

ISABELA MAYÁ WAYHS SILVA

ATIVIDADE RELATIVA DAS FORMAS MOLECULARES DA  
BUTIRILCOLINESTERASE EM ADOLESCENTES OBESOS

Curitiba 2011

ISABELA MAYÁ WAYHS SILVA

ATIVIDADE RELATIVA DAS FORMAS MOLECULARES DA  
BUTIRILCOLINESTERASE EM ADOLESCENTES OBESOS

Monografia entregue ao Departamento  
de Genética – UFPR, como requisito  
parcial para obtenção de grau de  
Bacharel em Ciências Biológicas.

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

Co-orientadora: Dellyana R. Boberg

Curitiba 2011

## DEDICATÓRIA

à minha avó Neusa

## RESUMO

A butirilcolinesterase (BChE) é uma esterase sérica codificada pelo gene *BCHE* e sintetizada no fígado. Sua função fisiológica ainda não foi completamente esclarecida, porém, evidências a correlacionam ao metabolismo de lipídeos e obesidade. A BChE plasmática pode ter estrutura de monômero, dímero, trímero, tetrâmero e/ou associada a outras substâncias como à albumina. As intensidades relativas das formas moleculares da BChE (G4, G2, G1-alb e G1), obtidas através de eletroforese em gel de poliacrilamida e da sua quantificação pelo programa *KODAK 1D Image Analysis Software*, foram a base de estudo nesse trabalho. A amostra constou de 68 adolescentes obesos submetidos à 12 semanas de exercícios físicos, sendo as coletas de sangue realizadas antes e após o término das 12 semanas. Apesar de não haver diferença significativa entre a frequência de ausência de bandas apresentadas nas amostras pré e pós-exercício, observa-se uma tendência de aumento da frequência de ausência nas amostras pós-exercício. Este resultado está em conformidade com o obtido por Boberg (2008). Com relação ao comportamento conjunto das bandas, foi obtida uma correlação negativa entre G4 e as demais bandas (G2, G1-alb e G1), tanto com as amostras pré-exercício quanto com as pós. Esse comportamento de correlação obtido se deve, provavelmente, ao fato de as formas moleculares G1, G2 e G4 serem parcialmente interconvertíveis, sendo possível que as formas G1 e G2 sejam precursoras e/ou produtos da degradação de G4.

## ABSTRACT

The butyrylcholinesterase (BChE) is a serum esterase encoded by the *BChE* gene and synthesized in the liver. Its physiological function has not been fully clarified, however, evidences correlate it to various aspects such as lipid metabolism and obesity. The BChE can be present in plasma as a monomer, dimer, trimer, tetramer and / or associated with other substances such as albumin. The relative intensities of the molecular forms of BChE (G4, G2, G1 and G1-alb), obtained by polyacrylamide gel electrophoresis and by its quantification in the KODAK 1D Image Analysis Software program, were the grounding of study in this work. The sample consisted of 68 obese adolescents who were subjected to 12 weeks of physical exercise, and had their blood samples taken before and after the end of the 12 weeks. Although there is no significant difference between the frequency of absence of bands presented in the samples before and after the exercises, an increasing trend of absence can be observed in the samples after exercises. This result is consistent with that obtained by Boberg (2008). Regarding the joint behavior of the bands, a negative correlation was obtained between G4 and the other bands (G2, G1 and G1-alb) either with the samples before and post exercise. This correlation behavior obtained is probably due to the fact that the molecular forms G1, G2 and G4 are partially interconvertible, or rather, G1 and G2 forms are precursors and / or degradation products of G4.

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. REAGENTES UTILIZADOS NO PREPARO DAS DUAS CONCENTRAÇÕES DO GEL PARA ELETROFORESE .....	18
TABELA 2. REAGENTES QUE COMPÕEM A SOLUÇÃO DE COLORAÇÃO DO GEL PARA DETECÇÃO DAS BANDAS DA BUTIRILCOLINESTERASE .....	19
TABELA 3. FREQUÊNCIAS DE AMOSTRAS PRÉ E PÓS-EXERCÍCIO NAS QUAIS NÃO FORAM DETECTADAS UMA OU MAIS DAS BANDAS G1, G1-ALB E G2 DA BUTIRILCOLINESTERASE .....	22
TABELA 4. MÉDIAS (M) $\pm$ DESVIOS PADRÕES (DP) DAS INTENSIDADES RELATIVAS DAS BANDAS G4, G2, G1-ALB E G1 DA BUTIRILCOLINESTERASE EM AMOSTRAS PRÉ E PÓS-EXERCÍCIO COM RESULTADOS DE TESTES t E F E SEUS RESPECTIVOS VALORES DE $p$ .....	23
TABELA 5. DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA EM RELAÇÃO À INTENSIDADE RELATIVA DA BANDA G4 DA BUTIRILCOLINESTERASE	23
TABELA 6. DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA EM RELAÇÃO À INTENSIDADE RELATIVA DA BANDA G2 DA BUTIRILCOLINESTERASE	24
TABELA 7. DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA EM RELAÇÃO À INTENSIDADE RELATIVA DA BANDA G1-alb DA BUTIRILCOLINESTERASE .....	25
TABELA 8. DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA EM RELAÇÃO À INTENSIDADE RELATIVA DA BANDA G1 DA BUTIRILCOLINESTERASE	25
TABELA 9. COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO (r) ENTRE AS INTENSIDADES RELATIVAS DAS BANDAS DA BUTIRILCOLINESTERASE DAS AMOSTRAS PRÉ-EXERCÍCIO .....	26
TABELA 10. COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO (r) ENTRE AS INTENSIDADES RELATIVAS DAS BANDAS DA BUTIRILCOLINESTERASE DAS AMOSTRAS PÓS-EXERCÍCIO .....	27
TABELA 11. COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO (r) ENTRE AS INTENSIDADES RELATIVAS DAS BANDAS DA BUTIRILCOLINESTERASE DAS AMOSTRAS PRÉ E PÓS-EXERCÍCIO ...	27

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. DESENHO ESQUEMÁTICO DO GEL DE POLIACRILAMIDA COM 2 GRADIENTES DE CONCENTRAÇÃO .....	18
FIGURA 2. GEL DE POLIACRILAMIDA MOSTRANDO TRÊS AMOSTRAS APÓS COLORAÇÃO, COM CINCO BANDAS DA BUTIRILCOLINESTERASE INDICADAS .....	20
FIGURA 3. IMAGEM CAPTADA DO PROGRAMA <i>KODAK</i> , MOSTRANDO A CAIXA DE DIÁLOGO <i>ADJUST LANES</i> E AO FUNDO O GEL A SER ANALISADO .....	21
FIGURA 4. IMAGEM CAPTADA DO PROGRAMA <i>KODAK</i> , MOSTRANDO A DELIMITAÇÃO DAS BANDAS PARA ANÁLISE .....	21
FIGURA 5. DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA EM RELAÇÃO À INTENSIDADE RELATIVA DA BANDA G4 DA BUTIRILCOLINESTERASE .....	24
FIGURA 6. DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA EM RELAÇÃO À INTENSIDADE RELATIVA DA BANDA G2 DA BUTIRILCOLINESTERASE .....	24
FIGURA 7. DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA EM RELAÇÃO À INTENSIDADE RELATIVA DA BANDA G1-alb DA BUTIRILCOLINESTERASE .....	25
FIGURA 8. DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA EM RELAÇÃO À INTENSIDADE RELATIVA DA BANDA G1 DA BUTIRILCOLINESTERASE .....	26

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	10
1.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	10
1.2	GENE <i>BChE</i> .....	10
1.3	FORMAS VARIANTES DA BChE .....	11
1.4	FORMAS MOLECULARES DA BChE .....	12
1.5	OBESIDADE .....	13
1.6	RELAÇÃO DA BChE COM OBESIDADE E IMC .....	15
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	16
2.1	GERAL .....	16
2.2	ESPECÍFICOS .....	16
<b>3.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	17
3.1	AMOSTRA .....	17
3.2	METODOLOGIA .....	17
3.2.1	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida para a Detecção das Bandas G4, G2, G1-alb e G1 .....	17
3.2.2	Preparação dos Géis .....	17
3.2.3	Preparação das Amostras .....	19
3.2.4	Coloração dos Géis .....	19
3.2.5	Análise de Densitometria Ótica pelo Programa <i>Kodak 1d Image Analysis Software</i> .....	20
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	22
4.1	ANÁLISE DAS BANDAS G4, G2, G1-alb E G1 DA BUTIRILCOLINESTERASE NOS ADOLESCENTES OBESOS ANTES E APÓS EXERCÍCIO FÍSICO .....	22
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	28
5.1	AVALIAÇÃO DA AUSÊNCIA DE UMA OU MAIS BANDAS DA BUTIRILCOLINESTERASE .....	28
5.2	AVALIAÇÃO CONJUNTA DAS MÉDIAS DAS INTENSIDADES RELATIVAS DE G4, G2, G1-alb E G1, DA DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DESSAS INTENSIDADES E DA CORRELAÇÃO ENTRE AS BANDAS .....	29
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	31
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	32



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A enzima butirilcolinesterase (BChE) é uma esterase sérica produzida no fígado e amplamente distribuída pelo organismo em regiões como fígado, pele, massa branca do cérebro, músculo liso gastrintestinal, glândulas exócrinas e endócrinas e plasma (RANG; DALE; RITTER, 2001). Embora possua uma ampla distribuição no organismo, suas funções fisiológicas ainda não são completamente conhecidas.

Devido à sua similaridade com a enzima acetilcolinesterase (outra esterase, responsável pela hidrólise de acetilcolina) e a resultados obtidos através de análises filogenéticas, supõe-se que essas duas enzimas tenham se originado de um precursor comum (cuja função era hidrolisar a acetilcolina) por duplicação gênica após o surgimento do sistema colinérgico na linhagem dos deuterostômios (CHATONNET; LOCKRIDGE, 1989; ARPAGAUS *et al.*, 1990).

A capacidade da BChE de hidrolisar inúmeros ésteres de colina utilizando a butirilcolina como substrato preferencial é bem conhecida (WHITTAKER, 1980), no entanto o seu substrato natural ainda é uma incógnita.

Existem evidências que relacionam a butirilcolinesterase a diversos fatores como a co-regulação da neurotransmissão colinérgica (DARVESH *et al.*, 1998), a regulação da proliferação celular durante o desenvolvimento do sistema nervoso (DARVESH *et al.*, 2003), a risco de acidentes cardiovasculares, à síndrome metabólica (VALLE *et al.*, 2008), ao metabolismo de lipídios e, conseqüentemente, ao Índice de Massa Corporal e a obesidade (ALCÂNTARA *et al.*, 2005) e a proteção contra agentes tóxicos neurais como os organofosforados (CHILUKURI *et al.*, 2008).

### 1.2 GENE *BCHE*

O gene *BCHE* está localizado no braço longo do cromossomo 3 (3q26.1-q26.2) e tem aproximadamente de 64.559 pb distribuídos desde o início do exon 1 até o sítio CA de poliadenilação (NCBI, *on-line*, 2011). Possui quatro exons, o exon 1, com 149 pb, contém as seqüências não traduzidas e dois

sítios potenciais de início de tradução nos códons -69 e -47. O exon 2, com 1.525 pb, contém 83% da seqüência codificadora da proteína madura. O exon 3 com 167 pb, também possui parte da seqüência codificadora da proteína madura. O exon 4, com 603 pb, possui as seqüências que codificam a extremidade C-terminal da proteína e a região 3' não traduzida com dois sinais de poliadenilação .

O gene *BCHE* humano não possui elemento TATA *box* ou CAAT, o elemento iniciador do gene *BCHE* é caracterizado por uma seqüência rica em pirimidinas (5'Pi-PiC*APiPiPiPi*-3') (JBILO *et al.*, 1994).

Alterações nos nucleotídeos deste gene são responsáveis pela formação de formas variantes da butirilcolinesterase, que podem ser caracterizadas por mudanças como: diminuição da atividade da BChE e redução das formas enzimáticas circulantes.

### 1.3 FORMAS VARIANTES DA BChE

A variabilidade genética da enzima butirilcolinesterase começou a ser revelada na década de 50. A primeira enzima variante descrita (atípica, *D70G*) foi verificada em indivíduos que diferiam na capacidade de hidrolisar a succinilcolina, um relaxante muscular. Pacientes com essa forma não-usual da enzima apresentam menor eficiência na hidrólise desse relaxante, levando-os a enfrentar um período de apnéia prolongado devido ao relaxamento da musculatura respiratória (KALOW; GENEST, 1957). A freqüência do alelo *D70G* foi estimada em cerca de 2% nas populações caucasóides (MCGUIRE *et al.*, 1989). Atualmente a identificação das variantes é efetuada por análise do DNA, e mais de 70 variantes já foram descritas.

Outros importantes alelos identificados foram: *A539T*, *T243M*, *G390V*, *E497V*, *V142M*, *D70G*.

O alelo *A539T* resulta de uma mutação de ponto no exon 4 e dá origem a variante não usual mais freqüente na população, considerando as mutações não sinônimas, que não afetam a quantidade de enzima circulante e nem a atividade da BChE (ALTAMIRANO *et al.*, 2000). A variante resistente ao fluoreto, detectada por inibição enzimática, mostrou-se, mais tarde,

heterogênea, sendo causada por duas mutações de ponto distintas no exon 2, resultando nas variantes *T243M* e *G390V* (HARRIS; WHITTAKER, 1961).

O alelo *E497V* caracteriza uma redução de 66% na quantidade de enzima circulante e é resultado de uma mutação de ponto no exon 3 (GARRY *et al.*, 1976). *V142M* resulta de uma mutação de ponto rara que ocorre no exon 2 e caracteriza uma redução de 90% na quantidade de enzima circulante (WHITTAKER e BRITTEN, 1987). *D70G* caracteriza a variante atípica, com afinidade reduzida por ésteres de colina e que resulta de uma mutação de ponto no exon 2.

Existem também variantes consideradas como silenciosas, com atividade enzimática inferior a 10% em relação à enzima usual, além polimorfismos descritos fora da região codificadora da enzima madura, como a variante no sítio -116 no exon 1 descrita por Bartels *et al.* (1990), associada a uma diminuição da atividade da BChE (FURTADO-ALLE e cols., 2008).

#### 1.4 FORMAS MOLECULARES DA BChE

A BChE pode apresentar-se no plasma de variadas formas moleculares, sendo as principais, descritas por Harris *et al.* (1962),  $C_1$ ,  $C_2$ ,  $C_3$ ,  $C_4$  e  $C_5$ , respectivamente: monômero, monômero ligado à albumina, dímero, tetrâmero e o tetrâmero ligado a uma substância ainda desconhecida. A classificação se dá em ordem decrescente de acordo com a mobilidade eletroforética de cada forma.

As formas moleculares podem ser obtidas através de diferentes metodologias laboratoriais, como: eletroforese, método de eluição da BChE por tampões salinos, através da separação das formas moleculares de amostras de tecido em colunas iônicas e métodos de centrifugação com gradiente de densidade.

O maior número de formas moleculares da BChE foi encontrado por Juul (1968), que determinou a presença no soro de 12 bandas eletroforéticas. Como já se conhecem quatro formas homólogas (monômero, dímero, trímero e tetrâmero), conclui-se que as outras oito sejam formas heterólogas. Três dessas formas heterólogas já foram estudadas: o complexo do monômero associado à albumina ( $C_2$ ); o tetrâmero ligado a uma substância ainda não

identificada codificada pelo gene *CHE2*, formando o complexo C<sub>5</sub>, ambos descritos por Harris *et al.* (1962) e a forma C<sub>4/5</sub>, descrita por Souza *et al.* (2003), na qual a BChE está ligada à substância ainda não determinada.

Existe outra nomenclatura da BChE, proposta por Masson (1991), que se baseia na estrutura molecular e não na mobilidade eletroforética da enzima. Esta nomenclatura é fundamentada de acordo com o número de subunidades monoméricas e no fato de as formas serem globulares. As designações são: G1, G2, G4 e G1-alb, sendo a primeira correspondente a forma C<sub>1</sub>, globular monomérica, a segunda correspondente ao dímero C<sub>3</sub>, a terceira equivalente ao tetrâmero C<sub>4</sub>, e a última equivalente à forma C<sub>2</sub>, globular monomérica ligada à albumina. Essa será a nomenclatura adotada nesse trabalho.

O monômero G1 possui peso molecular de cerca de 90.000 Da, movendo-se mais rapidamente em eletroforese em gel de poliacrilamida, seguido pelo conjunto monômero ligado à albumina, pelo dímero, formado pela união de monômeros por uma ligação dissulfeto (LOCKRIDGE *et al.*, 1987) e pelo tetrâmero, forma mais abundante no plasma e com peso molecular de aproximadamente 340.000 Da. O tetrâmero é formado por quatro subunidades idênticas arranjadas na forma de dois dímeros, cada um desses formado por dois monômeros unidos por uma ponte dissulfeto, cuja função é dar estabilidade à molécula (LOCKRIDGE *et al.*, 1979; LOCKRIDGE; LA DU, 1982). Os dímeros, por sua vez, são hidrofobicamente ligados para formar o tetrâmero.

As formas moleculares G1, G2 e G4 são parcialmente interconvertíveis, e é possível que as formas G1 e G2 sejam precursoras e/ou produtos da degradação de G4 (LA MOTTA *et al.*, 1968; MASSON, 1979).

## 1.5 OBESIDADE

A obesidade é considerada uma epidemia mundial. A prevalência do excesso de peso aumentou mais do que o dobro desde 1980. Tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento, sem diferenças étnicas, sociais e de faixa etária (JANSEN *et al.* 2005). Em 2008, 1,5 bilhões de adultos (com 20 anos ou mais) estavam acima do peso. Destes, aproximadamente 200 milhões

de homens e 300 milhões de mulheres eram obesos (World Health Organization).

No Brasil, segundo a Pesquisa de Antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil, realizada em 2008-09 pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), uma em cada três crianças de cinco a nove anos estava acima do peso recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e, com relação a população adulta, o excesso de peso em homens saltou de 18,5% (1974-75) para 50,1%, ultrapassando o das mulheres que foi de 28,7% para 48%.

A obesidade é uma enfermidade caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal, associado à problemas de saúde. A forma mais utilizada e recomendada pela OMS para classificar o sobrepeso e a obesidade em adultos, se baseia no Índice de Massa Corporal, obtido pela razão entre o peso em quilogramas e o quadrado da altura em metros, com  $IMC > 25$  definindo sobrepeso,  $IMC \geq 30$  definindo obesidade e  $IMC \geq 40$  definido como obesidade mórbida. No entanto, pelo fato de a faixa de normalidade para IMC ser bastante ampla, tem-se utilizado em conjunto com o IMC, o Índice de Relação Cintura-Quadril, que avalia o risco metabólico associado ao sobrepeso. Esse índice é obtido pela divisão da circunferência da cintura abdominal pela circunferência do quadril do paciente. De uma forma geral, aceita-se que existam riscos metabólicos quando a relação cintura-quadril seja maior do que 0,9 no homem e 0,8 na mulher (ABC DA SAÚDE, 2011).

Esse acúmulo excessivo de gordura corporal se deve a um desequilíbrio energético, causado pelo aumento do consumo de calorias e a diminuição do gasto calórico. A relação entre ingestão e gasto de energia é mantida pela homeostase, porém, essa atua de forma mais eficiente para aumentar o volume de massa adiposa e, conseqüentemente prevenir a perda de peso. Aliado a isso está a tendência de redução na prática de atividade física e o aumento no consumo de comidas altamente calóricas e ricas em gordura, sal e açúcar, nestes dois últimos séculos.

A importância genética na etiologia da obesidade tem sido foco de pesquisas no mundo inteiro, porém, por esta ser uma doença de natureza complexa, ainda não existe um consenso a esse respeito. Sabe-se que os genes de suscetibilidade à obesidade não são necessariamente requeridos

para o desenvolvimento dessa doença, no entanto, estes podem aumentar o risco de sua manifestação, principalmente se aliado à maus hábitos alimentares e ao sedentarismo (ABC DA SAÚDE, 2011).

A obesidade é fator de risco para uma série de doenças ou distúrbios como: hipertensão arterial, doenças cardiovasculares, diabetes mellitus tipo II, câncer, osteoartrite, distúrbios lipídico, intolerância à glicose, apnéia do sono, entre outros (World health organization), e é, sem dúvida, um grande problema da sociedade moderna e globalizada.

## 1.6 RELAÇÃO DA BChE COM OBESIDADE E IMC

Kutty (1980) correlacionou positivamente a atividade da BChE com distúrbios associados ao metabolismo anormal de lipídeos, como obesidade por exemplo. Chautard-Freire-Maia *et al.* (1991), Alcântara *et al.* (1999; 2001a; 2003) e Cipriani *et al.* (1999) encontraram correlação entre a atividade de formas heterólogas da BChE com peso e IMC.

Indivíduos de fenótipo CHE2 C5+ apresentam, em média, menor peso e menor IMC quando comparados a seus controles CHE2 C5-. Como o complexo C5 determina um aumento da atividade da BChE, sugere-se que esse aumento é que leva a uma menor estocagem de gordura (Alcântara, 2001). Observou-se também que obesos de fenótipo CHE2 C5+, tem uma facilidade maior para perder peso que os obesos de fenótipo CHE2 C5- (Alcântara, 2003). Porém, ao avaliar a atividade da BChE em indivíduos obesos e não obesos de fenótipo CHE2 C5-, verificou-se que os obesos apresentavam uma atividade média da BChE maior que os não obesos.

Os indivíduos obesos apresentam em média menor frequência e menor atividade relativa de G1-alb, quando comparados aos não obesos. Esses resultados foram justificados devido aos altos níveis de ácidos graxos livres no sangue de obesos, a maioria dos quais ligados à albumina (Alcântara e Cipriani, 1999).

## **2. OBJETIVOS**

### 2.1 GERAL

Estudar as intensidades relativas das formas moleculares da butirilcolinesterase presentes no plasma dos adolescentes obesos antes e após uma intervenção de 12 semanas de exercícios físicos.

### 2.2 ESPECÍFICOS

1. Estimar a intensidade relativa, presença e ausência das bandas G1, G1-alb, G2 e G4 da BChE em adolescentes obesos antes e após tratamento físico multidisciplinar.
2. Comparar amostras pré-exercício e pós-exercício quanto à frequência e média das intensidades relativas das bandas acima mencionadas
3. Verificar os coeficientes de correlação entre as bandas da BChE em adolescentes obesos antes e após tratamento físico multidisciplinar.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 AMOSTRA**

Foram utilizadas 68 amostras de plasma, sendo 34 delas coletadas pré-exercício e 34 pós-exercício, de adolescentes obesos com idade entre 10 e 16 anos da cidade de Curitiba-PR.

Todos os indivíduos foram submetidos a um programa de tratamento físico multidisciplinar, com a realização de coletas de sangue antes e após 12 semanas do programa de exercícios. Os exercícios constaram de atividades aeróbias (caminhada, ciclismo, alongamento e natação).

Para a realização desse programa, todos os pacientes tiveram que apresentar inicialmente um Índice de Massa Corporal (IMC) acima do percentil 95, peso estável em um período maior ou igual a dois meses e ausência de uso de medicamentos anorexígenos ou outros que pudessem interferir no controle de peso.

As coletas foram realizadas pelo Núcleo de Pesquisa em Qualidade de Vida do departamento de Educação Física da Universidade Federal do Paraná no ano de 2010 após a obtenção do Termo de Consentimento dos pais ou responsáveis.

O plasma das 68 amostras já havia sido separado pelo método centrifugação por 15 minutos a 2500 rpm.

#### **3.2 METODOLOGIA**

##### **3.2.1 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida para a Detecção das Bandas G4, G2, G1- alb e G1.**

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada seguindo o protocolo adaptado por Boberg (2008), com base no padronizado por Sambrook *et al.* (1989).

##### **3.2.2 Preparação dos Géis**



O gel contém dois gradientes de densidade, um gel de alinhamento com concentração equivalente a 5% e um gel de separação com concentração de 7%.

O gel de separação é colocado primeiro entre as placas, separadas por espaçadores de 0,8 mm. Logo em seguida coloca-se uma fina camada de álcool butílico e deixa-se polimerizar por 30 minutos. Após o término dos 30 minutos, coloca-se o gel de alinhamento, deixado para polimerizar por 20 minutos (Figura 1). A placa de gel, então, é deixada em repouso por aproximadamente 24 horas em local refrigerado.

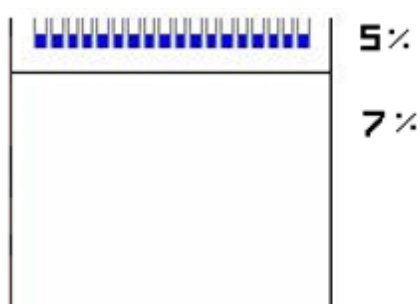


FIGURA 1. ESQUEMA DO GEL DE POLIACRILAMIDA COM 2 GRADIENTES DE CONCENTRAÇÃO

Fonte:Boberg (2008)

Os reagentes utilizados no preparo de cada um dos géis estão exibidos na tabela 1. A solução utilizada de poliacrilamida (30%) era composta por 29 g de acrilamida, 1 g de bisacrilamida e água destilada em quantidade suficiente para completar 100 ml.

TABELA 1. REAGENTES UTILIZADOS NO PREPARO DAS DUAS CONCENTRAÇÕES DO GEL PARA ELETROFORESE

Reagentes	Concentrações do gel	
	5%	7%
	ml	ml
Poliacrilamida 29:1	1,70	5,80
Água Destilada	6,20	14,00
TBE 5X	2,00	5,00
Persulfato de amônia 10%	0,25	0,25
TEMED	0,03	0,03

Fonte: a autora

### 3.2.3 Preparação das Amostras

As amostras aplicadas em cada poço continham 5 $\mu$ L de plasma e 7 $\mu$ L de azul de bromofenol. Após a aplicação realiza-se a corrida eletroforética por 8 horas, com uma tensão de 100 V e corrente de 20 mA. O tampão de corrida utilizado na cuba foi o TBE 1X.

### 3.2.4 Coloração dos Géis

Após a corrida, o gel é retirado dentre as placas e colocado em um recipiente de tamanho adequando e previamente umedecido com água destilada para que o gel não grude. Em seguida é colocada a solução de coloração até cobrir o gel, que é, posteriormente, incubado a uma temperatura de 37 °C na estufa por 30 a 40 minutos. Os reagentes utilizados na solução de coloração estão descritos na tabela 2.

TABELA 2. REAGENTES QUE COMPÕEM A SOLUÇÃO DE COLORAÇÃO DO GEL PARA DETECÇÃO DAS BANDAS DA BUTIRILCOLINESTERASE

Fast Red TR	150 mg
Tampão Fosfato pH 7,1	60 ml
Solução de acetato de $\alpha$ -naftil	2,1 ml

Fonte: a autora

Durante o processo de coloração, a butirilcolinesterase do plasma hidrolisa o acetato de  $\alpha$ -naftil formando alfanaftol e ácido acético. O  $\alpha$ -naftol, por sua vez, reage com o sal do Fast Red TR, produzindo uma coloração avermelhada e revelando as bandas referentes às formas moleculares da BChE no gel, como mostrado na Figura 2.

Ao término da incubação o gel é colocado entre duas folhas de transparência e em seguida é feita uma cópia do gel no *Scanner*. O registro é arquivado no computador no formato tiff, para posterior análise pelo programa *KODAK1D Image Analysis Software*.

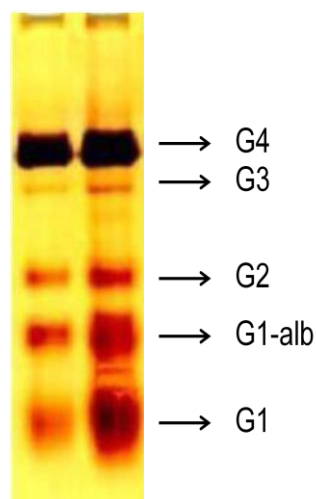


FIGURA 2. GEL DE POLIACRILAMIDA MOSTRANDO TRÊS AMOSTRAS APÓS COLORAÇÃO, COM CINCO BANDAS DA BUTIRILCOLINESTERASE INDICADAS.

Fonte: Adaptado de Boberg (2008)

### 3.2.5 Análise de Densitometria Ótica Pelo Programa *Kodak 1D Image Analysis Software*

Foram realizados ajustes no programa a fim de se obter melhores resultados com as análises de densitometria ótica. Na caixa de diálogo de Ajuste de Linhas (*Adjust Lanes*; Figura 3) selecionou-se o modo automático, no qual o próprio programa capta o número de amostras do gel e cria um número de linhas correspondente a esse valor. O tipo de linha selecionado foi o da linha reta.

Foi necessário ajustar manualmente a posição das linhas, para que estas correspondessem à região em que todas as bandas a serem analisadas estivessem melhor definidas.

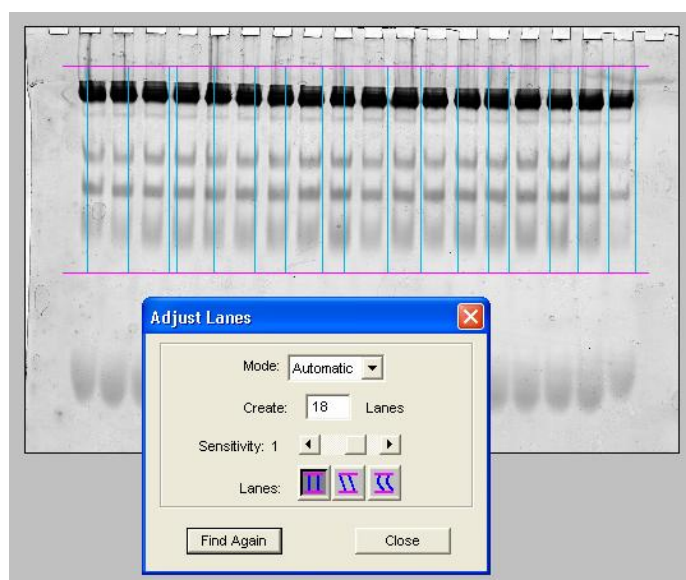


FIGURA 3. IMAGEM CAPTADA DO PROGRAMA *KODAK*, MOSTRANDO A CAIXA DE DIÁLOGO *ADJUST LANES* E AO FUNDO O GEL A SER ANALISADO.

Fonte: Boberg (2008)

Em seguida, com um aumento maior, as bandas foram definidas através do uso da ferramenta Ajuste de Bandas (*Adjust Bands*) e, posteriormente, ajustadas e delimitadas manualmente (retângulos vermelhos – Figura 4) para possibilitar a análise da intensidade relativa de cada banda pelo programa.

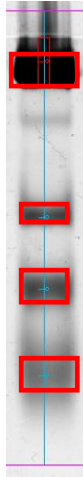


FIGURA 4 - IMAGEM CAPTADA DO PROGRAMA *KODAK*, MOSTRANDO A DELIMITAÇÃO DAS BANDAS PARA ANÁLISE.

Fonte: Adaptado de Boberg (2008)

## 4.RESULTADOS

### 4.1 ANÁLISE DAS BANDAS G4, G2, G1-alb E G1 DA BUTIRILCOLINESTERASE EM ADOLESCENTES OBESOS ANTES E APÓS-EXERCÍCIO FÍSICO

A frequência de ausência de bandas apresentadas nas amostras pré e pós-exercício, assim como os seus valores  $p$ , obtidos pelo teste exato de Fischer-bi-caudal, que tem a finalidade de verificar se houve diferenças antes e após os exercícios físicos, são mostrados na Tabela 3. Como critério geral, amostras com ausência da banda G4 foram excluídas previamente das análises. Os grupos não apresentaram diferença significativa entre eles.

TABELA 3. FREQUÊNCIA DE AMOSTRAS PRÉ E PÓS-EXERCÍCIO NAS QUAIS NÃO FORAM DETECTADAS UMA OU MAIS DAS BANDAS G1, G1-ALB E G2 DA BUTIRILCOLINESTERASE

	Ausência de banda <sup>a</sup>						
	G1		G1-alb		G2		Total
	N	%	N	%	N	%	%
Pré-exercício (N= 34)	3	8,82	0	0,00	1	2,94	11,76
Pós-exercício (N= 34)	4	11,76	3	8,82	3	8,82	29,40
$p$	=1		= 0.239		= 0.614		=0,132

a  $\leq 0,003$  de intensidade relativa

Fonte: a autora

As médias ( $\pm$  DP) das intensidades relativas das quatro bandas estudadas (G1, G1-alb, G4 e G2), antes e após o programa de exercício físico, juntamente com os resultados de comparação das médias (teste  $t$ ) e das variâncias (teste F) estão exibidas na Tabela 4. Não houve diferença significativa entre as médias de cada banda e entre as variâncias.

TABELA 4. MÉDIAS (M) ± DESVIOS PADRÕES (DP) DAS INTENSIDADES RELATIVAS DAS BANDAS G4, G2, G1-ALB E G1 DA BUTIRILCOLINESTERASE EM AMOSRTRAS PRÉ E PÓS-EXERCÍCIO COM RESULTADOS DE TESTES t E F E SEUS RESPECTIVOS VALORES DE  $p$

	Pré-exercício		Pós-exercício		t(p)		F(p)	
	N	M ± DP	N	M ± DP				
G4	34	0,677 ± 0,190	34	0,717 ± 0,176	-0,941	(0,350)	0,250	(0,619)
G2	34	0,127 ± 0,088	34	0,105 ± 0,076	1,252	(0,215)	0,543	(0,464)
G1-alb	34	0,103 ± 0,087	34	0,102 ± 0,081	0,353	(0,725)	0,005	(0,946)
G1	34	0,093 ± 0,080	34	0,083 ± 0,075	0,227	(0,821)	0,801	(0,374)

Fonte: a autora

A distribuição de freqüência, nas amostras pré e pós-exercícios, de acordo com a intensidade relativa das bandas G4, G2, G1-alb e G1, respectivamente, está exibida nas Tabelas de número 5, 6, 7 e 8. Nas Figuras 1, 2, 3 e 4 estão as representações gráficas desses resultados.

Nessa distribuição, os valores máximos e mínimos encontrados para cada banda, antes e após-exercício físico foram: para G4, 0.97/0.17 e 1.0/0.42, para G2, 0.38/0.00 e 0.32/0.00, para G1-alb, 0.33/0.01 e 0.33/0.00 e para G1, 0.24/0.00 e 0.29/0.00, respectivamente.

TABELA 5. DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA EM RELAÇÃO À INTENSIDADE RELATIVA DA BANDA G4 DA BUTIRILCOLINESTERASE

Intensidade relativa da banda G4	Pré-exercício		Pós-exercício	
	N	%	N	%
0,0 < x ≤ 0,2	1	2,94	0	0,00
0,2 < x ≤ 0,4	2	5,88	0	0,00
0,4 < x ≤ 0,6	7	20,59	12	35,29
0,6 < x ≤ 0,8	15	44,12	10	29,41
0,8 < x ≤ 1,0	9	26,47	12	35,29
Total	34	100	34	100

Fonte: a autora

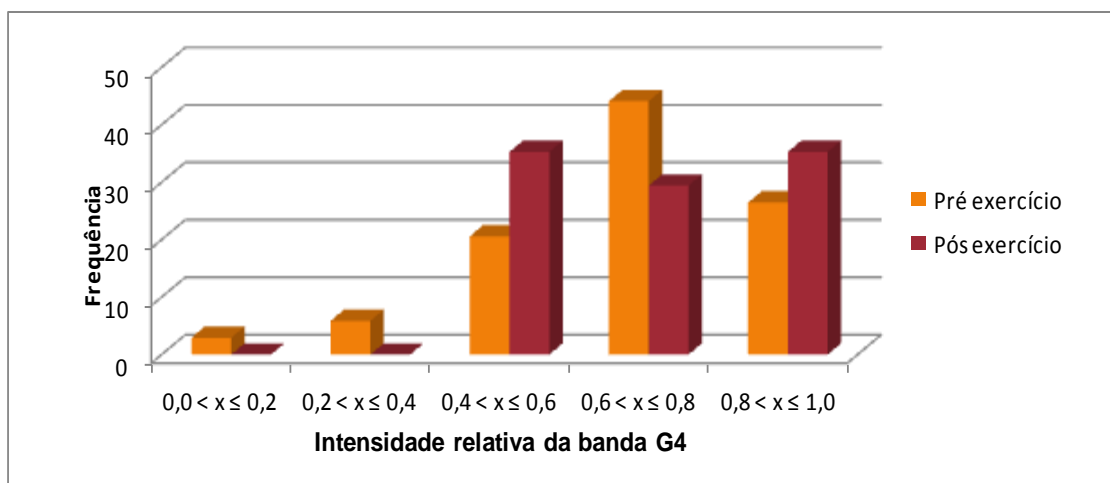


Figura 5. Distribuição de frequência em relação à intensidade relativa da banda G4 da butirilcolinesterase

TABELA 6. DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA EM RELAÇÃO À INTENSIDADE RELATIVA DA BANDA G2 DA BUTIRILCOLINESTERASE

Intensidade relativa da banda G2	Pré-exercício		Pós-exercício	
	N	%	N	%
0,0 ≤ x ≤ 0,1	15	44,12	15	44,12
0,1 < x ≤ 0,2	13	38,24	15	44,12
0,2 < x ≤ 0,3	4	11,76	3	8,82
0,3 < x ≤ 0,4	2	5,88	1	2,94
Total	34	100	34	100

Fonte: a autora

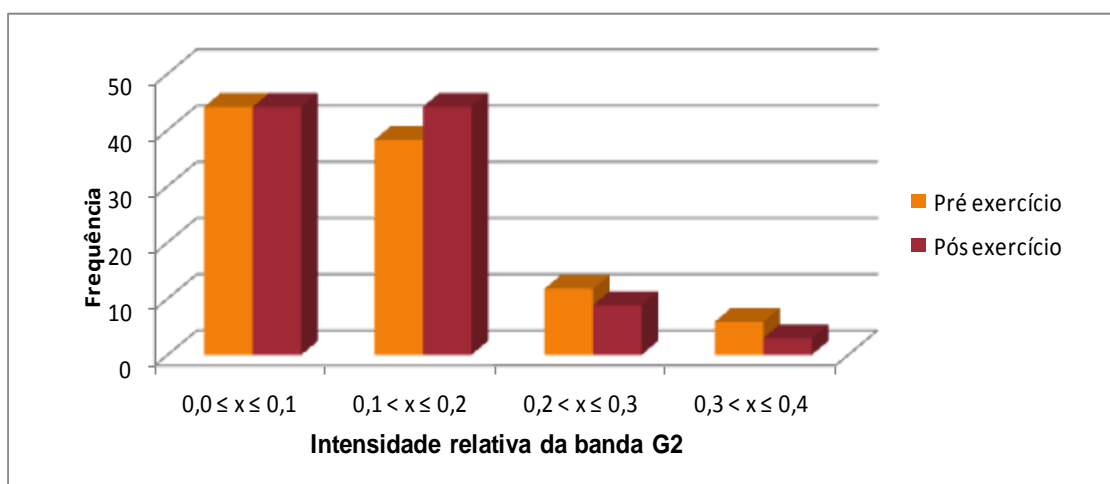


Figura 6. Distribuição de frequência em relação à intensidade relativa da banda G2 da butirilcolinesterase



TABELA 7. DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA EM RELAÇÃO À INTENSIDADE RELATIVA DA BANDA G1-alb DA BUTIRILCOLINESTERASE

Intensidade relativa da banda G1-alb	Pré-exercício		Pós-exercício	
	N	%	N	%
$0,0 \leq x \leq 0,1$	20	58,82	19	55,88
$0,1 < x \leq 0,2$	9	26,47	10	29,41
$0,2 < x \leq 0,3$	2	5,88	3	8,82
$0,3 < x \leq 0,4$	3	8,82	2	5,88
Total	34	100	34	100

Fonte: a autora

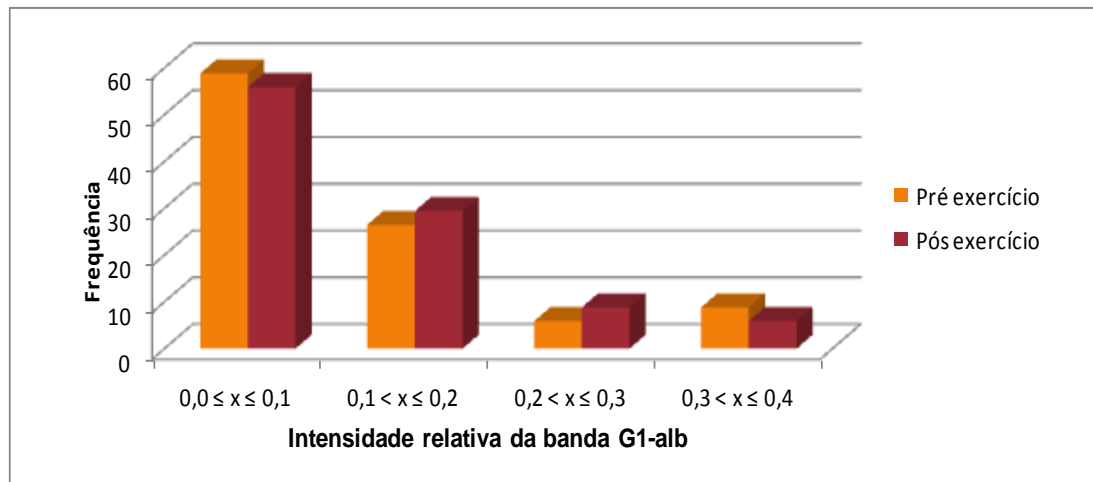


Figura 7. Distribuição de frequência em relação à intensidade relativa da banda G1-alb da butirilcolinesterase

TABELA 8. DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA EM RELAÇÃO À INTENSIDADE RELATIVA DA BANDA G1 DA BUTIRILCOLINESTERASE

Intensidade relativa da banda G1	Pré-exercício		Pós-exercício	
	N	%	N	%
$0,0 \leq x \leq 0,1$	19	55,88	21	61,76
$0,1 < x \leq 0,2$	12	35,29	9	26,47
$0,2 < x \leq 0,3$	3	8,82	4	11,76
$0,3 < x \leq 0,4$	0	0,00	0	0,00
Total	34	100	34	100

Fonte: a autora

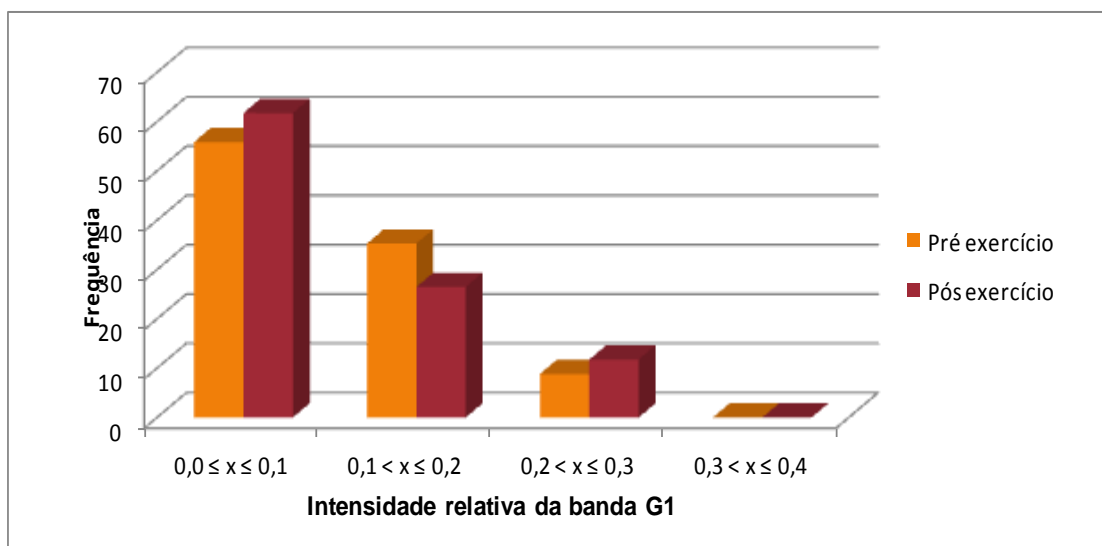


Figura 8. Distribuição de frequência em relação à intensidade relativa da banda G1 da butirilcolinesterase

O comportamento conjunto das bandas estudadas nos pacientes obesos (antes e após-exercício) foi analisado com o uso de correlação simples. Os valores resultantes e seus respectivos valores de  $p$  estão apresentados nas Tabelas 9, 10 e 11.

TABELA 9. COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO ( $r$ ) ENTRE AS INTENSIDADES RELATIVAS DAS BANDAS DA BUTIRILCOLINESTERASE DAS AMOSTRAS PRÉ-EXERCÍCIO

Pré-exercício	Pré-exercício		
	G2 ( $p$ )	G1-alb ( $p$ )	G1( $p$ )
G4	-0,822	-0,900	-0,617
G2		0,685	0,170
G1-alb			0,390

Fonte: a autora

TABELA 10. COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO ( $r$ ) ENTRE AS INTENSIDADES RELATIVAS DAS BANDAS DA BUTIRILCOLINESTERASE DAS AMOSTRAS PÓS-EXERCÍCIO

Pós-exercício	Pós-exercício		
	G2 ( $p$ )	G1-alb ( $p$ )	G1( $p$ )
G4	-0,835	-0,853	-0,522
G2		0,805	0,086
G1-alb			0,092

Fonte: a autora

TABELA 11. COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO (r) ENTRE AS INTENSIDADES RELATIVAS DAS BANDAS DA BUTIRILCOLINESTERASE DAS AMOSTRAS PRÉ E PÓS-

Pré-exercício	Pós-exercício		
	G2 (p)	G1-alb (p)	G1(p)
G4	-0,498	-0,473	0,006
G2		0,166	0,022
G1-alb			-0,056

Fonte: a autora

A correlação entre as bandas antes dos exercícios físicos se mostrou, no geral, semelhante à encontrada após os exercícios. A tendência foi de correlação negativa entre G4 e as demais bandas (G2, G1-alb e G1) e positiva entre G2 e G1-alb. A exceção se deu entre a correlação de G1-alb com G1, que apresentou um valor significativo na correlação entre as intensidades relativas pré exercício, e não significativo entre as pós-exercício. Com relação à correlação feita entre as bandas pré e pós-exercício, os valores significativos encontrados foram apenas entre G4, G2 e G1-alb, seguindo a tendência de correlação negativa entre a banda G4 e as outras duas bandas apresentadas.

## 5. DISCUSSÃO

A discussão será feita em duas etapas. Na primeira etapa será discutida a frequência de adolescentes obesos, antes e após os exercícios físicos, que apresentaram ausência de uma ou mais bandas; na segunda, o enfoque será sobre a avaliação conjunta das médias das intensidades relativas das quatro bandas (G4, G2, G1-alb e G1) antes e após os exercícios, bem como da distribuição de frequência, nas amostras pré e pós-exercícios, de acordo com a intensidade relativa de cada banda e da correlação entre as intensidades relativas de cada banda, pré e pós-exercício.

### 5.1 AVALIAÇÃO DA AUSÊNCIA DE UMA OU MAIS BANDAS DA BUTIRILCOLINESTERASE

A frequência de adolescentes obesos que apresentaram ausência de pelo menos uma das bandas da BChE (G2, G1 e G1-alb) antes da realização dos exercícios físicos, foi de 11,76 %, sendo que a frequência maior de ausência se encontra na banda G1. No plasma coletado após os exercícios físicos a frequência de adolescentes obesos que apresentaram ausência de pelo uma das bandas foi de 29,40 %, sendo a frequência maior de ausência encontrada também na banda G1.

Não houve diferença significativa entre a frequência de ausência de bandas apresentadas nas amostras pré e pós-exercício, o que provavelmente se deve ao pequeno tamanho da amostra. Porém, observa-se uma tendência de aumento da frequência de ausência de bandas nas amostras pós-exercício físico. Esta tendência está em conformidade com o resultado obtido por Boberg (2008), no qual a não detecção de uma das bandas foi observada com menor frequência em obesos e com maior frequência no grupo controle, com IMC normal, o que permite inferir que as 12 semanas de exercício físico levaram a uma aproximação da normalização fisiológica da BChE.

Não foi possível verificar se os exercícios físicos foram suficientes para reduzir a frequência de ausência da banda G1-alb, correlacionada positivamente com a obesidade (Alcântara e Cipriani, 1999), o que se deve, possivelmente, ao pequeno tamanho da amostra.

## 5.2 AVALIAÇÃO CONJUNTA DAS MÉDIAS DAS INTENSIDADES RELATIVAS DE G4, G2, G1-ALB E G1, DA DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA E DA CORRELAÇÃO ENTRE AS INTENSIDADES RELATIVAS DE CADA BANDA, PRÉ E PÓS-EXERCÍCIO

As correlações entre as intensidades relativas das bandas G4, G2, G1-alb e G1 nas amostras pré-exercício mostraram uma correlação negativa significativa entre G4 e as demais bandas (G2, G1-alb e G1) e positiva entre G2 e G1-alb e entre G1-alb e G1. O mesmo padrão e com valores semelhantes foi encontrado nas correlações entre as intensidades relativas de cada banda nas amostras pós-exercício, com exceção de G1-alb e G1 que apresentaram correlação positiva não significativa.

Na correlação abrangendo as intensidades relativas de cada banda pré e pós-exercício, apesar da correlação negativa entre a banda G4 e as bandas G2 e G1- alb ter sido mantida, esta apresentou um valor menor, tanto com relação a G2, quanto com G1-alb.

A correlação negativa entre a banda G4 e as bandas G2 e G1-alb também foi encontrada no trabalho de Boberg (2008), tanto nos obesos quanto nos indivíduos com IMC normal, o que, juntamente com a correlação positiva entre G2 e G1-alb encontrada nesse trabalho, condiz com a sugestão de que as formas moleculares G1, G2 e G4 sejam parcialmente interconvertíveis e com a possibilidade de que as formas G1 e G2 sejam precursoras e/ou produtos da degradação de G4 (LA MOTTA *et al.*, 1968; MASSON, 1979).

Não houve diferença significativa entre as médias das intensidades relativas pré e pós-exercício de cada banda, o que condiz com a sugestão de que as suas intensidades relativas sejam reguladas pelo organismo de forma a se manter a proporção entre as mesmas frente a diferentes fatores como obesidade e genótipo ( BOBERG *et al.*, 2010).

## 6. CONCLUSÃO

- A realização das 12 semanas de exercícios físicos levaram a uma possível normalização fisiológica da BChE .
- A proporção entre as médias das intensidades relativas de cada banda pré e pós-exercício é mantida constante pelo organismo frente a variações como a obesidade.
- As formas moleculares G1, G2 e G4 são parcialmente interconvertíveis, como sugere a literatura (LA MOTTA *et al.*,1968; MASSON, 1979).

## REFERÊNCIAS

ABC DA SAÚDE. Obesidade. <http://www.abcdasaude.com.br/artigo.php?303>, acesso em 12/ 09/ 2011.

ALCÂNTARA, V. M.; CIPRIANI, T.; RÉA, R.; SUPLICY, H.; CHAUTARD-FREIREMAIA, E. A. Formas moleculares da butirilcolinesterase (BChE) e índice de massa corporal (IMC). *Genet. Mol. Biol.* 22 (supl.): 213, 1999.

ALCÂNTARA, V. M.; CIPRIANI, T.; RÉA R; SUPLICY, H.; CHAUTARD-FREIREMAIA, E. A. Deficiência do complexo butirilcolinesterase: albumina associada com fatores de risco para doença arterial coronariana em obesos. **Revista Brasileira de Análises Clínicas** (supl.), vol. 33(2), 2001a.

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

ALCÂNTARA, V. M.; OLIVEIRA, L. C.; RÉA, R. R.; SUPLICY, H. L.; CHAUTARDFREIRE-MAIA, E. A. Butyrylcholinesterase activity and metabolic syndrome in obese patients. **Clin. Chem. Lab. Med.** v. 43(3), p 285-288, 2005.

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

ARPAGAUS, M.; KOTT, S.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**, Washington, v.29, n.1, p.124-131, 1989

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

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. **FORMAS MOLECULARES DA BUTIRILCOLINESTERASE**

**E OBESIDADE.** Tese de mestrado. Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2008. Disponível em:  
<<http://genetica.bio.ufpr.br/posgraduacao/index.html>>

BOBERG, D. et al. Molecular forms of butyrylcholinesterase and obesity. *Genetics and Molecular Biology*, Curitiba, v 33, n 3, p. 452-454, 2010.

CHATONNET, A.; LOCKRIDGE, O. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *The Biochemical Journal*, Londres, v.260, n.3, p.625-634, 1989.

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

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

CIPRIANI, T. R.; ALCÂNTARA, V. M.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A. Estudo das diferentes bandas da BChE com relação ao índice de nutrição. In: **Evento de Iniciação Científica da UFPR**, VII, Curitiba, 1999.

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

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

FURTADO, L. **Variabilidade genética da butirilcolinesterase e obesidade.** Tese de Doutorado. Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2005. Disponível em:  
<http://genetica.bio.ufpr.br/posgraduacao/index.htm>>

FURTADO, L.; NUNES, K.; MIKAMI, L.; SOUZA, R. L. R.; CHAUTARD-FREIREMAIA, E. A. Association of the -116A variant of the *BCHE* gene to lower mean butyrylcholinesterase activity. **Chem.-Biol. Interact**, 2008

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



HARRIS, H.; WHITTAKER, M. Differential inhibition of human serum cholinesterase with fluoride: recognition of two new phenotypes. *Nature*, v.29, p.496-498, 1961

HARRIS, H.; HOPKINSON, D.A.; ROBSON, E.B. Two-dimensional electrophoresis of pseudocholinesterase components in normal human serum. *Nature*, v.29, p.1296-1298, 1962

JANSSEN, I.; KATZMARZYK, P.; BOYCE, W.; VEREECKEN, C.; MULVIHILL, C.; ROBERTS, C.; THE HEALTH BEHAVIOUR IN SCHOOL-AGED CHILDREN OBESITY WORKING GROUP. Comparison of overweight and obesity prevalence in school-aged youth from 34 countries and their relationships with physical activity and dietary patterns. *Obes Rev*, 6(2):123–32, 2005

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

JUUL, P. Human plasma cholinesterase isoenzymes. *Clin. Chim. Acta*, v. 19, p.205-13, 1968.

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

KODAK 1D IMAGE ANALYSIS SOFTWARE, versão 3.5, 2000.

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

LA MOTA, R. V.; MCCOMB, R. B.; NOLL J R.; WETSTONE, H. J.; EINFRAK, R.F. Multiples forms of serum cholinesterase. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 124, p. 299-308, 1968.

LOCKRIDGE, O.; ECKERSON, H.W.; LA DU, B.N. Interchain disulfide bonds and subunits organization in human serum cholinesterase. *J.Biol.Chem.*, v.10, p.8324-8330, 1979

LOCKRIDGE, O.; LA DU, B.N. Loss of the interchain disulfide peptide and dissociation of the tetramer following proteolysis of native human serum cholinesterase. *J. Biol. Chem.*, v. 257, p. 12012-12018, 1982.

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

MASSON, P. Formes moléculaires multiples de la butyrylcholinesterase du plasma humain. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 578, p. 493-504, 1979.

MASSON, P. Molecular heterogeneity of human plasma cholinesterase. **In Massoulié j. et al. cholinesterases: structure, function, mechanisms, genetics and cell biology.** eds. Washington DC: American Chemical Society, p. 42-45, 1991.

MCGUIRE, M. C.; NOGUEIRA, C. P.; BARTELS, C. F.; LIGHTSTONE, H.; HAJRA, A.; VAN DER SPEK, A. F. L.; LOCKRIDGE, O. e LA DU, B. N. Identification of the structural mutation responsible for the dibucaine-resistant (atypical) variant form of human serum cholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 86, p. 953-957, 1989. MIKAMI, National center for biotechnology information (NCBI). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>, acessado em 05/07/20011.

PESQUISA DE ANTROPOMETRIA E ESTADO NUTRICIONAL DE CRIANÇAS, ADOLESCENTES E ADULTOS NO BRASIL 2008-2009, INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE).

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**, 4ªed., Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, p.110, 2001.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning: A Laboratory 83 Manual*, 2ª ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press USA, 1989.

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

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

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

WHITTAKER, M. **Cholinesterase**. New York: Karger, Basel, 1986.

WHITTAKER, M.; BRITTEN, J.J. E1h, a new allele at cholinesterase locus 1.  
**Hum.Hered.**, v.37, p.54-58, 1987.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Obesity and Overweight. Fact sheet of  
WHO Consultation.** 2011