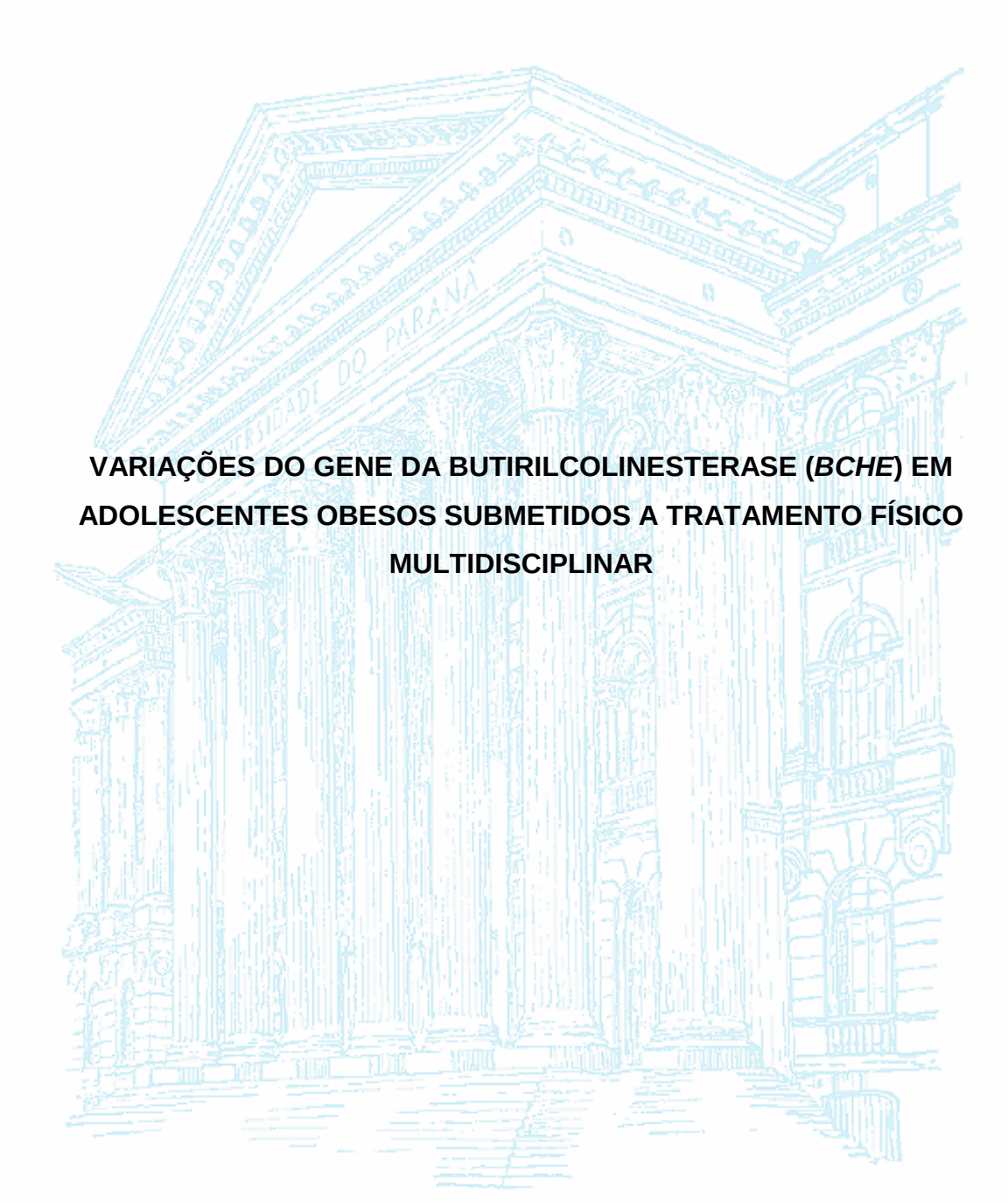
THAÍS JANNUZZI CHAVES



VARIAÇÕES DO GENE DA BUTIRILCOLINESTERASE (*BCHE*) EM ADOLESCENTES OBESOS SUBMETIDOS A TRATAMENTO FÍSICO MULTIDISCIPLINAR

CURITIBA
2011

THAÍS JANNUZZI CHAVES

VARIAÇÕES DO GENE DA BUTIRILCOLINESTERASE (*BCHE*) EM ADOLESCENTES OBESOS SUBMETIDOS A TRATAMENTO FÍSICO MULTIDISCIPLINAR

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR), como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientadora: Profª. Drª. Lupe Furtado Alle

Co- orientadores: Profº. Dr. Ricardo L. R. de Souza
Profª. Drª Neiva Leite

CURITIBA
2011

A todos que tem paixão pela ciência.

AGRADECIMENTOS

À Prof[a]. Dra. Lupe Furtado Alle, minha adorável orientadora, que acreditou no meu potencial proporcionando a chance de desenvolver este trabalho e me ensinou a pensar criticamente para fazer realmente parte do meio científico. Além de orientadora, uma pessoa fabulosa, dedicada e responsável a qual tenho e sempre terei muita estima e admiração. Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza, meu co-orientador, pelos auxílios gerais, esclarecimentos técnicos, dúvidas de emergência, dicas de informática e consertos eletrônicos.

À Prof. Dra. Eleidi Alice Chautard Freire Maia pelas palavras doces de incentivo, críticas relevantes e ótimas análises sempre transmitidas com opiniões sinceras e que acrescentaram muito ao meu trabalho devido a sua imensa experiência científica.

Ao Prof. Iglenir João Cavalli, integrante da minha banca de acompanhamento, que analisou todo meu trabalho e me direcionou a pensar de maneira crítica para realizar uma ótima dissertação.

À Prof[a]. Neiva Leite e Doutoranda Gerusa Milano pelas coletas e análises das amostras no Departamento de Educação Física.

Aos colegas de Laboratório: Fabiana, Dellyana, Meire, Nalini, Nathacha, Thais, Gleyse, Mariana, Alejandro e Maicon que além de me ajudarem no dia-a-dia, pela convivência se tornaram maravilhosos amigos. Agradeço pelos momentos de diversão e conselhos científicos.

À amiga, Danielle Jackowski que me abriu as portas da Genética na UFPR, a qual me ensinou várias técnicas laboratoriais e acreditou no meu potencial; E ao colega Hugo que também me ensinou procedimentos com muito carisma e bom humor.

Aos estagiários, Bruna, Gisele e Leonardo que em momentos diferentes me auxiliaram na rotina do laboratório.

Aos colegas do Mestrado: Mariane Madalozzo, Cynthia Hernandes Costa, Laércio Piancini, Larissa Oliveira Guimarães, Rodrigo Schuh, Juliana Marta, Ricardo Dalla Costa e Geórgia Gemini pelos ótimos momentos de alegria e descontração, sempre presentes.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética da UFPR e aos seus professores, que me permitiram conquistar mais um degrau da minha vida acadêmica.

Aos amigos da vida toda, Lucíola Thais Baldan, Viviane Marques Sass e Jeferson Vargas que compartilharam muitas das minhas aflições e me incentivaram a seguir em frente e não desistir com os obstáculos.

Aos meus pais, Ises e João, luzes da minha vida, pelo incentivo e apoio, que sempre acreditaram no meu esforço.

Ao meu amor Jonas, que compartilha todos os momentos da minha vida e me incentiva a sempre procurar nossos desafios e ser firme, mas sempre dando um passo de cada vez. Obrigada por sempre estar ao meu lado e acreditar no meu sucesso.

À Deus por me guiar e permitir concluir mais uma etapa da minha vida.

“O jovem que quer ser cientista,
e à ciência dedicar todo o seu tempo e amor,
tem pelo menos três certezas:
a de que morrerá um dia (como todo mundo),
a de que não ficará rico (como quase todo mundo)
e a de que se divertirá muito (como pouca gente)".

Newton Freire Maia

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS..... VIII

LISTA DE TABELAS..... VIII

LISTA DE GRÁFICOS..... IX

LISTA DE ABREVIATURAS..... X

RESUMO..... XI

ABSTRACT..... XII

1. INTRODUÇÃO..... 1

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... 2

2.1 BUTIRILCOLINESTERASE (BChE)..... **2**

2.2 ESTRUTURA DO GENE *BCHE*..... **2**

2.3 VARIABILIDADE DO GENE *BCHE*..... **5**

2.3.1 SNPs abordados neste trabalho..... ***6***

2.4 LOCO *CHE2*..... ***7***

2.5 OBESIDADE..... **8**

2.5.1 Obesidade juvenil..... **10**

2.5.2 Obesidade e IMC (Índice de massa corporal) ***13***

2.6 RELAÇÃO OBESIDADE E BChE..... 17

3. OBJETIVOS..... 18

3.1 OBJETIVO GERAL..... **18**

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... **18**

4. ARTIGO 1..... 19

4.1 RESUMO..... **19**

4.2 ABSTRACT..... **20**

4.3 INTRODUÇÃO..... **20**

4.4 MATERIAL E MÉTODOS..... **22**

4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... **24**

4.6 AGRADECIMENTOS..... **28**

4.7 REFERÊNCIAS **28**

5. ARTIGO 2..... 31

5.1 RESUMO..... **31**

5.2 ABSTRACT..... **32**

5.3 INTRODUÇÃO..... **32**

5.4 MATERIAL E MÉTODOS..... **34**

5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... **36**

5.6 AGRADECIMENTOS..... **41**

5.7 REFERÊNCIAS **41**

6. DISCUSSÃO GERAL..... 43

7. CONCLUSÕES..... 45

8. REFERÊNCIAS 47

9. DOCUMENTOS CONSULTADOS..... 51

10. APÊNDICE..... 53

A. ACOMPANHAMENTO DO PROJETO PELA EQUIPE MULTIDISCIPLINAR: EXERCÍCIOS FÍSICOS, PALESTRAS E ORIENTAÇÃO..... 53

B. AVALIAÇÕES FÍSICAS MULTIDISCIPLINARES REALIZADAS..... 54

C. TABELA DAS ANÁLISES BIOQUÍMICAS / ANTROPOMÉTRICAS, ATIVIDADE ENZIMÁTICA E CHE2 NO GRUPO DE OBESOS..... 55

11. ANEXOS..... 58

A. MODIFICAÇÕES NO MÉTODO DE LAHIRI & NURNBERGER (1991)..... 58

B. MEDIDA DE ATIVIDADE DA BCHE PELO MÉTODO DE DIETZ ET AL. (1972), MODIFICADO POR EVANS E WROE (1978) 59

C. FENOTIPAGEM DO LOCO *CHE2* PELO MÉTODO DE ROBINSON ET AL. (1957) COM MODIFICAÇÕES DE VAN ROS E VERVOORT (1973) E FADEL PICHETH (1991) E SOUZA (1995)..... 60

LISTA DE FIGURAS

REFERENCIAL TEÓRICO:

FIGURA 1. Esquema da Butirilcolinesterase..... 3
FIGURA 2. Informações moleculares do gene BCHE..... 4

ARTIGO 1:

FIGURA 1. Padrão de bandas encontradas no gel de Agar ácido para *CHE2* 27

ARTIGO 2:

FIGURA 1. Padrão de curvas do programa Realplex para as duas sondas do Tempo Real..... 37
FIGURA 2. Exemplo de resultado gráfico da Genotipagem em Tempo Real..... 37

LISTA DE TABELAS

REFERENCIAL TEÓRICO:

TABELA 1. Lista de variantes descritas do gene BCHE, com a localização, alteração de nucleotídeo e o nome do alelo..... 6
TABELA 2. Classificação IMC para adultos, segundo a OMS..... 13
TABELA 3. Distribuição dos valores do índice de massa corporal (Kg/m^2) da população masculina brasileira em função da faixa etária..... 16
TABELA 4. Distribuição dos valores do índice de massa corporal (Kg/m^2) da população feminina brasileira em função da faixa etária..... 16

ARTIGO 1:

TABELA 1. Média de idade, Índice de massa corporal (IMC), características clínicas e atividade da butirilcolinesterase em 118 adolescentes obesos..... 24
TABELA 2. Valores médios da atividade da BChE ± EP e valores de t e p para as comparações entre as médias..... 26
TABELA 3. Índice de massa corporal (IMC), características clínicas e

atividade da butirilcolinesterase em 25 adolescentes obesos antes do início e ao término do programa multidisciplinar de exercícios físicos..... 27
TABELA 4. Frequências do fenótipo CHE2 C5+ em obesos, controles e na população de Curitiba e valores de Qui-quadrado e p para as comparações entre as frequências..... 27

ARTIGO 2:

TABELA 1. Valores de P para o teste do χ^2 para o equilíbrio de Hardy-Weinberg..... 36
TABELA 2. Frequências alélicas e genotípicas para a mutação K..... 39
TABELA 3. Frequências alélicas e genotípicas para a mutação -116..... 39
TABELA 4. Variáveis antropométricas e clínicas em adolescentes obesos classificados de acordo com os genótipos do sítio -116..... 40
TABELA 5. Variáveis antropométricas e clínicas em adolescentes obesos classificados de acordo com os genótipos do sítio 1615..... 40

LISTA DE GRÁFICOS

REFERENCIAL TEÓRICO:

GRÁFICO 1. Percentual de homens e mulheres (≥ 18 anos) com obesidade (IMC ≥ 30 kg/m2) segundo as capitais dos estados brasileiros e Distrito Federal..... 10
GRAFICO 2. Evolução temporal para adolescentes entre na Região Sul..... 11
GRÁFICO 3. Estimativas de adolescentes com excesso de peso e obesidade no Brasil, entre os anos de 1974 a 2009..... 12
GRÁFICO 4. Percentil de massa corporal para meninos de 2 a 20 anos de idade..... 14
GRÁFICO 5. Percentil de massa corporal para meninas de 2 a 20 anos de idade..... 15

ARTIGO 1:

GRÁFICO 1. Atividade Enzimática no grupo de adolescentes obesos 25
GRÁFICO 2. Atividade enzimática no grupo de controles (adolescentes não-obesos)..... 25

LISTA DE ABREVIATURAS

BCHE	Gene da butirilcolinesterase
BChE	Butirilcolinesterase
CA	Circunferência abdominal
CHE2	Loco condicionador do complexo C5 da butirilcolinesterase
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EP	Erro padrão
FC	Frequência cardíaca
GMR	Gasto metabólico em repouso
HDL	*High Density lipoprotein*
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IMC	Índice de Massa Corporal
Kb	Kilobases
KU/L	Medida da atividade enzimática
LDL	*Low Density Lipoprotein*
NCBI	*National Center for Biotechnology Information*
OMS	Organização Mundial de Saúde
Pb	Pares de bases
PCR	*Polymerase Chain Reaction* (reação em cadeia da polimerase)
RCE	Razão cintura-estatura
RCQ	Razão cintura-quadril
SNPs	*Single nucleotide polymorphisms*
TG	Triglicérides
$VO_{2\ max}$	Consumo máximo de oxigênio
VCO_2	Consumo de gás carbônico

RESUMO

A Butirilcolinesterase (BChE; EC 3.1.1.8) é uma esterase sérica de ampla distribuição no organismo que possui um papel importante no metabolismo de lípides e que já foi relacionada a variáveis clínicas e antropométricas associadas à obesidade. A BChE é codificada pelo gene *BCHE* (3q26.1-q26.2) que possui mais de 65 variantes descritas, sendo a -116A e a A539T duas das mais frequentes mutações na população Brasileira. Estas mutações, que estão em desequilíbrio de ligação, já apresentaram relações com a atividade da BChE e com a obesidade em adultos. O presente estudo foi realizado em duas etapas: Na etapa I foi analisada uma comparação entre um grupo de adolescentes obesos e um grupo de adolescentes não obesos da cidade de Curitiba-PR com idade de 10 a 16 anos. Na etapa II avaliou-se 25 adolescentes obesos submetidos a um programa multidisciplinar de atividade física e orientação nutricional antes e após 12 semanas de intervenção. Primeiramente foi analisada a atividade da butirilcolinesterase em obesos juvenis (N=118) e controles não obesos (n=158). Variáveis antropométricas e bioquímicas já associadas à obesidade, bem como o loco *CHE2*, também foram avaliadas. Em um segundo momento, foi investigado o SNP G-116A: mutação -116 (114 adolescentes obesos e 150 controles) e o SNP A539T: mutação K (120 adolescentes obesos e 144 controles) do gene *BCHE* e também analisadas variáveis antropométricas e bioquímicas correlacionadas com estas variantes e a atividade da BChE. Foi encontrado que a atividade média da butirilcolinesterase nos adolescentes obesos é significativamente mais alta que no grupo controle e que na população de Curitiba. A frequência do fenótipo CHE2 C5+ é semelhante em obesos e controles, bem como em relação à população de Curitiba. Não existe diferença significativa na atividade da butirilcolinesterase em obesos com fenótipo CHE2 C5+ e CHE2 C5-. Os valores de LDL e de IMC estão positivamente correlacionados com a atividade enzimática nos adolescentes obesos. A avaliação dos adolescentes após o término do programa multidisciplinar mostrou que a atividade da butirilcolineterase foi significativamente reduzida, tornando-se semelhante àquelas verificadas no grupo controle e na população de Curitiba. Também foram significativamente reduzidos IMC, triglicerídeos e circunferência abdominal. A atividade da butirilcolinesterase, portanto, está relacionada à obesidade juvenil e, assim como outras variáveis associadas, responde à prática de exercícios físicos e pode ser utilizada como um marcador secundário para os riscos associados à obesidade juvenil. Na genotipagem da mutação K foi verificado que os genótipos estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg e as frequências alélicas e genotípicas não diferem entre obesos, controles e população de

Curitiba. Os genótipos do sítio -116 também estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg, mas as frequências alélicas e genotípicas diferem nos adolescentes obesos e no grupo controle, e entre a amostra de obesos e a população de Curitiba, sugerindo um efeito protetor dessa variante no desenvolvimento de obesidade juvenil. Adolescentes obesos portadores da mutação -116A tem atividade média da BChE significativamente menor e triglicerídeos significativamente mais elevados que obesos com genótipo usual e com valores considerados elevados de acordo com os valores de referência propostos para esta faixa etária. Considerando que os indivíduos dos dois genótipos são obesos e que não apresentam diferenças significativas nas demais variáveis analisadas, a mutação -116A pode ser sugerida como um marcador genético para hipertrigliceridemia em obesos.

Palavras - Chave: Obesidade, Adolescência, BChE, atividade enzimática, loco *CHE2*, variante -116A, variante K.

ABSTRACT

The butyrylcholinesterase (BChE, EC 3.1.1.8) is a serum esterase widely distributed in the body that has an important role in lipid metabolism, and that has been implicated with anthropometric and clinical variables associated with obesity. The BChE is encoded by the BCHE gene (3q26.1-q26.2), which has more than 65 variants described above, and the A539T-116A and two of the most frequent mutations in the Brazilian population. These mutations, which are in linkage disequilibrium, as were relations with BChE activity and obesity in adults. This study was conducted in two stages: In stage I was considered a comparison between a group of obese and a non-obese group of teenagers from the city of Curitiba-PR aged 10 to 16 years. In a second step we evaluated 25 obese adolescents underwent a multidisciplinary program of physical activity and nutritional counseling before and after 12 weeks of intervention. We first analyzed the activity of butyrylcholinesterase in obese juveniles (N =118) and non-obese controls (n =150). Anthropometric and biochemical variables associated with obesity as well as the locus CHE2, were also evaluated. In a second step, we investigated the G-116A SNP: -116 mutation (114 obese and 150 controls) and A539T SNP: K mutation (120 obese and 144 controls) of the BCHE gene and also analyzed anthropometric and biochemical variables correlate with these variants and activity of BChE. Was found that the average activity of butyrylcholinesterase in obese adolescents is significantly higher than the control group and that the population of Curitiba. The frequency of phenotype CHE2 C5+ is similar in obese and controls as well

as for the population of Curitiba. There is no significant difference in the activity of butyrylcholinesterase in obese phenotype CHE2 C5+ e CHE2 C5-. The values of LDL and BMI are positively correlated with enzyme activity in obese adolescents. The assessment of adolescents after the multidisciplinary program showed that the activity of butirilcolineterase was significantly reduced, becoming similar to those observed in the control group and the population of Curitiba. Were significantly lower BMI, waist circumference and triglycerides. The activity of butyrylcholinesterase therefore, is related to obesity and early as well as other associated variables, responds to physical exercise and can be used as a secondary marker for the early risks associated with obesity. In genotyping K mutation was found that the genotypes are in Hardy-Weinberg equilibrium and allelic and genotypic frequencies did not differ between obese controls and population of Curitiba. The genotypes of the -116 site are also in Hardy-Weinberg equilibrium, but the allelic and genotypic differ in obese and control groups, and between the sample and the obese population of Curitiba, suggesting a protective effect of this variant in the development of early obesity. Obese that carriers -116A mutation average activity of BChE has significantly lower and triglycerides were significantly higher than normal and obese patients with genotype values considered high according to the reference values proposed for this age group. Considering that individuals of both genotypes are obese and who do not show significant differences in other variables, the -116A mutation may be suggested as a genetic marker for hypertriglyceridemia in obese people.

Keywords: Obesity, Adolescence, BChE, enzymatic activity, *CHE2* loco, -116A variant, K variant .

1. INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença que afeta milhões de pessoas no mundo e vem crescendo exponencialmente em todas as faixas etárias da população, sendo considerada um problema de saúde pública pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Pode ser indicada também como uma das doenças crônicas não-transmissíveis que epidemiologicamente mais crescem mundialmente (NAVAES e PASCHOAL, 2007).

O período de vida da adolescência que vai dos 10 aos 19 anos caracteriza-se por grandes transformações físicas, psicológicas, somáticas e sociais. É nesta fase que ocorrem o crescimento físico, desenvolvimento psicossocial e estimulação cognitiva intensa, tornando as necessidades nutricionais elevadas. É neste momento, portanto, que o indivíduo pode predispor-se uma obesidade séria para a fase adulta.

Uma enzima importante na obesidade é a butirilcolinesterase (BChE) que é encontrada em vários tecidos e está relacionada com o metabolismo de lípides e de algumas variáveis como Índice de massa corporal (IMC), colesterol, triglicérides, estatura, peso corporal, entre outros.

Assim, este estudo teve como foco investigar a associação entre obesidade juvenil, variantes do gene *BCHE*, SNPs (*single nucleotide polymorphisms*), atividade da BChE e fenótipo do loco *CHE2,* os quais auxiliam na variação genética deste gene.

Os estudos de associação genética utilizando casos e controles são importantes para delinear estratégias de diagnóstico e tratamento de doenças como a obesidade. A relação da atividade enzimática da BChE com a intervenção da atividade física ainda não foi estudada, pois não foram encontrados dados da literatura que avaliassem este efeito na obesidade juvenil.

Portanto, este estudo desejou auxiliar na identificação de perfis genéticos de indivíduos com obesidade juvenil e analisar sua influência no metabolismo basal observado depois da prática de atividade física nos perfis antropométricos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BUTIRILCOLINESTERASE (BChE)

A butilcolinesterase (BChE; EC 3.1.1.8) antes chamada de pseudocolinesterase, colinesterase do soro ou colinesterase não específica é uma enzima sérica produzida pelo fígado e adipócitos. É amplamente distribuída no organismo e pode estar presente no plasma, músculo liso, pâncreas, adipócitos, pele, massa branca do cérebro e coração (WESCOE *et al.*, 1947).

Encontrada em diversos tecidos do corpo, parece estar relacionada a várias vias do metabolismo e desenvolvimento do organismo. Entre algumas variáveis relacionadas estão: diabetes; obesidade; estatura; IMC; peso; RCQ (razão cintura-quadril); colesterol; triglicérides e lipoproteínas.

No sangue humano, existem cinco formas moleculares da BChE, denominadas C1, C2, C3, C4 e C5 que são ordenadas de forma decrescente de mobilidade eletroforética.

As formas consistem em monômeros, dímeros, trímeros e tetrâmeros, ou associadas a outras substâncias, como a albumina, formando complexos heterólogos. BOBERG *et al*. (2010) verificaram que embora a atividade média de cada banda da BChE seja significantemente mais alta em obesos, as proporções de cada banda são mantidas mesmo sob o estresse metabólico associado à obesidade. Os autores sugerem que estas proporções são reguladas e que podem ser importantes para as funçoes fisiológicas da BChE.

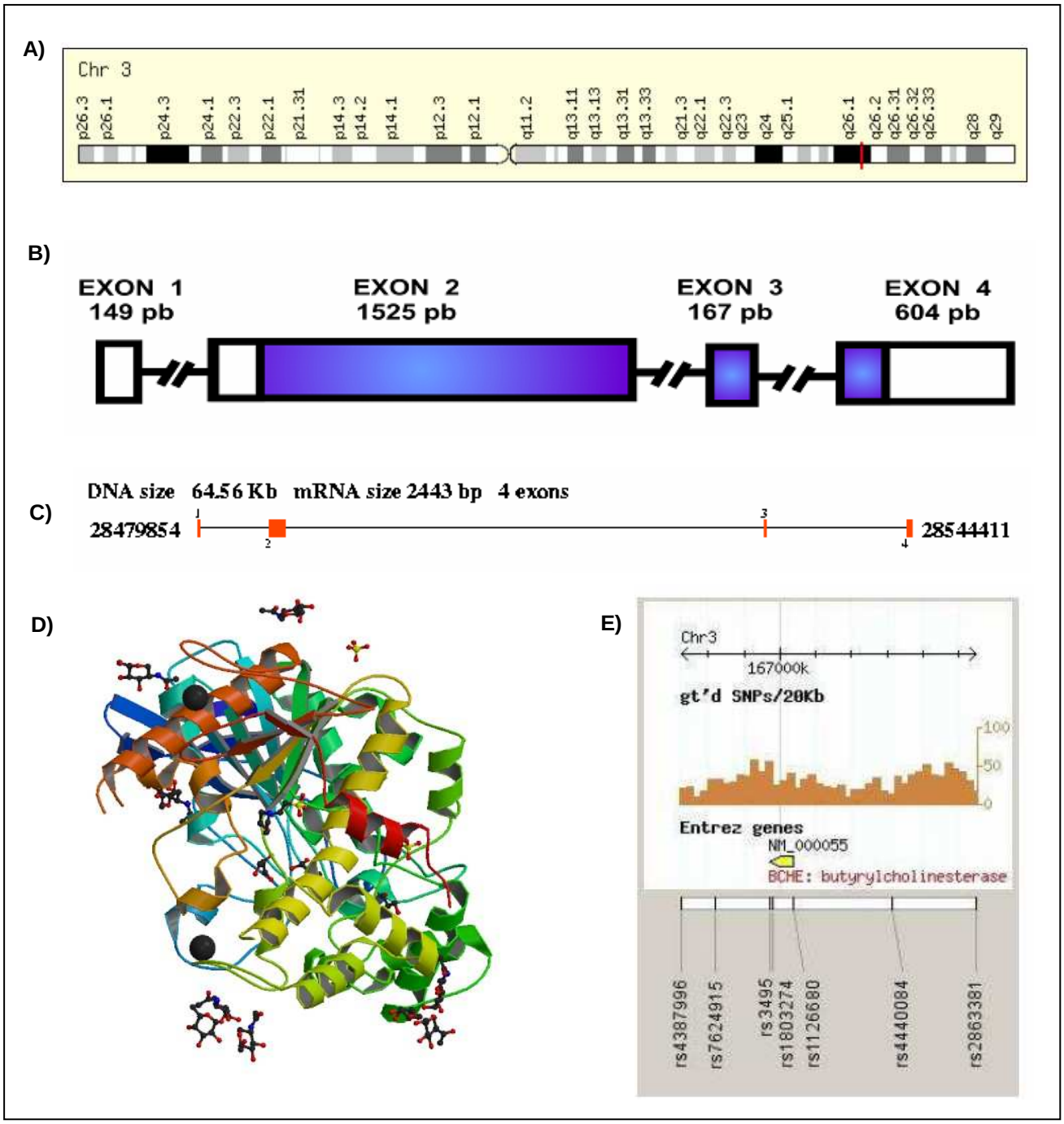
2.2 ESTRUTURA DO GENE *BCHE*

A butilcolinesterase é codificada pelo gene *BCHE*, que está no braço longo do cromossomo 3 (3q26.1-q26.2) (SOREQ *et al*., 1987; ALLDERDICE *et al*., 1991; GAUGHAN *et al*., 1991), apresentando 64.559 pb desde o início do exon 1 até o sítio CA de poliadenilação.

Um estudo importante foi de ARPAGAUS *et al.* (1990) em que foram indicadas evidências da existência de um único gene que codifica a BChE e determinada a estrutura do gene, que possui 4 exons. O exon 1 apresenta 149 pb, apresentando as sequências não traduzidas. O exon 2 apresenta 1.525 pb contendo 83% da sequência codificadora da proteína madura. O exon 3 apresenta 167 pb e o exon 4 apresenta 604 pb e codifica para a extremidade C-terminal da proteína e contém a região 3’ não traduzida que possui dois sinais de poliadenilação.

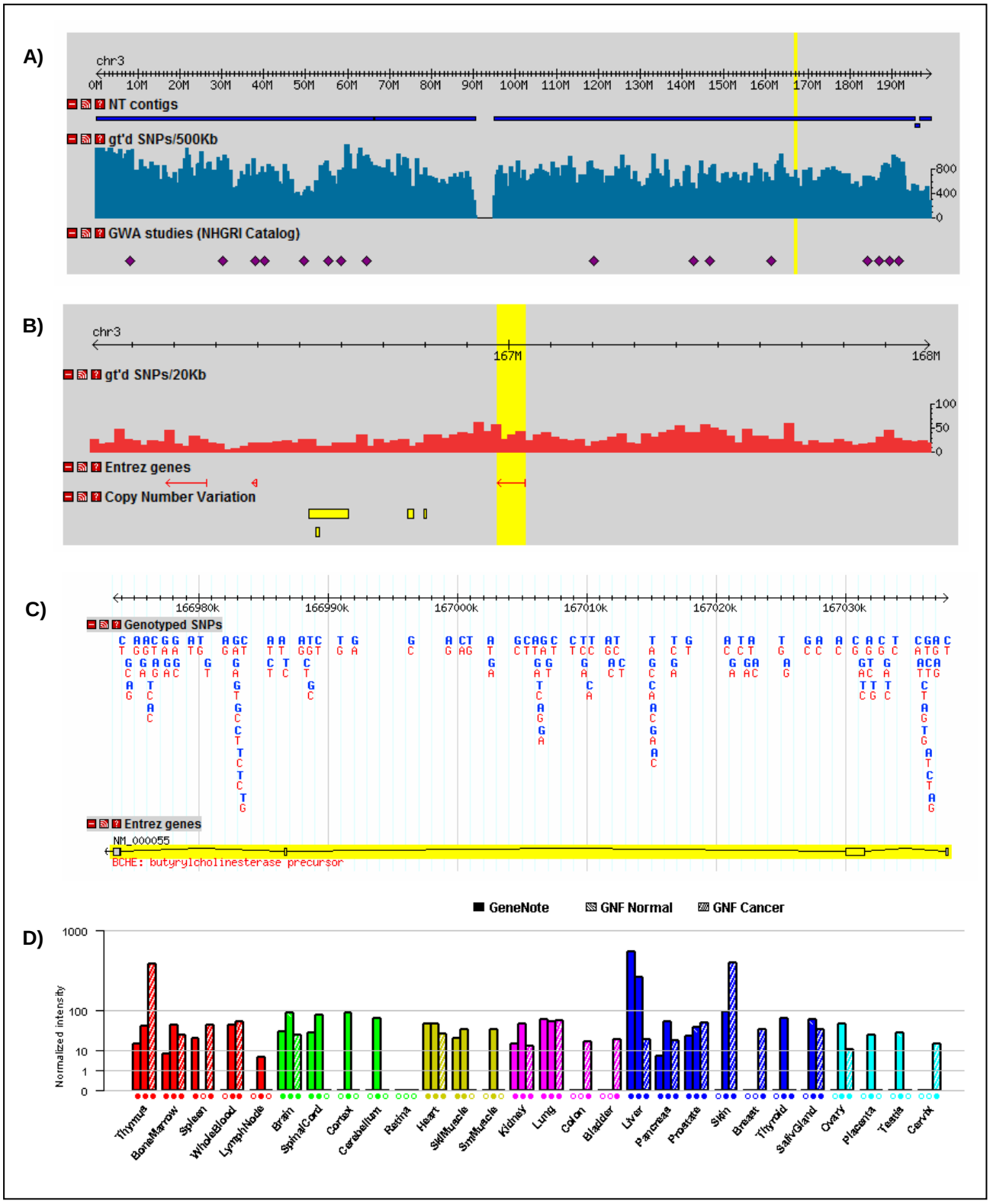
Um esquema da localização do gene *BCHE* no cromossomo 3, a delimitação dos exons, a estrutura protéica e principais SNPs podem ser observadas na FIGURA 1 e aspectos moleculares na FIGURA 2.

FIGURA 1 – Esquema da Butirilcolinesterase



FONTES: A) GENELOC, 2011; B) FURTADO-ALLE, 2005 com modificações. C) HAPMAP, 2011. D) Protein Data Bank (RCSD), 2011. E) HAPMAP, 2011.
NOTA: A) Localização do Gene *BCHE* no cromossomo 3. B) Estrutura do gene da *BCHE*, mostrando os quatro exons e o número total de pares de bases. Na região colorida está indicada a região codificadora para a proteína madura. C) Tamanho dos exons e íntrons do gene BCHE. D) A estrutura da proteína *BCHE*. E) Localização dos principais SNPs no Chr3: Montante: rs 2863381, rs 4440084 Gene: rs 1126680 (Mutação -116), rs 1803274 (Mutação K), rs 3495 (Mutação 1914) e Jusante: rs 7624915, rs 4387996.

FIGURA 2 - Informações moleculares do gene BCHE



FONTES: A, B, C) HAPMAP, 2011. D) GENECARDS, 2011.
NOTA: A) Visão geral do Cromossomo 3: Localização do gene no cromossomo 3q26.1-q26.2, seus contigs, SNPs e os estudos já catalogados. B) Região do gene BCHE: Orientação do gene. C) Gene da BCHE: Demonstração dos SNPs genotipados e o gene com os 4 exons (retângulos) e os 3 introns (linhas). D) Expressão do gene BCHE: Tecidos humanos normais hibridizado com 2 sondas diferentes comparados com tecidos cancerosos. Maiores valores: Fígado, pele, timo.

2.3 VARIABILIDADE DO GENE *BCHE*

Na década de 50 se iniciaram os primeiros estudos da variabilidade da butirilcolinesterase que começou a ser investigada quando se verificou que alguns indivíduos eram incapazes de hidrolisar doses fisiológicas de succinilcolina (relaxante muscular hidrolisável) devido a uma forma variante da BChE.

Inicialmente, a identificação das variantes da BCHE era feita por inibição enzimática. Pode-se citar o uso de alfa-naftilacetato ou benzoilcolina como substrato e dibucaína, fluoreto de sódio, DL-propanolol 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).

Atualmente é utilizada a análise de DNA para permitir a melhor detecção de mutações no gene *BCHE*. Os métodos mais utilizados são o PCR-RFLP (Reação em Cadeia de Polimerase - Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição), o PCR-SSCA (PCR seguida de Análise Conformacional de Fita Simples) e o sequenciamento de DNA.

Como exemplo de trabalhos que utilizaram estes métodos está o estudo de MIKAMI (2005) que realizou um rastreamento de mutações, utilizando a técnica de SSCA. No estudo de LANDO *et al*. (2003) foi utilizado PCR-RFLP para rastrear mutações conhecidas no gene *BCHE*, como as mutações D70G, A539T, T243M e G390V.

O presente estudo utilizou a técnica de PCR em tempo real para genotipagem das variantes. Este método vem sendo utilizado pelo grupo do Laboratório de Polimorfismos e Ligação e tem se mostrado como boa ferramenta nas análises das variações da *BCHE*, oferecendo resultados mais rápidos e precisos.

Atualmente, já foram identificadas mais de sessenta e cinco variantes (mutações) no gene *BCHE* por métodos de análise do DNA (SOUZA *et al*., 2005). A TABELA 1 mostra a localização das variações já identificadas para o gene *BCHE.*

A maior parte das mutações descritas no gene *BCHE* se encontra no exon 2, sendo que 92% das mutações descritas para esse gene apresentam frequência populacional menor que 1% (SOUZA *et al*., 2005). Estas são algumas variantes mais frequentes do gene *BCHE*: c.*1615G>A* (p.*A539T*); c.*–116G>A*; c.*209A>G* (p.*D70G*); c.*765G>C* (p.*E255D*); c.*551C>T* (p.*A184V*) e c.1914A>G. Outras variantes do gene *BCHE* podem apresentar atividade nula ou inferior a 10% do valor de atividade do tipo usual, então indicadas como silenciosas.

TABELA 1 – Lista de variantes descritas do gene BCHE, com a localização, alteração de nucleotídeo e o nome do alelo.

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

FONTE: SOUZA *et al*., 2005; MIKAMI, 2005.

2.3.1 SNPs abordados neste trabalho

Neste trabalho foram investigados dois SNPs dentro do gene *BCHE* (*-116A e* A539T*).* Estas variações são duas das mais frequentes na população, sendo encontradas nos sítios *-G116A (variante -116) e G1615A (*A539T; variante K) e apresentando relações com a atividade da BChE e com a obesidade.

A variante K é parte da região codificadora e foi descrita por RUBINSTEIN *et al*. (1978), sendo caracterizada por uma mutação de ponto que causa substituição da alanina (GCA) para treonina (ACA) no aminoácido 539 do peptídio maduro. Estudos populacionais, baseados em análise do DNA, indicaram que a variante K é uma das mais frequentes dentre as variantes não usuais da BChE. Originalmente foi associada a diminuição na atividade da enzima, mas estudos realizados por ALTAMIRANO *et al*. (2000) mostraram que a enzima variante K não difere da enzima usual em relação à afinidade e taxa de catálise de substratos, taxa de secreção da célula ou formação sérica de tetrâmeros. Estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa mostram que isoladamente a mutação A539T não leva à diminuição da atividade enzimática, só ocorrendo na presença da mutação *-116A* (FURTADO-ALLE *et al*., 2008).

A variante -116 localiza-se na região não codificadora (fora da região codificadora da enzima madura), encontra-se no exon 1 e leva à alteração de G para A, com frequência observada do alelo -116A de 8% (BARTELS *et al.*, 1990). Esta mutação *–116A* apresenta associação com uma diminuição na atividade da BChE em obesos e não obesos (FURTADO-ALLE *et al*., 2008).

Estes dois polimorfismos do gene *BCHE*, um na posição nt -116 (G/A) no exon 1 e outro na posição 1615 (G/A) do exon 4, estão em desequilíbrio de ligação aparecendo preferencialmente na conformação cis (BARTELS *et al.*, 1990).

2.4 LOCO *CHE2*

A BChE pode apresentar variação genética, devido ao loco *CHE2* que, junto com o gene *BCHE*, é responsável pela formação do complexo C5.

O complexo C5 é caracterizado pela BChE ligada a um composto ainda não identificado que origina uma banda extra detectada em eletroforese (HARRIS et al.,1962). Nesse trabalho HARRIS *et al*. verificaram, usando eletroforese bidimensional em papel e gel de amido, que a banda apareceu em apenas 4,6% da amostra e determinaram que o loco responsável é chamado de *CHE2* (2q33-35). Os fenótipos que podem apresentar-se são CHE2 C5+ e CHE2 C5-, responsáveis pela presença e ausência do complexo C5, respectivamente.

MASSON (1991), por meio de análises de eletroforeses em gel de poliacrilamida, sugere que o peso molecular de C5 é de 400 kDa.

CHAUTARD-FREIRE MAIA *et al*. (1991) encontraram o fenótipo CHE2 C5+ com frequência de 10,3% em amostra da população de Curitiba.

2.5 OBESIDADE

A obesidade é uma doença caracterizada como multifatorial, incluindo diversos fatores como genéticos, psicológicos, metabólicos e ambientais (ROMERO E ZANESCO, 2006), ou seja, tanto fatores endógenos quanto do meio externo. Dentre os fatores ambientais podemos citar a alimentação inadequada e falta de atividade física para os gastos energéticos e para a manutenção do peso.

Como fatores relacionados ao metabolismo NAVAES & PASCHOAL (2007) em seu estudo sobre regulação funcional da obesidade levantaram criteriosamente estes fatores e os dividiram em alterações hormonais e hipotalâmicas. Dentre as alterações hormonais indicam a insulina, cortisol, leptina, e a adiponectina. Já entre os fatores hipotalâmicos indicam o NPY (neuropeptídeo orexigênico), a grelina e a serotonina. Esses autores sugerem que o entendimento da interação desses fatores é fundamental para o sucesso no tratamento da obesidade e no caso de resistência a redução de peso pode-se ter a possibilidade de investigar o caminho do desequilíbrio funcional entre órgãos e tecidos.

A caracterização da obesidade é feita pelo excesso de gordura corporal de um indivíduo. O excesso está relacionado à ingestão calórica maior que o gasto calórico, o que resulta em fatores de risco para a saúde, podendo predispor para doenças graves, como *diabetes melitus* do tipo 2, hipertensão arterial, hipotireoidismo, doenças cardiovasculares e até mesmo depressão e doenças psicológicas (TERRES *et al*., 2006).

Este acúmulo de gordura corporal pode estar associado a hábitos alimentares inadequados, sedentarismo, distúrbios hormonais ou ainda à predisposição genética. Este fator genético precisa ser observado, pois é um fator de risco importante para a obesidade relacionado ao grau de eficiência de dietas e sucesso na redução de peso pela prática de atividade física regular.

Os fatores genéticos que predispõem à obesidade interagem com o ambiente e podem provocar diversos graus de obesidade. Os estudos de associação genética com a obesidade são importantes para compreender os fatores implicados em sua etiologia e fornecer informações que auxiliem nos tratamentos e na prevenção da obesidade. Alguns estudos já identificaram locos relacionados à obesidade em todos os autossomos e no cromossomo X (RANKINEN *et al*,. 2005).

Algumas estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS) indicaram que em 2005 o mundo teria 1,6 bilhões de pessoas acima de 15 anos de idade com excesso de peso (IMCI ≥ 25kg/m2) e 400 milhões de obesos (IMC ≥ 30 kg/m^2). A projeção para 2015 seria ainda mais grave: 2,3 bilhões de pessoas com excesso de peso e 700 milhões de obesos. Isto indica um aumento de 75% nos casos de obesidade em 10 anos. Outra

informação importante é observada no ranking dos países obesos da OMS onde o Brasil ocupa a 77ª posição e a Argentina o país mais obeso na América do Sul (WHO, 2011).

O Ministério da Saúde e o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em 2010 divulgaram dois grandes levantamentos dos números do excesso de peso e obesidade no Brasil: o VIGITEL Brasil: Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquéritos Telefônicos (2009) e a Pesquisa de Orçamentos Familiares, POF (2008-2009).

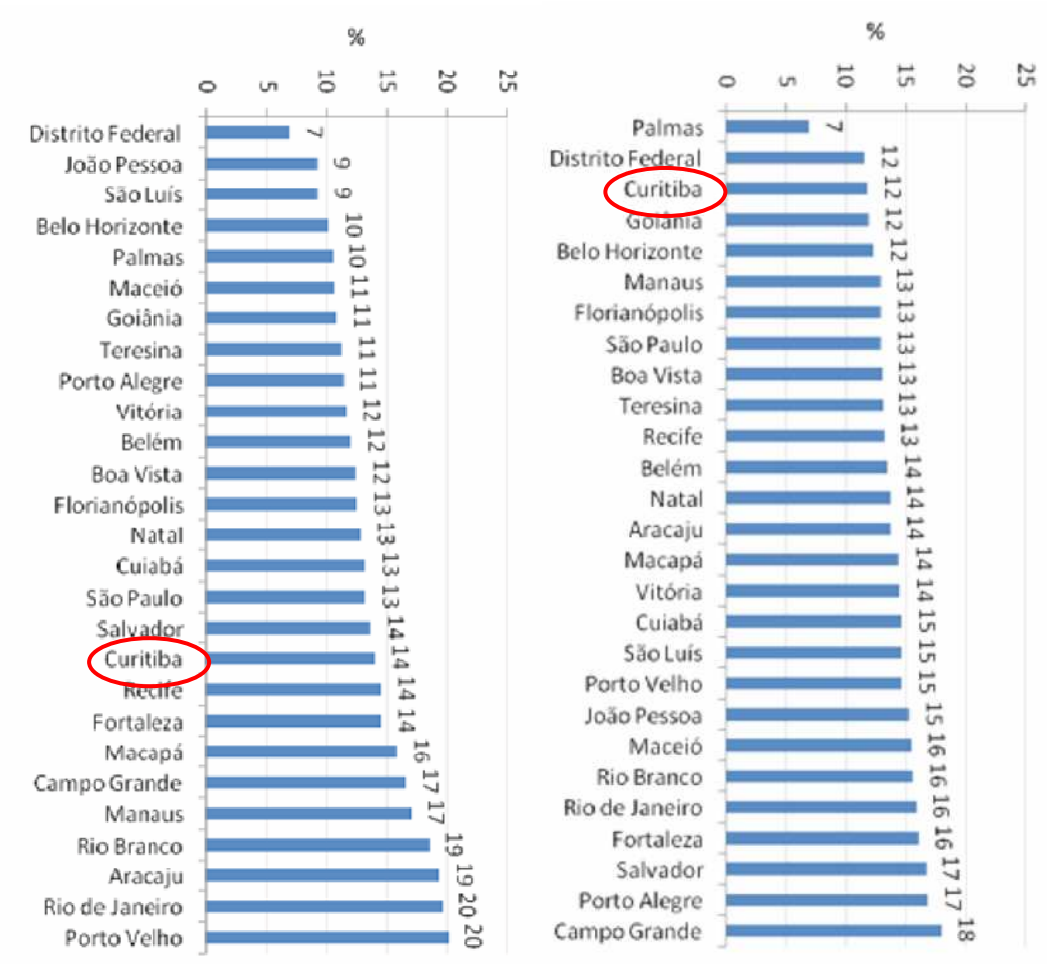
O estudo divulgado pela VIGITEL (2009) a respeito da Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas demonstra que a obesidade vem aumentando nos últimos anos nos brasileiros de acordo com a idade. Foi encontrada uma frequência de excesso de peso de 46,6%, sendo maior entre homens (51,0%) do que entre mulheres (42,3%).

Em 2006, na primeira versão da pesquisa VIGITEL, 11,4% dos brasileiros eram obesos, em 2007 este valor subiu para 12,9% em 2008 foi 13% e atualmente é aproximadamente 14% dos adultos são obesos. O GRÁFICO 1 demonstra que entre as 27 capitais estudadas, Curitiba (PR) está no 3º lugar da prevalência da obesidade em mulheres adultas e em 18º lugar para homens adultos.

As pesquisas dos POFs são realizadas pelo IBGE em parceria com o Ministério da Saúde, as quais realizam uma avaliação antropométrica e do estado nutricional da população brasileira como um dos itens. A obtenção dos dados é feita por amostragem a partir de visitas domiciliares e são incluídos indivíduos de todas as idades em todos os estados brasileiros, moradores das zonas rural e urbana. Na POF 2008-2009 foram analisados os dados de mais de 188 mil pessoas em 55.970 domicílios. As medidas antropométricas foram tomadas de cada um dos moradores encontrados durante o período da entrevista, perfazendo cerca de 337.000 medições em 188.461 pessoas. Os resultados obtidos na POF 2008-2009 foram comparados com as pesquisas de 1974-75 (Estudo Nacional da Despesa Familiar – ENDEF), 1989 (Pesquisa Nacional sobre Saúde e Nutrição – PNSN) e a POF 2002-2003.

Estas comparações demonstram a crescente estimativa de obesos jovens e adultos que ocorre principalmente na região urbana onde em cerca de 35 anos o excesso de peso em homens adultos saltou de 18,5% para 50,1% e ultrapassou, em 2008-2009, o das mulheres, que foi de 28,7% para 48%. Já o aumento de peso em adolescentes de 10 a 19 anos foi contínuo nestes últimos anos.

GRÁFICO 1 - Percentual de homens e mulheres (≥ 18 anos) com obesidade (IMC ≥ 30 kg/m2) segundo as capitais dos estados brasileiros e Distrito Federal.



FONTE: VIGITEL, 2009 (com modificações).

NOTA: O gráfico da esquerda representa os homens e o da direita as mulheres. O círculo vermelho demonstra a posição da cidade de Curitiba - PR.

2.5.1 Obesidade juvenil

Uma nutrição equilibrada e uma vida com hábitos saudáveis durante a infância e adolescência são fundamentais para a saúde do organismo. Algumas medidas como dietas e exercícios físicos são essenciais neste período da vida, uma vez que é durante esta etapa inicial do desenvolvimento corporal que o metabolismo se forma e adquire a vitalidade necessária para a vida inteira, podendo reduzir significativamente a predisposição da manifestação da obesidade juvenil que continue na fase adulta.

As necessidades calóricas dos adolescentes dependem da sua taxa de crescimento, composição corporal, nível de atividades hormonais e graus de maturação física. Assim são necessários nutrientes extras para suportar esta grande exigência e modificações do corpo até a sua completa formação.

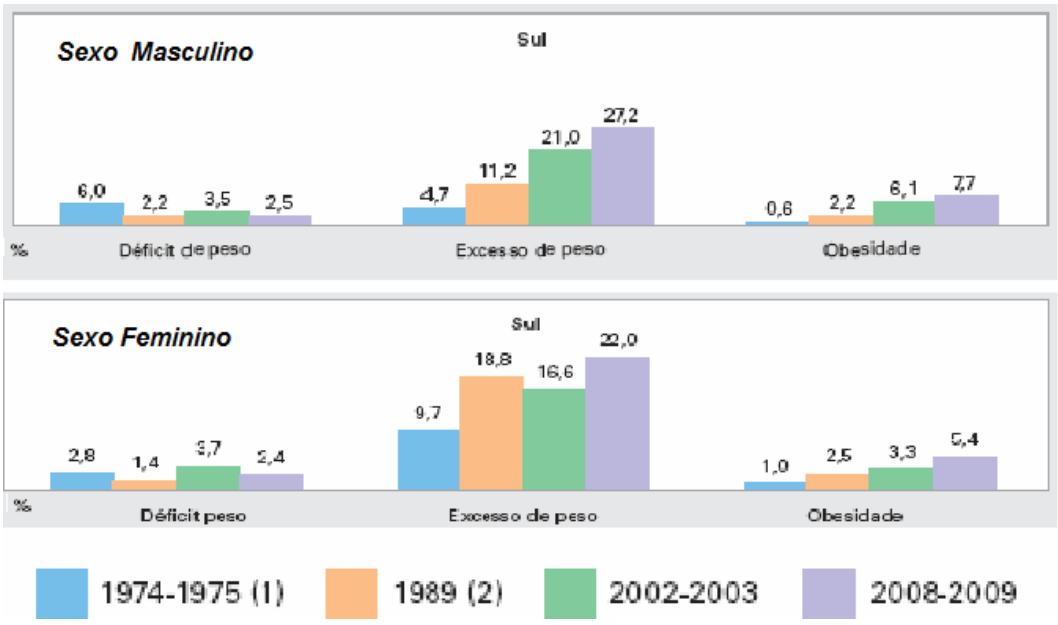
Nos últimos 30 anos, o número de obesos e com sobrepeso em crianças tem quadriplicado e em adolescentes triplicado. Nesta faixa etária a redução do peso ocorre com maior eficiência, pois ainda estão no período de crescimento e desenvolvimento (IFIC, 2009).

A pesquisa POF (2002-2003) revelou que cerca de 17% dos adolescentes brasileiros têm excesso de peso, sendo que meninos possuem uma maior frequência (17,9%) e meninas uma frequência menor (15,4%). Destes adolescentes cerca de 2% são obesos, sendo de 1,8% em meninos e 2,9% em meninas. Estes índices indicam um obeso para cada dez meninos com excesso de peso e uma obesa para cada cinco meninas com excesso de peso.

Já na ultima pesquisa do POF realizada em 2008/2009 revela que o excesso de peso aumentou para 21,5% dos adolescentes, onde a parcela dos meninos de 10 a 19 anos de idade com excesso de peso passou para 21,7%, já entre as meninas o crescimento do excesso de peso foi 19,4%.

Neste mesmo estudo POF, a análise das regiões brasileiras demonstrou que o excesso de peso oscilou entre 16% e 18% no Norte e no Nordeste e entre 20% e 27% no Sudeste, Sul e Centro Oeste em ambos os sexos. Portanto, apesar de ocorrer em todas as regiões brasileiras, a Região Sul tem o maior crescimento na freqüência de excesso de peso, tendo sido encontradas variações de 4,7% para 27,2% no sexo masculino e 9,7% para 22,0% no sexo feminino, conforme os valores presentes do GRAFICO 2.

GRAFICO 2 - Evolução temporal para adolescentes entre na Região Sul

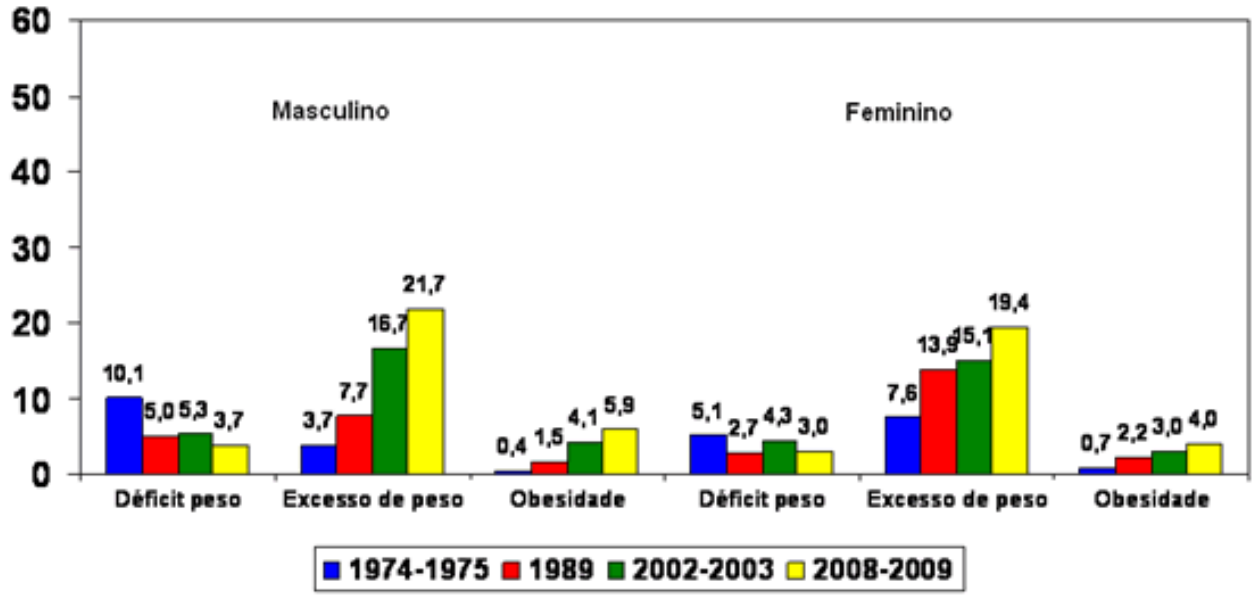


FONTE: POF 2008-2009, com modificações.
NOTA: Valores referentes às estimativas de déficit de peso, excesso de peso e obesidade no sexo masculino e sexo feminino em adolescentes de 10 a 19 anos na Região Sul entre os anos de 1974 e 2009.

Foi verificado também que o excesso de peso foi maior na área urbana do que na rural: 37,5% e 23,9% para meninos e 33,9% e 24,6% para meninas, respectivamente.

Análises da estimativa de prevalência para excesso de peso e obesidade entre os anos de 1974 e 2009, podem ser observadas no GRÁFICO 3 que separa os dados em quatro épocas diferentes (1974-1975, 1989 e 2002-2003, 2008-2009).

GRÁFICO 3 - Estimativas de adolescentes com excesso de peso e obesidade no Brasil, entre os anos de 1974 a 2009.



FONTE: POF, Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009.
NOTA: Indicadores antropométricos para adolescentes entre 10 e 19 anos de idade, por sexo nos períodos 1974-1975, 1989, 2002-2003 e 2008-2009.

Este gráfico indica que a frequência de excesso de peso em meninos cresceu de 3,7% no período de 1974-1975 para 16,7% no período de 2002-2003 e no período de 2008-2009 foi para 21,7%. Já nas meninas no período de 1974-1975 o excesso de peso era de 7,5%, em 1989 cerca de 13,8%, 2002-2003 para 15,4% e em 2008 2009 atingiu 19,4% na mesma faixa etária, indicando um grande crescimento .

Foi verificado que o maior rendimento familiar está diretamente relacionado ao excesso de peso: ocorrendo três vezes mais entre os rapazes de maior renda do que nos de menor renda (34,5% contra 11,5%); no sexo feminino, a diferença foi de 24% para 14,2%, indicando que a obesidade é maior entre adolescentes com mais renda (POF, 2008-2009).

Portanto, a frequência de obesidade em meninos e meninas reproduz a evolução do excesso de peso, reduzindo o aumento da obesidade nos dois últimos períodos mais recentes.

2.5.2 Obesidade e IMC (Índice de massa corporal)

A análise de sobrepeso e obesidade pode ser definida a partir do índice de massa corporal (IMC), que é calculado a partir do peso (Kg) e estatura (m) do indivíduo (IMC= peso/ (estatura)^2) sendo um indicador confiável de gordura corporal.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO - *Word Health Organization*) a classificação do IMC para os adultos segue padrões demonstrados na TABELA 2.

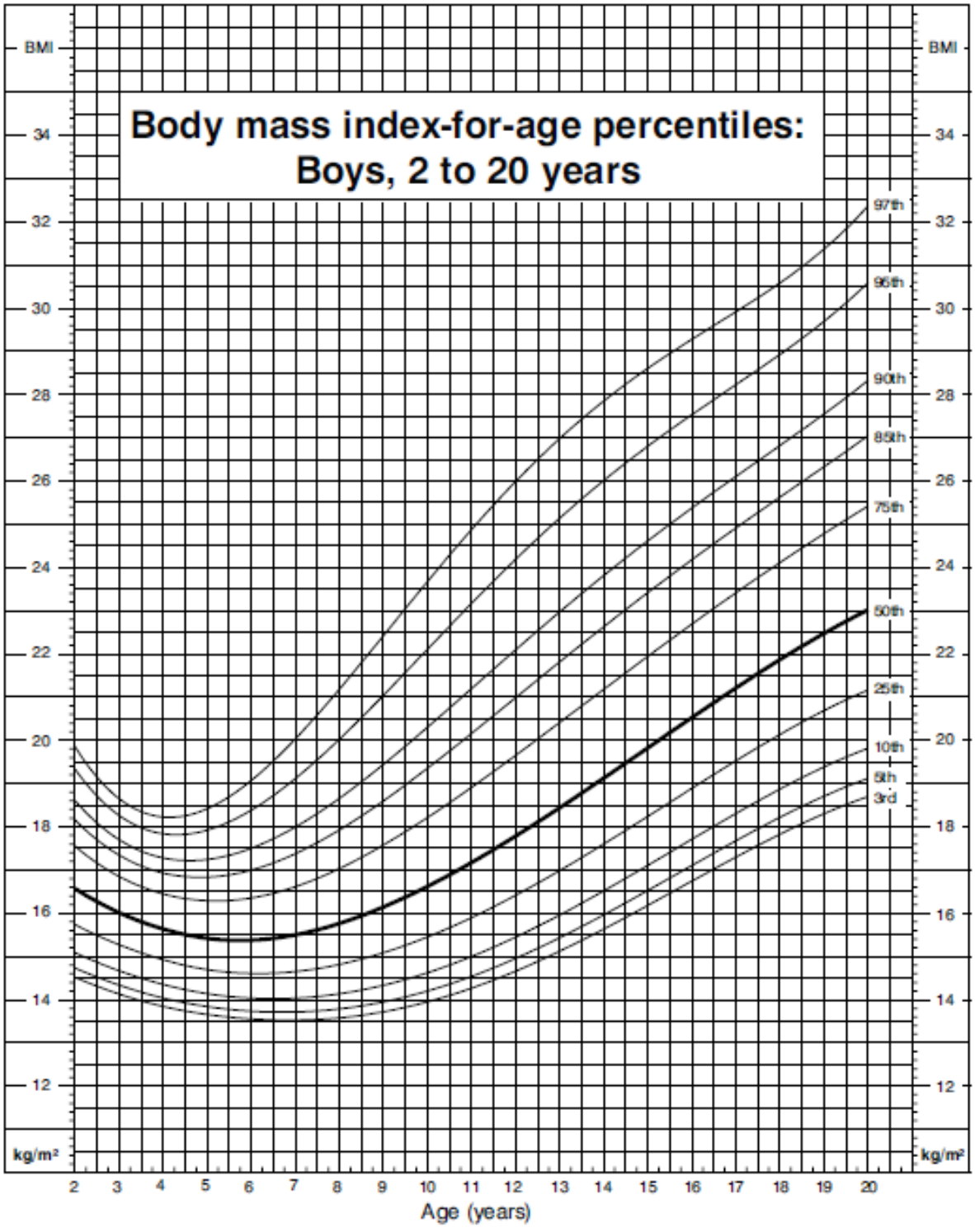
TABELA 2 – Classificação IMC para adultos , segundo a OMS

IMC	Classificação
< 18,5	Magreza
18,5 – 24,9	Saudável
25,0 – 29,9	Sobrepeso
30,0 – 34,9	Obesidade Grau I
35,0 – 39,9	Obesidade Grau II
≥ 40,0	Obesidade Grau III

O IMC é um método barato e fácil de fazer para enquadramento nas categorias de peso corporal, mas é inadequado para crianças e adolescentes, neste caso os valores sofrem ajustes relativos à idade e sexo, uma vez que estão em períodos metabólicos diferenciados. Após o calculo do IMC o valor se enquadra em curvas padrões que envolvem uma classificação percentil, que indicam a posição relativa da classificação da criança ou adolescente em relação a outras crianças e adolescentes do mesmo sexo e idade. Com isto realiza-se o diagnóstico de sobrepeso e obesidade envolvendo os percentis acima de 85 e 95, respectivamente (ABESO, 2011).

O Centro de Controle de Doenças e Prevenção Americano (CDC, CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION) propõe gráficos atualizados de crescimento para crianças e adolescentes em duas faixas etárias: do nascimento aos 36 meses e dos 2 anos aos 20 anos. Estes gráficos indicam o percentil do índice de massa corporal de meninos e meninas nestas faixas etárias (KUCZMARCZIK *et al*., 2000). Os gráficos 4 e 5 mostram respectivamente os percentis de IMC para meninos e meninas de 2 a 20 anos de idade.

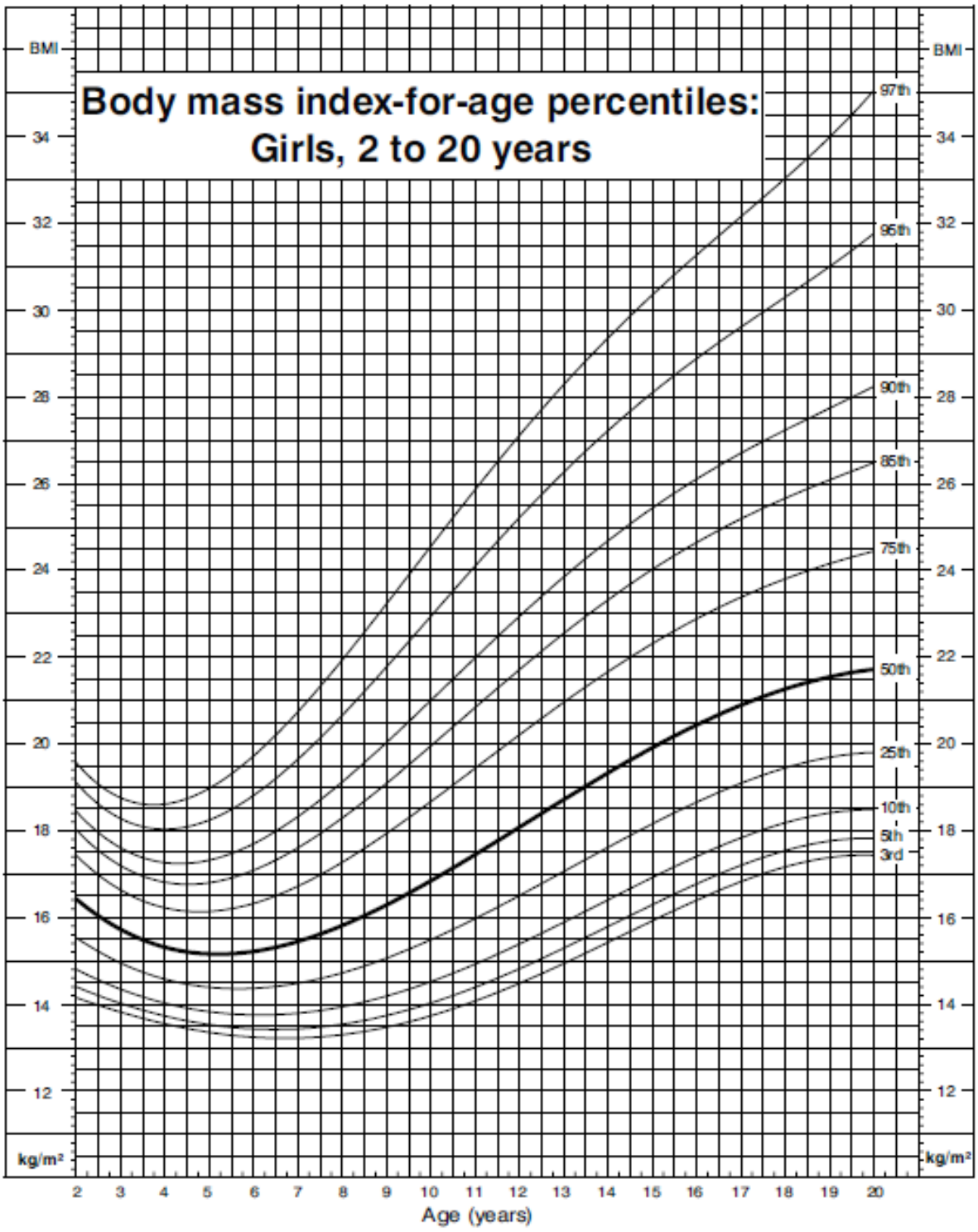
GRÁFICO 4 - Percentil de Massa Corporal para meninos de 2 a 20 anos de idade



FONTE: (KUCZMARCZIK *et al*., 2000)

NOTA: As curvas do gráfico mostram os percentis de IMC (Kg/m^2) por idade em meninos de 2 a 20 anos de idade.

GRÁFICO 5 - Percentil de Massa Corporal para meninas de 2 a 20 anos de idade



FONTE: (KUCZMARCZIK *et al*., 2000).

NOTA: As curvas do gráfico mostram os percentis de IMC (Kg/m^2) por idade em meninas de 2 a 20 anos de idade. Detecta-se uma diferença das curvas do gráfico anterior, dos meninos.

Outro estudo que utilizou os percentis de adolescentes foi o trabalho de DOS ANJOS, VEIGA e CASTRO (1998). Nesse trabalho, os autores utilizaram tabelas

percentis (TABELAS 3 e 4) indicadas pela PNSN (Pesquisa Nacional sobre Saúde e Nutrição) do ano de 1989 para fazer um levantamento nacional da população brasileira e descrever o estado de saúde e nutrição da população. Estes percentis foram calculados através de programas estatísticos, diferenciando o sexo e a faixa etária, que neste estudo foi de jovens até 25 anos.

TABELA 3 - Distribuição dos valores do índice de massa corporal (kg/m^2) da população masculina brasileira em função da faixa etária.

Faixa etária (anos)	No.	Percentis								
		3	5	15	25	50	75	85	95	97
0 – 0,9	685	12,6	13,0	14,8	15,7	17,4	18,7	19,4	20,9	21,8
1 – 1,9	768	14,2	14,6	15,6	16,2	17,1	18,2	18,9	20,0	20,4
2 – 2,9	701	14,5	14,7	15,5	15,8	16,7	17,7	18,2	19,3	19,9
3 – 3,9	776	13,6	14,2	15,0	15,4	16,2	17,1	17,6	18,6	19,2
4 – 4,9	754	13,5	13,9	14,6	15,1	15,8	16,7	17,2	18,4	18,7
5 – 5,9	767	13,3	13,6	14,3	14,8	15,5	16,4	16,9	18,5	20,0
6 – 6,9	835	13,3	13,6	14,3	14,7	15,4	16,3	16,9	18,0	18,8
7 – 7,9	879	13,4	13,5	14,2	14,6	15,5	16,3	16,9	18,6	20,0
8 – 8,9	803	13,4	13,7	14,3	14,8	15,6	16,6	17,2	18,5	20,0
9 – 9,9	767	13,4	13,7	14,5	15,0	15,9	16,9	17,5	19,6	21,2
10 – 10,9	780	13,7	14,1	14,8	15,2	16,1	17,1	18,0	20,0	21,2
11 – 11,9	782	13,9	14,3	15,1	15,6	16,5	17,6	18,7	21,3	22,4
12 – 12,9	721	14,1	14,5	15,4	15,9	16,9	18,2	19,1	22,0	23,1
13 – 13,9	732	14,8	15,1	16,0	16,5	17,7	19,2	20,1	21,9	23,4
14 – 14,9	742	15,1	15,4	16,4	17,1	18,3	19,8	20,8	22,4	23,4
15 – 15,9	616	15,5	15,7	17,2	17,8	19,1	20,7	21,7	23,8	24,7
16 – 16,9	689	16,2	16,6	18,0	18,6	19,8	21,5	22,5	24,1	24,8
17 – 17,9	596	16,8	17,2	18,4	19,1	20,4	21,8	22,6	24,3	25,0
18 – 18,9	624	17,3	17,8	19,1	19,6	21,0	22,4	23,3	25,1	25,7
19 – 19,9	542	17,9	18,1	19,2	19,8	21,2	22,9	23,8	25,7	27,4
20 – 20,9	478	17,9	18,4	19,6	20,3	21,7	23,1	24,1	25,8	26,7
21 – 21,9	578	18,1	18,5	19,7	20,5	21,8	23,2	24,0	26,5	27,6
22 – 22,9	541	18,0	18,4	19,7	20,5	21,9	23,6	24,9	26,9	27,8
23 – 23,9	477	18,4	18,8	19,8	20,6	22,0	23,7	24,6	26,9	27,8
24 – 24,9	502	18,1	18,6	19,9	20,6	22,4	24,2	25,4	28,5	30,1
Total	17 135									

TABELA 4 - Distribuição dos valores do índice de massa corporal (kg/m^2) da população feminina brasileira em função da faixa etária.

Faixa etária (anos)	No.	Percentis								
		3	5	15	25	50	75	85	95	97
0 – 0,9	672	12,0	12,8	14,5	15,2	16,7	18,1	18,8	20,2	20,8
1 – 1,9	760	13,4	14,0	15,1	15,8	16,7	17,9	18,4	19,7	20,4
2 – 2,9	672	13,7	14,3	15,0	15,5	16,4	17,4	18,0	19,2	19,7
3 – 3,9	766	13,6	13,8	14,7	15,2	15,9	16,9	17,5	19,1	19,5
4 – 4,9	708	13,2	13,5	14,3	14,7	15,5	16,4	16,9	18,0	18,7
5 – 5,9	737	13,1	13,2	14,0	14,5	15,3	16,3	17,0	18,3	19,0
6 – 6,9	764	13,0	13,3	14,0	14,4	15,1	16,1	16,7	18,2	19,2
7 – 7,9	819	13,1	13,3	14,0	14,4	15,3	16,4	16,9	18,3	19,5
8 – 8,9	718	13,2	13,5	14,2	14,7	15,6	16,7	17,4	19,6	20,2
9 – 9,9	802	13,2	13,5	14,4	14,8	15,8	17,0	17,8	19,6	20,8
10 – 10,9	776	13,5	13,8	14,6	15,1	16,3	17,6	18,6	21,0	22,3
11 – 11,9	768	13,6	14,1	15,1	15,6	16,8	18,6	19,8	22,8	23,8
12 – 12,9	757	14,4	14,7	15,7	16,4	17,9	19,6	20,9	23,4	24,6
13 – 13,9	713	15,2	15,4	16,7	17,4	19,0	21,1	22,2	24,3	25,6
14 – 14,9	699	15,6	16,1	17,3	18,3	20,0	21,9	23,3	26,0	27,2
15 – 15,9	615	16,7	17,1	18,3	19,0	20,6	22,5	23,6	26,0	27,6
16 – 16,9	652	16,9	17,4	18,7	19,4	21,1	23,1	24,3	26,6	27,6
17 – 17,9	589	17,0	17,6	18,7	19,7	21,4	23,5	24,6	27,7	28,8
18 – 18,9	577	17,2	17,6	18,9	19,6	21,5	23,5	24,6	28,2	29,0
19 – 19,9	536	17,3	17,8	19,1	19,9	21,7	23,9	25,2	27,8	29,0
20 – 10,9	547	16,8	17,6	18,9	19,6	21,6	23,4	24,6	27,3	29,3
21 – 21,9	538	17,6	18,0	19,0	19,6	21,5	23,7	25,4	29,1	30,7
22 – 22,9	499	17,4	18,0	19,0	19,8	21,6	23,9	25,6	29,2	31,0
23 – 23,9	480	17,4	17,8	19,0	20,0	21,8	24,0	25,4	28,0	29,7
24 – 24,9	477	17,3	17,7	19,1	20,0	21,8	24,0	25,4	29,1	30,6
Total	16 641									

Os autores verificaram que os valores de IMC aumentam ao longo da adolescência, indicando esta fase como um marcador de amadurecimento orgânico e que no sexo feminino este valor foi maior, principalmente devido a diferenças hormonais e corporais.

2.6 RELAÇÃO OBESIDADE E BChE

Vários estudos mostram que a atividade média da BChE é maior nos obesos ao ser comparada com a de não-obesos. BERRY e*t al.*, (1954) encontraram uma correlação positiva entre a atividade da BChE e o teor de gordura subcutânea. CUCUIANU *et al.* (1968) encontram também um aumento da atividade da BChE em obesos e em hiperlipêmicos com peso normal. STUEBER-ODEBRECHT *et al*. (1985) e CHAUTARD-FREIRE-MAIA (1989) mostraram associação positiva entre atividade da BChE e peso corporal.

O aumento na atividade da BChE pode ser consequência de distúrbios associados com o metabolismo anormal de lípides, caracterizados pelo aumento de triglicérides e/ou colesterol, excesso de ácidos graxos derivado do metabolismo de carboidratos, obesidade e diabetes (KUTTY, 1980; KÁLMÁN *et al*., 2004).

Segundo HARRIS (1980) o alelo CHE2 C5+ apresenta em torno de 30% a mais de atividade média da BChE que o fenótipo CHE2 C5-. CHAUTARD-FREIRE-MAIA *et al.* (1990 e 1991) encontraram correlação positiva da atividade da BChE com peso corporal em indivíduos CHE2 C5- e, posteriormente, em indivíduos CHE2 C5+ de banda fraca, sendo que o mesmo não ocorre em CHE2 C5+ de banda forte.

ALCÂNTARA *et al*. (2003) investigaram a associação da BChE e IMC em indivíduos obesos e não-obesos. Nos indivíduos de fenótipo CHE2 C5-, verificaram que a atividade média da BChE é significativamente maior em obesos, quando comparados com seus controles de peso normal. Neste mesmo trabalho, os autores sugerem que o alelo CHE2 C5+ poderia predispor a uma maior facilidade para reduzir peso corporal, isso porque observaram uma frequência significativamente maior de pacientes que diminuíram peso no grupo de fenótipo CHE2 C5+ do que no grupo de fenótipo CHE2 C5-.

O fenótipo CHE2 C5+ é associado com peso e IMC mais baixos do que o fenótipo CHE2 C5- (CHAUTARD-FREIRE-MAIA *et al.*, 1991; ALCÂNTARA *et al.*, 2001).

Um estudo recente demonstrou que o alelo CHE2 C5+ está associado a um aumento da atividade da BChE tanto em obesos como em controles, possuindo frequência menor em obesos do que em controles (FURTADO-ALLE *et al*., 2008). Indicando, portanto, que o fenótipo CHE C5+ tem efeito protetor em relação à predisposição à obesidade em homens adultos, reforçando a hipótese de um papel da BChE em processos metabólicos relacionados à obesidade.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Investigar associação entre obesidade juvenil, SNPs do gene *BCHE*, atividade da BChE e fenótipos do loco *CHE2.*

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Analisar os SNPs -*G116A e A539T*(K), do gene *BCHE* em grupo de adolescentes obesos submetidos a um tratamento físico multidisciplinar e em grupo controle de adolescentes não obesos.
2) Quantificar a atividade da BChE no grupo controle e no grupo de adolescentes obesos submetidos ao programa de exercícios antes do início e ao término das 12 semanas do programa.
3) Realizar a fenotipagem do loco *CHE2* nos dois grupos de adolescentes.
4) Comparar os dados obtidos com dados de adultos obesos e da população em geral.
5) Verificar associação, em uma análise conjunta, entre os dados estudados (variantes do gene *BCHE*, atividade da BChE, fenotipagem do loco *CHE2*) e obesidade juvenil.
6) Verificar associação, em uma análise conjunta, dos dados estudados (variantes do gene *BCHE*, atividade da BChE, fenotipagem do loco *CHE2*) com a perda de peso e taxa metabólica basal nos adolescentes submetidos ao programa de exercícios e dieta.

4. ARTIGO 1

Atividade da Butirilcolinesterase (*BChE*) em adolescentes obesos submetidos a tratamento físico multidisciplinar

RESUMO

A obesidade é uma doença que afeta milhões de pessoas no mundo e vem crescendo exponencialmente em todas as faixas etárias da população, sendo considerada um problema de saúde pública pela Organização Mundial de Saúde (OMS). A butirilcolinesterase (BChE; EC 3.1.1.8), codificada pelo gene *BCHE* (3q26.1-q26.2) é uma esterase sérica de ampla distribuição no organismo e que já foi relacionada a variáveis clínicas e antropométricas associadas à obesidade. A prática de exercícios físicos comprovadamente pode alterar tais parâmetros. O presente estudo foi realizado em duas etapas: Na etapa I foi analisada uma comparação entre um grupo de adolescentes obesos e um grupo de adolescentes não obesos da cidade de Curitiba-PR com idade de 10 a 16 anos. Na etapa II avaliou-se 25 adolescentes obesos submetidos a um programa multidisciplinar de atividade física e orientação nutricional antes e após 12 semanas de intervenção. Foram analisadas a atividade da butirilcolinesterase em obesos juvenis (N=118) e controles não obesos (n=150), variáveis antropométricas e bioquímicas já associadas à obesidade, e a fenotipagem do loco *CHE2*. A atividade média da butirilcolinesterase nos adolescentes obesos é significativamente mais alta que no grupo controle e que na população de Curitiba. A frequência do fenótipo CHE2 C5+ é semelhante em obesos e controles, bem como em relação à população de Curitiba. Não existe diferença significativa na atividade da butirilcolinesterase em obesos com fenótipo CHE2 C5+ e CHE2 C5-. Os valores de LDL (r2=0,11) e de IMC (r2=0,07) estão positivamente correlacionados com a atividade enzimática nos adolescentes obesos. A avaliação dos adolescentes após o término do programa multidisciplinar mostrou que a atividade da butirilcolineterase foi significativamente reduzida, tornando-se semelhante àquelas verificadas no grupo controle e na população de Curitiba. Também foram significativamente reduzidos IMC, triglicerídeos e circunferência abdominal. Embora não seja um fator de risco para a obesidade, pois existem outros fatores metabólicos envolvidos na sua regulação, a atividade da butirilcolinesterase está relacionada à obesidade juvenil e, assim como outras variáveis associadas, responde à prática de exercícios físicos e pode ser utilizada como um marcador secundário para os riscos associados à obesidade juvenil.

Palavras - Chave: Obesidade, Adolescência, BChE, IMC, atividade enzimática, loco *CHE2*.

ABSTRACT

Obesity is a disease that affects millions of people worldwide and is growing exponentially across all age populations and it is considered a public health problem by the World Health Organization (WHO). The butyrylcholinesterase (BChE, EC 3.1.1.8), encoded by the BCHE gene (3q26.1-q26.2) is a serum esterase widely distributed in the body which have been associated with anthropometric and clinical variables related to obesity.The practice of physical exercises shown can change these parameters.This study was conducted in two stages: In stage I was considered a comparison between a group of obese and a nonobese group of teenagers from the city of Curitiba-PR aged 10 to 16 years. In a second step we evaluated 25 obese adolescents underwent a multidisciplinary program of physical activity and nutritional counseling before and after 12 weeks of intervention. We analyzed the activity of butyrylcholinesterase in obese juveniles (N = 118) and non-obese controls (n = 158), anthropometric and biochemical variables already associated with obesity, and phenotyping of CHE2 locus. The mean activity of butyrylcholinesterase in obese adolescents is significantly higher than the control group and that the population of Curitiba. The frequency of phenotype CHE2 C5+ is similar in obese and controls as well as for the population of Curitiba. There is no significant difference in the activity of butyrylcholinesterase in obese phenotype CHE2 C5+ e CHE2 C5-. The values of LDL and BMI are positively correlated with enzyme activity in obese adolescents. The assessment of adolescents after the multidisciplinary program showed that the activity of butirilcolineterase was significantly reduced, becoming similar to those observed in the control group and the population of Curitiba. BMI, waist circumference and triglycerides were also significantly lower. Although BChE activity is not a risk factor for obesity, because there are other metabolic factors involved in its regulation, it is related to early obesity and, as well as other associated variables, responds to physical exercise and could be considered as secondary marker for obesity health complications.

Keywords: Obesity, Adolescence, BChE, BMI, enzyme activity, *CHE2* locus.

INTRODUÇÃO

A butilcolinesterase (BChE; EC 3.1.1.8) é uma enzima sérica produzida pelo fígado e adipócitos e amplamente distribuída no organismo (WESCOE *et al.*, 1947). O gene

BCHE, presente no braço longo do cromossomo 3 (3q26.1-q26.2) (SOREQ *et al*., 1987; ALLDERDICE *et al*., 1991; GAUGHAN *et al*., 1991), apresenta 4 exons e 2445 pares de bases (NCBI, 2009) e já foram identificadas mais de sessenta e cinco variantes deste gene (SOUZA *et al*., 2005)

A BChE pode apresentar variação devida ao loco *CHE2* que, junto com o gene *BCHE*, é responsável pela formação do complexo C5, este complexo C5 é caracterizado pela BChE ligada a um composto ainda não identificado que origina uma banda extra detectada em eletroforese (HARRIS *et al*.,1962). Os fenótipos que podem apresentar-se são CHE2 C5+ e CHE2 C5-, responsáveis pela presença e ausência do complexo C5, respectivamente. CHAUTARD-FREIRE MAIA *et al*. (1991) encontraram o fenótipo CHE2 C5+ com frequência de 10,3% em amostra da população de Curitiba. BOBERG *et al.* (2010) verificaram que embora a atividade média de cada banda da BChE seja significantemente mais alta em obesos, as proporções de cada banda são mantidas mesmo sob o estresse metabólico associado à obesidade. Os autores sugerem que estas proporções são reguladas e que podem ser importantes para as funções fisiológicas da BChE.

Vários estudos mostram que a atividade média da BChE é maior nos obesos ao ser comparada com a de não-obesos. BERRY e*t al.*, (1954) encontraram uma correlação positiva entre a atividade da BChE e o teor de gordura subcutânea. CUCUIANU *et al.* (1968) encontram também um aumento da atividade da BChE em obesos e em hiperlipêmicos com peso normal. Outros estudos indicaram associação positiva entre atividade da BChE e peso (STUEBER-ODEBRECHT *et al.*, 1985; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, 1989).

O aumento na atividade da BChE pode ser consequência de distúrbios associados com o metabolismo anormal de lípides, caracterizados pelo aumento de triglicérides e/ou colesterol, excesso de ácidos graxos derivado do metabolismo de carboidratos, obesidade e diabetes (KUTTY, 1980; KÁLMÁN *et al*., 2004).

O fenótipo CHE2 C5+ apresenta em torno de 25-30% a mais de atividade média da BChE que o fenótipo CHE2 C5- (HARRIS, 1980; CHAUTARD-FREIRE-MAIA *et al.,* 1991). ALCÂNTARA *et al*. (2003) investigaram a associação da BChE e IMC em indivíduos obesos e não obesos nos indivíduos de fenótipo CHE2 C5- e verificaram que a atividade média da BChE é significativamente maior em obesos, quando comparados com seus controles de peso normal e sugerem que o alelo CHE2 C5+ poderia predispor a uma maior facilidade para perder peso, isso porque observaram uma frequência significativamente maior de pacientes que perderam peso no grupo de fenótipo CHE2

C5+ do que no grupo de fenótipo CHE2 C5-. Outros estudos associados com peso e IMC confirmam os IMCs mais baixos nos fenótipos CHE2 C5+ (CHAUTARD-FREIRE-MAIA *et al.*, 1991; ALCÂNTARA *et al.*, 2001). O fenótipo CHE2 C5+ tem um efeito protetor em relação à predisposição à obesidade em homens adultos, isto porque ele esta associado a um aumento da atividade da BChE em obesos e em não obesos, mas com uma frequência menor em obesos, reforçando a hipótese de um importante papel da BChE em processos metabólicos relacionados à obesidade (ALCÂNTARA *et al.*, 2005; FURTADO-ALLE *et al.*, 2008).

MATERIAL E METODOS

Amostra: O estudo envolveu dois delineamentos: primeiramente foram analisados 118 adolescentes obesos e 158 adolescentes não-obesos ambos provenientes da cidade de Curitiba/PR. O material utilizado envolveu amostras provenientes de plasma (n=87) e de sangue total (n=31). Posteriormente 25 amostras foram coletadas também após os exercícios físicos para comparações de atividade enzimática e análises dos fatores bioquímicos e antropométricos.

O recrutamento, as coletas e as avaliações multidisciplinares do grupo de obesos foram realizados em parceria com o Programa de Pós-Graduação em Educação Física, no Núcleo de Pesquisa em Qualidade de Vida da Universidade Federal do Paraná e após isto encaminhado o material para as análises genéticas.

A coleta de todas as amostras foi realizada após a obtenção do Termo de Consentimento dos pais ou responsáveis, aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e após a aplicação de questionários de anamnese. Houve um cuidado com a seleção da amostra, a qual seguiu alguns critérios pré-estabelecidos como: índice de massa corporal (IMC) acima do percentil 95; peso estável em um período maior ou igual há dois meses; ausência da utilização de medicamentos anorexígenos ou outros que possam interferir no controle de peso e na hiperinsulinemia.

As amostras controles foram adquiridas do banco pré-existe de amostras ALPE (altura/peso) do Laboratório de Polimorfismos e Ligação da Universidade Federal do Paraná (n=130) e provenientes de amostras de plasma coletadas pelo Setor de Educação Física (n=28).

Etapas do estudo: Os indivíduos selecionados foram previamente avaliados por uma equipe composta de nutricionista, médico, professor de educação física e psicólogo e encaminhados a sessões de exercícios físicos e de orientação nutricional. Na etapa de

avaliação inicial foram realizadas avaliações multisciplinares e direcionados ao tratamento (3 meses) com Exercício Físico, Orientação Nutricional e Orientação Psicológica e consequentemente a avaliação final com as mesmas avaliações multidisciplinares.

As avaliações físicas multidisciplinares incluíram Aspectos Clínicos e Antropométricos (peso, estatura, circunferência abdominal (CA) e IMC-escore Z), Aptidão Cardiorrespiratória (frequência cardíaca-FC, consumo de oxigênio- $VO_{2\ máx}$, volume de gás carbônico-VCO_2 e ventilação-VE), Determinação do Gasto Metabólico em Repouso (GMR), Exames Laboratoriais (hemograma, dosagens de, insulina, colesterol total-CT, lipoproteína de alta densidade (HDL-C), lipoproteína de baixa densidade (LDL-C), triglicérides (TG), adipocitocinas (IL-1, TNF-α, Leptina, Adiponectina), Ferritina Sérica, TSH e T4 livre), e Avaliações Nutricionais (inquérito alimentar recordatório de 24 horas e o registro alimentar de três dias, validados pela *American Dietetic Association* (TINKER *et al.*, 2001).

A análise Genética envolveu a determinação dos fenótipos do loco *CHE2* e a determinação atividade enzimática da BChE.

A prática de exercícios físicos ocorreu em 36 sessões de exercícios programados durante 12 semanas. Os exercícios constaram de atividades aeróbias realizadas na frequência de três vezes por semana no período da manhã ou tarde e consistiam de 50 minutos de caminhada, 50 minutos de ciclismo *indoor* e 20 minutos de alongamento. A intensidade dos exercícios foi variável, sendo de 35 a 55% do $VO_{2\ máx}$ da 1ª a 4ª semana, 45 a 65%, na 5ª a 8ª semana e de 55 e 75% na 9ª a 12ª semana.

Quantificação da Atividade Enzimática da BChE: para medição da atividade enzimática das amostras foi usada a metodologia de DIETZ *et al*. (1972), modificada por EVANS e WROE (1978). Seu princípio é a hidrólise da propioniltiocolina pela butirilcolinesterase, produzindo ácido propiônico e tiocolina, a qual reage com o DTNB (ácido 5,5'-bisditio-2-nitrobenzóico), gerando 5-tio-2-nitrobenzoato de coloração amarela. A quantificação foi feita com um espectrofotômetro (423nm) e um Banho-Maria a 25^0 C. Foram determinadas a média de atividade da BChE no grupo controle de adolescentes não-obesos e nos adolescentes obesos nos dois momentos: antes do início do programa e ao término das 12 semanas do programa de atividades físicas.

Fenotipagem do loco *CHE2*: Para a fenotipagem do loco *CHE2* foi utilizada a Eletroforese em gel de Agar Ácido de acordo com a técnica original de ROBINSON *et al.* (1957) com modificações de VAN ROS E VERVOORT (1973) e FADEL PICHETH (1991)

e SOUZA (1995) para permitir a aplicação e adaptações da técnica para a *BCHE*. O gel foi padronizado com as condições de pH incluindo valores entre 6,42 e 6,47, corrida de 4 horas e aplicação de 2µl da amostra de plasma.

Análises estatísticas: Foi utilizado o programa Statistica para Windows (Statsoft, Inc. 1996) para cálculos de médias, frequências, teste *t*, teste F, coeficiente de correlação e testes de χ^2 e o programa Arlequin versão 2.0 (EXCOFFIER *et al*., 2005) para o cálculo das frequências haplotípicas, dos valores de D e D' e testes de χ^2 para o equilíbrio de Hardy-Weinberg dos haplótipos. As frequências alélicas e genotípicas foram realizadas por contagem direta e as variáveis quantitativas foram comparadas entre os grupos e os genótipos por meio de ANOVA ou teste t.

* mais detalhes da metodologia no Apêndice.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A TABELA 1 mostra as médias de idade, índice de massa corporal (IMC) e dados clínicos dos 118 adolescentes obesos. O grupo controle tem média de idade de 18,6 anos ±0,3 e média de IMC de 22,6 ±0,5.

TABELA 1 - Média de idade, Índice de massa corporal (IMC), características clínicas e atividade da butirilcolinesterase em 118 adolescentes obesos.

Variáveis	Média ± EP	S^2	Valores de Referência[*4]
Idade (anos)	12,9±0,2	3,1	-
IMC (kg/m^2)[*1]	29,5±0,4	21,7	-
Colesterol total (mg/dL)[*2]	158,1±3,1	1055,9	Menor que 170 mg/dL
Colesterol LDL (mg/dL)[*2]	90,3±2,5	731,9	Menor que 130 mg/dL
Colesterol HDL (mg/dL)[*2]	43,8±0,8	66,9	Maior ou igual a 45 mg/dL
Triglicérides (mg/dL)[*2]	119,1±6,5	4708,6	Menor ou igual a 130 mg/dL
Glicemia em jejum (mg/dL)[*2]	89,8±0,8	73,1	Menor que 100 mg/dL
RCE[*3]	0,61 ± 0,01	0,005	Menor que 0,50

NOTA: *[1] Índice de Massa Corpórea, incluindo adolescentes pertencentes ao percentil 95 de IMC. *[2]Algumas informações não estão disponíveis para todos os indivíduos estudados: os valores referentes às dosagens de colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL e triglicérides estão disponíveis para 113 adolescentes obesos; os valores referentes às dosagens de glicemia estão disponíveis para 111 adolescentes obesos. [*3] Razao Cintura estatura. [*4] Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz de Prevenção da Aterosclerose na Infância e Adolescência.

Os valores médios de colesterol HDL estão abaixo dos valores recomendados e os valores de triglicerídios e de colesterol total, embora não estejam aumentados,

encontram-se na faixa limítrofe. A razão cintura para estatura foi obtida pelo quociente do perímetro da cintura pela estatura em centímetros (HO *et al*., 2003). Todos os adolescentes obesos estão incluídos no percentil 95 de IMC e a média da razão cintura estatura é superior a 0,50. A classificação segundo o estudo de Ashwell e Gibson (2009) sugere que indivíduos que apresentarem esta variável acima de 0,50 serão classificados como de risco à saúde. Esses dados caracterizam a amostra de adolescentes obesos, como um grupo de risco a complicações da obesidade, como o desenvolvimento futuro de síndrome metabólica.

Os GRÁFICOS 1 e 2 mostram a distribuição dos valores da Atividade enzimática da BChE em Obesos e Controles.

GRÁFICO 1 - Atividade Enzimática no grupo de adolescentes obesos

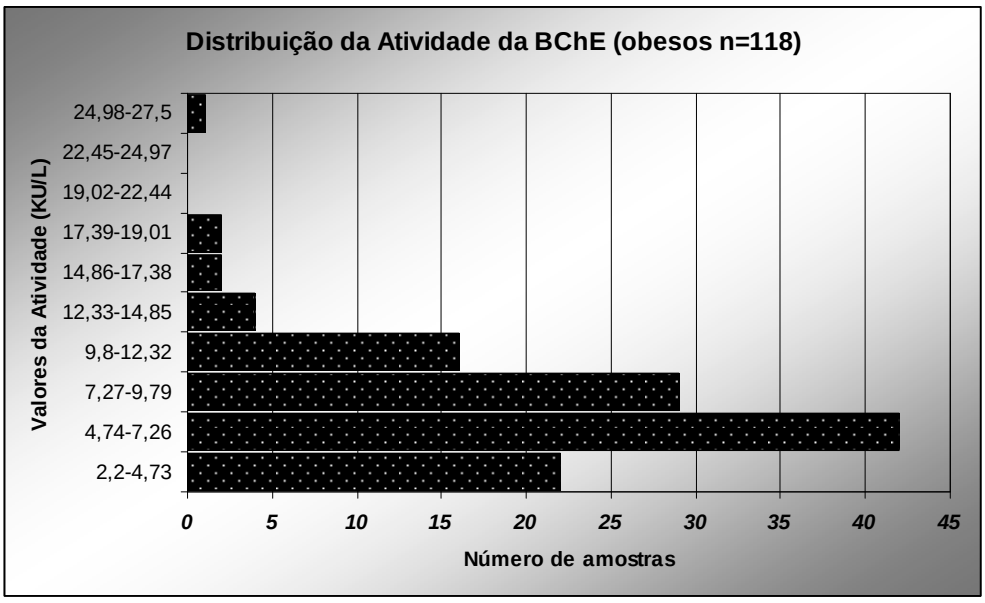
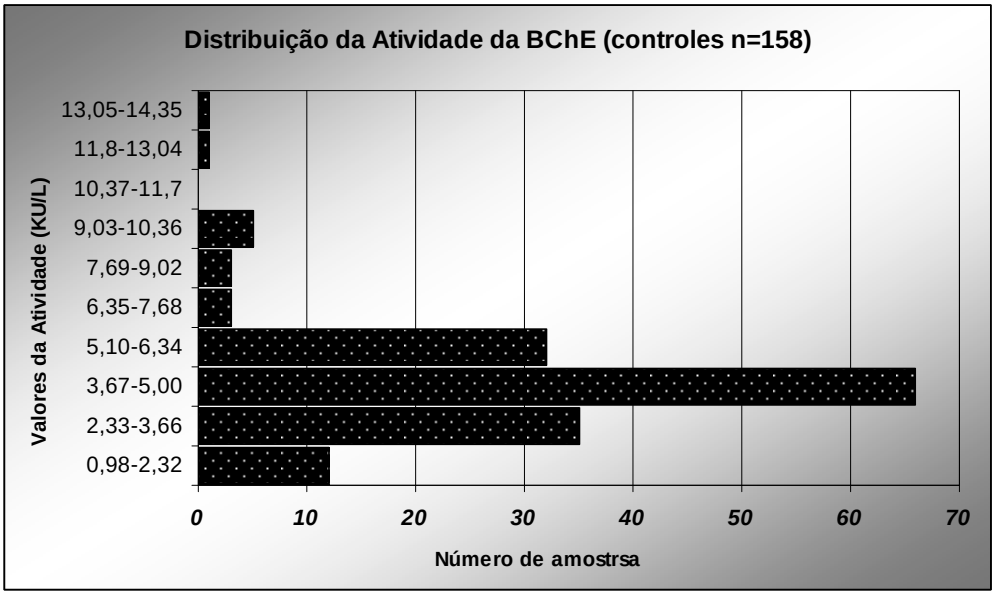


GRÁFICO 2 - Atividade enzimática no grupo de controles (adolescentes não-obesos)



A média da atividade enzimática da BChE é significativamente maior em adolescentes obesos do que em adolescentes não-obesos e maior também do que a média da população em geral (TABELA 2).

TABELA 2 - Valores médios da atividade da BChE ± EP e valores de t e p para as comparações entre as médias.

Amostra	N	Atividade da BChE (KU/L) ± EP	t e p
Adolescentes não obesos (controle)	158	4,5 ± 0,1	
			4,0 e 0,0002
Adolescentes obesos	118	7,5 ± 0,3	
			7,5 e $8x10^{-12}$
População de Curitiba*	883	4,9 ± 0,1	

NOTA: * Banco de dados do laboratório de Polimorfismos e Ligação.

Após a prática de exercícios verificou-se redução significativa do valor da atividade enzimática, que se tornou semelhante à média populacional. Também foram significativamente reduzidos IMC, triglicerídeos e circunferência abdominal (TABELA 3). Como já sugerido por KÁLMÁN *et al*., 2004, o aumento na atividade da BChE pode ser consequência de distúrbios associados à obesidade, como mostra a diminuição concomitante da atividade enzimática, IMC, triglicerídeos e RCE. Especialmente, os valores de triglicerídeos que se encontravam na faixa limítrofe passam à normalidade, caracterizando uma melhora no perfil lipídico desses adolescentes.

Embora a frequência do fenótipo CHE2 C5+ seja menor nos obesos, esta diferença não é significativa pois, diferente de resultados de estudos anteriores com adultos obesos, o fenótipo CHE2 C5+ tem frequências estatisticamente semelhantes em obesos, controles e na população de Curitiba (TABELA 4).

A FIGURA 1 ilustra os resultados do gel de ágar para identificação dos fenótipos CHE2 C5 dos grupos de obesos e controles. Na fenotipagem do loco CHE2 C5+ os padrões de banda ficaram com característica forte e em alguns casos foi observado padrão de banda extra já observado em amostras de obesos.

TABELA 3 - Índice de massa corporal (IMC), características clínicas e atividade da butirilcolinesterase em 25 adolescentes obesos antes do início e ao término do programa multidisciplinar de exercícios físicos

Variáveis Analisadas	Obesos (N = 25)	Obesos após atividade física multidisciplinar (N = 25)	t e p
IMC (kg/m^2)[*1]	29,3 ± 0,4	28,5 ± 0,5	4,4 e 0,0002[*1]
Colesterol total (mg/dL)[*2]	158,1 ± 7,0	155,2 ± 5,8	0,74 e 0,47
Colesterol LDL (mg/dL)[*2]	101,4 ± 4,4	94,8 ± 4,4	1,25 e 0,22
Colesterol HDL (mg/dL)[*2]	45,5± 1,7	46,7 ± 1,8	0,69 e 0,49
Triglicérides (mg/dL)[*2]	104,6 ± 9,3	78,3 ± 6,6	3,5 e 0,002[*1]
Glicemia em jejum (mg/dL)[*2]	91,0 ± 1,4	92,2 ± 1,6	0,89 e 0,38
RCE[*3]	0,62 ± 0,01	0,60 ± 0,01	4,13 e 0,0004[*1]
Atividade da BChE	7,35 ± 0,63	5,47 ± 0,39[*2]	2,9 e 0,008[*1]

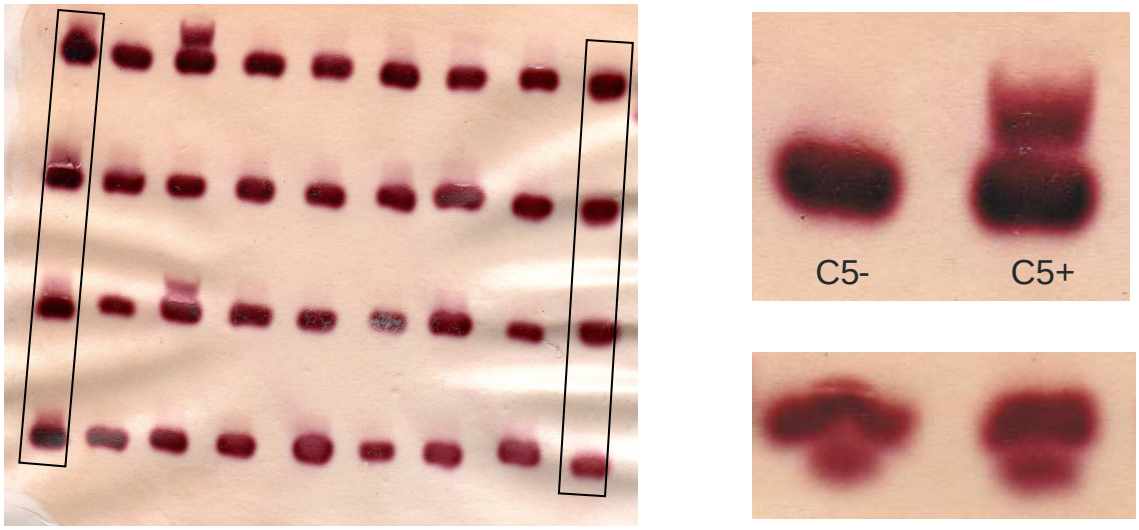
NOTA: [*1] Valores significativos. [*2]Comparação entre atividade da BChE após exercícios e população de Curitiba t = 1,3 e p 0,19.

TABELA 4 - Frequências do fenótipo CHE2 C5+ em obesos, controles e na população de Curitiba e valores de Qui-quadrado e p para as comparações entre as frequências.

Amostra	% de CHE2 C5+ ± EP	Qui-quadrado e p
Adolescentes não obesos	9,5 ± 2,0	0,55 e 0,46
Adolescentes obesos	6,8 ± 2,3	
População de Curitiba[*1]	10,2 ± 0,6	1,42 e 0,23

NOTA: [*1] CHAUTARD-FREIRE-MAIA *et al*., 1991

FIGURA 1 - Padrão de bandas encontradas no gel de Agar ácido para *CHE2*



NOTA: Imagem de um gel de ágar corrido para *CHE2,* onde as bandas da primeira coluna são os controles positivos e as bandas da última coluna são os controles negativos. Ao lado a imagem do padrão das bandas C5+ e C5-. Abaixo um exemplo de bandas extras verificadas.

Foram verificadas correlações positivas entre atividade da BChE e IMC (r2=0,07, t=2,1 e p =0,03) e entre atividade da BChE e colesterol LDL (r2 = 0,11, t= 2,6 e p =0,01), demonstrando que também na obesidade juvenil, atividade da BChE está relacionada ao metabolismo de lipídios.

O presente estudo permite reforçar as hipóteses de associação da BChE com a obesidade e metabolismo de lipídios, mostrando que esta associação está presente também na obesidade juvenil. Embora não seja um fator de risco para a obesidade, pois existem outros fatores metabólicos envolvidos na sua regulação, a atividade da butirilcolinesterase está relacionada à obesidade juvenil e, assim como outras variáveis associadas, responde à prática de exercícios físicos e pode ser utilizada como um marcador secundário para os riscos associados à obesidade juvenil.

AGRADECIMENTOS

Ao grupo do Núcleo de Pesquisa em Qualidade de Vida do departamento de Educação Física da Universidade Federal do Paraná (UFPR), ao setor nutricional da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR) e aos colegas do Laboratório de Polimorfismos e Ligação do setor de Genética da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

REFERÊNCIAS

ASHWELL, M. E GIBSON, S. Waist to Height Ratio Is a Simple and Effective Obesity Screening Tool for Cardiovascular Risk Factors: Analysis of Data from the British National Diet and Nutrition Survey of Adults Aged 19-64 Years. v.2: p.97-103. **Obes Facts,** 2009.

ALCÂNTARA, V.M.; OLIVEIRA, L.C.; RÉA, R.R.; SUPLICY, H.L. e CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Butyrylcholinesterase activity and metabolic syndrome in obese patients. **Clin. Chem. Lab. Med**., v. 43, p. 285-288, 2005.

ALCÂNTARA, V.M.; OLIVEIRA, L.C.; RÉA, R.R.; SUPLICY, H.L. e CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Butyrylcholinesterase and obesity in individuals with the CHE2 C5+ and CHE2 C5- phenotypes. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.**, v.27, p. 1557-1564, 2003.

ALCÂNTARA, V.M.; RODRIGUES, L.C.; OLIVEIRA, L.C. e CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Association of the CHE2 locus with body mass index and butyrylcholinesterase activity. **Hum Biol**., v. 73, p. 587-595, 2001.

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.

BERRY, W.T.C.; COWIN, P.J. e DAVIS, D.R. A relationship between body fat and plasma pseudocholinesterase. **Brit. J. Nutr**., v. 8, p. 79-82, 1954.

BOBERG, D. R. Furtado-Alle, L. R.;. Souza R. L. R e Chautard-Freire-Maia E. A. Molecular forms of butyrylcholinesterase and obesity. **Genetics and Molecular Biology Online Ahead of Print.** Received: October 20, 2009; Accepted: March 30, 2010.

CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. **Relação entre os fenótipos do loco CHE2 da colinesterase do soro e o peso individual em duas amostras dos sul do Brasil**. Curitiba. 1989. f. 125. Tese (professor titular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.; VIEIRA, M.M.; PRIMO-PARMO, S.L. A expressividade do fenótipo CHE2 C5+ da butirilcolinesterase em relação a sexo e peso. ***Rev. Bras. Genet.***, v. 14, supl., p. 149, 1991.

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

DIETZ, A. A.; RUBINSTEIN, H. M.; LUBRANO, T. E HODGES, L. K. Improved method for the differentiation of cholinesterase variants. **Am. J. Hum. Genet**., v. 24, p. 58-64, 1972.

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

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

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

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

GAUGHAN, G.; PARK, H.; PRIDDLE, J.; CRAIG, S. Refinement of localization of human butyrylcholinesterase to chromosome 3q26.1-q26.2 using a PCR-derived probe. **Genomic**, v.11, p. 455-458, 1991.
HARRIS, H.; HOPKINSON, D.A; ROBSON, E.B. Two-dimensional electrophoresis of pseudocholinesterase components in human serum. **Nature**, v.196, p. 1296-98, 1962.

HARRIS, H. **The principles of human biochemical genetics**. 3ª ed. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical, p. 171,1980.

HO SY, LAM TH, JANUS ED. Waist to stature ratio is more strongly associated with cardiovascular risk factors than other simple anthropometric indices. **Ann Epidemiol.** V.13(10): p.683-91, 2003.

KALNÁN, J. *et al.* Increased serum butyrylcholinesterase activity in type IIb hyperlipidaemic patients. **Life Sciences**: n 75 , p.1195–1204, 2004.

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

NCBI - National Center for Biotechnology Information. **BCHE.** Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov. Acesso em: 02/11/2009

ROBINSON, A.R.; ROBSON, M.; HARRISON, A.P.; ZUELZER, W.W. A new technique for differentiation of hemoglobin. **J. Lab. Clin. Med**., v. 50, p. 745-52, 1957.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. **I Diretriz de Prevenção da Aterosclerose na Infância e Adolescência**. Arquivos Brasileiros de Cardiologia. v. 85, p.1-36, 2005.

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

SOUZA, R.L.R. **Estudos sobre nova banda da butirilcolinesterase humana (C4/5) verificada em eletroforese**. Curitiba, 1995. Tese de Mestrado. Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná.

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

STATSOFT, Inc. **Statistica for Windows** (Computer program manual). Tulsa,1996. 1cd.

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

TINKER, L. F.; PATTERSON, R. E.; KRISTAL, A. R.; BOWEN, D. J.; KUNIYUKI, A.; HENRY, H.; SHATTUCK, A. Measurement Characteristics of 2 Different Self-Monitoring Tools Used in a Dietary Intervention Study. **Journal of American Dietetic Association**, v. 101, n. 9, 2001.

VAN ROS, G.; VERVOORT, T. Frequencies of the "atypical" and C5 variants of serum cholinesterase in Zairians and Belgians. Detection of the C5 variant by agar gel electrophoresis with an acid buffer. **Ann. Soc. Belg. Med. Trop**., v. 53, p. 633-44, 1973.

WESCOE, W. C.; HUNT, C. H.; RIKER, W. F.; LITT, I. C. Regeneration rates of serum cholinesterase in normal individuals and in patients with liver damage. **Am. J. Physiol**., v. 149, p. 549-551, 1947.

5. ARTIGO 2

SNPs do gene da Butirilcolinesterase (*BCHE*) em adolescentes obesos.

RESUMO

A Butirilcolinesterase (BChE) é uma esterase sérica que possui um papel importante no metabolismo de lípides e que já foi associada ao IMC, colesterol, triglicérides e peso. A BChE é codificada pelo gene *BCHE* (3q26.1-q26.2) que possui mais de 65 variantes descritas, sendo a -116A e a A539T duas das mais frequentes mutações na população brasileira. Estas mutações, que estão em desequilíbrio de ligação, já apresentaram relações com a atividade da BChE e com a obesidade em adultos. O presente estudo analisou uma amostra de adolescentes obesos e uma amostra controle de adolescentes não obesos da cidade de Curitiba/PR, com o objetivo de investigar a associação entre a obesidade juvenil, o SNP G-116A: mutação -116 (114 obesos/150 controles) e o SNP A539T: mutação K (120 obesos e 144 controles) do gene *BCHE*. Foram analisadas variáveis antropométricas e bioquímicas correlacionadas com as variantes *-116A e K* do gene *BCHE* e com a atividade da BChE. Na genotipagem da mutação K foi verificado que os genótipos estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg e as frequências alélicas e genotípicas não diferem entre obesos, controles e população de Curitiba. Os genótipos do sítio -116 também estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg, mas as frequências alélicas e genotípicas diferem nos adolescentes obesos e no grupo controle, e entre a amostra de obesos e a população de Curitiba, sugerindo um efeito protetor dessa variante no desenvolvimento de obesidade juvenil. Adolescentes obesos portadores da mutação -116A tem atividade média da BChE significativamente menor e triglicerídeos significativamente mais elevados que obesos com genótipo usual e com valores considerados elevados de acordo com os valores de referência propostos para esta faixa etária. Considerando que os indivíduos dos dois genótipos são obesos e que não apresentam diferenças significativas nas demais variáveis analisadas, a mutação -116A pode ser sugerida como um marcador genético para hipertrigliceridemia em obesos.

.***Palavras - Chave***: BCHE, Obesidade, Adolescentes, PCR em Tempo Real, Variantes -116A, variante K.

ABSTRACT

The butyrylcholinesterase (BChE) is a serum esterase that has an important role in lipid metabolism and that was associated with BMI, cholesterol, triglycerides and weight. The BChE is encoded by the BCHE gene (3q26.1-q26.2), which has more than 65 variants already described, and the A539T and -116A are two of the most frequent mutations in the Brazilian population. These mutations, which are in linkage disequilibrium, have already shown relations with BChE activity and obesity in adults. This study examined a sample of obese adolescents and a control sample of non-obese adolescents from Curitiba/PR, in order to investigate the association between early obesity, the SNP G-116A: mutation -116 (114 obese and 150 controls) and A539T SNP: K mutation (120 obese and 144 controls) of the BCHE gene. Anthropometric and biochemical variables were analyzed and correlated with variants K and -116A of the *BCHE* gene and the activity of BChE. Data from K mutation genotyping showed that the genotypes are in Hardy-Weinberg equilibrium and allelic and genotypic frequencies did not differ between obese controls and population of Curitiba. The genotypes of the -116 site are also in Hardy-Weinberg equilibrium, but the allelic and genotypic frequencies differ in obese and control groups, and between the obese sample and the population of Curitiba, suggesting a protective effect of this variant in the development of early obesity. Obese carrying -116A mutation have mean BChE activity significantly lower and triglycerides significantly higher than obese homozygous for the usual allelle showing triglycerides values considered high for this age group. Considering that individuals of both genotypes are obese and do not show significant differences in other variables, the mutation -116A may be suggested as a genetic marker for hypertriglyceridemia independent of present of obesity.

Keywords: BCHE, Obesity, Teens, Real-Time PCR, -116A variants, K variant.

INTRODUÇÃO

A obesidade pode ser considerada como uma das doenças crônicas não-transmissíveis que epidemiologicamente mais crescem mundialmente (NAVAES e PASCHOAL, 2007). O fator genético é um elemento de risco importante para a doença relacionado ao grau de eficiência de dietas e sucesso na redução de peso pela prática de atividade física regular, pois podem provocar diversos tipos de obesidade na interação com o ambiente. Os estudos de associação genética com a obesidade são importantes para compreender os fatores implicados em sua etiologia e fornecer informações que auxiliem nos tratamentos e na prevenção da obesidade (RANKINEN *et al.*, 2005). É na

fase da adolescência que o indivíduo pode predispor-se uma obesidade séria para a fase adulta, pois durante essa fase ocorrem o crescimento físico, desenvolvimento psicossocial e estimulação cognitiva intensa, tornando as necessidades nutricionais elevadas.

A butilcolinesterase (BChE; EC 3.1.1.8) é uma enzima sérica amplamente distribuída no organismo, produzida pelo fígado e adipócitos que está relacionada a várias vias metabólicas e de desenvolvimento corporal (WESCOE *et al.*, 1947) e está associada a algumas variáveis como: estatura; IMC; peso; RCQ (razão cintura-quadril); CA (circunferência abdominal); colesterol; triglicérides e lipoproteínas.

O gene *BCHE* está presente no braço longo do cromossomo 3 (3q26.1-q26.2) (SOREQ *et al*., 1987; ALLDERDICE *et al*., 1991; GAUGHAN *et al*., 1991), e apresenta 64.558 Kb (NCBI, 2009). Apresenta uma única cópia e sua estrutura envolve 4 exons: o exon 1 apresenta 149 pb, apresentando as sequências não traduzidas; o exon 2 apresenta 1.525 pb contendo 83% da sequência codificadora da proteína madura; o exon 3 apresenta 167 pb e o exon 4 apresenta 604 pb e codifica para a extremidade C-terminal da proteína e contém a região 3' não traduzida que possui dois sinais de poliadenilação (ARPAGAUS *et al.*, 1990).

Já foram identificadas mais de sessenta e cinco variantes (mutações) no gene *BCHE* (SOUZA *et al*., 2005) e dentre as mutações mais frequentes do gene *BCHE* estão*:* c.*1615G>A* (p.*A539T*); c.*–116G>A*; c.*209A>G* (p.*D70G*); c.*765G>C* (p.*E255D*); c.*551C>T* (p.*A184V*) e c.1914A>G.

A variante do sítio -116 encontra-se na região não codificadora (fora da região codificadora da enzima madura), no exon 1 e leva à alteração de G (guanina) para A (adenima) ou seja (T<u>G</u>C/T<u>A</u>C), com frequência observada do alelo -116A de 8% (BARTELS *et al.*, 1990). Esta variante *–116A,* mesmo não estando na região codificadora da proteína, esta numa região que é transcrita podendo afetar a ação do gene por meio da ligação de elementos regulatórios. Está associada a uma diminuição na atividade da BChE e à baixa variância do IMC (FURTADO-ALLE *et al*., 2008).

A variante K (*G1615A,* A539T) é parte da região codificadora e foi descrita por RUBINSTEIN *et al*. (1978), sendo caracterizada por uma mutação de ponto que causa uma substituição da alanina (GCA) para treonina (ACA) no aminoácido 539 do peptídio maduro. Esta mutação ocorre no nucleotídeo 1615, localizado no exon 4 do gene *BCHE*. Estudos populacionais baseados em análise do DNA indicaram que a variante K é uma das mais frequentes dentre as variantes não usuais da BChE. Originalmente foi associada a uma diminuição na atividade da enzima, mas estudos realizados por ALTAMIRANO *et al*. (2000) mostraram que a enzima variante K não difere da enzima usual em relação à

afinidade e taxa de catálise de substratos, taxa de secreção da célula ou formação sérica de tetrâmeros. Estudos realizados por nosso grupo de pesquisa mostram que isoladamente a mutação A539T não leva à diminuição da atividade enzimática, só ocorrendo na presença da mutação *-116A* (FURTADO-ALLE *et al*., 2008).

Estes polimorfismos do gene *BCHE*, um na posição nt -116 (G/A) no exon 1 (variante *-116A)* e outro na posição 1615 (G/A) do exon 4 (variante A539T) estão em desequilíbrio de ligação, aparecendo preferencialmente na conformação cis (BARTELS *et al.*, 1990).

O primeiro estudo que pesquisa a relação entre os alelos da BCHE com caracteres antropométricos foi realizado no trabalho de SOUZA *et al.* (2005) onde foi investigada uma associação entre variantes do gene BChE com peso e estatura. Foi comparada a diferença destas medições entre indivíduos com variantes não usuais do gene e seus respectivos controles usuais. Na análise da mutação K foi encontrado que os individuais que possuíam a mutação atípica não diferiram dos controles com fenótipos usuais. Sendo que os indivíduos que possuem um alelo K e um alelo usual possuem uma alta variação do IMC em comparação com o grupo dos usuais. Isto indica que esta alta variação do IMC não aparece como efeito isolado da mutação K, mas sim como resultado de uma interação entre o alelo K e o alelo usual, existindo portanto, uma relação entre a variabilidade do locus da BCHE e IMC.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostra: O número de amostras utilizadas neste trabalho foi de 114 adolescentes obesos e 150 controles de adolescentes não obesos para genotipagem da mutação K e 120 adolescentes obesos e 144 controles para genotipagem da mutação -116, ambos os grupos com idade entre 10 a 16 anos provenientes da cidade de Curitiba/PR.

A coleta de todas as amostras foi realizada após a obtenção do Termo de Consentimento dos pais ou responsáveis aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e após a aplicação de questionários de anamnese. Houve um cuidado com a seleção da amostra, a qual seguiu alguns critérios pré-estabelecidos como: índice de massa corporal (IMC) acima do percentil 95; peso estável em um período maior ou igual há dois meses; ausência da utilização de medicamentos anorexígenos ou outros que possam interferir no controle de peso e na hiperinsulinemia. O recrutamento, as coletas e as avaliações multidisciplinares do grupo de obesos foram realizados em parceria com o Programa de Pós-Graduação em Educação Física, no Núcleo de Pesquisa

em Qualidade de Vida da Universidade Federal do Paraná e após isto encaminhado o material para as análises genéticas.

O material utilizado envolveu amostras provenientes de plasma cedidas pelo Setor de Educação Física e amostras coletadas de sangue total (amostras recentes). As amostras controles foram adquiridas do banco pré-existe de amostras ALPE (altura/peso) do Laboratório de Polimorfismos e Ligação da Universidade Federal do Paraná e provenientes também de amostras de plasma cedidas pelo Setor de Educação Física.

Etapas do estudo: Os indivíduos selecionados foram previamente avaliados por uma equipe composta de nutricionista, médico, professor de educação física e psicólogo. As avaliações físicas multidisciplinares incluíram Aspectos Clínicos e Antropométricos (peso, estatura, circunferência abdominal (CA) e IMC-escore Z), Aptidão Cardiorrespiratória (frequência cardíaca - FC, consumo máximo de oxigênio- $VO_{2MÁX}$, volume de gás carbônico-VCO_2 e ventilação-VE), Determinação do Gasto Metabólico em Repouso (GRM), Exames Laboratoriais (hemograma, dosagens de, insulina, colesterol total-CT, lipoproteína de alta densidade (HDL-C), lipoproteína de baixa densidade (LDL-C), triglicérides (TG), adipocitocinas (IL-1, TNF-α, Leptina, Adiponectina), Ferritina Sérica, TSH e T4 livre), e Avaliações Nutricionais (inquérito alimentar recordatório de 24 horas e o registro alimentar de três dias, validados pela *American Dietetic Association* (TINKER *et al.*, 2001).

A análise Genética envolveu a investigação de dois SNPs (sigla inglesa para *single nucleotide polymorphisms*) do gene da *BCHE: G116A e* A539T.

Extração do DNA: as amostras provenientes de plasma e de DNA leucocitário foram extraídas diferencialmente. A extração do DNA do plasma foi realizada por meio do *Mini Kit DNAAmp* da Quiagen conforme seu protocolo para extração e então evaporadas e ressuspendidas em água milli-Q para aumento da concentração. As amostras de sangue total foram submetidas à extração do DNA leucocitário pelo método de LAHIRI E NURNBERGER (1991) com modifiações. Ao final do procedimento, estas amostras tiveram suas concentrações mensuradas e então são ressuspendidas em água ultra-pura para normalização em 100ng/µl e armazenadas em alíquotas para estocagem em freezers no Laboratório de Polimorfismos e Ligação.

Genotipagem com Taqman: O método de PCR em Tempo Real foi padronizado para o gene *BCHE* e foram aplicadas as amostras de obesos e controle para determinação da

variante -116A e variante K. Para este protocolo de genotipagem foi realizada a amplificação com os seguintes passos: 1º passo de 2 minutos a 50ºC; 2º passo de 10 minutos a 95ºC; 3º passo repetido 50 vezes de 15 segundos a 95ºC intercalados por 60 segundos a 62ºC. Após a leitura e análise dos dados gerados foi construído um gráfico representativo de dispersão (XY) para separação FAM-VIC e determinação do genótipo de cada indivíduo. Para as amostras de plasma foi elevado o valor de DNA por poço na placa (de 2µ para 4µl) para aumentar o valor dos picos das leituras e as escalas foram mais ampliadas para facilitar a separação dos genótipos. O equipamento utilizado foi da Eppendorf, Matercycler Realplex 2 e o Kit de genotipagem *TaqMan SNP* da Applied Biosystems para a variante -116A (rs1126680) e para a variante K (rs1803274).

Análises estatísticas: As frequências alélicas e genotípicas foram realizadas por contagem direta e as variáveis quantitativas foram comparadas entre os grupos e os genótipos por meio de teste t. O programa Statistica para Windows (Statsoft, Inc. 1996) foi utilizado para cálculos de médias, frequências, teste *t*, teste F e testes de χ^2.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A técnica de extração do sangue total realizada por método da técnica de Lahiri e Nurnberger obteve bom resultado, uma vez que foi testada a concentração do material pós-extração. No caso das extrações de DNA provenientes de Plasma com o *Mini Kit Amp* obtiveram resultado razoável, uma vez que a concentração do DNA nestas amostras ficou reduzida. Uma solução eficaz foi a posterior evaporação de 100 µl de amostra extraída com auxílio de termocicladores para aumentar sua concentração e então adicionada aos tubos 35 µl de água bi-destilada para rediluição destas amostras.

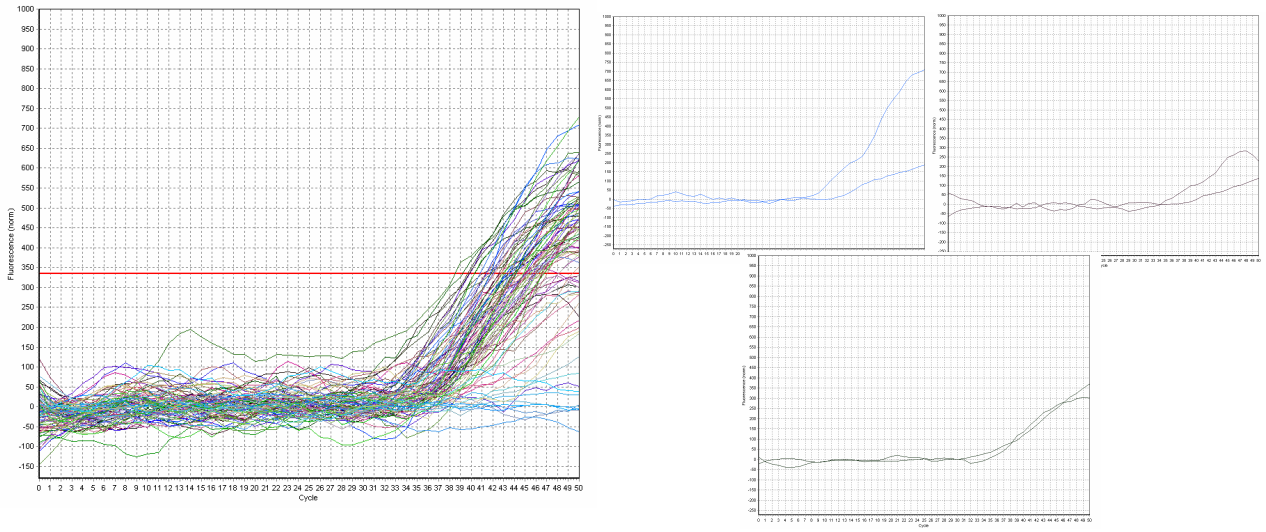
Para as genotipagens da mutação K (rs1803274) e -116 (rs1126680) foi utilizada a técnica de genotipagem em tempo-real com TaqMan. Um exemplo de picos das curvas geradas está na FIGURA 1 e a plotagem dos gráficos, na FIGURA 2.

As amostras de obesos e não obesos encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg para os dois SNPs analisados no presente estudo, conforme pode ser demonstrado na TABELA 1.

TABELA 1 - Valores de P para o teste do χ^2 para o equilíbrio de Hardy-Weinberg

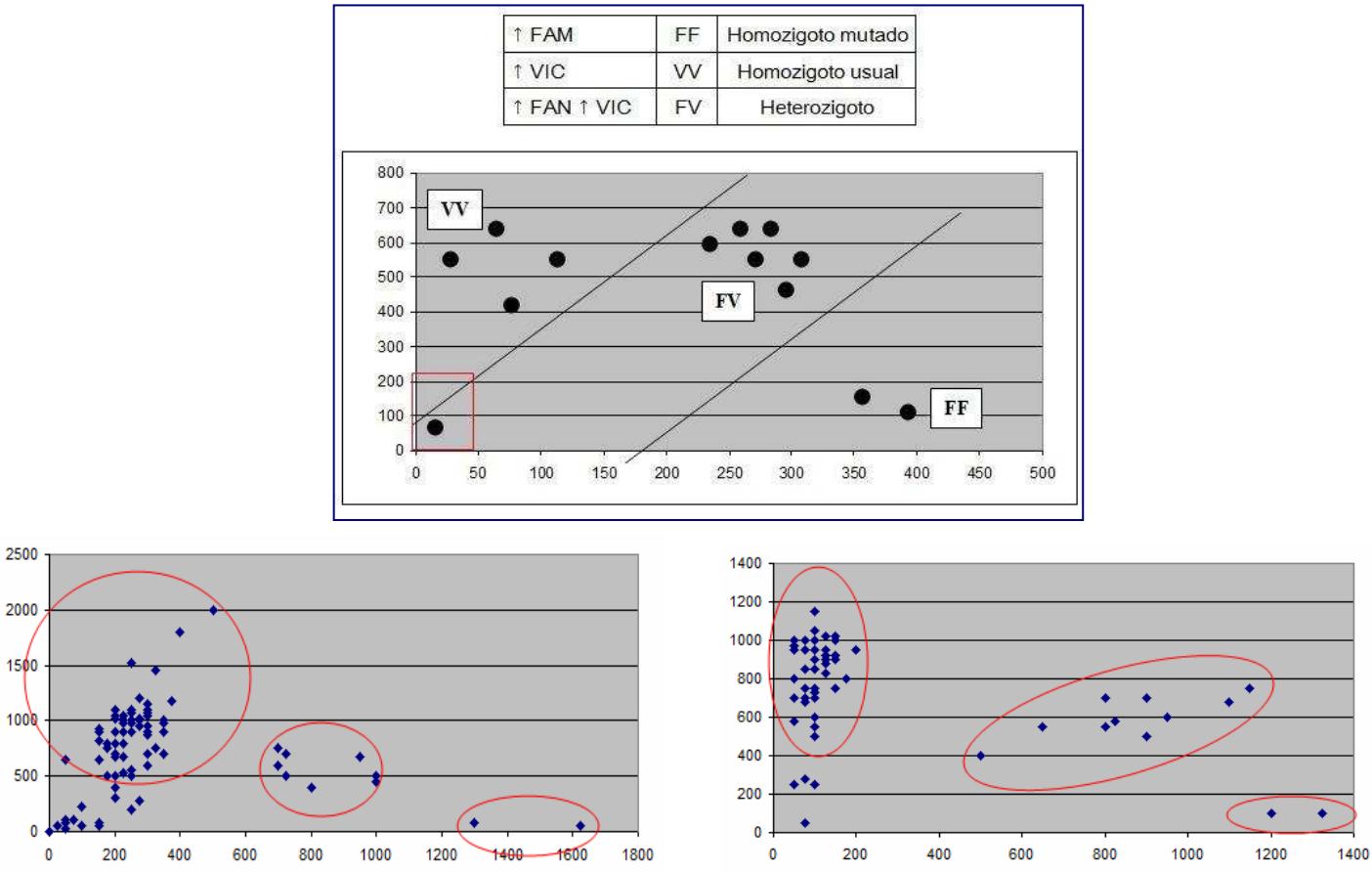
SNPs	OBESOS		NÃO-OBESOS	
	χ^2	p	χ^2	p
K	0,068	0,96	2,0	0,36
116	0,14	0,93	1,4	0,49

FIGURA 1 - Padrão de curvas do programa Realplex para as duas sondas.



NOTA: O gráfico maior indica um exemplo de leitura padrão para SNPs em Tempo real. Os gráficos menores indicam respectivamente de cima para baixo um (FF) mutado, um (VV) homozigoto usual e um (FV) heterozigoto.

FIGURA 2 - Exemplo de resultado gráfico da Genotipagem em Tempo Real



NOTA: O gráfico superior demonstra o padrão ideal da distribuição das amostras: heterozigotas na região central, homogizoto usual no canto superior esquerdo e o homozigoto mutado no canto inferior direito. Os gráficos inferiores demonstram dois resultados obtidos: o primeiro mostra uma placa realizada para -116 e o segundo para a mutação k.

As frequências alélicas e genotípicas de obesos e não obesos estão demonstradas nas TABELAS 2 e 3 com gráficos ilustrativos.

Na análise da mutação K foi verificado que as frequências alélicas (χ^2 = 2,21 / p = 0,13) e genotípicas (χ^2 = 3,39 / p = 0,63) não diferem em obesos e controles. Nos controles as frequências alélicas não diferem com a população de Curitiba (χ^2 = 0,13 p = 0,72) e isto também ocorre na amostra de obesos (χ^2 = 3,0 p = 0,09).

Na genotipagem da mutação -116A foi verificado que as frequências alélicas (χ^2 = 6,13 / p = 0,01) e genotípicas (χ^2 = 6,59 / p = 0,01) diferem nos adolescentes obesos e no grupo controle (não-obesos). Na amostra de controles as frequências alélicas não diferem com a população de Curitiba (χ^2 = 0,05 / p = 0,83) mas na amostra de obesos as frequências alélicas diferem com a população de Curitiba (χ^2 = 5,47 p = 0,02). A menor frequência da mutação -116A em adolescentes obesos sugere um efeito protetor dessa variante no desenvolvimento de obesidade juvenil (OR = 0,35, IC 95% 0,15 a 0,78).

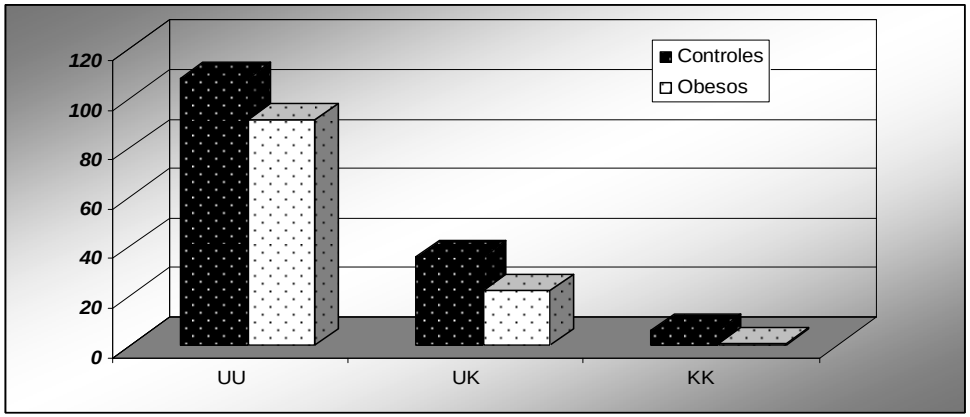
FURTADO-ALLE *et al*. (2008) não encontraram diferença significativa na frequência do alelo -116A em obesos adultos e em controles, mas encontraram maior média de IMC em obesos portadores da mutação -116A do que em obesos portadores do alelo usual. No presente estudo, não há diferença significativa na média de obesos portadores ou não da mutação -116A respectivamente (t =0,27 e p = 0,79), mas é importante ressaltar o número reduzido de obesos portadores desta mutação (N =8).

Como já verificado em estudo anterior (FURTADO-ALLE *et all*., 2008), a atividade da BChE é significativamente menor em obesos portadores da mutação -116A do que em homozigotos para o alelo usual (3,9 ± 0,7 e 7,7 ± 0,3, respectivamente; t = 2,9, p= 0,04).

As TABELAS 4 e 5 mostram médias de IMC, RCE (razão cintura estatura), colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL, triglicerídeos e glicemia de jejum e os valores de teste t e p para as comparações entre adolescentes obesos classificados de acordo com os genótipos dos sítios -116 e 1615 (mutação K) do gene *BCHE*.

TABELA 2 - Frequências alélicas e genotípicas para a mutação K.

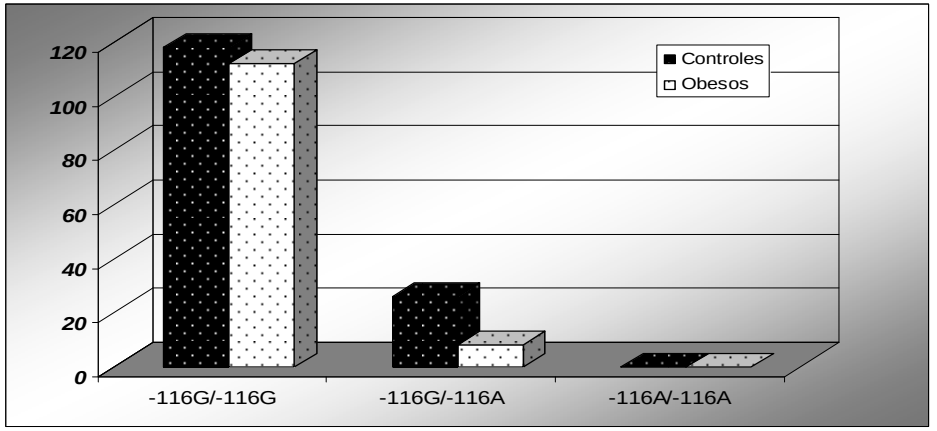
Mutação K					
	Controles (n= 150)			Obesos (n=114)	
Genótipos	**N**	**% ± EP**		**N**	**% ± EP**
UU	108	72,5 ± 2,6		91	79,8 ± 3,8
UK	36	23,5 ± 2,5		22	19,3 ± 3,7
KK	6	4,0 ± 1,1		1	0,9 ± 0,9
Alelos	**N**	**% ± EP**		**N**	**% ± EP**
U	251	84,2 ± 2,1		204	89,5 ± 2,0
K	47	15,8 ± 2,1		24	10,5 ± 2,0



Distribuição dos genótipos em obesos e controles

TABELA 3 - Frequências alélicas e genotípicas para a mutação -116.

Mutação -116					
	Controles (n=144)			Obesos (n=120)	
Genótipos	**N**	**%± EP**		**N**	**% ± EP**
-116G/-116G	118	81,9 ± 3,2		112	93,3 ± 2,3
-116G/-116A	26	18,1 ± 3,2		8	6,7 ± 2,3
-116A/-116A	0	0		0	0
Alelos	**N**	**% ± EP**		**N**	**% ± EP**
-116G	262	91,0 ± 1,7		232	96,7 ± 1,2
-116A	26	9,0 ± 1,7		8	3,3 ± 1,2



Distribuição dos genótipos em obesos e controles

TABELA 4 - Variáveis antropométricas e clínicas em adolescentes obesos classificados de acordo com os genótipos do sítio -116.

Variáveis	Genótipos do sítio -116		t e p
	-116G/-116A	-116G/-116G	
IMC	29,9 ± 1,9	29,5 ± 0,5	0,27 e 0,79
RCE	0,61 ± 0,03	0,61 ± 0,01	0,2 e 0,85
Colesterol total	176,1 ± 11,7	156,4 ± 3,2	1,6 e 0,12
Colesterol LDL	94,3 ± 9,8	89,6 ± 2,7	0,4 e 0,7
Colesterol HDL	45,9 ± 2,8	43,8 ± 0,8	0,6 e 0,52
Triglicerídeos	**180,4 ± 32,3**	**114,1 ± 6,5**	**2,6 e 0,01***
Glicemia	88,6 ± 2,8	89,9 ± 0,9	0,4 e 0,68

NOTA: * Valores significativos.

Tabela 5 - Variáveis antropométricas e clínicas em adolescentes obesos classificados de acordo com os genótipos do sítio 1615.

Variáveis	Genótipos do sítio 1615*		t e p
	UK	UU	
IMC	29,6 ± 0,8	29,8 ± 0,6	0,14 e 0,89
RCE	0,61 ± 0,01	0,61 ± 0,08	0,05 e 0,96
Colesterol total	165,5 ± 6,8	156,8 ± 3,7	1,1 e 0,29
Colesterol LDL	95,9 ± 5,4	88,4 ± 3,1	1,1 e 0,27
Colesterol HDL	44,5 ± 1,8	44,0 ± 0,9	0,2 e 0,84
Triglicerídeos	139,6 ± 20,1	117,5 ± 7,4	1,2 e 0,22
Glicemia	91,0 ± 1,9	89,5 ± 1,0	0,7 e 0,51

NOTA: *O genótipo KK não foi incluído na análise, pois apenas um indivíduo representa tal genótipo.

Adolescentes obesos portadores da mutação -116A tem triglicerídeos significativamente mais elevados que obesos com genótipo usual e com valores considerados elevados de acordo com os valores de referência propostos para esta faixa etária (Sociedade Brasileira de Cardiologia, I Diretriz de Prevenção da Aterosclerose na Infância e Adolescência, 2005). Considerando que os indivíduos dos dois genótipos são obesos e que não apresentam diferenças significativas nas demais variáveis analisadas, a mutação -116A pode ser sugerida como um marcador genético para hipertrigliceridemia em obesos.

AGRADECIMENTOS

Aos colegas do Laboratório de Polimorfismos e Ligação do setor de Genética da Universidade Federal do Paraná (UFPR), ao Núcleo de Pesquisa em Qualidade de Vida do departamento de Educação Física da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e ao Setor Nutricional da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR).

REFERÊNCIAS

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.

ALTAMIRANO, C. V,; BARTELS, C. F.; LOCKRIDGE, O. The Butyrylcholinesterase K-Variant Shows Similar Cellular Protein Turnover and Quaternary Interaction to the Wild-Type Enzyme. **Journal of Neurochemistry**, Vol. 74, No. 2, 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. **Biochemistry**, v. 29, p. 124-131, 1990.

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

FURTADO-ALLE, L.; ANDRADE, F.A.; NUNES, K.; MIKAMI, L.R.; SOUZA, L.R.L. E CHATAURD-FREIRE-MAIA, E.A. Association of variants of the −116 site of the butyrylcholinesterase *BCHE* gene to enzyme activity and body mass index. **Chem. Biol. Inter**.,175:115–118, 2008.

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

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. **I Diretriz de Prevenção da Aterosclerose na Infância e Adolescência**. Arquivos Brasileiros de Cardiologia. v. 85, p.1-36, 2005.

LAHIRI, D.K. e NURNBERGER JR., J. L. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Res.**, v. 19, p. 5444, 1991.

NAVAES, A. ; PASCHOAL, V. C. P. Regulação funcional da obesidade. **Conscientiae Saúde**, São Paulo, v.6, n1, p.189-1999, 2007.

NCBI - National Center for Biotechnology Information. **BCHE.** Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov. Acesso em: 02/11/2009

RANKINEN, T. et al. The Human Obesity Gene Map: The 2005 Update. **Obesity** Vol.14 No.4 April 2005.

RUBINSTEIN, H.M.; DIETZ, A.A.; LUBRANO, T. $E1^K$, Another quantitative variant at cholinesterase locus1. *J.* **Med. Genet**., v. 15, p. 27-29, 1978.

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

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

STATSOFT, Inc. **Statistica for Windows** (Computer program manual). Tulsa,1996. 1cd.

TINKER, L. F.; PATTERSON, R. E.; KRISTAL, A. R.; BOWEN, D. J.; KUNIYUKI, A.; HENRY, H.; SHATTUCK, A. Measurement Characteristics of 2 Different Self-Monitoring Tools Used in a Dietary Intervention Study. **Journal of American Dietetic Association**, v. 101, n. 9, 2001.

WESCOE, W. C.; HUNT, C. H.; RIKER, W. F.; LITT, I. C. Regeneration rates of serum cholinesterase in normal individuals and in patients with liver damage. **Am. J. Physiol**., v. 149, p. 549-551, 1947.

6 DISCUSSÃO GERAL

Este estudo buscou identificar variáveis da butirilcolinesterase que pudessem ter associação com a obesidade juvenil (através da genotipagem de SNPs, quantificação da atividade enzimática da BChE e da fenotipagem do loco *CHE2)* e os resultados encontrados permitiram verificar que a BChE está relacionada a algumas destas variáveis.

A média da atividade enzimática da butirilcolinesterase nos adolescentes obesos é significativamente mais alta que no grupo controle e que na população de Curitiba, mas após o programa multidisciplinar a atividade foi significativamente reduzida, tornando-se semelhante àquelas verificadas no grupo controle e na população de Curitiba. Também foram significativamente reduzidos IMC, triglicerídeos e circunferência abdominal. Como já sugerido por KÁLMÁN *et al*., 2004, o aumento na atividade da BChE pode ser consequência de distúrbios associados à obesidade, pois quando existe uma intervenção ocorre diminuição da atividade juntamente com IMC e triglicerídeos.

As correlações positivas verificadas entre atividade da BChE e IMC e entre colesterol LDL demonstram que, também na obesidade juvenil, a atividade da BChE está relacionada ao metabolismo de lipídios.

Embora a frequência do fenótipo CHE2 C5+ seja menor nos obesos, esta diferença não é significativa, diferindo de resultados de estudos anteriores com adultos obesos (CHAUTARD-FREIRE-MAIA *et al*., 1991; FURTADO-ALLE *et al*., 2008), nos quais o fenótipo CHE2 C5+ tem frequências estatisticamente menores em obesos. No presente estudo a falta de significância é provavelmente devida ao tamanho reduzido da amostra ou a um efeito diferente em adolescentes.

A ausência de aumento significativo na atividade da butirilcolinesterase em obesos com fenótipo CHE2 C5+ em relação a CHE2 C5- é provavelmente devido ao tamanho reduzido da amostra de obesos com fenótipo CHE2 C5+.

As amostras de obesos e não-obesos encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg para os dois SNPs analisados no presente estudo. Na análise da mutação K foi verificado que as frequências alélicas e genotípicas não diferem entre obesos, controles e população de Curitiba. Na análise da mutação -116 as frequências alélicas e genotípicas diferem nos adolescentes obesos e no grupo controle, e entre a amostra de obesos da população de Curitiba, tendo frequência significativamente menor no grupo de obesos.

Estudos anteriores não encontraram diferença significativa na frequência do alelo -116A em obesos adultos e em controles, mas encontraram maior média de IMC em

obesos portadores da mutação -116A do que em obesos portadores do alelo usual e atividade da BChE significativamente menor em obesos portadores da mutação -116A do que em homozigotos para o alelo usual (FURTADO-ALLE *et al*., 2008). No presente estudo, não há diferença significativa na média de IMC de obesos portadores ou não da mutação -116A, mas é importante ressaltar o número reduzido de obesos portadores desta mutação (N =8). No presente estudo, a média de atividade da BChE também é significativamente menor em obesos portadores da mutação -116A que em obesos com genótipo usual para este sítio.

7. CONCLUSÕES

- **PARCERIA – PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM EDUCAÇÃO FÍSICA**

O trabalho desenvolvido em conjunto com o Programa de Pós-Graduação em Educação Física, no Núcleo de Pesquisa em Qualidade de Vida da Universidade Federal do Paraná, permitiu uma troca eficaz de informações e um acompanhamento direto das coletas, análises e avaliações físicas multidisciplinares dos indivíduos.

- **FENOTOPAGEM DO LOCO *CHE2***

A frequência do fenótipo CHE2 C5+ é semelhante em obesos e controles, bem como em relação à população de Curitiba (não é significativo). Sendo assim, não existe diferença significativa na atividade da butirilcolinesterase em obesos com fenótipo CHE2 C5+ e CHE2 C5-.

- **ATIVIDADE DA BUTIRILCOLINESTERASE:**

A atividade da butirilcolinesterase está relacionada à obesidade juvenil e, assim como outras variáveis associadas, responde à prática de exercícios físicos e pode ser utilizada como um marcador secundário para os riscos associados à obesidade na adolescência. Mesmo possuindo tendência a normalização, deve-se considerar que a atividade da enzima não seja um fator de risco para a obesidade, porque existem outros fatores metabólicos envolvidos na sua regulação.

- **GENOTIPAGEM SNPs**

A menor frequência da mutação -116A em adolescentes obesos sugere um efeito protetor dessa variante no desenvolvimento de obesidade juvenil. Assim, adolescentes obesos portadores da mutação -116A tem atividade média da BChE significativamente menor e triglicerídeos significativamente mais elevados que obesos com genótipo usual e com valores considerados elevados se comparados com os valores de referência propostos para esta faixa etária de acordo com a Diretriz de Prevenção da Aterosclerose na Infância e Adolescência (2005). Considerando que os indivíduos dos dois genótipos são obesos e que não apresentam diferenças significativas nas demais variáveis analisadas, a mutação -116A pode ser sugerida como um marcador genético para hipertrigliceridemia em obesos.

- **ASPECTOS GERAIS**

Através de estatísticas mundiais podemos observar o crescente aumento nos casos de obesidade entre crianças e jovens em desenvolvimento e este estudo permitiu auxiliar na identificação de perfis genéticos de indivíduos, verificar que a BChE está relacionada a algumas das variáveis da obesidade, identificar as variações do gene BCHE que possuem associação com a obesidade juvenil e determinar a influencia da prática de atividade física no metabolismo.

Portanto, com as análises genéticas realizadas neste trabalho, foram reforçadas as hipóteses de associação da BChE com a obesidade e metabolismo de lipídios, mostrando que esta associação está presente também na obesidade juvenil.

8. REFERÊNCIAS

ABESO. Associação brasileira para o estudo da obesidade e da síndrome metabólica. **Diagnostico da obesidade infantil**. Disponível em: http://www.abeso.org.br. Acesso em: 11-04-2011.

ALCÂNTARA, V.M.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.; PICHETH, G.; VIEIRA, M.M. A method for serum cholinesterase phenotyping.**Rev. Bras. Genet**., Ribeirão Preto, v. 4, p.841-846, 1991.

ALCÂNTARA, V.M.; RODRIGUES, L.C.; OLIVEIRA, L.C. e CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Association of the *CHE2* locus with body mass index and butyrylcholinesterase activity. **Hum Biol**., v. 73, p. 587-595, 2001.

ALCÂNTARA, V.M.; OLIVEIRA, L.C.; RÉA, R.R.; SUPLICY, H.L. e CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Butyrylcholinesterase and obesity in individuals with the CHE2 C5+ and CHE2 C5- phenotypes. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.**, v.27, p. 1557-1564, 2003.

ALCÂNTARA, V.M.; OLIVEIRA, L.C.; RÉA, R.R.; SUPLICY, H.L. e CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Butyrylcholinesterase activity and metabolic syndrome in obese patients. **Clin. Chem. Lab. Med**., v. 43, p. 285-288, 2005.

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

ALTAMIRANO, C. V,; BARTELS, C. F.; LOCKRIDGE, O. The Butyrylcholinesterase K-Variant Shows Similar Cellular Protein Turnover and Quaternary Interaction to the Wild-Type Enzyme. **Journal of Neurochemistry**, Vol. 74, No. 2, p.869-877, 2000.

ALVES, H.S**. Variabilidade do gene BCHE em populações indígenas do Paraná**. Curitiba, 2009. 69f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

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

ASHWELL, M. E GIBSON, S. Waist to Height Ratio Is a Simple and Effective Obesity Screening Tool for Cardiovascular Risk Factors: Analysis of Data from the British National Diet and Nutrition Survey of Adults Aged 19-64 Years. v.2: p.97-103. **Obes Facts,** 2009.

BERRY, W.T.C.; COWIN, P.J. e DAVIS, D.R. A relationship between body fat and plasma pseudocholinesterase. **Brit. J. Nutr**., v. 8, p. 79-82, 1954.

BAR-OR, O. **Pediatric Sports Medicine for the Practitioner**. New York: Springer-Verlag, p. 315-338, 1983.

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

BOBERG, D. R. Furtado-Alle, L. R.;. Souza R. L. R e Chautard-Freire-Maia E. A. Molecular forms of butyrylcholinesterase and obesity. **Genetics and Molecular Biology Online Ahead of Print.** Received: October 20, 2009; Accepted: March 30, 2010.

CDC, CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION). **CDC Growth Charts: United States**: n.314, 2000.

CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.; VIEIRA, M.M.; PRIMO-PARMO, S.L. A expressividade do fenótipo CHE2 C5+ da butirilcolinesterase em relação a sexo e peso. ***Rev. Bras. Genet*.**, v. 14, supl., p. 149, 1991.

CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. **Relação entre os fenótipos do loco CHE2 da colinesterase do soro e o peso individual em duas amostras dos sul do Brasil**. Curitiba. 1989. f. 125. Tese (professor titular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

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

DIETZ, A. A.; RUBINSTEIN, H. M.; LUBRANO, T. E HODGES, L. K. Improved method for the differentiation of cholinesterase variants. **Am. J. Hum. Genet**., v. 24, p. 58-64, 1972.

DOS ANJOS, Luiz Antonio; VEIGA, Gloria Valeria de; CASTRO, Inês Rugani Ribeiro de. Distribuição dos valores do índice de massa corporal da população brasileira até 25 anos. **Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health.** v**.** 3(3), p. 164-173, 1998.

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

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

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

FURTADO-ALLE, L.; ANDRADE, F.A.; NUNES, K.; MIKAMI, L.R.; SOUZA, L.R.L. E CHATAURD-FREIRE-MAIA, E.A. Association of variants of the −116 site of the butyrylcholinesterase *BCHE* gene to enzyme activity and body mass index. **Chem. Biol. Inter**.,175:115–118, 2008.

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

GENELOC – Gene Location. **BCHE**. Disponível em: http://genecards.weizmann.ac.il/geneloc/index.shtml. Acesso em: 02/11/2009.

HARRIS, H.; HOPKINSON, D.A; ROBSON, E.B. Two-dimensional electrophoresis of pseudocholinesterase components in human serum. **Nature**, v.196, p. 1296-98, 1962.

HO SY, LAM TH, JANUS ED. Waist to stature ratio is more strongly associated with cardiovascular risk factors than other simple anthropometric indices. **Ann Epidemiol.** V.13(10): p.683-91, 2003.

IFIC, Foundation Media Guide on Food Safety and Nutrition. **Child & Adolescent Nutrition, Health and Physical Activity.** Disponível em http://www.ific.com.br. Acesso em: 19 out 2009.

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

KALNÁN, J. et al. Increased serum butyrylcholinesterase activity in type IIb hyperlipidaemic patients. **Life Sciences**: n 75 , p.1195–1204, 2004.

KUCZMARSKI, R.J.; OGDEN, C.L.; GUO, S.S.; GRUMMER-STRAWN, L.M., et al. **CDC growth charts**: United States. Advance data from vital and health statistics; n. 314. Hyattsville, Maryland: National Center for Health Statistics, 2000.

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

LAHIRI, D.K. e NURNBERGER JR., J. L. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Res.**, v. 19, p. 5444, 1991.

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

MASSON, P. Molecular heterogeneity of human plasma cholinesterase. In: Massoulié J. et al. *Cholinesterases:* Structure, Function, Mechanisms, Genetics and Cell Biology. *Washington:* ***American Chemical Society****,* p. 42-45, 1991.

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

NAVAES, A. ; PASCHOAL, V. C. P. Regulação funcional da obesidade. **Conscientiae Saúde**, São Paulo, v.6, n1, p.189-1999, 2007.

NCBI - National Center for Biotechnology Information. BCHE. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov. Acesso em: 02/11/2009

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**., New York, v. 32, p. 83-89, 1994.

POF. Pesquisa de Orçamentos Familiares – **Antropometria e Análise do Estado Nutricional de Crianças e Adolescentes no Brasil**, IBGE: 2002-2003.

POF. Pesquisa de Orçamentos Familiares – **Antropometria e Análise do Estado Nutricional de Crianças e Adolescentes no Brasil**, IBGE: 2008-2009.

PROTEIN DATA BASE. **BCHE**. Disponível em: http://www.pdb.org. Acesso em: 02//11//2009.

RANKINEN, T. et al. The Human Obesity Gene Map: The 2005 Update. **Obesity** Vol.14 No.4 April 2005.

ROBINSON, A.R.; ROBSON, M.; HARRISON, A.P.; ZUELZER, W.W. A new technique for differentiation of hemoglobin. **J. Lab. Clin. Med**., v. 50, p. 745-52, 1957.

ROMERO, C. E. M.; ZANESCO, A. O papel dos hormônios leptina e grelina na gênese da obesidade**. *Rev. Nutr.*** vol.19, n.1, pp. 85-91, 2006.

RUBINSTEIN, H.M.; DIETZ, A.A.; LUBRANO, T. $E1^K$, Another quantitative variant at cholinesterase locus1. *J.* **Med. Genet**., v. 15, p. 27-29, 1978.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. **I Diretriz de Prevenção da Aterosclerose na Infância e Adolescência**. Arquivos Brasileiros de Cardiologia. v. 85, p.1-36, 2005.

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

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

SOUZA, R.L.R. **Estudos sobre nova banda da butirilcolinesterase humana (C4/5) verificada em eletroforese**. Curitiba, 1995. Tese de Mestrado. Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná.

STATSOFT, Inc. **Statistica for Windows** (Computer program manual). Tulsa,1996. 1cd.

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

TANNER, J. M. Normal growth and techniques of growth assessment. **Clinics in Endocrinology and Metabolism**, v. 15, n. 3, p. 411-451, 1986.

TERRES *et al*., **Prevalência e fatores associados ao sobrepeso e à obesidade em adolescentes.** Rev Saúde Pública; v. 40, n.3, 2006.

TINKER, L. F.; PATTERSON, R. E.; KRISTAL, A. R.; BOWEN, D. J.; KUNIYUKI, A.; HENRY, H.; SHATTUCK, A. Measurement Characteristics of 2 Different Self-Monitoring Tools Used in a Dietary Intervention Study. **Journal of American Dietetic Association**, v. 101, n. 9, 2001.

VAN ROS, G.; VERVOORT, T. Frequencies of the "atypical" and C5 variants of serum cholinesterase in Zairians and Belgians. Detection of the C5 variant by agar gel electrophoresis with an acid buffer. **Ann. Soc. Belg. Med. Trop**., v. 53, p. 633-44, 1973.

VALONES M. A. A. *et al*. Principles and Applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fiels: a review. **Brazilian Journal of Microbiology.** v.40, p. 1-11, 2009

VIGITEL – Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. **Estimativas sobre frequência e distribuição sócio-demográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2008**. Ministério da Saúde: Brasília, 2008.

VIGITEL – Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônicos. **Estimativas sobre frequência e distribuição sócio-demográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2009.** Ministério da Saúde, 2009.

WESCOE, W. C.; HUNT, C. H.; RIKER, W. F.; LITT, I. C. Regeneration rates of serum cholinesterase in normal individuals and in patients with liver damage. **Am. J. Physiol**., v. 149, p. 549-551, 1947.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO/OMS). **BMI Classification.** Disponível em: http://www.who.int/en/. Acesso em: 18-10-2009.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO/OMS). **Obesity.** Disponível em: https://apps.who.int/infobase/. Acesso em: 18-01-2011.

9. DOCUMENTOS CONSULTADOS

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

BARTELS, C. F., JAMES, K. e LA DU, B.N. DNA Mutations associated with the human butyrylcholinesterase J-variant. **American Journal of Human Genetics**, v.50, p1104-1114, 1992(a).

BARTELS, C. F., JENSEN, F.S., LOCKRIDGE, O., VAN DER SPEK, A. F. L., RUBINSTEIN, H. M., LUBRANO, T. e LA DU, B. N. DNA Mutations associated with the human butyrylcholinesterase k-variant and its linkage to the atypical variant mutation and other polymorphic sites. **American Journal of Human Genetics**, v.50, p1086-1103, 1992(b).

BUDOWLE, B.; CHAKRABORTY, R.; GIUSTI. A.M.; EISENBERG, A.J.; ALLEN, R.C. Analysis of the VNTR locus DIS80 by the PCR followed by right-resolution PAGE. **Am. J. Hum. Genet**., Berlin, v.48, p. 137-144, 1991.

CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A. E SOUZA, R. L. R. **Butyrylcholinesterase - a still mysterious enzyme. In Fifty Years of Human Genetics. A Festschrift and liber amicorum to celebrate the life and work of George Robert Fraser. Edits. Oliver Mayo e Carolyn Leach.** Wakefield Press, Austrália, p. 584, 2007.

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

DANTAS, V. G. L. **Estudo de associação de variações dos genes BCHE (Butirilcolinesterase) e GHRL (Grelina) com obesidade**. Curitiba, 2008. 76f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

FURTADO, L. **Variabilidade genética da butirilcolinesterase e obesidade**. Tese de Doutorado. Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2005.

GOEDDE, H.W.; GEHRING, D.; HOFMAN, R.A. On the problem of a silent gene in pseudocholinesterase polymorphism. **Biochim. Biophys***. Acta*, v. 107, p. 391-93, 1965.

GARRY, P.J.; DIETZ, A.A.; LUBRANO, T.; FORD, P.C.; JAMES, K. e RUBINSTEIN, H.M. New allele at cholinesterase locus 1. J. **Med. Genet**., v. 13, p. 38-42, 1976.

HARRIS, H. **The principles of human biochemical genetics**. 3ª ed. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical, 1980, p. 171.

KUCZMARSKI, R.J.; OGDEN, C.L.; GUO, S.S.; GRUMMER-STRAWN, L.M., et al. **CDC growth charts**: United States. Advance data from vital and health statistics; n. 314. Hyattsville, Maryland: National Center for Health Statistics, 2000.

LEITE, N. Obesidade Infanto-juvenil: efeito da atividade física e da orientação nutricional sobre a resistência a insulina. **Tese de doutorado Universidade Federal do Paraná.** 2005.

LIDDELL, J.; LEHMANN, H.; SILK, E. A silent pseudocholinesterase gene. **Nature, Lond.**, v. 193, p. 561-62, 1962.

McGUIRE, M.C.; NOGUEIRA, C.P.; BARTELS, C.F.; LIGHTSTONE, H.; HAJRA, 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*., v. 86, p. 953-57, 1989.

NUNES, K. **Haplótipos do gene bche da butirilcolinesterase humana e aspectos evolutivos.** Curitiba, 2006. 152f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

PRIMO-PARMO, S.L. **Caracterização de nove alelos silenciosos novos da butirilcolinesterase humana a nível de ADN**. Curitiba, 1993. Tese de Doutorado. Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná.

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

10. APÊNDICE

A. Acompanhamento do Projeto pela equipe multidisciplinar: exercícios físicos, palestras e orientação

B. Avaliações Físicas Multidisciplinares realizadas

Avaliações Clínicas e Antropométricas: As avaliações clínica e puberal (TANNER, 1986) foram realizadas por médicos e avaliados o peso, estatura e circunferência abdominal (CA) e calculados o IMC-escore Z. A composição corporal foi avaliada pelo método de bioimpedância elétrica (BIA), com o aparelho Biodynamics® tetrapolar.

Avaliação da Aptidão Cardiorrespiratória: O condicionamento cardiorrespiratório foi avaliado em esteira (marca *Ecafix EG 700X*) utilizando o protocolo de Balke modificado (ROWLAND, VARZEUS, WALSH, 1991) e na bicicleta ergométrica com o protocolo de McMaster (BAR-OR, 1983). Foram mensurados: frequência cardíaca (FC), consumo de oxigênio ($VO_{2\ MÁX}$), volume de gás carbônico (VCO_2) e ventilação (VE), utilizando ergoespirômetro (*Parvo Medics MMS2400*, USA).

Determinação do Gasto Metabólico em Repouso (GRM): As mensurações do GMR foram realizadas pela manhã, durante 35 minutos, com o aparelho Deltatrac II®, no modo canópia (respiração espontânea), no indivíduo acordado após jejum de 10 - 12 horas e repouso de 30 minutos, determinados o $VO_{2\ MÁX}$ e o VCO_2.

Exames Laboratoriais: As amostras sanguíneas serão coletadas no período da manhã, após 12 horas de jejum, para realização de hemograma, dosagens de glicose (curva glicêmica de duas dosagens -1,75 g/kg e máx. de 75g), insulina, colesterol total (CT), lipoproteína de alta densidade (HDL-C), lipoproteína de baixa densidade (LDL-C), triglicérides (TG), adipocitocinas (IL-1, TNF-α, Leptina, Adiponectina), Ferritina Sérica, TSH e T4 livre.

Avaliação Nutricional: A nutrição foi avaliada por inquérito alimentar recordatório de 24 horas e o registro alimentar de três dias, validados pela *American Dietetic Association* (TINKER *et al.*, 2001).

C. Tabela das Análises Bioquímicas / Antropométricas, Atividade Enzimática e *CHE2* no grupo de obesos

A	N	S	ID.	IMC 1	IMC 2	CA 1	CA 2	P 1	P 2	Colest 1	Colest 2	Trigl 1	Trigl 2	LDL 1	LDL 2	HDL 1	HDL 2	Glic 1	Gli 2	ATIV.	ATIV. PÓS	*CHE2*
O1	1	F	14,6	27,33	27,039	88,4	86,3	63,4	62,8	134	137	93	59	84	85	31	40	96	104	4,79	3,59	C5-
O2	2	F	11,18	23,55		76,4		52		192		267		95		44		99		10,11		C5-
O3	3	M	11,25	22,04		102,3		51,2		164		67		95		56		95		7,25		C5-
O4	4	M	13	26,65		90,8		67,2		187		97		125		43		89,0		2,34		C5-
O5	5	F	12,8	29,22		98,2		78,3												5,26		C5-
O6	6	F	15,25	36,77		115,3		105,4		134		34		110		46		101		7,38		C5-
O7	7	M	12,25	26,93		94,5		65,8		167		139		99		40		85,0		7,14		C5-
O8	8	F	15,75	29,77		96,8		76,7		160		79		104		40		86		9,69		C5-
O9	9	F	14,25	26,07		82,5		67,4		108		48		64		34		76,0		7,85		C5-
O10	10	F	14,7	27,47		90,6		73,0		168		166		140		50		82,0		3,61		C5-
O11	11	F	12,65	29,46		98,6		80,5		140		100		84		36		99,0		12,81		C5-
O12	12	F	11,15	28,88		95,5		54,2		180		280		87		37		101,0		5,52		C5+
O13	13	F	13	24,12		78		58,4		140		105		72		47		82,0		3,13		C5-
O14	14	F	15,75	34,51		108,3		87,9		99		60		50		37		86,0		4,54		C5-
O15	15	M	15	23,50		78,8		71,4		171		59		103		56		96,0		4,10		C5-
O16	16	M	15,83	25,28		90,3		80,0		126		53		51		64		93,0		3,29		C5-
O17	17	M	12,9	33,76		103,6		77,9		112		72		41		57		87		7,04		C5-
O18	18	M	12,8	29,27		94,8		71,7		212		102		144		48		95,0		7,34		C5-
O19	20	M	13,3	23,78		87,8		70,2		206		126		126		55		79,0		11,12		C5-
O20	21	F	12,05	24,63		82,8		58,8		151		124		101		25		77,0		9,16		C5-
O21	22	M	12	25,60		91		59,3		216		162		126		58		92		3,00		C5-
O22	23	M	12,15	35,99		113,4		95,5												6,62		C5-
O23	24	M	15	28,86		100,8		89												3,49		C5+
O24	25	M	10,21	38,00		109,3		74,7		158		49		75		73		85		4,86		C5-
O25	26	M	14,82	35,65		116,3		99,9		123		62		70		41				6,88		C5-
O26	27	F	14	33,10		103,6		90		158		202		81		37				5,94		C5-
O27	28	M	15,28	28,47		94,2		89,9		197		115		124		50		98		7,46		C5-
O28	49	F	12,45	26,45		91,9		67,7		149		85		86		46		93		9,28		C5+
O29	50	M	14,5	31,96		104,1		99,0		165		232		85		34		99,0		5,31		C5-
O30	51	M	11,9	26,02		83,9		61,3		171		108		107		42		102,0		6,25		C5-
O31	52	M	15,08	26,42		92,5		72,2		137		70		90		33		85,0		6,61		C5-
O32	53	M		29,00		91,7		63,7												8,05		C5-
O33	54	F	15,75	31,89		91,7		78,9		150		51		103		35		89,0		5,31		C5+
O34	55	F	14,4	29,09		100,1		82,3		125		76		73		37		82,0		12,30		C5-
O35	56	M	14,75	29,19		99,9		78,7		148		133		79		42		102		27,50		C5-
O36	57	M	13,5	27,81	25,646	95,7	88,5	84,6	78,9	157	135	85	86	90	70	50	48	85	94	8,34	6,89	C5-
O37	58	M	12	22,51		78		48,9		143		41		95		40		85,0		5,50		C5-
O38	60	M	11,9	29,17		94,1		70		197		269		103		40		102		8,73		C5-

O39	61	F	12	29,18		91,5		71,2		154		92		91		45		88,0		15,53		C5-
O40	62	F	15,4	25,67	25,709	78,7	78,8	74,0	74,3	136	115	56	63	86	64	39	38	109,0	102,0	5,67	4,99	C5-
O41	63	F	11,3	24,67		89,5		67,4		194		131		123		45		97,0		8,21		C5-
O42	64	M	14,08	30,85		107,9		99,3												6,56		C5-
O43	65	F	15,25	32,24		111,2		95,7		232		101		167		47		86		14,42		C5-
O44	66	M	11,5	26,42	25,081	94,2	90,1	64,3	61,9	130	146	68	44	64	82	52	55	96	98	18,08	6,74	C5-
O45	67	F	12,3	34,03		107,3		94,9		182		238		100		34		84,0		9,80		C5-
O46	69	M	14,8	27,68		95,2		88,0		198		112		133		43		93,0		10,70		C5-
O47	70	M	10,25	23,78		81,3		51,8		146		209		70		34		94,0		6,86		C5-
O48	71	F	15	38,61		121,3		103,2		162		275		64		43		76,0		3,88		C5-
O49	72	M	12,4	29,96		102,8		71,7		102		89		39		45		89,0		11,37		C5+
O50	73	F	13,75	30,41		95,9		76,1		104		69		49		41		92,0		3,28		C5-
O51	74	F	13	24,22		86,3		70,5		158		269		67		37		83		4,66		C5-
O52	75	F	12	26,70		85,4		64,8		146		70		92		40		88		10,50		C5+
O53	76	M	10,5	31,08	28,50	98,9	91,9	69	64,9	163	139	167	47	88	81	42	49	94	89	10,30	6,13	C5-
O54	77	F	12,3	23,66		76,3		53,6		171		75		101		55		82,0		11,10		C5-
O55	78	F	13,25	27,97		95,2		66,6		160		116		92		45		97,0		14,71		C5-
O56	80	F	12,05	24,63		82,8		58,8		151		124		101		25		89,0		13,62		C5+
O57	81	M	13,8	25,71		88,7		67,8		132		41		76		48		93,0		8,43		C5-
O58	82	F	15,08	29,61		99,2		74,1		124		69		70		40		92,0		7,63		C5-
O59	83	M	10,25	29,67		102,3		66,5		164		67		95		56		95		5,91		C5-
O60	84	M	15,5	31,24		108,6		99,3		175		145		102		44		86,0		7,72		C5-
O61	85	F	15	25,72		88,9		73,9		139		79		75		48		86,0		3,28		C5-
O62	86	F	14,25	25,87		80,6		66,8		148				96		44		84,0		6,51		C5-
O63	87	F	13,75	40,14		113		98,3		170		140		100		42		81,0		2,99		C5-
O64	88	F	10,75	34,16		119,2		91,2		144		106		75		48		89,0		7,49		C5-
O65	89	F	13,75	27,43		90,7		71,2		198		84		135		46		100,0		9,91		C5-
O66	90	F	12,6	32,67		100,8		79,8		134		76		85		34		97,0		5,95		C5-
O67	91	F	16	30,93		100		89,5		123		56		70		42		92,0		5,40		C5-
O68	92	M	14,6	32,75		109,8		92,2		138		124		67		46		89		6,98		C5-
O69	93	F	14,6	27,33	27,039	88,4	86,3	63,4	62,8	134	137	93	59	84	85	31	40	96	104	7,60	6,61	C5-
O70	94	F	13,5	31,04		94,7		84,3		102		104		47		34		98		7,40		C5-
O71	95	M	12	27,36		91		67,0		143		81		85		42		111,0		9,57		C5-
O72	96	F	13,3	37,18		114,7		86,7		147		99		77		50		90		2,20		C5-
O73	98	M	11,3	28,43		99		74,8		144		185		71		36		94		6,85		C5-
O74	99	F	12,85	27,04		89,5		73		178		47		126		43		90		6,49		C5-
O75	100	F	12	26,84		83,8		62,0		216		293		111		46		92,0		3,49		C5-
O76	101	M	11,05	25,31	23,262	92,6	84,2	66,1	63,1	135	130	53	31	68	68	56	56	96	103	4,21	4,13	C5-
O77	102	M	12,25	26,55				70,1		110		111		59		29		86,0		2,47		C5-
O78	103	F	14,5	35,77	35,116	107,6	107	94,1	92,5	202	225	227	93	124	165	33	41	91	95	2,79	3,76	C5-
O79	105	F	13,75	30,41				76,1		104		69		49		41		92,0		6,15		C5-
O80	108	F	15,3	40,03	37,644	127,4	116,5	112,3	107	167	178	182	140	87	97	44	53	106	102	6,85	6,76	C5-

O81	109	F	10,5	30,60	30,228	96,9	94,8	68,2	70,3	139	141	92	73	77	78	44	48	93	98	8,43	4,30	C5-
O82	110	F	15,5	27,35		87,9		78,4		196	178	67	47	128	126	55	43	90	96	4,09	5,48	C5-
O83	111	M	14,8	30,38		106,3		82,6		131		56		76		44		96		5,39		C5-
O84	112	M	14,75	26,17		91,3		77,7		147		62		91		44		97		5,62		C5-
O85	114	F	15,08	28,12		96,4		67,2		137		49		85		42		65,0		11,70		C5-
O86	115	M	12,1	25,57		96		59,3		121		45		72		40		80,0		17,87		C5-
O87	116	F	12,3	33,35		109,2		95,7		212		97		152		41		79,0		15,19		C5-
O88	121	F	13	31,47		108		83,6		182		282		82,6		41		95		6,71		C5-
O89	122	M	10	25,54	25,991	84,1	83,9	44,5	46,6	172	170	128	115	91,4	108	55	39	89	81	11,26	4,18	C5-
O90	123	F	12	27,22		89,5		65,4		162		155		83		48		80		5,86		C5-
O91	124	M	13	30,51		100,5		85,1		168		171		89,8		44		71		7,20		C5-
O92	125	M	13	36,79		115,3		102,6		150		174		71,2		44		100		8,49		C5-
O93	126	M	10	28,44	29,227	90	95	59,8	62,3	86	115	118	75	26,4	69	36	31	82	99	5,10	4,62	C5-
O94	127	M	10	25,25		74,4		47,4		84		68		22,4		37		74		6,94		C5-
O95	128	M	11	30,49		93,1		67,7		154		109		94,2		38		82		7,70		C5-
O96	129	M	12	39,22		124		104,2		181		156		110		39		79		8,16		C5-
O97	130	M	12	28,51		92,1		68,5		224		316		123,8		37		102		11,18		C5-
O98	131	F	11	27,03	26,665	95	92	60	59,2	141	156	106	122	70,8	92,6	49	39	84	87	8,77	5,97	C5-
O99	132	M	12	32,09		92,1		72,2		158		64		92,5		50		86		4,91		C5-
O100	133	F	14	29,32	28,361	102,5	99	73,2	70,8	159	163	53	34	85,4	96,2	63	60	95	97	3,66	3,52	C5-
O101	134	M	10	25,59	24,664	84,3	80,1	51,6	52	148	135	110	135	82	95,8	44	32	87	83	5,35	5,03	C5-
O102	136	M	11	37,48	37,305	110,2	109	91,2	95,5	201	212	138	84	123,4	154,2	50	41	83	82	7,30	5,20	C5-
O103	137	F	12	29,85		103,5		88,3		173		171		97,8		41		80		4,49		C5-
O104	139	M	14	44,45		120,2		114,8		250		194		167		44		114		7,72		C5-
O105	140	F	9	25,90		93		51,5		177		119		114,2		39		87		5,89		C5-
O106	141	M	15	48,64		123,5		115,2		232		95		55		55		103		3,59		C5-
O107	146	M	12	32,37		106,1		86		207		282		112,6		38		84		10,20		C5-
O108	147	F	14	26,04	25,279	104	102	72,7	70,5	216	214	88	94	142,4	128,2	56	67	82	86	5,73	5,59	C5+
O109	148	M	16	35,86	33,292	110,8	108,9	109,2	104	166	153	104	82	106,2	86,6	39	50	84	81	7,90	4,25	C5-
O110	149	F	11	29,34		104		70,5		142		75		89		38		75		6,00		C5-
O111	151	F	10	26,00	25,301	83	84	51,7	52,1	161	181	172	142	87,6	101,6	39	51	95	89	10,28	6,78	C5-
O112	152	M	11	26,44		83,5		51,9		187		99		103,2		64		97		7,78		C5-
O113	153	M	13	35,03	35,268	107	105,1	92,5	95,9	130	144	55	90	71	72	48	54	88	93	9,85	4,94	C5-
O114	155	F	10	34,31	34,024	107,5	108	83,5	82,8	167	149	94	73	114,2	86,4	34	48	97	87	6,10	4,07	C5-
O115	156	M	11	31,24				67,5		155		307		51,9		41,7		75,8		5,74		C5-
O116	157	M	11	26,88	26,459	94	96	71,6	70,3	123	134	41	33	62,8	81,4	52	46	90	84	6,13	13,04	C5-
O117	158	F	11	23,84	23,841	85,5	84	54	53,7	171	158	76	51	107,8	89,8	48	58	83	91	7,57	3,73	C5-
O118	160	M	10	23,39	22,464	85	83,6	46,5	46	147	135	150	85	70	77	47	41	84	80	7,75	6,37	C5-

NOTA: As siglas da tabela representam: A: Amostra; N: Numeração; S: sexo: (F-Feminino / M-Masculino); ID: idade; IMC: índice de massa corporal, CA: circunferência abdominal; P: peso; COLEST: colesterol total; TRIGL: triglicérides; LDL: colesterol LDL; HDL: colesterol HDL; GLIC: glicose; ATIV: atividade enzimática BChE; *CHE2*: loco CHE2 (C5+ ou C5-). Os valores 1 e 2 indicam respectivamente antes dos exercícios e após os exercícios.

11. ANEXOS

Métodos Detalhados

A) Modificações no método de LAHIRI & NURNBERGER, 1991.

A técnica de extração de DNA pelo método de Lahiri e Nurnberger consiste na separação, a partir do sangue periférico, do creme de leucócitos de onde será extraído DNA. São coletados 10 mL de sangue em EDTA e o creme de leucócitos, acrescido de suspensão de hemácias, e estocado a -20 ^{0}C. Desse material descongelado será retirado o creme de leucócitos, ressuspendido em 10 mL de TKM1 (Tris-HCl 0,01 M pH 7,6; KCl 0,01 M; $MgCl_2$ 0,01 M; EDTA 0,002M) e 125 µL de IGEPAL CA-630. Após centrifugar a 2500 rpm por 15-20 minutos, despreza-se o sobrenadante e completa-se novamente para 10 mL com TKM1. Repete-se a centrifugação e a ressuspensão em TKM1 até que o precipitado fique bem claro.

Após ressuspensão delicada do precipitado, são adicionados 800 µL de TKM2 (Tris-HCl 0,01 M pH7,6; KCl 0,01 M; $MgCl_2$ 0,01 M; EDTA 0,002 M; NaCl 0,4 M) agitando-se bem. Adiciona-se 50 µL de SDS 10% e mistura. Incubar em banho-maria a 55℃ durante a noite.

Retirar do banho-maria e adicionar 300 µL de NaCl saturado (6 M) e misturar bem. Centrifugar a 1200 rpm por 10-20 minutos, passar o sobrenadante para um tubo de ensaio e adicionar dois volumes de etanol 100%, gelado, tampar o tubo com parafilme e invertê-lo várias vezes (delicadamente) até precipitar o DNA. Pescar o DNA utilizando micropipeta com ponteira de ponta cortada e colocar em tubo de 1,5 mL.

Lavar o DNA obtido com etanol 70%, dispensando posteriormente o álcool. O tubo é mantido semi-aberto na estufa a 37℃, até ev aporar todo o álcool. Ressuspender o DNA em 200 µL de tampão TE (Tris HCl pH8,0 0,01 M e EDTA pH 8,0 0,001 M) e deixar no banho-maria a 55℃ por uma hora. Após três dias na geladeira, verificar a densidade ótica e congelar.

B) Medida de atividade da BChE pelo método de DIETZ *et al*. (1972), modificado por EVANS e WROE (1978) .

A medida da atividade é feita em espectrofotômetro devidamente ajustado em 410 nm, usando reagentes mantidos em banho-maria a 25℃ .

O tampão fosfato 0,1 M utilizado na reação (pH 7,6) é preparado pela mistura de duas soluções “a” e “b” até a obtenção do pH adequado. A solução “a” contém 4,73 g de Na_2HPO_4 anidro (PM = 141,96) em 1000 mL de água destilada. A solução “b” contém 13,61 g de KH_2PO_4 anidro (PM = 136,09) em 1000 mL de água destilada. O DTNB (0,423 mM) é dissolvido em tampão fosfato na proporção de 167g por 1000 mL. O substrato (propioniltiocolina 100 mM) é preparado com 303 mg de iodeto de propioniltiocolina (PM = 303,2) em 10 mL de água destilada.

Os tubos contendo 2,2 mL de tampão-DTNB, e 0,25 mL de soro (1/100 em água destilada) devem ser mantidos por três minutos no banho-maria a 25℃ antes da leitura em espectrofotômetro. Após os três minutos deve ser adicionado 0,05 mL de substrato e iniciada a leitura. A primeira leitura, chamada A0, deve ser efetuada imediatamente após a colocação dos reagentes na cubeta termostatizada do espectrofotômetro. As leituras A1, A2 e A3 são efetuadas com um, dois e três minutos a partir da leitura A0. Após as quatro leituras, deve ser calculado o Δ/minuto (variação de absorbância por minuto). Para a obtenção da atividade (KU/L), Δ/minuto é multiplicado pelo fator 73,53 e por dividido por 1.000.

C) Fenotipagem do loco *CHE2* pelo método de ROBINSON *et al.* (1957) com modificações de VAN ROS E VERVOORT (1973) e FADEL PICHETH (1991) e SOUZA (1995).

O gel de ágar é preparado com uma solução de Bacto ágar (Difco) a 1,4% p/v em tampão citrato de sódio, pH 6,38 (solução estoque de tampão citrato de sódio 50 mM, pH 6,7; pH ajustado com ácido cítrico 1,56 M). Esta solução é aquecida por cerca de quinze minutos ou até que o ágar seja totalmente dissolvido, sendo importante não deixar a solução ferver. Após o aquecimento a solução é vertida sobre uma placa de vidro de 230 x 160 mm. O gel deve resfriar completamente e então ser colocado na geladeira e mantido em repouso por pelo menos 12 horas a fim de diminuir o efeito da eletroendosmose. Após esse período de repouso as amostras de plasma são aplicadas no gel através da extremidade de uma lâmina de metal (5 x 5 x 0,1 mm) onde é colocado 1,5 µL de plasma ou soro. A placa contendo as amostras é então submetida à eletroforese com tampão citrato pH em torno de 6,7 nas cubas, por três horas e meia (a 4℃; 75 V e 35 mA). Após a corrida eletroforética d espeja-se sobre a placa o cromógeno-substrato que deve ser preparado imediatamente antes do uso. A solução cromógeno-substrato é preparada utilizando-se Fast Red TR Salt (SIGMA F-2768) a 0,1% p/v em tampão fosfato de sódio pH 7,1 (670 mL de Na2HPO4, 0,2 M e 330 mL de NaH2PO4, 0,2 M) e solução de α-naftilacetato 30 mM (2,5% v/v). A placa com o cromógeno-substrato deve ser incubada por uma hora a 37℃. Após a revel ação das bandas a placa é lavada com água para retirar o excesso de corante. O gel é então colocado entre uma folha de papel cartão e uma folha de papel filtro, prensado entre duas placas de vidro e levado à estufa a 37℃ até completa secagem.