcal/mol. Além disso, as variações no sítio -116 não causam alteração na estrutura secundária do RNAm (Figura 21) e, possivelmente, não interferem na regulação da tradução.

Em vista do exposto, formulamos uma segunda hipótese, a de que a variação no sítio -116 poderia interferir na ligação dos fatores de transcrição na molécula de DNA. Testamos teoricamente essa hipótese com a aplicação do programa GENOMATIX, o qual procura possíveis sítios de ligação de fatores de transcrição numa determinada seqüência. Quando se considerou a seqüência com a variante usual -116G, foram encontrados três possíveis fatores de transcrição ligantes da região do sítio -116: fator de transcrição dedo de zinco MYT1 envolvido na neurogênese primária; Sítio ativador 1 Yin e Yang; TCF/LEF1 envolvido na via de transcrição Wnt. A seqüência com a variante não usual -116A apresentou apenas quatro possíveis fatores de transcrição ligantes: fator de transcrição dedo de zinco MYT1 envolvido na neurogênese primária; dedo de zinco TF envolvido na

leucemia promielocítica; homeodomínio Hoxb-9; TCF/LEF1 envolvido na via de transcrição Wnt.

Caso essa diferença no número e nos fatores de transcrição ligantes em relação às variações *-116A* e *-116G* possa afetar o nível de transcrição do gene *BCHE*, isso poderia explicar o maior número de moléculas circulantes em indivíduos portadores de *-116G*. Uma hipótese alternativa seria a de que o sítio *-116* esteja em desequilíbrio de ligação com outro sítio variante na região promotora ou reguladora do gene *BCHE*, que seja responsável pela baixa na atividade da BChE.

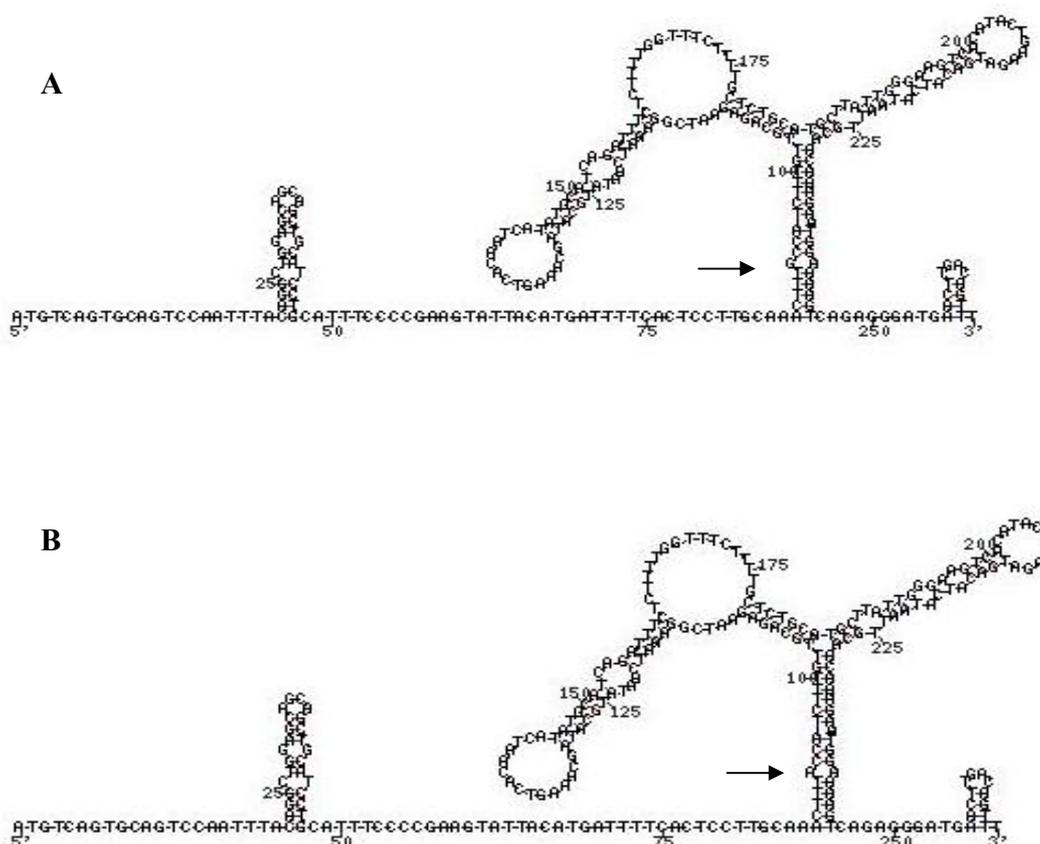


Figura 21. Estruturas secundárias parciais do RNAm da BChE: A) com *-116G*; B) com *-116A*. As setas indicam a posição *-116*.

6.1.2 Exon 2

Dois tipos de variantes foram observadas no exon 2, nos seis fragmentos analisados no presente estudo: *c.344G>A* (*p.G115D*) e *c.765G>C* (*p.E255D*).

MIKAMI (2005) analisou 118 indivíduos com atividade baixa para oito fragmentos do exon 2 e encontrou pelo menos uma mutação por fragmento. A maioria das variantes não usuais observada por essa autora apresentou frequências alélicas que variaram de $0,42\% \pm 0,42\%$ a $2,17\% \pm 0,96\%$, nesse grupo com atividade baixa da BChE. Desta forma, a não detecção de variação observada no presente estudo, em quatro dos fragmentos analisados, pode ser devida ao número amostral baixo (53 indivíduos) e à baixa frequência da maioria das variantes do gene *BCHE*.

A mutação *c.344G>A* foi descrita por PRIMO-PARMO et al. (1997), em duas famílias e em dois outros indivíduos isolados, e condiciona enzima instável que pode levar a problemas clínicos, quando o paciente recebe succinilcolina. No Laboratório de Polimorfismos e Ligação da UFPR, foram anteriormente encontrados quatro heterozigotos para essa mutação, sendo dois deles em amostras com fenótipo não usual determinado por inibição enzimática. Se considerarmos os outros dois heterozigotos (um de amostra de 108 doadores de sangue, examinada por SOUZA, 2001 e o outro, de amostra de 346 doadores de sangue, examinada por MIKAMI, 2005), encontra-se uma frequência de $0,22\% \pm 0,16\%$ dessa variante em doadores de sangue de Curitiba. Esta frequência não difere da observada no presente estudo ($0,96\%$; $\chi^2 = 1,735$, $p > 0,25$). Considerando-se apenas a amostra de MIKAMI (2005) de atividade baixa ($N = 106$), onde foi encontrado um heterozigoto para essa mutação ($0,47\% \pm 0,47\%$), e comparando com os presentes dados, de 52 doadores de sangue com atividade baixa da BChE, também não houve diferença entre as duas frequências alélicas ($\chi^2 = 0,266$; $p > 0,99$).

A variante não usual *c.765G>C* foi descrita por PRIMO-PARMO et al. (1996) em um único indivíduo e foi inferido que se tratava de variação rara. MIKAMI (2005) reuniu seus dados com os de SOUZA (2001) e estimou a frequência dessa variante não usual na população de Curitiba em $1,03\% \pm 0,32\%$ e observou que a distribuição dessa variante não usual ocorre independente da classificação da amostra por atividade enzimática e, portanto, não parece afetar a atividade da BChE. Comparando essa frequência populacional com a

encontrada na amostra de atividade baixa do presente trabalho ($1,89\% \pm 1,32\%$), não se encontrou diferença significativa entre elas ($\chi^2 = 0,639$; $p > 0,60$).

6.1.3 Exon 3

Estudos anteriores, realizados no Laboratório de Polimorfismos e Ligação da UFPR, não detectaram variação neste fragmento (CAZAROTE, 1999; SOUZA, 2001; FURTADO et al., 2006). Partindo deste conhecimento prévio, optamos por modificar a metodologia utilizada, alterando a concentração de acrilamida, a proporção de bisacrilamida em relação a acrilamida total e ajustamos o tempo de corrida eletroforética (Tabela 6). Essa metodologia tem se mostrado eficiente no Laboratório de Polimorfismos e Ligação, para diferenciar mutações distintas que se encontram em um mesmo fragmento e/ou melhorar o grau de separação das bandas. Porém não obtivemos êxito na detecção de variações neste exon do gene *BCHE*. HAYASHI e YANDELL (1993) relatam que a metodologia de SSCA pode detectar cerca de 90% da variação no DNA e, portanto 10% da variação pode estar sendo perdida.

Neste fragmento já foram descritas cinco mutações: uma no íntron 2 (*c.IVS2-8T>G*) e quatro no exon 3 [*c.1490A>T* (*p.E497V*), *c.1500T>A* (*p.Y500X*), *c.1543C>T* (*p.R515C*), *c.1553A>T* (*p.Q518L*)]. A variante *c.1490A>T* foi seqüenciada por BARTELS et al. (1992a) em integrantes de apenas uma família, provavelmente norte-americana, e não parece existir registro desta variante em outras famílias. A variante *c.1543C>T* foi encontrada por MAEKAWA et al. (1997) em quatro indivíduos no Japão, não tendo sido descrita em outros lugares do mundo. As variantes *c.IVS2-8T>G*, *c.1500T>A* (*p.Y500X*) e *c.1553A>T* (*p.Q518L*) foram descritas na população dos Estados Unidos da América do Norte, por PRIMO-PARMO et al. (1996), como sendo variantes silenciosas da BChE, ou seja, variantes que apresentam atividade enzimática < 10% em relação à atividade da enzima usual. O conjunto dos fenótipos silenciosos tem frequência estimada em 1 a cada 100.000 indivíduos. Desta forma, as mutações descritas no exon 3 parecem ser extremamente raras ou restritas a uma determinada população.

6.1.4 Íntron 3 e início do exon 4

Neste fragmento também foram identificadas duas variantes não usuais: *c.IVS3-14T>C* e *c.1719delT*.

A mutação *c.IVS3-14T>C* foi descrita por PARMO-FOLLONI et al. (2006) em um indivíduo que apresentava diabetes do tipo 2 e em um doador de sangue. Quando os dados do presente estudo foram comparados com os de PARMO-FOLLONI et al. (2006), oito indivíduos com atividade baixa da BChE foram retirados da presente amostra para evitar sobreposição de observações, ocasionada pelo fato de que ambos os estudos utilizaram o mesmo banco de doadores de sangue. As frequências genotípicas e alélicas nos 152 indivíduos do presente estudo foram, respectivamente: *IVS3-14TT* = 150 e *IVS3-14TC* = 2; *IVS3-14C* = 0,66% ± 0,46%. Comparando a amostra do presente estudo, tanto com a amostra de diabéticos do tipo 2 (*IVS3-14TT* = 59 e *IVS3-14TC* = 1; *IVS3-14C* = 0,83% ± 0,83%), quanto com o grupo de doadores de sangue de PARMO-FOLLONI et al., 2006 (*IVS3-14TT* = 131 e *IVS3-14TC* = 1; *IVS3-14C* = 0,38% ± 0,38%), não houve diferença estatisticamente significativa ($\chi^2 = 0,509$ e $\chi^2 = 0,512$; $\chi^2 = 0,558$ e $\chi^2 = 0,561$, para as frequências alélicas e genotípicas de diabéticos do tipo 2 e doadores de sangue, respectivamente).

A mutação *c.1719delT*, ainda não descrita na literatura, foi identificada em agosto de 2006 no nosso laboratório por PARMO FOLLONI, ao analisar amostra de doadores de sangue. O indivíduo (377) que possui essa mutação, também faz parte da amostra de doadores de sangue com atividade da BChE $\leq 4,00$ KU/L, do presente estudo. Essa variante provoca mudança no quadro de leitura, afetando o último códon (*p.L574fs576X*). A deleção produz um códon sinônimo no penúltimo aminoácido (GGT>GGC, glicina), o último aminoácido muda de leucina para serina (CTC>TCT), o códon de parada para asparagina (TAA>AAT) e, em seguida, é produzido um novo códon de parada (TAA). Assim, a BChE passa de 574 aminoácidos a 575. O quanto essa variante pode afetar a atividade da enzima ainda não sabemos. Foi observado em nosso laboratório, após eletroforese em gel de poliacríamida, que o indivíduo (377) forma tetrâmeros da BChE, contudo por se tratar de um heterozigoto, não foi possível saber se as duas formas variantes do monômero interagem ou não para formar o tetrâmero.

6.2 Desequilíbrio de ligação entre as variantes do gene *BCHE*

BARTELS et al. (1990), quando descreveram variação no sítio -116, verificaram desequilíbrio de ligação com as variações do sítio 1615, porém os valores de D e de D' não foram determinados. A variante não usual -116A encontra-se preferencialmente em cromossomo com a variante não usual 1615A. FURTADO (2005) estimou o desequilíbrio de ligação em $D'=91,2\%$. No presente estudo também foi verificado desequilíbrio de ligação, sendo $D'=91,18\%$. Os valores de desequilíbrio encontrados para a amostra populacional (FURTADO, 2005) e a amostra selecionada por atividade baixa do presente estudo são semelhantes, apesar da presente amostra ter sido selecionada por atividade baixa da BChE. A seleção por atividade baixa não alterou o valor de D' , pois não distorceu as proporções dos haplótipos ao aumentar a frequência da variante -116A.

Foram feitas duas estimativas de D' entre as variantes dos sítios -116 e 209. Quando consideramos que exista na amostra um haplótipo [-116A; 209G; 1615A], a frequência estimada é de $0,2\% \pm 0,3\%$ e o valor de $D'=60,25\%$ ($\chi^2=1,15$; $p=0,28$). Quando recalculamos o desequilíbrio de ligação, considerando a inexistência desse haplótipo na amostra, $D'=100\%$, porém novamente o valor de p não é significativo ($\chi^2=2,94$; $p=0,085$). A explicação para a falta de significância deve-se à frequência baixa das variantes (-116A = $18,58\% \pm 2,59\%$ e $D70G=4,65\% \pm 1,38\%$), fazendo com que, em uma amostra de 161 indivíduos, os valores observados dos haplótipos com essas duas variações sejam muito semelhantes aos esperados pela hipótese nula. Portanto, os valores de D' são pouco informativos e se faz necessário uma amostra maior para que se possa avaliar melhor o desequilíbrio real entre essas variações.

Para tentar entender melhor a relação das variantes dos sítios -116 e 209 analisamos 51 portadores da variante não usual *c.209A>G*. A tabela 15 mostra os genótipos apresentados por esses indivíduos. É possível observar que 88,24% (45/51) dos genótipos apresentam a variante não usual 209G em cis com a variante usual -116G. Os demais seis genótipos revelam que a variante não usual -116A aparece apenas quando o indivíduo também é portador da variante não usual 1615A. Desses seis portadores de -116A, cinco são homocigotos para 1615A e um é triplo heterocigoto. Assim, supomos que nessa amostra de 51 indivíduos, os haplótipos que contêm -116A também possuem 209A e 1615A.

MIKAMI (2005) também detectou desequilíbrio de ligação entre as variantes dos sítios 765 e 1615, obtendo D' igual a 65,58%.

Constatamos que os quatro indivíduos portadores da variante não usual *344A*, identificados no nosso laboratório (dois de SOUZA, 2001, um de PARMO-FOLLONI et al., 2006 e um do presente estudo), também possuem a variante não usual *IVS3-14C* (Tabela 17), sugerindo que as variações desses dois sítios estão em desequilíbrio de ligação absoluto ou que existe um forte desequilíbrio entre elas.

6.3 Estrutura haplotípica

6.3.1 Sítios -116, 209 e 1615

Os haplótipos mais frequentes na amostra foram [*-116G; 209A; 1615G*] – usual – (N = 216; 67,05% ± 2,8%), [*-116A; 209A; 1615A*] (N = 50; 15,44% ± 2,01%), [*-116G; 209A; 1615A*] (N = 38; 11,73% ± 1,67%), segundo os dados da tabela 13.

Dos oito haplótipos possíveis para as combinações dos sítios -116, 209 e 1615, apenas o haplótipo [*-116A; 209G; 1615G*] não foi encontrado, sendo possível que ele seja extremamente raro ou inexistente. As frequências haplotípicas, estimadas pelo método de máxima verossimilhança, estimaram o haplótipo [*-116A; 209G; 1615A*] com baixa frequência e com um valor alto de desvio padrão (0,20% ± 0,34%), sendo que com apenas um desvio padrão para baixo se encontra a frequência zero. Desta forma, os dados a respeito deste haplótipo são pouco informativos. Além disso, em discussão anterior, feita sobre a amostra de 51 portadores da mutação *c.209A>G*, discutiu-se a possível ausência deste haplótipo na amostra do presente estudo.

Para se ter certeza da fase haplotípica é recomendado realizar estudos familiares em três gerações. BARTELS et al. (1992a) analisaram 11 casos familiares e BARTELS et al. (1992b), cinco casos familiares para os sítios -116, 209, 1615 e *189. O haplótipo [*-116A; 209G; 1615A*] foi encontrado em um indivíduo cujo genótipo era [*-116GA; 209GG; 1615AA; *189GG*], o que evidencia a sua existência real.

6.3.2 Sítios 344, IVS3-14 e 1615

A mutação *c.IVS3-14T>C* foi identificada em nosso laboratório em um indivíduo diabético do tipo 2 que apresentava resultados discordantes quanto a genotipagem do sítio 1615. Analisando esse indivíduo por PCR-RFLP ele apresentava-se como heterozigoto *1615GA* e analisando por PCR-SSCA, homozigoto *1615AA*. Por seqüenciamento foi possível detectar que se tratava de mutação intrônica, exatamente na região de hidridização do iniciador utilizado na PCR-SSCA. Desta forma, o cromossomo que apresenta a variante usual *1615G* não é amplificado e o indivíduo apresenta-se como homozigoto *1615AA* em PCR-SSCA (PARMO-FOLLONI et al., 2006). Essa situação foi verificada em mais dois indivíduos analisados por SOUZA (2001) e esclarecida no presente estudo. Além disso, as condições eletroforéticas, utilizadas no presente estudo, favorecem a visualização de que a variante não usual *IVS3-14C* está em cis com *1615G*.

Em função disso, analisamos todos os indivíduos *344GA*, genotipados no Laboratório de Polimorfismos e Ligação, quanto ao sítio IVS3-14. Todos os indivíduos *344GA* analisados também são *IVS3-14TC*. Baseando-se nesses fatos, infere-se que a variante não usual *344A* está em cis com a variante não usual *IVS3-14C* e a variante *IVS3-14C* por sua vez, está em cis com *1615G*. Assim, os prováveis haplótipos encontrados na amostra de portadores da mutação *c.IVS3-14T>C* do presente estudo (Tabela 17) são: [*344A; IVS3-14C; 1615G*] (N = 4); [*344G; IVS3-14C; 1615G*] (N = 3); [*344G; IVS3-14T; 1615G*] (N = 3); [*344G; IVS3-14T; 1615A*] (N = 4).

6.3.3 Estrutura haplotípica e fenótipo

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.

6.3.3.1 Sítios –116 e 1615

A mutação *c.1615G>A* foi associada à redução de um terço no número de moléculas circulantes da BChE (RUBINSTEIN et al., 1978), em estudos de determinação fenotípica por meio de inibidores da BChE. BARTELS et al. (1992b), com dados genotípicos ao nível de DNA, constataram que heterozigotos para a mutação *c.1615G>A* mostram uma redução média de 20% na atividade da BChE, em relação aos homozigotos usuais e que homozigotos *1615AA* apresentam em média 30% menos atividade. ALTAMIRANO et al. (2000) estudaram o efeito isolado da variante *c.1615G>A*, por mutagênese sítio dirigida em células CHO e, aparentemente, não encontraram diferenças entre a enzima usual e a enzima condicionada por *1615A*, no que diz respeito à atividade, afinidade por substratos, taxa catalítica, taxa de secreção da BChE da célula, taxa de degradação intracelular, interação C-terminal e formação de tetrâmeros. Os autores atribuíram o decréscimo no número de moléculas circulantes, nesse fenótipo não usual, a alguma mutação na região promotora ou reguladora do gene *BCHE*, que esteja em desequilíbrio de ligação com *1615A*.

FURTADO (2005) comparou a atividade média da BChE dos genótipos quanto ao sítio –116 e constatou que esta era significativamente menor em *–116GA* do que em *–116GG* ($p = 0,04$). A autora também contrastou a atividade média da BChE dos genótipos para o sítio 1615 e também observou média significativamente menor no grupo *1615GA + 1615AA* do que em *1615GG* ($p = 0,008$). Em seguida, a autora considerou os dois sítios em conjunto e comparou a atividade média da BChE de cada genótipo. Essa análise mostrou que o genótipo [*–116GA;1615GA*] apresenta atividade média da BChE significativamente mais baixa ($p = 0,01$) que o genótipo [*–116GG;1615GA*]. Visto que esses genótipos diferem entre si apenas na posição –116, foi sugerido que a variação não usual *–116A* esteja condicionando a baixa atividade da BChE.

Assim, como dito anteriormente, a variante não usual *–116A* pode ser responsável pela redução do número de moléculas circulantes da BChE, atribuída anteriormente à variante não usual *1615A*. Ou ainda, o haplótipo [*–116A;1615A*] pode estar em desequilíbrio de ligação com outra(s) variante(s) na região promotora ou reguladora do gene, condicionante(s) de atividade menor da BChE.

6.3.3.2 Sítios 344 e IVS3-14

PRIMO-PARMO et al.(1997) quando descreveram a mutação *c.344G>A*, relataram menor estabilidade da enzima após o processo de descongelamento do plasma estocado. A atividade média dos indivíduos portadores das mutações *c.344G>A* e/ou *c.IVS3-14T>C* é baixa ($1,88 \pm 0,90$ KU/L; N = 6; dados do Laboratório de Polimorfismos e Ligação da UFPR). Contudo, é difícil avaliar o efeito isolado de cada mutação, uma vez que a maioria dos indivíduos é heterozigoto composto para ambas as mutações e também para *-116A*.

Apenas um indivíduo apresenta somente a mutação *c.IVS3-14T>C* (2,85 KU/L). Ainda não sabemos ao certo o quanto essa mutação afeta a produção do monômero da BChE. Tomando-se como base o modelo geral de retirada dos íntrons em eucariontes, a posição -14 dos íntrons é caracterizada por fazer parte da região rica em pirimidinas que é reconhecida pela U2 snRNP (pequena ribonucleoproteína nuclear). A U2 snRNP possui uma seqüência consenso que reconhece, possivelmente por complementaridade de bases, a região rica em pirimidinas no íntron e se liga a ela. Em seguida, as demais snRNP se associam a ela ou à região 3' do íntron e desencadeiam o processo de clivagem (SCHRANK e SILVA, 2001). Desta maneira, dependendo do grau de especificidade da complementaridade de bases da U2 snRNP com o íntron, a alteração na posição -14 T>C pode ou não comprometer a retirada do íntron 3 do gene *BCHE* e interferir na síntese da BChE.

A hipótese do presente trabalho é que a mutação *c.344G>A* também poderia afetar a atividade específica da enzima. Esse sítio codifica para o aminoácido 115, localizado ao lado dos aminoácidos 116 e 117 que fazem parte da cavidade oxianiónica cuja função é auxiliar na rotação do substrato da posição vertical para posição horizontal ideal para sua hidrólise pela S198 e para a ligação de sua porção acil no sítio de ligação acil da BChE (MASSON et al., 1997).

Desta maneira, é possível inferir que ambas as mutações podem contribuir para a diminuição na atividade da BChE, observada em seus portadores.

6.3.4 Estrutura haplotípica, seqüência em genes homólogos e ordem cronológica do aparecimento das mutações

Através de análises dos haplótipos, do desequilíbrio de ligação e de seqüências em genes homólogos em outras espécies é possível inferir a ordem cronológica de aparecimento de algumas mutações em um gene.

A variante *-116A* está presente em *P. troglodytes*, *M. mulatta*, *F. catus*, *P. tigris*, *C. familiaris*, *E. caballus* (Tabela 18). Em roedores, a posição *-116* é ocupada pelo nucleotídeo C e em *G. gallus* é *-116G*. Desta forma, podemos inferir que a variante *-116A*, observada em humanos, é provavelmente mais antiga que *-116G*. Como sugerido por FURTADO (2005) e ratificado no presente trabalho, *-116A* pode estar relacionada com a diminuição do número de moléculas circulantes da BChE. A variante *-116G* determina, portanto, maior atividade e sua elevada freqüência na população humana podem evidenciar que o fenótipo esteja sob pressão seletiva positiva. Contudo, mais análises se fazem necessárias para que se possa testar essa hipótese. Quanto à origem da variante *-116G* não é possível dizer se ela surgiu na espécie humana ou se já estava presente como polimorfismo na linhagem ancestral.

O sítio 1615 está conservado em *P. troglodytes*, *M. mulatta*, *F. catus*, *P. tigris*, *C. familiaris*, *E. caballus* e *G. gallus* (Tabela 18). Apesar de *M. musculus* e *R. norvegicus* apresentarem *1615A*, a mutação em *H. sapiens* ocorreu provavelmente num evento distinto daquele dos roedores.

Partindo desses dados, tentamos inferir a ordem cronológica do aparecimento das mutações nesses sítios. A variante não usual *-116A* é, portanto, a mais antiga, e devido ao forte desequilíbrio de ligação com o sítio 1615 é possível que a mutação *c.1615G>A* tenha surgido em um cromossomo que era *-116A*. Esses sítios encontram-se separados por 63.846 pb e eventos raros de recombinação entre eles podem ocorrer. A figura 22 apresenta uma possível seqüência cronológica de algumas das mutações do gene *BCHE*.

Devido ao sítio 209 estar conservado em todas as espécies analisadas, podemos inferir que a mutação *c.209A>G* (*p.D70G*) apareceu na linhagem humana. Com base nas análises haplotípicas apresentadas no presente estudo e os dados de desequilíbrio de ligação de MIKAMI (2005), sugerimos que essa mutação deve ter surgido num cromossomo com as variações *-116G* e *1615A* (Figura 22).

Estudos de inibição da enzima G70 mostraram sua distribuição étnica e geográfica. WHITTAKER (1986) reuniu dados de vários autores e constatou que a variante não usual 209G ocorre principalmente em populações de origem caucasóide, sendo extremamente rara em asiáticos e africanos. A ocorrência dessa variante não usual no continente africano é observada apenas em países do norte da África (Egito, Etiópia, Argélia), onde ocorre miscigenação, principalmente com caucasóides europeus. A maioria dos ameríndios do Novo Mundo não apresenta 209G e seus raros portadores têm sido explicados como resultantes de miscigenação com europeus. Esses dados apontam para uma origem européia dessa variante.

Os dados inter-específicos são pouco informativos a respeito do sítio 765, pois se trata de um sítio extremamente variável, onde os quatro nucleotídeos são encontrados, sendo difícil determinar qual é o nucleotídeo ancestral. Através dos dados de desequilíbrio de ligação, determinados por MIKAMI, 2005 ($D' = 65,58\%$) entre as variações dos sítios 765 e 1615, sugere-se que a mutação 765C tenha surgido em um cromossomo com a variante 1615A, a qual está preferencialmente em cis com -116G (tabela 16). Porém, é necessário um número amostral maior para esclarecer melhor a relação de 765C com as variantes do sítio -116. MIKAMI (2005) infere que, devido ao valor do desequilíbrio de ligação com as variantes do sítio 1615 ser menor do que o estimado para as variações dos sítios 209 e 1615, a variante 765C deve ser mais antiga que a 209A.

O sítio 344 encontra-se conservado em todas as espécies analisadas pelo presente estudo, indicando que a mutação não usual 344A tenha surgido na linhagem humana. Os dados de desequilíbrio de ligação sugerem que 344A tenha surgido em um cromossomo que apresentava IVS3-14C, visto que todos os indivíduos com 344A também apresentam IVS3-14C e nem todos com IVS3-14C possuem 344A. A mutação IVS3-14C, por sua vez, parece ter surgido em um cromossomo -116G, 1615G (Figura 22).

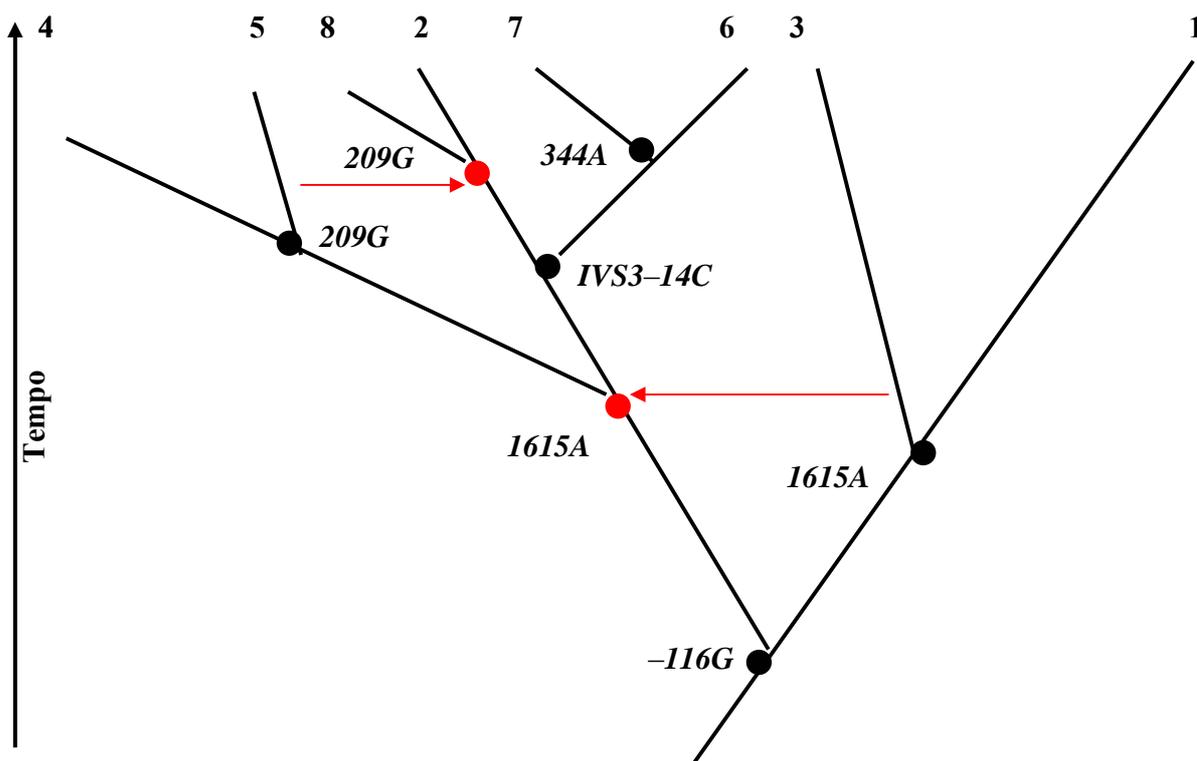


Figura 22. Ordem cronológica do aparecimento das mutações $-116G$; $1615A$, $209G$, $IVS3-14C$ e $344A$: 1- $[-116A; 209A; 344G; IVS3-14T; 1615G]$ sendo o estado ancestral, 2- $[-116G; 209A; 344G; IVS3-14T; 1615G]$, 3- $[-116A; 209A; 344G; IVS3-14T; 1615A]$, 4- $[-116G; 209A; 344G; IVS3-14T; 1615A]$, 5- $[-116G; 209G; 344G; IVS3-14T; 1615A]$, 6- $[-116G; 209A; 344G; IVS3-14C; 1615G]$, 7- $[-116G; 209A; 344A; IVS3-14C; 1615G]$, 8- $[-116G; 209G; 344G; IVS3-14T; 1615G]$ As setas \longrightarrow indicam possíveis eventos de recombinação entre os haplótipos. O comprimento dos ramos e a distância entre eles são arbitrários e não correspondem de forma proporcional ao tempo.

6.4 Guarani do Mato Grosso do Sul e variação no gene *BCHE*

Estudos realizados em ameríndios relatam atividade baixa da BChE nesses grupos (PRIMO-PARMO, 1986; FURTADO et al., 2006). Os autores atribuem essa baixa na atividade principalmente a hábitos alimentares, tempo de estocagem do plasma, e variantes do gene *BCHE*.

A amostra de ameríndios Guarani do Mato Grosso do Sul havia sido previamente analisada por FURTADO et al. (2006) para alguns fragmentos do gene *BCHE*. Visto que nessa amostra foi detectada a variante *c.1615G>A* (3,69% ± 0,85%), considerou-se relevante obter informações a respeito do sítio -116, devido ao desequilíbrio de ligação que suas variações apresentam com as do sítio 1615. Os dados do presente estudo revelaram que todos os indivíduos analisados, independentemente do genótipo para outros sítios do gene *BCHE*, apresentam o genótipo -116GG. Desta maneira, percebe-se que mesmo os indivíduos que apresentam a variante não usual *1615A* são -116G. Esse foi o primeiro estudo realizado em ameríndios quanto ao sítio -116 e, portanto, não temos informações a respeito de sua ocorrência em outras amostras de ameríndios. Além disso, a sua frequência em outros grupos étnicos como asiáticos e africanos ainda não foi determinada.

Como não dispomos de dados de -116A em outros grupos de ameríndios é difícil inferir algo sobre sua ausência nos Guarani Ñandeva e Kaiowá. Quando esses dados estiverem disponíveis, poderá se tentar responder a seguinte questão: A variante -116A já esteve presente nos ameríndios e foi perdida em Guarani Ñandeva e Kaiowá pela ação da deriva?

Em Guarani do Mato Grosso do Sul, FURTADO et al. (2006) testaram a hipótese de que a variante *1615A* estaria presente nos subgrupos Guarani-Kaiowá e Guarani-Ñandeva do Brasil, devido à miscigenação com euro- e afro-brasileiros e constataram que, levando-se em conta apenas o fluxo gênico, a frequência esperada de *1615A* seria significativamente menor que a observada ($p < 0,001$). Desta forma, formularam uma hipótese alternativa, sugerindo que essa variante poderia já estar presente nos paleo-ameríndios.

Outras variantes do gene *BCHE* também foram encontradas nessa amostra de ameríndios Guarani do Mato Grosso do Sul. FURTADO et al. (2006) analisaram pela primeira vez a variante *c.209A>G* ao nível de DNA em populações ameríndias. Os subgrupos Guarani-Kaiowá e Guarani-Ñandeva apresentaram as seguintes frequências alélicas:

0,69% \pm 0,49% e 0,6% \pm 0,6%, respectivamente. Pelo fato desses grupos apresentarem miscigenação com europeus e com base na ausência dessa variante não usual da BChE em mais de 2.300 ameríndios sul americanos, os autores propuseram que a presença da variante *209G*, nessas populações, ocorre devido ao fluxo gênico com populações européias. FURTADO et al. (2006) também verificaram a presença da variante *c.1169G>T (p.G390V)* em Guarani-Kaiowá (9,54% \pm 1,82%) e Guarani-Ñandeva (7,25% \pm 2,21%). Cerca de 30% dos grupos de ameríndios do Brasil estudados apresentam o fenótipo resistente ao fluoreto. Estes grupos, apesar de ocuparem áreas geográficas distintas, pertencem ao mesmo grupo lingüístico Tupi-Guarani. Com base nos dados de miscigenação desses subgrupos Guarani (TSUNETO, 2003) e na baixa frequência da variante *1169T* na população euro-brasileira (MIKAMI, 2005), FURTADO et al. (2006) levantaram a hipótese de que essa variante não usual estava presente nos paleo-ameríndios. PARMO-FOLLONI (2005) também analisou essa amostra de ameríndios, quanto ao sítio *IVS3-14*, sendo que todos os indivíduos analisados são *IVS3-14TT* e, portanto, não apresentam variação neste sítio.

6.5 Análise comparativa da região transcrita do gene *BCHE* de *H. sapiens* com outras espécies de animais

Estudos revelaram que a BChE apresenta maior atividade plasmática em humanos e macacos, atividade intermediária em porquinho-da-índia e cachorro e atividade baixa em porco, coelho, rato e galinha (ARPAGAUS et al., 1991). BARTELS et al. (2000) constataram que os felinos (gato e tigre) apresentam cerca de 0,5 mg/L de BChE no plasma em contraste com os humanos que apresentam cerca de 5mg/L. Os autores mostraram que a BChE de felinos apresenta valores de k_{cat} (constante catalítica) 3 vezes maior e K_m (constante de Michaelis Menten) e K_{ss} (constante de dissociação dos complexos enzima-substrato e substrato-enzima-substrato) 2 vezes maior que a BChE humana. Essas enzimas diferem entre si em 70 aminoácidos, sendo que três deles podem responder por essas diferenças cinéticas. Desse modo, a análise comparativa das seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos, referentes a BChE humana, com as de outras espécies é uma ferramenta interessante para observar quais as regiões mais conservadas e que, conseqüentemente, desempenham um papel funcional importante. Além disso, a análise de sítios com função e

importância conhecida pode revelar algumas respostas de como as variações podem estar afetando a atividade enzimática.

6.5.1 Identidade de nucleotídeos e de aminoácidos

O presente estudo é o primeiro a comparar uma seqüência tão extensa do gene *BCHE* humano com a de outras espécies. Infelizmente, em vista da falta de dados, a comparação de toda a região transcrita foi feita apenas em primatas. Os dados revelaram que a identidade é praticamente homogênea ao longo da região transcrita do gene *BCHE*, quando as duas outras espécies de primatas são comparadas com a espécie humana.

A identidade nucleotídica, em relação a *H. sapiens*, na região codificadora da proteína madura variou de 99,48% em *P. troglodytes* a 73,40% em *G. gallus* e a identidade de aminoácidos nesta região variou de 99,13% em *P. troglodytes* a 72,12% em *G. gallus*.

Comparando-se os dados do presente estudo com os disponíveis no HomoloGene (www.ncbi.org), encontramos a mesma percentagem quanto à identidade de nucleotídeos e aminoácidos de *P. troglodytes*, *C. familiaris*, *M. musculus*, *R. norvegicus* e *G. gallus* em relação a *H. sapiens*.

Um fragmento de 423 nucleotídeos, localizado no exon 2 do gene *BCHE*, foi comparado em alguns mamíferos com relação a humanos (ARPAGAUS et al., 1991). A identidade nucleotídica foi de 98,8% em macaco, 94,1% em ovelha, 93,6% em boi, 92,4% em coelho, 91,7% em porco, 91,3% em cachorro e 86,3% em camundongo. A identidade de aminoácidos foi de 100% em macaco, 95,7% em ovelha, 95,7% em boi, 97,2% em coelho, 95,7% em porco, 93,6% em cachorro e 91,5% em camundongo. ARPAGAUS et al. (1991), utilizando sondas humanas de fragmentos do gene *BCHE* para hibridização, encontraram 67% de identidade entre humanos e galinha. A diferença de identidade encontrada por esses autores em relação ao presente estudo deve-se ao tamanho das seqüências analisadas.

6.5.2 Taxa e padrões de substituição de nucleotídeos

As estimativas de taxa de substituição nas diferentes regiões transcritas do gene *BCHE* devem ser consideradas com cautela devido aos seguintes fatores: 1) o tempo de divergência entre as espécies nem sempre é bem conhecido e, além disso, os dados paleontológicos variam muito em relação aos dados moleculares; 2) o cálculo do número de

substituições foi baseado no modelo de substituição de JUKES e CANTOR (1969), que diminui sua precisão no caso de espécies que divergiram há muito tempo, como *H. sapiens* e *G. gallus*; 3) falta de consideração dos possíveis polimorfismos que possam existir na população ancestral de linhagens próximas como humanos e primatas (o efeito é mínimo para divergências remotas).

A taxa de substituição sinônima, por ano, em relação a *H. sapiens*, variou de 1×10^{-9} nucleotídeos em primatas, 2×10^{-9} em *E. caballus*, *F. catus*, *P. tigris*, *C. familiaris*, e *G. gallus* e 4×10^{-9} em roedores. A taxa de substituição não sinônima, por ano, variou de $0,28 \times 10^{-9}$ em *G. gallus* a $0,69 \times 10^{-9}$ nucleotídeos em roedores. GRAUR e LI (1999) comentam que as taxas de substituição sinônima e não sinônima variam muito entre os genes. Esses autores analisaram 47 genes codificadores de proteínas e estimaram as taxas de substituição sinônima e não sinônima desde a divergência entre humanos e roedores. A taxa de substituição sinônima variou de $1,57 \times 10^{-9}$ a $6,39 \times 10^{-9}$, por ano, apresentando média de $3,51 \times 10^{-9}$. A taxa de substituição não sinônima, por ano, variou de $0,09 \times 10^{-9}$ a $3,06 \times 10^{-9}$ com média de $0,74 \times 10^{-9}$. Observando os dados da tabela 23 e comparando com os dados apresentados por GRAUR e LI (1999), constata-se que o gene *BCHE* evolui de forma moderada.

Em primatas, as regiões 5' UTR e 3'UTR apresentaram taxa de substituição de 1×10^{-9} nucleotídeos por ano. Essa taxa é igual à encontrada para substituições sinônimas na região codificadora da proteína madura. Já a taxa de substituição não sinônima é cerca de 2,5 vezes menor. Isso ocorre porque as mutações, para se fixarem em uma dada população, passam pelo crivo da seleção natural. Em geral, mutações não sinônimas tendem a provocar danos no produto gênico, e são eliminadas. Assim, a diferença entre a taxa de substituição sinônima e não sinônima na região codificadora da proteína madura reflete a pressão seletiva sobre essa região. A intensidade da seleção purificadora é determinada pelo grau de tolerância característico de um sítio ou região genômica. No caso das enzimas, a restrição funcional define a taxa de substituição de nucleotídeos que é aceita em um sítio sem afetar negativamente a função ou estrutura (GRAUR e LI, 1999).

6.5.2.1 Testando seleção - análises de K_a/K_s

Segundo a teoria da neutralidade de KIMURA (1983), após a divergência entre duas espécies, a diferenciação entre elas é causada pelo efeito da deriva genética das mutações neutras e a taxa de substituição é igual à taxa de mutação. Uma predição dessa teoria é que a razão entre a taxa de substituição não sinônima e a taxa de substituição sinônima (K_a/K_s) deve ser constante entre diferentes linhagens evolutivas.

Como pode ser visto na tabela 25, as razões K_a/K_s de todas as espécies analisadas são menores do que 1, indicando que a região codificadora da proteína madura está sob efeito de pressão seletiva purificadora. O que chama a atenção, nestes dados, é que K_a/K_s varia de espécie para espécie e, como pode ser observado na tabela 25, há uma certa tendência de relaxamento da pressão seletiva em direção aos primatas. Como a estimativa de K_a/K_s é cumulativa ao longo do ramo da árvore filogenética do gene, são necessários testes para verificar se essas taxas são realmente diferentes.

Assim, optamos por utilizar os modelos "one ratio" e "free ratio", propostos por YANG (1998), para testar se os valores de K_a/K_s são similares entre os ramos, utilizando-se o teste estatístico $2\Delta l$ (duas vezes a diferença dos log de máxima verossimilhança entre dois modelos aninhados). Esse teste mostrou que a taxa varia entre os ramos da árvore do gene *BCHE*, indicando que possa estar ocorrendo seleção diferenciada entre os ramos.

O que chamou a atenção, nos dados gerados pelo modelo "free ratio", foram as altas taxas K_a/K_s no ramo que leva aos carnívoros e no ramo que leva ao homem e ao chimpanzé (0,70 e 0,53 respectivamente; Figura 18). Essas taxas diferentes sugerem relaxamento da pressão seletiva nesses ramos.

Uma hipótese para esse relaxamento funcional poder ser o hábito alimentar diferenciado, uma vez que os ramos dos herbívoros apresentaram taxas K_a/K_s que indicam maior pressão seletiva purificadora. HARRIS e WHITTAKER (1962), baseando-se em outros estudos que revelaram que extratos aquosos de batata eram capazes de inibir as colinesterases humanas e que isso ocorria devido à presença dos glicoalcalóides solanina e solanidina, testaram as duas substâncias e perceberam que fenótipos da BChE respondem de forma diferenciada a esses inibidores. Esses glicoalcalóides tóxicos em doses elevadas têm sido relatados na literatura como causadores de intoxicação em lotes que contenham essas substâncias em concentrações mais elevadas do que o comum. Os principais sintomas

da intoxicação são problemas gastrointestinais, vômito e diarreia. Assim, supomos que outras plantas poderiam apresentar glicoalcalóides ou outras substâncias que inibam naturalmente a BChE e por essa razão a pressão seletiva observada pode estar agindo com maior intensidade no grupo dos herbívoros.

6.5.3 Composição de nucleotídeos, uso dos códons e variação de aminoácidos

Apesar de o gene BCHE apresentar diferenças entre as espécies no que diz respeito às taxas e padrões de substituições, essas não foram suficientes para afetar a composição de nucleotídeos, como mostrado nos dados das tabelas 27 a 29, tanto nas regiões UTR como traduzidas.

As análises revelaram que os códons estão sendo usados da mesma maneira pelas 10 espécies analisadas (Tabela 30). Apenas os códons tirosina, glutamina, asparagina, cisteína, valina e serina estão sendo usados ao acaso (Figura 19). Os demais códons apresentaram desvio estatisticamente significativo ($p < 0,05$), mostrando preferência por códons ricos em adenina e timina, resultado da composição nucleotídica do gene *BCHE*.

As substituições de aminoácidos ocorrem com maior frequência entre aminoácidos com características físico-químicas semelhantes. As substituições conservadoras, por aminoácidos com propriedades semelhantes, têm maior probabilidade de serem seletivamente neutras. A evolução de genes codificadores de proteínas está atrelada à restrição funcional dos produtos protéicos. As propriedades mais conservadas durante a evolução são o volume e a densidade, enquanto que a polaridade e a hidrofobicidade são moderadamente conservadas e a carga elétrica é umas das propriedades menos conservadas (LEUNISSEN, 1990 apud GRAUR e LI, 1999).

6.5.4 Regiões conservadas e variáveis da BChE

Como mencionado anteriormente, a BChE é semelhante no que diz respeito à composição de nucleotídeos e uso de códons nas dez espécies analisadas. E as diferenças entre as taxas K_a/K_s nas diversas espécies sugerem seleção purificadora na região da proteína madura da BChE, porém com tendência a relaxamento seletivo em alguns ramos. Neste tópico será analisado o que na BChE está conservado e o que está sendo substituído nas espécies analisadas.

6.5.4.1 Sítios e aminoácidos variáveis nos indivíduos do presente estudo

A figura 23 mostra um desenho esquemático do dobramento do monômero da BChE, destacando os aminoácidos variáveis nos indivíduos do presente estudo. Não foi possível indicar o aminoácido 573, devido à falta de informação de dobramento nessa região.

Os aminoácidos D70 e G115, cujas funções foram descritas anteriormente, encontram-se conservados em todas as espécies analisadas e o aminoácido G333 encontra-se substituído apenas em *C. familiaris*. Esses sítios são conhecidos por interferirem na atividade da BChE. Os sítios, dos aminoácidos 184, 243 e 390, estão moderadamente conservados, e são caracterizados por suas variantes apresentarem dificuldades em hidrolisar certos substratos como a succinilcolina. As enzimas M243 e V390 são reconhecidas fenotipicamente por serem resistentes à inibição enzimática pelo fluoreto do sódio. BARTELS et al. (2000) constataram que os felinos apresentam a enzima D390 e testaram a hipótese de que gato e tigre poderiam ter também o fenótipo resistente ao fluoreto, o que foi confirmado por testes de inibição. As variações nos sítios dos aminoácidos 12, 162, 255, 470, e 539 não interferem na atividade enzimática e se encontram em sítios menos conservados.

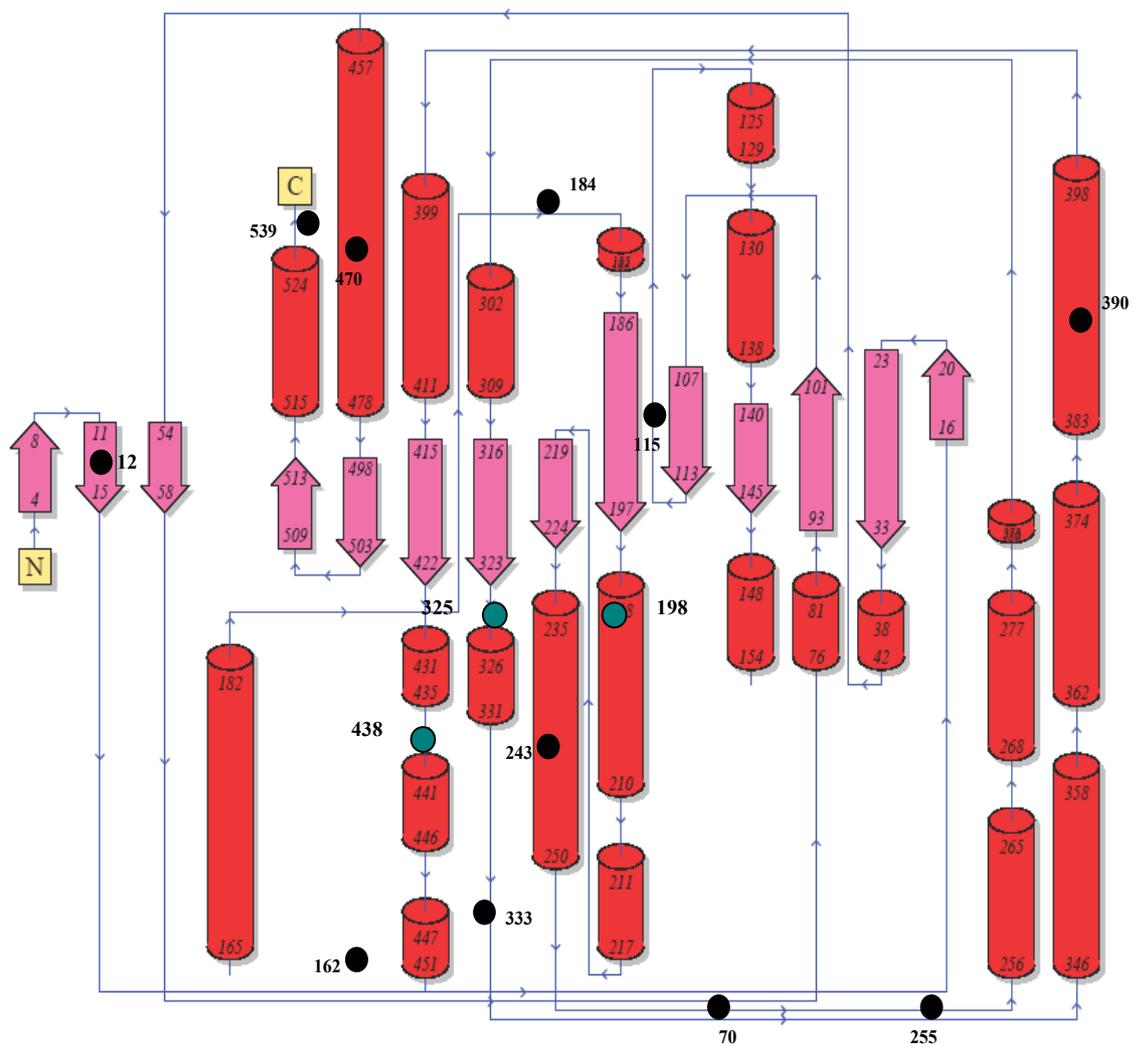


Figura 23. Desenho esquemático do padrão de dobramento do monômero da BChE, as marcações ● indicam os aminoácidos 12, 70, 115, 162, 184, 243, 255, 333, 390, 470 e 539 que foram encontrados alterados nos indivíduos do presente estudo. As marcações ● indicam a tríade catalítica (S198, G325, e H438) (Figura modificada de ESTHER Database, 2006).

Pode se perceber que essas regiões conservadas fazem parte da estrutura interna da enzima, e provavelmente desempenham importante papel funcional, sendo que as regiões 2, 3 e 4 contêm aminoácidos importantes da garganta da enzima onde está o sítio ativo. A região 5, por sua vez, está na superfície da enzima, mas corresponde à região de tetramerização da BChE. BOWIE et al., 1990 (apud ARPAGAUS et al., 1991) compararam diversos resíduos de aminoácidos da superfície e da região central da enzima em vários mamíferos e notaram que a BChE tolera melhor mutações que condicionam resíduos de aminoácidos da superfície da enzima do que aquelas que se referem aos aminoácidos da parte central da enzima.

Ao analisar o sítio aniônico periférico (composto pelos aminoácidos Y332 e D70), o sítio esterásico (S198, H438 e G325) e o orifício oxianiônico (G116 e G117), percebe-se que esses são conservados em todas as espécies comparadas. Por outro lado, o sítio de ligação acil (L286 e V288) não está conservado. Na posição da L286 em *R. novergicus* existe uma R286 e na posição da V288 há uma I288 em *R. novergicus*, *M. musculus* e *G. gallus*. Foram analisados também aminoácidos importantes para formação de dímeros (C571) e formação de tetrâmeros (W543, F547, W550, Y553, W557, F561, Y564) e todos esses sítios estão conservados em todas as espécies. Dos 9 sítios de glicosilação, 5 estão conservados em todas as espécies (N57, N106, N241, N455, N486). O sítio N17 apresenta-se como S17 nos roedores, os sítios N256 e N341 em galo mudaram para os respectivos D256 e S341 e o sítio N481 passou para D481 em cachorro.

CHATONNET e LOCKRIDGE (1989), comparando seqüências de aminoácidos da AChE de *Torpedo*, *Drosophila*, *Bos taurus* e BChE humana observaram que a seqüência GESAG, que contém a serina do sítio esterásico, está conservada nessas quatro espécies, bem como a cisteína responsável pela formação de dímeros. ALTAMIRANO e LOCKRIDGE (1999) também constataram que os sete resíduos de aminoácidos responsáveis pela formação de tetrâmeros encontram-se conservados na BChE humana, de coelho, camundongo, gato e cavalo e na AChE humana, de coelho, camundongo, gato, rato, boi, galinha, cobra, enguia e raia.

6.5.4.3 Conservação das regiões não transcritas

As comparações feitas até aqui levaram em consideração principalmente a região traduzida do gene *BCHE* e, quando possível, a transcrita. Em vista disso, foi utilizada a ferramenta computacional VISTA Browser, a qual se baseia no alinhamento global de seqüências genômicas e identifica seqüências conservadas, registrando graficamente picos nos casos com mais de 50% de identidade. A figura 25 mostra um esquema gráfico obtido após o uso dessa ferramenta. Neste esquema gráfico é possível perceber que os exons são bem conservados em *C. familiaris* (1), *R. norvegicus* (2), *M. musculus* (3) e *G.gallus* (4), quando comparados com *H. sapiens*. As regiões não codificadoras apresentam um grau de conservação muito menor, sendo quase nulo em *G. gallus*. Esse cenário gráfico revela dois aspectos importantes. Primeiro, a região transcrita do gene encontra-se mais conservada em relação à região não transcrita, em consequência da ação da seleção purificadora que age na região transcrita. Segundo, o menor grau de conservação das regiões não transcritas deve-se provavelmente à ausência de seleção. Além disso, o tamanho conservado dos íntrons pode indicar que essa variável exerça papel mais importante do que a própria composição da seqüência nucleotídica intrônica sendo que esse fato tem sido proposto recentemente na literatura.

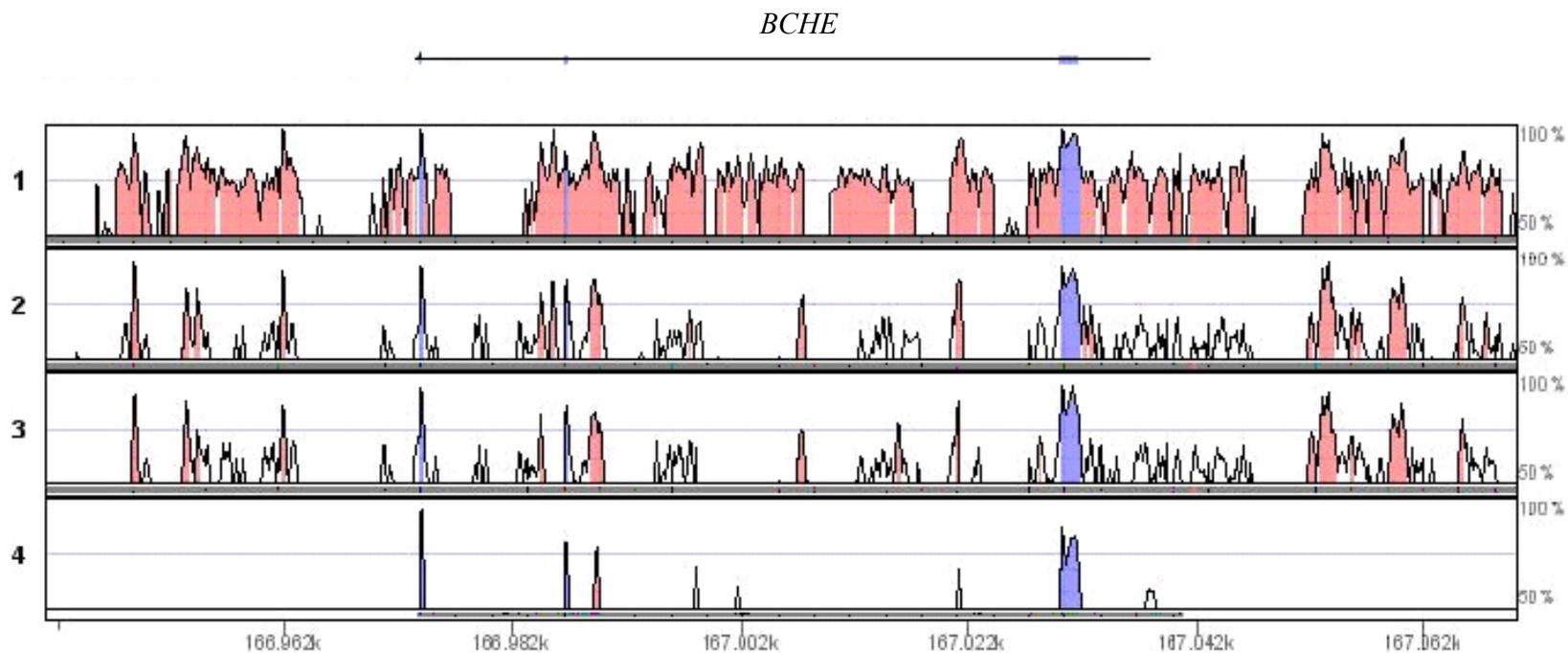


Figura 25. Comparação da conservação genômica do gene *BCHE*. Os números 1, 2, 3 e 4 representam a comparação da espécie humana com *C. familiaris*, *M. musculus*, *R. norvegicus* e *G. gallus*, respectivamente. Os picos indicam conservação maior que 50%. Os picos em azul representam as regiões dos exons, os picos em azul claro representam as regiões UTR e os picos em rosa representam regiões não codificadoras. O gene *BCHE* está representado no sentido de leitura no cromossomo da direita para a esquerda.

6.6 Análise comparativa do gene *BCHE* e do gene *ACHE*

Devido à origem por duplicação gênica dos genes *BCHE* e *ACHE* a partir de um gene ancestral comum e por apresentam, de acordo com dados do presente estudo, 54,45% de identidade nucleotídica e 51,63% de identidade de aminoácidos, é interessante comparar esses genes quanto a alguns aspectos evolutivos.

6.6.1 Comparação da identidade de nucleotídeos e de aminoácidos

Em termos respectivos de identidade nucleotídica e de aminoácidos, em relação a *H. sapiens*, os dados disponíveis no HomoloGene, referentes ao gene *ACHE*, mostram 89,6% e 93,6% com *C. familiaris* e 84,69% e 88,4% com *M. musculus*. Esses dados sugerem que a região traduzida do gene *ACHE* é mais conservada entre as espécies do que no gene *BCHE*. É interessante observar que a seqüência de nucleotídeos é menos conservada na *ACHE* quando comparada com a de aminoácidos e o contrário parece ocorrer na *BChE* (tabela 20). Usamos o mesmo banco para obter informações sobre outras esterases e verificamos que o gene *PONI* da paraoxonase e o gene *LIPF* da lipase apresentam padrões de identidade semelhantes ao do gene *BCHE*, quando se comparam nucleotídeos e aminoácidos.

6.6.2 Comparação de K_a/K_s entre genes

O padrão das taxas K_a/K_s apresentadas pelos genes *ACHE* e *BCHE* ao longo das espécies é diferente. A tabela 34 mostra uma comparação dessas taxas em relação à espécie humana e algumas espécies nesses dois genes. A taxa para o gene *BCHE* sugere um relaxamento na pressão seletiva neste gene em relação ao gene *ACHE*. Entretanto, mais testes são necessários para confirmar essa hipótese.

As taxas K_a/K_s disponíveis no HomoloGene (www.ncbi.org) para o gene *PONI* da paraoxonase (*P. troglodytes*, 0,29; *C. familiaris*, 0,20, *M. musculus*, 0,15 e *R. norvegicus*, 0,17) e para o gene *LIPF* da lipase (*P. troglodytes*, 0,22; *C. familiaris*, 0,14, *M. musculus*, 0,18 e *R. norvegicus*, 0,19) estão mais próximas das encontradas para o gene *BCHE* do que para o gene *ACHE*.

6.6.3 Composição de nucleotídeos e uso dos códons

O gene *BCHE* apresenta menor conteúdo C+G que o gene *ACHE* ($41,69\% \pm 1,49\%$ e $61,67\% \pm 3,10\%$, respectivamente) sendo essa diferença estatisticamente significativa ($\chi^2 = 9,236$; $p < 0,05$). Foi possível constatar que a diferença de composição encontra-se principalmente na terceira posição do códon (Tabela 36) e que a mesma diferença de conteúdo nucleotídico não ocorre nas demais posições do códon. CHATONNET e LOCKRIDGE (1989), comparando o RNAm da BChE humana com RNAm da AChE de *Torpedo* e *Drosophila* observaram as mesmas proporções. Os autores relatam que apenas 17 dinucleotídeos CpG são encontrados na seqüência codificadora do gene *BCHE*, enquanto 82 são encontrados no gene *ACHE* de *Torpedo* e 153 em *Drosophila*. Esses dinucleotídeos encontram-se principalmente nas extremidades dos códons (C é a terceira base do códon e G a primeira do próximo códon). No RNAm da BChE humana, o nucleotídeo C raramente está presente na terceira posição e, nesta, em geral, se encontra o nucleotídeo T.

GRAUR e LI (1999) observaram o padrão das mudanças de nucleotídeos em pseudogenes e relataram que 56,4% de todas as mutações resultam em alterações para A ou T, sendo que o esperado para mutações ao acaso, sem direcionamento de nucleotídeos, é 50%. Assim, existe uma tendência de C ou G mudar para A e T. Os autores também relatam que o padrão de metilação dos dinucleotídeos CpG facilita a conversão da citosina metilada em timina por desaminação. A tendência em pseudogenes é diminuir gradualmente as frequências dos dinucleotídeos CpG ao longo do tempo. Baseando-se nestes fatos e nas evidências, que sugerem que os genes *ACHE* e *BCHE* duplicaram de um ancestral comum, esses dados reforçam a idéia, anteriormente mencionada, de que o gene *ACHE* esteja sob pressão seletiva maior (maior conservação dos sítios CpG), enquanto o gene *BCHE* esteja sob pressão seletiva menor (maior aceitação de substituições de dinucleotídeos CpG).

Essa suposta pressão seletiva menor sobre o gene *BCHE* poderia ter propiciado a aquisição de novas funções por parte desse gene. E de acordo com os dados apresentados no presente trabalho, possivelmente as funções não colinérgicas da BChE é que estejam sendo selecionadas de maneira diferenciada entre carnívoros e/ou onívoros e os herbívoros.

7 CONCLUSÕES

O presente estudo teve como principais objetivos averiguar parte da variabilidade genética do gene *BCHE* e entender alguns aspectos evolutivos desse gene.

7.1 Variabilidade do gene *BCHE*

As genotipagens do presente estudo contribuíram para completar o banco de dados do Laboratório de Polimorfismos e Ligação, da amostra de doadores de sangue de Curitiba, com atividade da BChE $\leq 4,00$ KU/L. Foi possível constatar que cerca de 62,67% dos indivíduos (89/142 com dados de todos os fragmentos de DNA analisados), nesta faixa de atividade, apresentaram variação em um ou mais sítios do gene *BCHE*, evidenciando a contribuição da variabilidade genética para esse fenótipo de atividade.

O presente estudo também contribuiu para consolidar a hipótese da associação da variante não usual *-116A* com a redução na atividade da BChE, sugerida anteriormente por FURTADO (2005), uma vez que sua frequência alélica no grupo de atividade baixa é praticamente o dobro da encontrada na população geral. A redução da atividade pode ser devida ao fato da variante *-116A* possibilitar a ligação de um menor número de fatores de transcrição do que *-116G* ou ao desequilíbrio de ligação do sítio *-116* com outras variantes na região promotora ou reguladora do gene *BCHE*, que poderiam levar a esse fenótipo.

Os haplótipos encontrados com maior frequência no grupo de atividade da BChE ≤ 4 KU/L foram: [*-116G; 209A; 1615G*] – usual – (67,05% \pm 2,80%); [*-116A; 209A; 1615A*] (15,44% \pm 2,01%); [*-116G; 209A; 1615A*] (11,73% \pm 1,67%) e [*-116G; 209G; 1615A*] (4,00% \pm 0,84%).

A análise da amostra de ameríndios Guarani do Mato Grosso do Sul mostrou ausência de variação no sítio *-116*, sendo todos os indivíduos genotipados como *-116GG*. Assim, as evidências de menor atividade nesses indivíduos, relatadas em outros trabalhos, provavelmente são reflexo dos hábitos alimentares ou de outra variante do gene *BCHE*, ainda não identificada nessa amostra.

7.2 Aspectos evolutivos do gene *BCHE*

As análises de desequilíbrio de ligação e de comparação dos sítios variantes em outras espécies permitiram estabelecer a provável ordem cronológica do aparecimento das principais variações no gene *BCHE*. O haplótipo [-116A; 209A; 344G; IVS3-14T; 1615G] foi determinado como o provável haplótipo ancestral e foi sugerida, como mais provável, a seguinte ordem cronológica de aparecimento de quatro outros haplótipos: 1º por mutação [-116G; 209A; 344G; IVS3-14T; 1615G], 2º por mutação [-116A; 209A; 344G; IVS3-14T; 1615A], 3º por recombinação [-116G; 209A; 344G; IVS3-14T; 1615A], 4º por mutação [-116G; 209G; 344G; IVS3-14T; 1615A]. Ao haplótipo [-116G; 209A; 344G; IVS3-14C; 1615G], seguiu-se o [-116G; 209A; 344A; IVS3-14C; 1615G], sendo que estes dois haplótipos podem ter surgido antes ou depois de [-116G; 209G; 344G; IVS3-14T; 1615G].

As comparações dos sítios variáveis nos indivíduos do presente estudo com os de nove outras espécies revelaram que os sítios de DNA, que apresentam papel importante para a função da enzima, como o 209 e o 344, são altamente conservados e sítios que condicionam aminoácidos da superfície da enzima, como o 765, são pouco conservados.

A região codificadora da proteína madura do gene *BCHE* mostrou estar bem conservada entre as espécies. Além disso, pela taxa K_a/K_s , foi possível sugerir que essa região está sob pressão seletiva purificadora. Entretanto, a seleção parece apresentar um relaxamento no ramo dos Carnívoros e no ramo do homem e do chimpanzé. Supomos que isso possa estar ocorrendo devido a inibidores naturais da BChE presentes em plantas como as da família solanaceae.

A comparação dos genes *ACHE* e *BCHE* mostram que, apesar de terem duplicado há muito tempo, ainda apresentam 54,45% de identidade nucleotídica. Os dados referentes à taxa K_a/K_s mostraram-se < 1 , indicando seleção purificadora, cuja intensidade parece ser diferente entre eles. A comparação do conteúdo C+G mostrou-se significativamente maior no gene *ACHE* do que no gene *BCHE*, sendo mais evidenciada na terceira posição do códon. Esses fatos corroboram a hipótese, apresentada acima, de maior pressão de seleção sobre o gene *ACHE* do que sobre o gene *BCHE*.

8 REFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCÂNTARA, V. M.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A.; PICHETH, G.; VIEIRA, M. M. A method for serum cholinesterase phenotyping. **Rev. Bras. Genet.**, v. 14, p. 841-846, 1991.

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

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

ALCÂNTARA, V. M.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A.; SCARTEZINI, M.; CERCI, M. S. J.; BRAUN-PRADO, K.; PICHETH G. Butyrylcholinesterase activity and risk factors for coronary artery disease. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.**, v. 62, p. 399-404, 2002.

ALCÂNTARA, V. M.; OLIVEIRA, L. C.; RÉA, R. R.; SUPPLY, H. L.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A. Butyrylcholinesterase and obesity in individuals with the CHE2 C5+ and CHE2 C5- phenotypes. **Intern. J. Obesity.**, v. 27, p. 1557-1564, 2003a.

ALCÂNTARA, V. M.; RODRIGUES, L. C.; OLIVEIRA, L. C.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A. The variable expression of the C_{4/5} complex of human butyrylcholinesterase and body mass index. **Hum. Bio.**, v. 75, p. 47-55, 2003b.

ALLDERDICE, P.W.; GARDNER, H.A.R.; GALUTIRA, D.; LOCKRIDGE, O.; LA DU, B.N.; McALPINE, P.J. The cloned butyrylcholinesterase (*BCHE*) gene maps to a single chromosome site, 3q26. **Genomics**, v.11, p452-454, 1991.

ALMEIDA, M.C.S. Succinilcolina: 50 Anos de soberania. **Rev. Bras. Anesthesiol.**, v. 52, p. 513-526, 2002.

ALMEIDA, M.C.S. O uso de bloqueadores neuromusculares no Brasil. **Rer. Bras. Anesthesiol.**, v. 54, p. 850-864, 2004.

ALTAMIRANO, C.V.; LOCKRIDGE, O. Association of tetramers of human butyrylcholinesterase is mediated by conserved aromatic residues of the carboxy terminus. **Chem-Biol. Int.**, v. 199, p. 53-60, 1999.

ALTAMIRANO, C.V.; BARTELS, C.; LOCKRIDGE, O. The butyrylcholinesterase K-variant shows similar cellular protein turnover and quaternary interaction to the wild-type enzyme. **J. Neurochem.**, v.74, p. 869-877, 2000.

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. **Biochem.**, v. 29, p. 124-131, 1990.

ARPAGAUS, M., CHANTONNET, A., MASSON, P., NEWTON, M., VAUGHAN, T.A., BARTELS, C.F., NOGUEIRA, C.P., LA DU B.N., LOCKRIDGE, O. Use of the polymerase chain reaction for homology probing of butyrylcholinesterase from several vertebrates. **J Biol Chem.** v. 266, p. 6966-6974, 1991

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

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.

BARTEL, C.F.; XIE, W.; MILLER-LINDHOLM A.K.; SCHOPFER L.M.; LOCKRIDGE, O. Determination of the DNA sequences of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase from cat and demonstration of the existence of both in cat plasma. **Biochem. Pharmac.**, v.60, p.479-487, 2000.

BEGUN D. O planeta dos antropóides. **Scientific Americ. Brasil**, ed especial 17, p.6-15, 2006.

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.

BOVET D, BOVET-NITTI F. Pharmacological studies on succinylcholine and on short-acting curare simulants; the mechanism of potentiation through pre-storage and competitive action on non-specific receptors. **Farmakol Toksikol.** v. 3, p.201-211, 1959.

BROOMFIELD, C.A.; MAXWELL, D.M.; SOLANA, R.P.; CASTRO, C.A.; FINGER, A.V.; LENZ, D.E. Protection by butyrylcholinesterase against organophosphorus poisoning in nonhuman primates. **J. Pharm. Experim. Therap.**, v.259, p. 633-638, 1991.

BROWN, S.S.; KALOW, W.; PILZ, W.; WHITTAKER, M.; WORONICK, C.L. The plasma cholinesterases: a new perspective. In: **Advances in clinical chemistry**, v.22, p.99, 1981.

CARTHARIUS, K. FRECH K., GROTE K., KLOCKE B., HALTMEIER M., KLINGENHOFF, A., FRISCH, M., BAYERLEIN, M., WERNER, T. MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. **Bioinf.** v. 21, p.2933-2942, 2005

CAZAROTE, H. B. **Variabilidade do gene da butirilcolinesterase humana quanto ao exon 3 e suas junções intrônicas.** Curitiba, 1999. 38f. Monografia (Bacharel em Biologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

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

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

CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A., SOUZA, R. L. R. **Butyrylcholinesterase - a still mysterious enzyme.** (*No prelo*).

ÇOKUGRAG, A. N., Butyrylcholinesterase: structure and physiological importance. **Turk. J. Biochem.**, v. 28, p. 54-61, 2003.

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.

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

DE VRIESE, C., GREGOIRE, F., LEMA-KISOKA, R., WAELBROECK, M., ROBBERECHT, P. and DELPORTE, C. Ghrelin degradation by serum and tissue homogenates: identification of the cleavage sites. **Endocrinology** , v. 145, p. 4997-5005, 2004.

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.

DEN DUNNEN J.T., ANTONARAKIS E. Nomenclature for description of human sequence variations. **Hum Genet.** v.109, p. 121-124, 2001.

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. Suplemento.

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.

DIETZ, A.A., RUBINSTEIN, H.M.; LUBRANO, T. Colorimetric determination of serum cholinesterase and its genetics variants by the propionylthiocholine-dithiobis (nitrobenzoic acid) procedure. **Clin. Chem.**, v. 19, p. 1309-1313, 1973.

ESTHER Database: Disponível em:
<http://bioweb.ensam.inra.fr/ESTHER/structure?name=1P0I&class=Structure> Acessado em 15/11/2006.

EPSTEIN, H.M.; JARZEMSKY, D.; ZUCKERMAN, L.; VAGHER, P. Plasma cholinesterase activity in bank blood. **Anest. Analg.**, v.59, p. 211-214, 1980.

EVANS, R.T.; WROE, J. Is serum cholinesterase activity a predictor of succinylcholine sensitivity? An assessment of four methods. **Clin. Chem.**, v. 24, p. 1762-1766, 1978.

FONTOURA-DA-SILVA, S.E.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Butyrylcholinesterase variants associated with erythrocyte acetylcholinesterase inhibition in farmers exposed to pesticides. **Hum. Hered.**, v.46, p. 142-147, 1996.

FU, Y.X.; LI, W.H. Maximum likelihood estimation of population parameters. **Genetics**, v.134, p.1261-70, 1993.

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.

FURTADO-ALLE, L. NUNES, K., MIKAMI, L.R., SOUZA, R.L.R., CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. **Associação entre variante -116A do Exon 1 do gene BCHE e atividade da butirilcolinesterase**. Em Congresso Brasileiro de Genética. Resumos. Foz do Iguaçu, 2006.

GAFFNEY, D.; CAMPBELL, R.A. A PCR method to determine the Kalow allele frequency and its significance in the normal population. **J. Med. Genet.**, v. 31, p. 248-250, 1994.

GATKE, MR.; OSTERGAARD, J.R.; BUNDGAARD, J.R.; VARIN, F.; VIBY-MOGENSEN, J. Response to mivacurium in a patient compound heterozygous for novel and a known mutation in the butyrylcholinesterase gene: genotyping by sequencing. **Anesthesiol.** v.3, p. 600-606, 1995.

GAUGHAN, G.; PARK, H.; PRIDDLE, J.; CRAIG, S. Refinement of localization of human butyrylcholinesterase to chromosome 3q26.1-q26.2 using a PCR-derived probe. **Genomic**, v.11, p. 455-458, 1991.

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

GNATT, A., PRODY, C. A., ZAMIR R., LIEMAN-HURWITZ, J., ZAKUT, H.; SOREQ, H. Expression of alternatively terminated unusual human butyrylcholinesterase messenger-

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.

GRAUR D.; LI, W.H; **Fundamentals of molecular evolution**. Sunderland: Sinauer, 2ed, p.67-163,1999.

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.

GUO, S.W.; THOMPSON, E.A. Performing the exact test of Hardy-Weimberg proportion for multiples alleles. **Biometrics**, v.48, p.361-372, 1992.

HADA, T., MURATANI, K., OHUE, T., IMANISHI, H., MORIWAKI, Y., 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, L. e SPIERER P. The Ace locus of *Drosophila melanogaster* structural gene for acetylcholinesterase with an unusual 5'leader. **EMBO J.** v.5, p.2949-2954, 1986.

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. e 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.

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

HAYASHI, K., e YANDELL, D. W. How sensitive is PCR-SSCP? **Hum. Mutat.** v.2, p. 338-346, 1993.

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.

HÖHLER, T.; HUNDT, M.; RITTNER, C.; SCHNEIDER, P.M.; BÜSCHENFELDE, K.H.M. Cholinesterase variants: rapid characterisation by PCR/SSCP and evidence for molecular homogeneity. **J. Med. Genet.**, v. 32, p. 109-112, 1995.

HOSODA, H.; KOJIMA, M.; MATSUO, H. e KANGAWA, K. Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. **Biochem. Biophys.Res. Commun.**, v. 279, p. 909-913, 2000.

IZUMI, M.; MAEKAWA, M.; KANNO, T. Butyrylcholinesterase K-variant in Japan: frequency of allele and associated enzyme activity in serum. **Clin. Chem.**, v. 40, p. 1606-1607, 1994.

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

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.

JENSEN, F.S.; NIELSEN, L.R.; SCHWARTZ, M. Detection of the plasma cholinesterase K variant by PCR using an amplification-created restriction site. **Hum. Hered.**, v. 46, p. 26-31, 1996.

JUKES, T.H., CANTOR, C.R. Evolution of protein molecules. In: Munro, H.N. (Ed.), **Mammalian Protein Metabolism**. Academic Press, New York, p. 21–132, 1969.

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

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

KALOW, W.; GUNN, D. R. Some statistical data on atypical cholinesterase of human serum. **Ann. Hum. Genet.**, v. 23, p. 239-250, 1959.

KALOW, W.; STARON, N. On distribution and inheritance of atypical forms of human serum cholinesterase, as indicated by dibucaine numbers. **Canad. J. Biochem. Physiol.**, v. 35, p. 1305-1320, 1957.

KIMURA, M. **The neutral theory of molecular evolution.** Cambridge, UK: Cambridge Univ. Press. 367p., 1983.

KREJCI, E., THOMINE S., BOSCHETTI, N., LEGAY, C., SKETELJ, J. AND MASSOULIÉ, J. The mammalian gene of acetylcholinesterase-associated collagen. **J. Biological.** v.272, p.22840-22847,1997.

KUMAR S.; HEDGES B. A molecular timescale for vertebrate evolution. **Nature.** v. 392, p.917-920, 1998.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA 3.1 Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, v. 5, p.150-163, 2004.

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

LAHIRI, D. K.; NURNBERGE JR, J.I. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucl. Acids Res.**, v. 19, p. 5444, 1991.

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.

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

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

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

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.

MAEKAWA, M., TANIGUCHI, T., ISHIKAWA, J., TOYODA, S.; TAKAHATA, N. Problem with detection of an insertion-type mutation in the *BCHE* gene in a patient with butyrylcholinesterase deficiency. **Clin.Chem.**, v. 50, p. 2410-2411, 2004.

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.

MARK, A., ROBITZKI, A. The key role of butyrylcholinesterase during neurogenesis and neural disorders: an antisense-5' butyrylcholinesterase-DNA study. **Prog. Neurobio.**, v. 60, p. 607-628, 2000.

MARTINEZ J. Intoxicación por organofosforados: enfoque actual de esta entidad clinica. **Med Clin**, v. 98, p. 702-705, 1992.

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.; FROMENT, M.T.; BARTELS, C.F.; LOCKRIDGE, O. Importance of aspartate 70 in organophosphate inhibition, oxime re-activation and aging of human butyrylcholinesterase. **Biochem. J.**, v. 325, p. 53-61, 1997.

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

MASSOULIÉ, J e BON, S. The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates. **Annual Review of Neurosciences** , v. 5 p.57-106, 1982.

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

McDONALD, J. H. and M. KREITMAN. Adaptive protein evolution at the Adh locus in *Drosophila*. **Nature.**, v.351, p.652-654, 1991.

McGUIRE, M.C.; NOGUEIRA, C.P.; BARTELS, C.F.; LIGHTSTONE, H.; HAJEA, A.; VAN DER SPEK, A.F.L.; LOCKRIDGE, O.; LA DU, B.N. Identification of the structural mutation responsible for the dibucaine-resistant (atypical) variant form of human serum cholinesterase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 86, p. 953-957, 1989.

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.

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.

MORTON, B. R. Chloroplast DNA codon use: Evidence for selection at the psb A locus based on tRNA availability. **J. Mol. Evol.** v.37, p.273-280, 1993.

MURATANI K., HADA T, YAMAMOTO H., KANEKO T, SHIGETO Y., OHUE T., FURUYAMA J., HIGASHI K. **Inactivation of the cholinesterase gene by Alu insertion: Possible mechanism for human gene transposition (retrotransposon/homologous**

recombinant/small polydisperse Circular DNAs). Proc. Natl. Acad. Sci. V. 88, p.11315-11319, 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/entrez/viewer.fcgi?val=NC_000000&from=166973395&to=167037952&strand=2&dopt=gb. Acessado em 05/08/2005.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI) acesso ao banco de dados do GENBANK <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide&cmd=search&term=bche>. Acessado em 12/11/2005.

NEI M.; GOJOBORIT, T. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. **Mol. Biol. Evol.**, v.3, p.418-426, 1986.

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 (GGT → GGAG). **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.

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

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. Pseudocholinesterase in aloxan-diabetic rats. Res. Commun. **Chem. Pathol. Pharmacol**, v. 78, p. 117-120, 1992.

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.; LEPIENSKI, L.M., MIKAMI, L., SOUZA, R.R.L., CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. **Estudos sobre a mutação IVS3-14T>C do gene *BCHE***. Em Congresso Brasileiro de Genética. Resumos. Foz do Iguaçu, 2006.

PARMO-FOLLONI, F.; NUNES, K.; LEPIENSKI, L.M.; MIKAMI, L.; SOUZA, R.R.L.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. **Estudos sobre as mutações IVS3-14T>C e 1917delT do gene *BCHE***. (No prelo).

PERRIER, A. L., MASSOULIÉ J. AND KREJCI E. The membrane anchor of acetylcholinesterase in the brain. **Neuron**, v.33, p.275-285, .2002.

PICHETH, G., FADEL-PICHETH, C., PRIMO-PARMO, S. L., CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A.; VIEIRA, M. M. An improved method for butyrylcholinesterase phenotyping. **Biochem. Genet.**, v. 32, p. 83-89, 1994.

PRIMO-PARMO, S. L.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.; LOURENÇO, M.A.C.; SALZANO, F.M.; FREITAS, M.J.M. Studies on serum cholinesterase (*CHE1* and *CHE2*) in Brazilian Indian and admixed populations. **Rev. Bras. Genet.** v. 3, p 467-478,1986.

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.

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

ROBSON, E.B.; SUTHERLAND, I.; HARRIS, H. Evidence for linkage between the transferring (TF) and serum cholinesterase locus (E_1) in man. **Ann. Hum. Genet.**, v. 29, p. 325-336, 1966.

ROZAS, J.; SANCHES-DELBARRIO, J.C.; MESSEGUER, X.; ROZAS, R. DnaSP, DNA polymorphism analyse by the coalescent and other methods. **Bioinformatics**, v.19, p.2496-2497, 2003.

RUBINSTEIN, H.M.; DIETZ, A.A.; LUBRANO, T. E_1^K , another quantitative variant at cholinesterase locus 1. **J. Med. Genet.**, v. 15, p. 27-29, 1978.

SÁEZ-VALERO, J.; POZA-CISNEROS, G.; VIDAL, C.J. Molecular forms of acetyl- and butyrylcholinesterase in human glioma. **Neurosci. Lett.**, v. 206, p. 173-176, 1996.

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.

SCHUMACHER, M.; CAMP, S.; MAULET, V.; NEWTON, M.; MACPHEE-QUIGLEY, K.; TAYLOR, S.S.; FRIEDMANN, T., e TAYLOR, P. Primary structure of *Torpedo Californica* acetylcholinesterase deduced from its cDNA sequence. **Nature (London)**, v. 319, p. 407-409, 1986.

SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D. e EXCOFFIER, L. **Arlequin ver. 2.000: A software for population genetics data analysis**. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland, 2000.

SCHRANK A., SILVA, S.C. **Biologia molecular básica**. Org. Arnaldo Zahra. Porto Alegre: Mercado aberto, 2ed., 2001.

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

SHIBUTA, K.; ABE, M.; SUZUKI, T. A new detection method for the K variant of butyrylcholinesterase based on PCR primer introduced restriction analysis (PCR-PIRA). **J. Med. Genet.**, v.31, p. 576-579, 1994.

SIMPSON, N. E. Factors influencing cholinesterase activity in a Brazilian population. **Am. J. Hum. Genet.**, v.18, p. 243-252, 1966.

SLATKIN, M.; EXCOFFIER L. Testing for linkage disequilibrium in genotypic data using the Expectation-Maximization algorithm. **Heredity**. v. 4, p.377-383, 1996

SOREQ, H.; ZAMIR, R.; ZEVIN-SONKIN, D.; ZAKUT, H. Human cholinesterase genes localized by hybridization to chromosomes 3 and 16. **Hum. Genet.** v.77, p. 325-328, 1987.

SOREQ, H.; ZAKUT, H. Amplification of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase genes in normal and tumor tissues: putative relationship to organophosphorus poisoning. **Pharm. Res.**, v. 7, p. 1-7, 1990.

SOREQ, H.; LAPIDOT-LIFSON, Y.; ZAKUT, H. A role for cholinesterases in tumorigenesis? **Cancer Cells**, v.3, p. 511-516, 1991.

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 *BCHE* gene of human butyrylcholinesterase in a Brazilian blood donor sample. **Mol. Genet. Metab.**, v.84, p. 349-353, 2005.

STUEBER-ODEBRECHT, N., CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A., PRIMO-PARMO, S. L.; CARRENHO, J. M. X. Studies on the *CHE1* locus of serum cholinesterase and surnames in a sample from Santa Catarina (Southern Brazil). **Rev. Bras. Genet.**, v. 8, p. 535-543, 1985.

SUAREZ-KURTZ, G. Farmacogenômica: a genética dos medicamentos. **Ciência hoje**, v.35, p. 20-27, 2004.

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.

TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics.**; v.123, p.585-95, 1989.

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.

TSCHÖP, M., SMILEY, D. L. e HEIMAN, M. L. Ghrelin induces adiposity in rodents. **Nature**, v. 407, p. 908-913, 2000.

TSUNETO, L.T. **Polimorfismo HLA em cinco populações ameríndias**. Curitiba, 2003. Tese (Pós-Doutorado) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

VIBY-MOGENSEN, J.; HANEL, H.K. Prolonged apnoea after suxamethonium: an analysis of the first 225 cases reported to the Danish cholinesterase research unit. **Acta Anaesthesiol. Scand.**, v. 22, p. 371-380, 1978.

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

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

WILKIE G.S.; DICKSON K.S.; GRAY N.K. Regulation of RNAm translation by 5' and 3' UTR binding factors. **Biochem. Scienc.**, v.28, p 182-188, 2003.

WRIGHT, F. The "effective number of codons" used in a gene. **Gene.**, v.87, p.23-29, 1990.

YANG, F.; LUM, J.B.; MCGILL, J.R.; MOORE, C.M.; NAYLOR, S.L.; VAN BRAGT, P.H.; BALDWIN, W.D.; BOWMAN, B.H.; Human transferrin: cDNA characterization and chromosomal localization. **Proc. Natl. Acad. Sci USA**, v. 81, p. 2752-2756, 1984.

YANG, Z. PALM: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood. **Comp.Applic. BioScie.** v.13, p.555-556, 1997.

YANG, Z. Likelihood ratio test for detecting positive selection an application to primate lysozyme evolution. **Mol. Biol. Evol.** v.15, p. 568-573, 1998.

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.

ZUKER, M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. 3415
Nucleic Acids Research. v.31, p. 3406-3415, 2003

9 APÊNDICES

Apêndice 9.1. Genótipos da amostra de doadores de sangue de Curitiba com atividade $\leq 4,00\text{KU/L}$

Alpe	Atividade	Exon 1	Exon 2								Exon 3	Itron 3 e início do exon 4	Exon 4
			-28 a 27	-42 a 204	155 a 347	304 a 535	481 a 719	659 a 876	835 a 1059	1000 a 1235			
4	3,35	11'	11*	11*	11*		11*	11*	11*	11*	11	11	11*
7	3,75	11'				11	11			11			
9	3,46	11	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	12*
24	3,69	11	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	11*
31	3,11	11'	11	11'	11	11	11	11	11'	11	11	11	11'
41	3,06	11'	11	11'	11	11	11	11	11'	11	11	11	11'
50	3,98	11	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	11*
53	2,21	11	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	11*
57	3,4	11	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*			11*
58	3,68	11	11*	11*	11*	11*	11*	11*	12*	11*	11	11	11*
77	3,49	11	11*	11*	11*	12*	11*	11*	11*	11*	11	11	12*
81	1,69	11'	11	11'	11	11	11	11	11'	11	11	11	11'
89	3,05	11	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	11*
91	3,99	11'	11	11	11	11	11	11	11'	11	11	11	11'
100	2,84	11	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	11*
103	2,21	12'	11	12'	11	11	11	11	11'	11	11	11	12'
111	3,59	11	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	11*
125	3,72	11	11*	12*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	12*
130	3,87	11	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	12*
138	3,46	11	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	12*
143	1,9	11	11*	12*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	22*
147	3,47	11	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	12*
148	3,46	11	11*	11*	11*	12*	11*	11*	11*	11*	11	11	11*
199	3,73	11'	11	11'	11	11	11	11	11'	11	11	11	11'
208	2,77	11	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	11*
210	2,65	11	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	11*
212	3,35	12	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	12*

217	2,87	11	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	12*
220	3,32	12'	11	11'	11		11	11	11'	11	11	11	12'
239	2,92	12'	11	11'	11	11	11	11	11'	11	11	11	12'
261	3,76	11	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	11*
285	3,93	11	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	11*
325	3,92	11'	11	11'	11	11	11	11	11'	11	11		11'
327	2,44	12'	11	11'	11	11	11	11	11'	11	11	11	12'
338	3,85	11'	11	11'	11	11	11	11	11'	11	11	11	11'
354	2,62	11	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	11*
372	2,82	11	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	11*
377	3,32	11	11*	11*	11*		11*	11*	11*	11*	11	13	11*
378	3,68	11	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	12*
389	3,46	11	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	11*
393	3,1	12	11*	11*	12*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	12*
395	3,69	11'	11	11'	11	11	11	11	11'	11	11	11	11'
401	3,81	12	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11		12*
412	1,96	12	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	12*
429	3,37	12	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	12*
467	2,68	11	11*	12*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	12*
478	3,12	11'	11	12'	11	11	11	11	11'	11	11	11	12'
491	3,22	12	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	12*
541	3,43	12	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*		11	12*
546	4		11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	12*			11*
555	1,69	11'	11	12'	11	11	11	11	11'	11	11	11	12'
562	2,71	11'	11		11	11	11	11	11'	11	11	11	11'
567	3,56	11	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	11*
612	3,86	11	11*	11*	11*	11*		11*	11*	11*	11	11	11*
659	0,16	11	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	11*
660	3,65	11	11*	11*	11*	11*	11*	11*	12*	11*	11	11	11*
666	3,33	11'	11	11'	11	11	11	11	11'	11	11	11	11'
672	3,98	11'	11	11'	11	11	11	11	11'	11	11	11	11'
674	2,65	11'	11	11'	11	11	11	11	11'	11	11	11	11'
682	3,39	11'	11	11'	11	11	11	11	11'	11	11	11	11'

1129	3,86	11	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	11*
1132	3,63	12	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	12*
1137	2,97	12	11*	12*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	22*
1138	3,85	11	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	11*
1181	2,98	11	11*	12*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	12*
1186	3,54	11	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	11*
1206	3,77	12	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	12*
1216	3,92	12'	11	11'	11	11	11	11	11'	11	11	11	12'
1244	3,78	11	11*	11*	11*	12*	11*	11*	11*	11*	11	11	11*
1262	3,57	11	11*	12*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	12*
1263	2,62		11*	12*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	12*
1273	3,64	11'	11	11'	11	11	11	11	11'	11	11	11	12'
1279	3,01	11'	11	11'	11	11	11	11	11'	11	11	11	12'
1288	3,95	11	12*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	11*
1341	3,96	11	11*	11*	11*		11*	11*	11*	11*	11	11	11*
1344	3,75	12	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*			12*
1349	3,11		11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*		11		12*
1363	3,79	12	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	12*
1370	3,84	12	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	12*
1385	3,82	12	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	22*
1398	3,66	12'	11	11'	11	11	11	11	11'	11	11	11	12'
1405	2,73	12	11*	11*	11*			11*				12	12
1406	3,29	12	11*	11*	11*	11*	13*	11*	11*	11*	11	11	22*
1408	3,38	11	11*	11*	11*	11*	13*	11*	11*	11*	11	11	12*
1421	3,33	22	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	22*
1438	3,37	11	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	11*
1446	3,02	22	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	22*
1481	3,36	11	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	12*
1499	3,57	12	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	12*
1524	2,83	12	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	12*
1526	3,46	12	11*		11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	12*
1535	3,93	12'	11	11'	11	11	11	11	11'	11	11	11	12'
1568	3,77	11	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	12*

1594	3,08	11	11*	12*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	11*
1602	3,96	11'	11	11'	11	11	11	11	11	11	11	11	12'
1632	3,31	11'	11	11'	11	11	11	11	11'	11	11	11	12'
1635	2,68	11'	11	11'	11	11	11	11	11'	11	11	11	12'
1640	2,88	11'	11	11'	11	11	11	11	11'	11	11	11	11'
1646	3,88	11'	11	11'	11	11	11	11	11'	11	11	11	12'
1670	2,9	22'	11	11'	11	11	13	11	11'	11	11	11	22'
1679	4	11	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	11*
1686	3,6	11	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	11*
1705	2,65	11'	11	11'	11	11	13	11	11'	11	11	11	12'
1768	3,93	12'	11	11'	11	11	11	11	11'	11	11	11	12'
1771	2,89	11'	11	11'	11	11	11	11	11'	11	11	11	11'
1797	3,35	11	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	12*
1832	3,74	11	11*	11*	11*	11*		11*	11*	11*	11	11	11*
1833	3,62	12	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	12*
1836	3,9	11	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	12*
1847	3,15	11	11*	12*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	12*
1862	3,34	12	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	12*
1864	3,81	12	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	12*
1884	3,68	11	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	11*
1934	3,81	12	11*		11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	11*
1939	3,66	12	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	12*
1943	3,9	11	11*	12*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	12*
1947	3,81	11	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	11*
1957	2,93	11	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	11*
1963	3,91	12	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	12*
1969	3,82	11	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	12*
1981	3,62	12	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	22*
1997	3,21	12	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	12*
2045	2,93	12	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11		11*
2131	3,71	11'	11	11'	11		11	11	11'	11	11	11	11
2139	3,46	11	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	11*
2150	3,88	11'	11	11'	11	11	11	11	11'	11	11	11	22

2216	2,03	12	11*	12*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	22*
2310	3,47	11	11*	11*	11*	12*	11*	11*	11*	11*	11	11	11*
2331	4	11	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	11*
2545	2,9		11*	11*	11*	11*	12*	11*	11*	11*			11*
2603	2,85	11	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	12	11*
2669	3,84	12	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	12*
2734	2,93	11'	11	11	11	11	11	11	11'	11	11	11	11'
2735	3,7	11	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	12*
2754	3,09	11	11*	11*	11*	11*	11*	12*	11*	11*	11	11	11*
2784	3,38	11	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11*	11	11	11*
2832	3,48		11*	11*	11*	11*	13*	11*	11*	11*			12*
2858	3,6	11'	11	11'	11		11	11	11'	11	11	11	11'

11 – Homozigoto usual

12 – Heterozigoto

13 – Heterozigoto

22 – Homozigoto não usual.

Em negrito indivíduos genotipados no presente trabalho

* Indivíduos genotipados por MIKAMI (2005)

´ Indivíduos genotipados por FURTADO (2006).

Apêndice 9.2. Genótipos da amostra de indivíduos heterozigotos para a variante *D70G*

Alpe	Atividade	Exon 1 (-116)	Exon 2 (D70G)	Exon 4 (A539T)
101		11	12*	12*
103	2,21	12	12*	12'
125	3,72	11	12*	12#
136		11	12*	12*
143	1,9	12	12*	22*
277		11	12*	12*
356	3,73	12	12*	22'
416	5,36	11	12'	12'
467	2,68	11	12*	12#
478	3,12	11	12*	12*
482		11	12*	12*
535		11	12*	11*
555	1,69	11	12*	12*
579		11	12*	11*
630		11	12*	12*
712		11	12*	12*
717		11	12*	12*
720		11	12*	12*
722	2,86	11	12*	12#
885	5,39	12	12'	22'
987	2,19	11	12*	12#
1042		11	12*	12*
1137	2,97	12	12*	22#
1181	2,98	12	12*	12#
1184		11	12*	12*
1243	4,83	11	12*	12*
1250		11	12*	11*
1262	3,57	11	12*	12#
1424		11	12*	12#
1448		11	12*	12#
1462	5,9	12	12'	12'
1542	8,17	11	12'	11'
1561		11	12*	12*
1580		11	12*	12*
1594	3,08	11	12*	11*
1610		11	12*	11*
1690		11	12*	12*
1757		11	12*	12*
1772		11	12*	11*
1784		11	12*	12*
1847	3,15	11	12*	12#
1905		11	12*	12*
1943	3,9	11	12*	12#
1985	4,31	11	12*	11*

2101		11	12*	12*
2184		11	12*	12*
2216	2,03	12	12*	22#
2238		11	12*	11*
2356	5,06	11	12*	12*
2763	4,46	11	12'	22'
2905		11	12*	22'

11 – Homozigoto usual

12 – Heterozigoto

22- Homozigoto atípico

Em negrito indivíduos genotipados no presente estudo

* Indivíduos genotipados por SOUZA (2001)

Indivíduos genotipados por MIKAMI (2005)

‘ Indivíduos genotipados por FURTADO (2006)

Apêndice 9.3. Genótipos da amostra de Guarani do Mato Grosso do Sul.

Amostra	Subtribo	Sexo	Idade	Atividade	Exon 1	Exon 2 (209G>A)	Exon 2 (1169G>T)	Exon 3	Exon 4
1	NW	M	23		11		11	11	11
2	NW	F	22		11		11	11	11
3	NW	F	64		11		11	11	11
4	NW	F	14	2.976	11	11	11	11	12
5	NW	F	14		11		11	11	11
6	NW	F	15		11		11	11	11
7	NW	M	17		11		11	11	11
8	NW	F	19		11		11	11	11
9	NW	F	14		11		11	11	11
10	NW	F	12		11		11	11	11
11	NW	F	27	3.198	11	11	11	11	12
12	NW	F	14		11		11	11	11
13	NW	F	13		11		11	11	11
14	NW	F	19		11		11	11	11
15	NW	F	20	3.8	11	11	11	11	11
16	NW	F	51	2.026	11	11	12	11	11
17	NW	F	30		11		12	11	11
18	NW	F	29		11		12	11	11
19	NW	M	43		11		11	11	11
20	NW	F	36	3.529	11	11	12	11	12
21	NW	M	17	4.985	11	11		11	11
22	NW	F	15		11		11	11	11
23	NW	F	57		11		11	11	11
24	NW	M	33		11	11	12	11	11
25	NW	F	23		11		11	11	11
26	NW+P	F	18	3.739	11	11	11	11	11
27	NW	F	40	4.204	11	11	11	11	11
28	NW	F	24		11		11	11	11
29	KW+NW	F	55	2.598	11		11	11	11
30	NW	F	38	2.015	11	11	11	11	12
31	NW	F	30		11		11	11	11
32	NW	F	18		11		11	11	11
33	NW	F	17		11		11	11	11
201	KW	F	15	3.928	11		11	11	11
202	KW+B	M	25	3.625	11	11	12	11	11
203	KW	F	35	2.933	11	11	11	11	11
204	KW	M	65	3.449	11	11	11	11	11
205	KW	F	22	4.683	11	11	11	11	11
206	KW	F	25	6.024	11		11	11	11
207	KW	F	52	3.0596	11		12	11	11
208	KW	M	12		11		11	11	11

209	KW	F	12		11		11	11	11
210	KW	F	19		11		11	11	11
211	KW	F	14		11		11	11	11
212	KW	F	31		11		11	11	11
213	KW	F	35		11		11	11	11
214	KW	F	34		11		11	11	11
215	KW	F	60		11		11	11	11
216	KW	M	66		11		12	11	11
217	KW	F	16		11		11	11	11
218	KW	M	27	1.956	11	11	11	11	12
219	KW	M	35		11			11	11
220	KW	F	17		11			11	11
221	KW	F	19		11		12	11	11
222	KW	F	25		11			11	11
223	KW	F	42		11			11	11
224	KW	F	20		11		12	11	11
225	KW	F	23		11	11	11	11	11
226	KW	F	60		11		11	11	11
227	KW	F	16	4.33	11	11	11	11	11
228	KW	F	24	4.683	11	11	11	11	11
229	KW	M	16		11		11	11	11
230	KW	F	18	3.337	11	11	11	11	11
231	KW	M	18		11		11	11	11
232	KW	F	12	1.07	11		12	11	11
233	KW	F	12		11		12	11	11
234	KW	F	11		11		11	11	11
235	KW	F	12		11		11	11	11
236	KW	M	13		11			11	11
237	KW	F	15		11		12	11	11
238	KW	F	13		11		11	11	11
239	KW	F	35		11		11	11	11
240	KW+NW	F	14		11		11	11	11
241	KW	M	22		11		11	11	11
242	KW	M	71		11			11	11
244	KW	F	36		11			11	11
245	KW	M	35	3.537	11	11	11	N	12
247	KW	M	33	2.933	11		12	11	11
248	KW	F	24	3.637	11		12	11	11
249	KW	F	59				11	11	11
250	KW	F	20	4.194	11	11	12	11	11
251	KW	F	19		11			11	11
252	KW	F	29		11			11	11
253	KW	F	35	4.435	11	11	11	11	11
254	KW	F	30		11			11	11
255	KW	F	53	4.597	11	11	11	11	11

256	KW	F	15		11			11	11
257	KW	F	17	1.46	11	11	11	11	11
258	KW	F	44		11		11	11	11
262	KW	F	15		11		11	11	11
263	KW+NW	F	18	2.782	11	11	11	11	11
264	KW	F	24	7.616	11		11	11	11
266	KW	F	24		11		11	11	N
268	KW	F	42		11		11	11	11
269	KW+NW	F	19	3.059	11		12	11	11
270	KW	F	19		11		11	11	11
271	KW	F	22	5.237	11	11	11	11	11
273	KW+NW	F	18		11		11	11	11
275	KW	F	16		11		11	11	11
276	KW+NW	F	14		11			11	11
277	KW	F	17		11			11	11
279	KW	F	20		11			11	11
280	KW+NW	F	13	4.053	11		11	11	11
281	KW+NW	F	16	4.67	11	11	12	11	11
284	KW	F	20		11		11	11	N
285	KW	F	16	2.404	11		12	11	11
286	KW	F	55	0.227	11	11A	11	11	11
287	KW	F	23	2.9	11	11A	11	11	11
288	KW	M	20		11			11	11
289	KW	M	12	4.588	11			11	11
290	KW	M	26	4.053	11	11	12	11	11
291	NW+MC	F	25	3.878	11		12	11	11
292	KW	F	39	2.543	11	11	11	11	11
293	KW	M	24		11		11	11	11
294	KW	F	37		11		11	11	11
295	KW	F	26	6.344	11	11	12	11	11
296	KW	M	42		11		11	11	11
297	KW	F	23		11		11	11	11
298	KW	F	19		11			11	11
299	KW	F	18		11		11	11	11
300	KW	F	60		11		11	11	11
301	KW	F	31		11			11	N
302	KW	F	26		11		11	11	11
303	KW	F	47		11		11	11	11
304	KW	F	15		11		11	11	11
305	KW	F	56		11		11	11	11
306	KW	F	19	3.172	11	11	11	11	11
307	KW	F	19	5.023	11	11	11	11	11
308	KW	M	60		11		11	11	11
309	KW	F	32	1.988	11	11	12	11	KK
310	KW	M	21		11		11	11	11

311	KW	M	23		11		11	11	11
312	KW	M	61		11		11	11	11
313	KW	M	15	4.754	11	11	12	11	11
314	KW	M	43		11		11	11	11
315	KW	F	57	3.829	11	11	11	11	11
316	KW+NW	F	24		11		11	11	11
317	KW+NW	M	72		11		11	11	11
318	KW	F	24	2.883	11	11	11	11	12
319	KW	F	13	4.167	11	11	11	11	11
320	KW	M	21		11		11	11	11
321	KW	F	40		11			11	11
322	KW	F	21		11		11	11	11
324	KW	F	26		11		11	11	11
325	KW+NW	M	22		11		11	11	11
326	KW	F	16		11		12	11	11
327	KW	F	19		11		12	11	11
328	KW	M	26	3.778	11	11	11	11	12
329	KW	F	23		11		12	11	11
330	KW	M	43	2.022	11	11	11	11	KK
331	KW+T	F	16		11		11	11	11
332	KW	F	20	4.035	11	11	11	11	12
333	KW	F	50	3.977	11	11	11	11	12
334	KW+NW	F	18	4.021	11	11	11	11	12
401	NW	F	44	5.045	11		11	11	11
402	NW	F	58	2.87	11	11A	11	11	12
403	NW	F	19	2.994	11	11	11	11	12
404	NW	F	14		11		11	11	11
405	NW	F	70		11		12	11	11
601	KW	F	36	3.223	11	11	11	11	12
602	KW	F	35		11		11	11	11
603	KW	F	13	4.859	11		11	11	11
604	KW	F	26		11		11	11	11
605	KW	F	11		11	11	11	11	11
606	KW	F	22		11	11	12	11	11
607	KW	F	20		11	11	12	11	11
608	KW	F	15		11		11	11	11
609	KW	M	20		11		11	11	11
610	KW	F	16		11		11	11	11
611	KW	F	16		11		11	11	11
612	KW	F	29		11		11	11	11
613	KW	M	31		11		11	11	11
614	KW	F	60	4.859	11	11	11	11	11
615	KW	F	55	6.435	11	11	11	11	11
616	KW	F	18		11		12	11	N
617	KW	M	14		11		12	11	11

618	KW	F	20		11		11	11	11
619	KW	F	49		11		11	11	11
620	KW+NW	F	38		11		11	11	11
621	KW+NW	F	23		11		11	11	11
622	KW	F	46		11		11	11	11
623	KW	F	66		11		11	11	11
624	KW	F	60	5.073	11	11	11	11	11
625	KW	F	39		11		11	11	11
626	KW	F	24		11		11	11	11
627	KW	F	16				11	11	11
628	KW+NW	M	32	5.861	11	11	12	11	11
629	KW	F	19	5.161	11	11	11	11	11
630	KW	F	53		11		11	11	11
631	KW	F	28	3.348	11	11	12	11	11
632	KW	F	23	5.831	11	11	11	11	11
633	KW	F	60		11		11	11	11
634	KW	F	19		11		12	11	11
635	KW	F	24		11		11	11	11
636	KW+NW	F	17		11		11	11	11
637	KW+NW	F	45	5.489	11		11	11	11
638	KW+NW	F	18		11		12	11	11
639	KW	F	32	4.108	11	11	11	11	11
640	KW+NW	F	15	4.469	11	11	11	11	11
641	KW+NW	F	15		11		11	11	11
642	KW	F	15		11		11	11	11
643	KW	F	14	4.366	11	11	11	11	11
644	KW	F	17		11		11	11	11
645	KW+NW	F	20		11		11	11	11
646	KW	M	63		11		11	11	11
647	KW	M	62		11		11	11	11
648	KW	M	19		11		11	11	11
649	KW	F	22		11		11	11	11
650	KW	F	14	3.656	11	11	11	11	11
651	KW	F	56		11			11	11
652	KW	F	17		11		12		
801	NW	F	18		11			11	11
802	NW	F	16	3.021	11	11	11	11	11
803	NW+B	M	19		11			11	11
804	NW	M	40		11			11	11
805	NW	M	22		11		11	11	11
806	NW	M	22				11	11	11
807	NW	M	25		11		11	11	11
808	NW	M	20	5.778	11	11	11	11	11
809	NW	M	48	3.651	11		11	11	11
810	NW	M	28		11		11	11	11

811	NW	M	17		11		11	11	11
812	NW	M	18		11		11	11	11
813	NW	M	55		11	11	11	11	11
814	NW+P	F	22	3.084	11	11	12	11	11
815	NW	M	17	3.429	11	11	11	11	11
816	NW	M	26	4.079	11	11	12	11	11
817	NW	M	29	2.92	11	11	12	11	11
818	NW	M	12		11		11	11	11
819	NW	F	57		11		11	11	11
820	NW	M	22	7.905	11		11	11	11
821	NW	M	30		11		12	11	11
822	NW	F	27	4.819	11		11	11	11
823	NW	F	17		11		11	11	11
824	NW	F	28		11		11	11	11
825	NW	F	24	4.267	11		11	11	11
826	NW	F	19		11		11	11	11
827	KW+NW	F	23	1.901	11		11	11	11
828	NW	F	55		11		11	11	11
829	NW	M	64		11		11	11	11
830	NW	F	60		11		11	11	11
831	NW+P	F	43	7.88	11		11	11	11
832	NW	F	39		11		12	N	N
833	NW	M	62	6.193	11	11	11	11	11
834	NW	F	38		11		11	11	11
835	NW	F	35	2.933	11		11	11	11
836	NW	F	28		11		11	11	11
837	NW	F	26	5.048	11		11	11	11
838	NW	F	34	6.672	11		11	11	11
839	NW	F	15		11			11	11
840	NW	F	14	6.594	11	11	11	11	11
841	NW	F	63		11			11	N
842	NW	M	29		11			11	N
843	NW	F	55	4.683	11	11	11	11	11
844	NW	F	22		11			11	N
845	NW	F	59	5.967	11			11	11
846	NW+P	F	46	3.421	11	11	11	11	12
847	NW	M	39		11			11	N
848	NW	M	37		11			11	N
849	NW	F	30		11			11	N
850	NW	F	40		11			11	N
851	NW	F	17		11			11	11
852	NW	F	33		11			11	11
853	NW	F	15		11			11	11

Subtribos: NW= Ñandewa ; KW= Kaiowá

Os exons 2, 3 e 4 foram genotipados por FURTADO et al., (2006).