

**FERNANDO PARMO FOLLONI**

**ESTUDOS SOBRE A MUTAÇÃO *IVS3-14T>C* DO GENE *BCHE***

Monografia de bacharelado entregue ao  
Departamento de Genética da Universidade  
Federal do Paraná

Orientadora: Professora Eleidi Alice Chautard  
Freire Maia

Co-orientador: Professor Ricardo L. R. Souza

**CURITIBA  
2005**

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>4</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>5</b>
<b>I. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>6</b>
I.1 Aspectos gerais .....	6
I.2 O gene <i>BCHE</i> .....	7
I.3 Variações do gene <i>BCHE</i> .....	7
I.3.1 Sítio 1914 do exon 4.....	10
I.3.2 Sítio 1615 do exon 4.....	10
I.3.3 Sítio -116 do exon 1 .....	11
I.3.4 Mutação intrônica <i>IVS2-8T&gt;G</i> .....	12
I.3.5 O gene <i>CHE2</i> .....	12
I.3.6 Mutação <i>IVS3-14T&gt;C</i> .....	12
<b>II. OBJETIVOS .....</b>	<b>14</b>
<b>III. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>15</b>
III.1 Amostras de DNA .....	15
III.2 Extração de DNA .....	15
III.3 PCR (Polymerase Chain Reaction).....	15
III.4 SSCA (Single strand conformation analysis) .....	16
III.5 Reagentes utilizados.....	17
III.6 Preparo dos géis.....	17
III.7 Preparo das amostras.....	18
III.8 Coloração dos géis.....	18
III.9 Secagem dos géis.....	19
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>20</b>
<b>V DISCUSSÃO .....</b>	<b>28</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>33</b>

## RESUMO

A butirilcolinesterase (BChE; 3.1.1.8) é uma acilcolina acilhidrolase anteriormente denominada colinesterase do soro. O gene *BCHE* tem quatro exons e 64,559 Kb, com mais de 60 alelos já descritos, o mais comum (usual ou selvagem) ocorrendo em cerca de 95% da população, considerando-se homo e heterozigotos. A mutação *IVS3-14T>C* (intron 3 do gene *BCHE*), rastreada no presente estudo, foi detectada em um paciente euro-brasileiro com diabetes do tipo 2 (LEPIENSKI, 2004). Supôs-se que essa mutação tivesse sido responsável pela falta de amplificação ocorrida com o DNA de Ameríndios Guarani do Mato Grosso do Sul (FURTADO, 2001) e também por resultados discordantes de genotipagem em doadores de sangue de Curitiba (SOUZA, 2001). Foi utilizada a técnica de PCR-SSCA para genotipar o sítio *IVS3-14* nestas amostras e também em diabéticos do tipo 2 euro-brasileiros. Essa mutação não foi encontrada em nenhuma das amostras examinadas e sua frequência em diabéticos do tipo 2 euro-brasileiros foi estimada em  $0,78\% \pm 0,78\%$ . Os problemas ocorridos nos estudos anteriores foram atribuídos a possíveis causas técnicas ou à presença de outras mutações não detectadas no presente estudo.

## ABSTRACT

Butyrylcholinesterase (BChE; 3.1.1.8) is an acylcholine acylhydrolase previously called serum cholinesterase. The *BCHE* gene has four exons and 64,559 Kb with more than 60 alleles already described, the commonest (usual or wild-type) being present in approximately 95% of the population, considering homo and heterozygotes. The *IVS3-14T>C* mutation (intron 3 of the *BCHE* gene), screened in the present study, was detected in one Euro-Brazilian type 2 diabetic patient (LEPIENSKI, 2004). It was inferred that this mutation had been responsible for the lack of DNA amplification occurred with Guarani Amerindian samples from Mato Grosso do Sul (FURTADO, 2001) and also for conflicting genotype results in blood donor samples of Curitiba (SOUZA, 2001). PCR-SSCA was used for genotyping the *IVS3-14* site in these samples and also in Euro-Brazilian patients with type 2 diabetes. This mutation was not found in the examined samples and its frequency in Euro-Brazilian patients with type 2 diabetes was estimated as  $0.78\% \pm 0.78\%$ . The problems occurred in the previous studies were assigned to possible technical causes or to the presence of other mutations not detected in the present study.

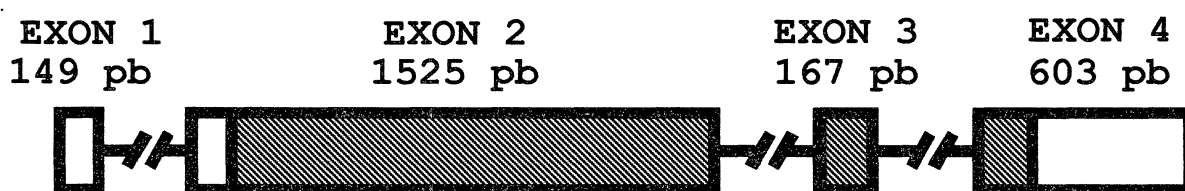
## I. INTRODUÇÃO

### I.1 *Aspectos gerais*

A butirilcolinesterase (BChE; 3.1.1.8) é uma acilcolina acilhidrolase também conhecida como colinesterase do soro. Apresenta grande semelhança com outra colinesterase, a acetilcolinesterase (AChE , 3.1.1.7), sendo as duas únicas colinesterases de vertebrados (revisão em CHATONNET e LOCKRIDGE, 1989). Enquanto a função da AChE na condução do impulso nervoso está bem explicada, a função da BChE ainda é desconhecida. Foi apenas na década de 40 (MENDEL e cols., 1943; AUGUSTINSSON e NACHMANSOHN, 1949) que essas duas colinesterases foram diferenciadas, com base em suas afinidades diferentes pela acetilcolina e outros ésteres de colina. Em 1949, foi introduzido o uso da succinilcolina (suxametônio) como relaxante muscular, empregado em anestésias gerais. O uso deste medicamento que normalmente causa uma paralisia de apenas alguns minutos, revelou a existência de pessoas com suscetibilidade exagerada e que são acometidas de apnéia prolongada de até algumas horas. Como já se tinha conhecimento de que a BChE era capaz de hidrolisar a succinilcolina, essa enzima foi examinada nos pacientes suscetíveis a esse relaxante muscular. A continuidade desses estudos revelou enzimas variantes determinadas geneticamente (KALOW, 1956; KALOW e GENEST, 1957). Esse foi o segundo exemplo de variação genética revelada pelo uso de drogas (o primeiro foi o da deficiência da enzima glucose-6-fosfato-desidrogenase), e contribuiu para o início e desenvolvimento da Farmacogenética, área científica em que atuam a genética, a bioquímica e a farmacologia.

## 1.2 O gene *BCHE*

ROBSON e cols. (1966) verificaram que o gene *BCHE* apresenta ligação com o gene da transferrina. Posteriormente, o gene da transferrina foi atribuído ao cromossomo 3 (YANG e cols., 1984). Hoje, sabe-se que o gene *BCHE* está localizado no cromossomo 3 (3q26.1-q26.2). ARPAGAUSS e cols. (1990) verificaram que o gene da BChE tem quatro exons (Figura 1). O gene *BCHE* apresenta 64,559 Kb (NCBI, acessado em 11/11/2005). Os íntrons 1, 2 e 3 possuem respectivamente 6.272, 43.205 e 12.638 pares de bases.



**Figura 1.** Desenho esquemático do gene *BCHE*, mostrando os quatro exons e o número de pares de bases que os compõem. A região hachurada corresponde à proteína madura.

## 1.3 Variações do gene *BCHE*

A variação genética da BChE é primariamente determinada pelo gene *BCHE* com mais de 60 variantes já descritas (Tabela 1), sendo a mais comum denominada de usual, presente em cerca de 95% da população, considerando-se homo e heterozigotos. A maioria dessas variações altera a atividade da enzima. As variantes são chamadas de silenciosas, quando condicionam desde a ausência total da proteína até sua presença com nível de atividade inferior a 10%.

**Tabela 1. Variantes do gene *BCHE* <sup>a</sup>**

Mudança(s) de nucleotídeo(s) <sup>b</sup>	Nome <sup>c</sup>	Referência
<i>Exon 1</i>		
-116; G→A		Bartels e cols., 1990
<i>Exon 2</i>		
9 a 11; CATCAT→CAT	<i>I4del</i>	Maekawa e cols., 1997
16; ATT→TT	<i>I6fs</i>	Bartels e cols., 1992b; Primo-Parmo e cols., 1996
35; AAA→AGA	<i>K12R</i>	Mikami e cols., 2004
45; GGG→GGC	<i>G15G</i>	Mikami e cols., 2004
71; ACG→ATG	<i>T24M</i>	Maekawa e cols., 1997
82; TTT→ATT	<i>F28I</i>	Yen e cols., 2003
98; TAT→TGT	<i>Y33C</i>	Primo-Parmo e cols., 1996
109; CCT→TCT	<i>P37S</i>	Primo-Parmo e cols., 1996
208; GAT→CAT	<i>D70H</i>	Boeck e cols., 2002
209; GAT→GGT	<i>D70G (A)</i>	McGuire e cols., 1989
223; GGC→CGC	<i>G75R</i>	Souza e cols., 2005b
270; GAA→GAC	<i>E90D</i>	Souza e cols., 2005b
286; AAT→TAT	<i>N96Y</i>	Yen e cols., 2003
297; ATT→ATG	<i>I99M</i>	Souza e cols., 2005b
298; CCA→TCA	<i>P100S</i>	Maekawa e cols., 1997; Takagi e cols., 1997; Lu e cols., 1997
318; AAT→AAAT	<i>NI06fs</i>	Yen e cols., 2003; On-Kei Chan e cols., 2005
344; GGT→GAT	<i>G115D</i>	Primo-Parmo e cols., 1997
351; GGT→GGAG	<i>G117fs</i>	Nogueira e cols., 1990
355; CAA→TAA	<i>Q119X</i>	Sudo e cols., 1996
375; TTA→TTT	<i>L125F</i>	Primo-Parmo e cols., 1996
383; TAT→TGT	<i>Y128C</i>	Hidaka e cols., 1997 <sup>a</sup>
424; GTG→ATG	<i>V142M (H)</i>	Jensen e cols., 1992
486; GCT→GCC	<i>A162A</i>	Souza e cols., 2005b
510; GAT→GAG	<i>D170E</i>	Primo-Parmo e cols., 1996
514; CAG→TAG	<i>Q172X</i>	Gätke e cols., 2001
551; GCC→GTC	<i>A184V (SC)</i>	Greenberg e cols., 1995
592; AGT→GGT	<i>S198G</i>	Primo-Parmo e cols., 1996
596; GCA→GTA	<i>A199V</i>	Sakamoto e cols., 1998
601; GCA→ACA	<i>A201T</i>	Primo-Parmo e cols., 1996
607; TCA→CCA	<i>S203P</i>	Hidaka e cols., 2001
728; ACG→ATG	<i>T243M (F-I)</i>	Nogueira e cols., 1992
748; ACT→CCT	<i>T250P</i>	Maekawa e cols., 1995
765; GAG→GAC	<i>E255D</i>	Pri Primo-Parmo e cols., 1996
800; AAA→AGA	<i>K267R</i>	Maekawa e cols., 1997
811; GAA→TAA	<i>E271X</i>	Primo-Parmo e cols., 1996

880; GTG→ATG	<i>V294M</i>	Mikami e cols., 2004
943; ACC→AACC	<i>T315fs</i>	Hidaka e cols., 1992
943; ACC→TCC	<i>T315S</i>	Liu e cols., 2002
988; TTA→ATA	<i>L330I</i>	Sudo e cols., 1997
997; GGT→TGT	<i>G333C</i>	Mikami e cols., 2004
1062 – 1076	<i>K355insALU</i>	Muratani e cols., 1991; Maekawa e cols., 2004
1093; GGA→CGA	<i>G365R</i>	Hada e cols., 1992; Hidaka e cols., 1992
1156; CGT→TGT	<i>R386C</i>	Yen e cols., 2003
1169; GGT→GTT	<i>G390V (F-2)</i>	Nogueira e cols., 1992
1200; TGC→TGA	<i>C400X</i>	Hidaka e cols., 1997b
1253; TTC→TCC	<i>F418S</i>	Maekawa e cols., 1995
1270; CGA→TGA	<i>R424X</i>	Yen e cols., 2003
1273; TCC→CCC	<i>S425P</i>	Gnatt e cols., 1990
1294; GAA→TAA	<i>E432X</i>	Levano e cols., 2005
1303; GGA→AGA	<i>G435R</i>	Dey e cols., 1997
1336; TTT→GTT	<i>F446V</i>	Dey e cols., 1998
1351; GAA→TAA	<i>E451X</i>	Dey e cols., 1998
1378; GAG→AAG	<i>E460K</i>	Yen e cols., 2003
1393; AGA→TGA	<i>R465X</i>	Maekawa e cols., 1995
1408; CGG→TGG	<i>R470W</i>	Mikami e cols., 2004
1411; TGG→CGG	<i>W471R</i>	Primo Parmo e cols., 1996
1420; TTT→CTT	<i>F474L</i>	On-Kei Chan e cols., 2005
<i>Intron 2</i>		
IVS2-8T→G		Primo-Parmo e cols., 1996
<i>Exon 3</i>		
1490; GAA→GTA	<i>E497V (J)</i>	Bartels e cols., 1992 <sup>a</sup>
1500; TAT→TAA	<i>Y500X</i>	Bartels e cols., 1992b; Primo-Parmo e cols., 1996
1543; CGT→TGT	<i>R515C</i>	Maekawa e cols., 1995
1553; CAA→CTA	<i>Q518L</i>	Primo-Parmo e cols., 1996
<i>Exon 4</i>		
1615; GCA→ACA	<i>A539T (K)</i>	Bartels e cols., 1992b
1914; A→G		Bartels e cols., 1990

<sup>a</sup>Atualizado de Souza e cols. (2005b); <sup>b</sup>Glu 1 é o aminoácido N-terminal da proteína madura da BChE e nt 1 corresponde ao primeiro nucleotídeo no códon para Glu 1; <sup>c</sup> Nome costumeiro entre parênteses.

Os fenótipos do gene *BCHE* foram inicialmente identificados por métodos de inibição enzimática, através de inibidores diferenciais, e, mais recentemente, os genótipos estão sendo determinados ao nível do DNA. Com a utilização do seqüenciamento de DNA se tem confirmado as variações descobertas por inibição

enzimática e também têm sido encontradas muitas variações anteriormente não descritas.

As variações não usuais do gene *BCHE* são responsáveis pela maioria dos casos de apnéia prolongada provocada pelo uso da succinilcolina, que ocorre em um caso entre cerca de 1800 pacientes submetidos a esse tratamento (BAULD e cols., 1974).

Nos próximos itens serão feitas descrições das três mutações mais frequentes do gene *BCHE* e da única já relatada em íntron, além daquela do presente estudo.

### **I.3.1 Sítio 1914 do exon 4**

É um sítio polimórfico do gene *BCHE* localizado 189 bases após o códon de término do exon 4, sendo que seu alelo mais raro cria um sítio de restrição para a enzima *MaeII*. Este sítio é caracterizado pela troca de A por G no nucleotídeo 1914, sendo A com frequência estimada em 74% e G em 26% (BARTELS e cols., 1990).

### **I.3.2 Sítio 1615 do exon 4**

A mutação *A539T* foi inicialmente detectada no fenótipo K, caracterizado inicialmente por uma redução de cerca de 33% no número de moléculas circulantes da butirilcolinesterase (RUBINSTEIN e cols., 1978). Essa mutação foi identificada, posteriormente no nucleotídeo 1615, alterando um códon de alanina (CCA) para treonina (ACA), na posição 539. Também foi observada a mutação *A539T* em 89% dos indivíduos que apresentavam a enzima atípica (A) da BChE, causada pela mutação de ponto *D70G* (McGUIRE e cols., 1989). Os testes de inibição enzimática disponíveis não permitem a discriminação dos genótipos usual, heterozigoto e homozigoto para a mutação *A539T*.

Os estudos populacionais, baseados em análise direta de DNA, mostram que o alelo *A539T* é o mais frequente dentre as variantes que alteram a parte codificadora do

gene *BCHE*. As frequências encontradas são as seguintes: 12,8% em população norte-americana (BARTELS e cols., 1992b), 19,6% em população escocesa (GAFFNEY e CAMPBELL, 1994), 16,4% em população japonesa (SHIBUTA e cols., 1994), 17,5% também em população japonesa (IZUMI e cols., 1994), 18% em população dinamarquesa (JENSEN e cols., 1996). Em amostras de euro-brasileiros e miscigenados (euro-brasileiros X afro-brasileiros) da população brasileira, foram relatadas as frequências de 18,4% e 17,1%, respectivamente, que não diferem estatisticamente (SOUZA e cols., 1998).

### **I.3.3 Sítio -116 do exon 1**

É um sítio polimórfico do gene *BCHE*, sendo que o nucleotídeo -116 pode apresentar as bases G ou A. A frequência de G foi estimada em 92% e a de A em 8%. As variantes do sítio -116 apresentam desequilíbrio de ligação com as variantes dos sítios 1615 e 1914. Os alelos menos frequentes dos sítios -116 (-116A), 1615 (A539T) e 1914 (1914G) tendem a estar em cis na combinação haplotípica. Testes de  $\chi^2$  indicam que os alelos menos frequentes desses três sítios apresentam forte desequilíbrio de ligação (BARTELS e cols., 1990). Um trabalho recente, desenvolvido em nosso laboratório (FURTADO, 2005), detectou associação entre a variante -116A e baixa atividade da BChE e mostrou que quando o portador do alelo A539T não apresenta -116A, não ocorre diminuição dessa atividade. Esses dados indicam que -116A é, provavelmente, o alelo responsável pela diminuição de cerca de 33% na atividade da BChE, que havia sido originalmente atribuída ao alelo A539T. Esses achados são reforçados por dados de ALTAMIRANO e cols. (2000), que não detectaram nenhuma diferença entre a atividade condicionada pelos alelos U (usual) e A539T (K), em experimentos de expressão gênica.

O indivíduo portador da variação que motivou o presente trabalho, além de ser heterozigoto para *IVS3-14T>C*, também é heterozigoto para essas 3 variações não

usuais do gene *BCHE*, apresentando o seguinte genótipo: *U/IVS3-14T>C*; *-116G/-116A*; *U/A539T*; *1914A/1914G*.

### **I.3.4 Mutação intrônica IVS2–8T>G**

A única mutação intrônica relatada antes da estudada no presente trabalho foi a *IVS2–8T>G*. Este sítio codifica uma enzima com atividade inferior a 10% da enzima usual, sendo considerada como silenciosa. Um processamento (*splicing*) alterado do RNAm parece ser o efeito determinado pela mudança de nucleotídeo presente no sítio *IVS2-8T>C* (PRIMO-PARMO e cols., 1996).

### **I.3.5 O gene CHE2**

Outra classe de variação genética da BChE é determinada pelo loco *CHE2*. Esta variação pode ser considerada como secundária, uma vez que a BChE, neste caso, se acha ligada a outra substância, que é provavelmente a responsável pela identificação de dois fenótipos, determinados pelo loco *CHE2* (*CHE2 C5+* e *CHE2 C5-*). O nome desses fenótipos deriva da forma como foram inicialmente detectados por eletroforese (HARRIS e cols., 1962), após a qual apareciam quatro bandas (*C<sub>1</sub> - C<sub>4</sub>*) em cerca de 90% da população, tendo os 10% restantes uma banda extra (*C<sub>5</sub>*). A presença ou ausência desta banda caracteriza, respectivamente, os fenótipos *CHE2 C5+* e *CHE2 C5-*.

### **I.3.6 Mutação IVS3-14T>C**

Em dissertação de mestrado do Laboratório de Polimorfismos e Ligação (Departamento de Genética, UFPR), na qual se estudaram Ameríndios Guarani, do Mato Grosso do Sul (FURTADO, 2001), foi registrada falta de amplificação em cerca de 80% dos casos, quando o iniciador P45 foi utilizado para amplificar o exon

4 do gene *BCHE*. A autora sugeriu a existência de mutação nesses indígenas, localizada na seqüência de DNA complementar à utilizada nesse iniciador, e que impediria a hibridização desse iniciador com o DNA do indivíduo que apresentasse a mutação.

Em um outro estudo do mesmo Laboratório (LEPIENSKI, 2004), foram encontrados resultados conflitantes na genotipagem de um paciente com diabetes do tipo 2, quando se examinou a mutação *A539T* do gene *BCHE* (BARTELS e cols., 1992b), localizada no exon 4. Esses resultados provieram de dois tipos de exames, que utilizaram iniciadores diferentes de DNA para a amplificação por PCR. Como explicação para esses resultados discordantes, foi levantada a hipótese da existência de uma mutação nesse indivíduo que impediria a hibridização de um dos iniciadores, o mesmo P45, e que levaria a um erro na genotipagem. Mais tarde, com a utilização de metodologia de seqüenciamento, foi comprovada a existência de uma mutação ainda não descrita, que foi caracterizada como uma troca de timina por citosina no intron 3, na posição -14 a montante do exon 4. Essa mutação é representada pela denominação *IVS3-14T>C*. O indivíduo portador da mutação *IVS3-14T>C* também possui os sítios -116 e 1914 em heterozigose.

Existe a possibilidade de que a mesma mutação, constatada no indivíduo que apresentou resultados conflitantes, *IVS3-14T>C* (LEPIENSKI, 2004), tenha causado os problemas de amplificação no trabalho com Ameríndios Guarani do Mato Grosso do Sul (FURTADO, 2001). Desta forma, a mutação *IVS3-14T>C*, além de induzir erros de genotipagem em relação ao alelo *A539T*, dependendo dos iniciadores utilizados para a amplificação, pode ter frequência alta em indígenas Guarani do Mato Grosso do Sul.

Souza (2001) também encontrou resultados discordantes de genotipagem, com relação à mutação *A539T*, em doadores de sangue de Curitiba, que foram genotipados por duas metodologias diferentes (PCR-RFLP e PCR-SSCA). Apenas na metodologia de PCR-SSCA, foi empregado o iniciador P45. É possível que a discordância nesses resultados seja devida à presença da mutação *IVS3-14T>C*.

## II. OBJETIVOS

1. Padronizar metodologia de PCR-SSCA para detectar a mutação *IVS3-14T>C*.
2. Genotipar Ameríndios Guarani do Mato Grosso do Sul para testar a hipótese da existência da mutação *IVS3-14T>C* nesse grupo étnico.
3. Testar amplificação em amostras de Guarani do Mato Grosso do Sul, que não tenham amplificado por FURTADO (2001), com os mesmos iniciadores utilizados no trabalho desta autora.
4. Genotipar os doadores de sangue de Curitiba que mostraram resultados discordantes de genotipagem (SOUZA, 2001), para testar a hipótese da existência da mutação *IVS3-14T>C* entre eles.
5. Verificar a possível presença da mutação *IVS3-14T>C* em outros diabéticos do tipo 2 estudados por LEPIENSKI (2004).

### III. MATERIAL E MÉTODOS

#### III.1 Amostras de DNA

As amostras examinadas são dos seguintes grupos: 85 amostras de indígenas Guarani do Mato Grosso do Sul divididas em dois sub-grupos provenientes das tribos Nandewa e Kaiowá; seis amostras de doadores de sangue de Curitiba e 41 amostras de diabéticos do tipo 2 do estudo de LEPIENSKI (2004). Todos esses diabéticos são euro-brasileiros como o portador da mutação *IVS3-14T>C* e são homocigotos *UU* ou *A539T/A539T* quanto ao exon 4. Foram escolhidos apenas os genotipados como homocigotos para se verificar a presença da mutação *IVS3-14T>C* pois inferiu-se que os genotipados como heterocigotos não deveriam possuir essa mutação uma vez que o portador dela não teria ambos os cromossomos amplificados pelo iniciador P45, usado por LEPIENSKI (2004).

#### III.2 Extração de DNA

O DNA do material examinado tinha sido extraído pelo método de LAHIRI e NURNBERGER (1991) e estava estocado a  $-20^{\circ}$  C, no Laboratório de Polimorfismos e Ligação da UFPR.

#### III.3 PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

O volume total da PCR foi de 10  $\mu$ L, sendo 1  $\mu$ L de DNA genômico (aproximadamente 100 ng) e 9  $\mu$ L de Supermix (Invitrogen- 22mM Tris HCl pH 8,4, 55mM KCl, 1,65mM MgCl<sub>2</sub>, 220 $\mu$ M dGTP, 220 $\mu$ M dATP, 220 $\mu$ M dTTP, 220 $\mu$ M dCTP, 22 U Taq DNA-polimerase/mL). Os iniciadores foram adicionados previamente ao Supermix na quantidade de 10 pmoles por amostra. A amplificação operou por 35 ciclos e foi feita em um termociclador Techgene-Ftgene2D. Cada

ciclo consistiu de 30 segundos a 94°C para desnaturação, 30 segundos a 58°C para hibridização e 30 segundos a 72°C para extensão. A extensão final foi feita a 72°C por 10 minutos.

A reação de PCR resulta na produção de um segmento de 258 pares de bases que inclui o sítio *IVS3-14T>C*. Os iniciadores utilizados foram os seguintes:

N45: 5'CTG TGT AGT TAG AGA AAA3'

P43: 3'GAA AAT ATG TTC TAT AAA GGG5' (inverso)

Na Figura 2, estão representadas partes do íntron 3 e o exon 4, bem como a mutação *IVS3-14T→C* e a posição dos iniciadores P43 e P45.

```
ctgtg tagttagaga aaatggcttt tgtattcgaa attatttttc agttaatgaa acagataaaa attttgatta
atacaactta tccatattt tacag GA AAT ATT GAT GAA GCA GAA TGG GAG
TGG AAA GCA GGA TTC CAT CGC TGG AAC AAT TAC ATG ATG GAC
TGG AAA AAT CAA TTT AAC GAT TAC ACT AGC AAG AAA GAA AGT
TGT GTG GGT CTC taattaatag atttaccctt tatagaacat atttte
```

**Figura 2. Representação esquemática de parte do íntron 3 e da região codificadora do exon 4 do gene *BCHe*.**

Realçado em amarelo: Sítio da mutação *IVS3-14T>C* (troca de timina por citosina).

Sublinhado: Posição dos iniciadores P43 e N45.

**Vermelho**: Sítio da Mutação *A539T*.

Sublinhado Duplo: Região de hibridização do iniciador P45.

### III.4 SSSA (*Single strand conformation analysis*)

O exame do DNA do final do íntron 3 e de parte do exon 4 foi realizado com o uso do método de PCR-SSCA, de acordo com modificações do protocolo já existente no Laboratório de Polimorfismos e Ligação da UFPR (SOUZA e cols., 2005a).

A técnica de SSCA (análise de conformação de fita simples, também chamada de SSCP) foi descrita originalmente por ORITA e cols., (1989). Nessa técnica, o DNA é amplificado por PCR e, depois, é desnaturado ao ser submetido à alta temperatura. As fitas simples resultantes são colocadas em gel de poliacrilamida não desnaturante, para uma corrida eletroforética. As fitas simples complementares podem adquirir diferentes conformações tridimensionais, podendo se deslocar com diferentes velocidades e ocupar posições diferentes no gel. Uma simples mutação de ponto pode alterar essa conformação e, conseqüentemente, o padrão de bandas do fragmento (IWAHANA e cols., 1992).

### **III.5 Reagentes utilizados**

Solução estoque para géis de poliacrilamida com  $C = 3,3\%$  ( $C =$  proporção de bisacrilamida no total de acrilamida mais bisacrilamida): 29g de acrilamida, 1g de bisacrilamida, 5 mL de glicerol e completar para 100 mL de água bidestilada.

Tampão TBE 5x: 54 g de Tris, 27 g de ácido bórico, 20 mL de EDTA 0,5M, pH 8,0 e q.s.p. 1000 mL de água destilada. Esta solução foi diluída em uma parte desta para quatro partes de água destilada (TBE 1x).

Solução de persulfato de amônio a 10%.- Agente polimerizador.

Temed.- Agente catalizador da polimerização.

### **III.6 Preparo dos géis**

Preparó de gel com  $T = 10\%$  (concentração de poliacrilamida no gel) e  $C = 3,3\%$ : 10mL de solução estoque de acrilamida (29:1), 20mL de tampão TBE 1x, , 250  $\mu$ L de solução a 10% de persulfato de amônio e 20  $\mu$ L de Temed. Em seguida colocou-se a solução entre duas placas de vidro com espaçadores de 0,8 mm. Deixou-se polimerizar por 5 minutos em sala com temperatura controlada (25°C).

### **III.7 *Preparo das amostras***

Foram utilizados 5 $\mu$ L do produto da PCR aos quais foram adicionados 6 $\mu$ L de corante com propriedade de manter as fitas de DNA separadas (95% de formamida, 0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xilenocianol, 10 mM de e DTA e 10 mM de NaOH). As amostras com o corante foram então aquecidas a 94°C por 5 minutos, no termociclador, para desnaturação da dupla fita do DNA e, em seguida, aplicadas no gel. A corrida foi realizada a 250 V, com amperagem entre 20 e 35 mA, durante 8 horas dentro do refrigerador (temperatura próxima de 4°C).

### **III.8 *Coloração dos géis***

A coloração dos géis procedeu-se de acordo com BUDOWLE e cols. (1991): cuidadosamente retirou-se o gel dentre as placas de vidro, colocando-o em um recipiente de tamanho adequado e previamente umedecido com um pouco de água para melhor assentamento. Em seguida colocou-se solução de ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) a 1% até cobrir o gel, por 3 minutos. Retirou-se a solução utilizada e lavou-se o gel com água destilada. Em seguida colocou-se solução de nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>) a 0,2%, por 20 minutos. Retirou-se a solução e lavou-se com água destilada. A seguir colocou-se um terço da solução de carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) a 2,96% + formaldeído (170ml e 92 $\mu$ l, respectivamente) e esperou-se até escurecimento da solução, que foi então retirada. Lavou-se o gel com água destilada e colocou-se o restante (dois terços) da solução. Em seguida esperou-se o tempo necessário para o aparecimento das bandas no gel (em torno de 10 minutos), retirou-se esta solução, lavou-se com água destilada e colocou-se solução de ácido acético a 10%, por 5 minutos. Retirou-se a solução, lavou-se o gel com água destilada e colocou-se solução de glicerol a 5 % também por 5 minutos. Os tempos de espera desse processo foram realizados com o recipiente sobre o oscilador.

Cuidadosamente, o gel foi retirado do recipiente e colocado sobre um pedaço de papel celofane de área um pouco maior que ele. Em seguida, cobriu-se o gel com papel filtro previamente umedecido com solução de metanol + glicerol (30% e 10%, respectivamente). A seguir, colocou-se o conjunto (gel + celofane + papel filtro) sobre uma placa de vidro e, em seguida, colocou-se sobre este conjunto outra placa de vidro acrescida de um peso preênsil, que permaneceu por uma noite. No dia seguinte, as placas de vidro e o peso-preênsil foram retirados e, sob a face umedecida do papel filtro, foram colocados mais pedaços de papel filtro secos com o objetivo de absorver a umidade do gel. Novamente o peso-preênsil foi colocado sobre o conjunto. Após alguns minutos, os papéis filtro secos ficaram úmidos e foram trocados por secos. Esse processo de troca foi feito diariamente por aproximadamente uma semana até a secagem completa do gel.

#### IV. RESULTADOS

Foi estabelecido o protocolo de SSCA que permitiu a visualização da mutação com os iniciadores N45 e P43 (Figura 3). Para o estabelecimento deste protocolo foram necessários vários testes até a obtenção da visualização da mutação *IVS3-14T>C*, que foi obtida com concentração total de poliacrilamida no gel de 10% e oito horas de corrida eletroforética (Tabela 2).

Foram genotipados 6 doadores de sangue (Tabela 3), que haviam mostrado em trabalho anterior (SOUZA, 2001) resultados discordantes de genotipagem referente à variante *A539T* do exon 4. Nenhum desses 6 indivíduos apresentou a mutação *IVS3-14T>C*.

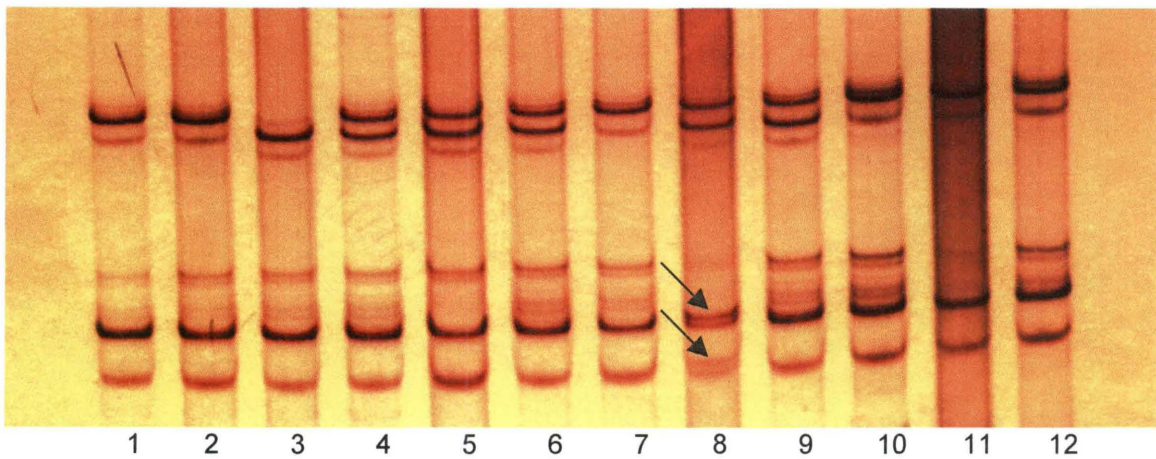
Foram examinados 85 indígenas Guarani do Mato Grosso do Sul para pesquisar a presença da mutação. Nessa amostra não foi encontrado nenhum indivíduo portador dessa mutação (Tabela 4).

Em vista da ausência dessa mutação nesses indígenas Guarani, foram escolhidos 36 deles, nos quais a amplificação do exon 4 pelos iniciadores P45 e P43 não tinha ocorrido em trabalho anterior (FURTADO, 2001). Esses indivíduos foram testados quanto à amplificação com esses mesmos iniciadores (Tabela 5). A amplificação foi bem sucedida nessas 36 amostras (Figura 4).

Foram examinados 41 indivíduos diabéticos do tipo 2 para pesquisar a presença da mutação *IVS3-14T>C*. Essa mutação também não foi encontrada nessa amostra (Tabela 6).

**Tabela 2.** Resultados dos testes com diferentes concentrações de poliacrilamida nos géis e diferentes tempos de corrida eletroforética, realizados com o objetivo da obtenção do protocolo para a visualização da mutação *IVS3-14T>C* seguindo a metodologia de PCR-SSCA.

<b>Concentração de poliacrilamida no gel</b>	<b>Tempo de corrida</b>	<b>Visualização da mutação <i>IVS3-14T&gt;C</i></b>
<b>8%</b>	Três horas e 50 minutos	Sem visualização
	Cinco horas	Sem visualização
<b>10%</b>	Cinco horas e 30 minutos	Sem visualização
	Sete horas e trinta minutos	Obtida
	Oito horas	Obtida com melhor resolução
<b>11%</b>	Cinco horas e 30 minutos	Sem visualização



**Figura 3.** A amostra 8 é o controle portador da mutação *IVS3-14T->C*, as outras são usuais para esse sítio, a diferença entre os padrões de bandas está indicada pelas setas. As amostras 1, 2, 7, 10, 11 e 12 são homozigotas usuais para o nucleotídeo 1615 (*A539T*; mutação K), as amostras 4, 5, 6, 8 e 9 são heterozigotas (*U/A539T*) e a amostra 3 é homozigota (*A539T/A539T*). A diferença entre os padrões de bandas, nesse caso, ocorre na região superior do gel.

**Tabela 3.** Genótipos quanto à variante *A539T* do exon 4 do gene *BCHE* de doadores de sangue do HEMEPAR (N = 6) que haviam mostrado resultados discordantes de genotipagem referentes a essa variante, em trabalho anterior (SOUZA, 2001). Esses indivíduos não apresentaram a variante *IVS3-14T>C*, quando examinados por PCR-SSCA.

Número de identificação (ALPE)	GENÓTIPOS
	PCR-SSCA
226	<i>U/U</i>
310	<i>U/A539T</i>
580	<i>U/U</i>
603	<i>U/U</i>
715	<i>U/A539T</i>
1149	<i>U/U</i>

**Tabela 4.** Relação dos Guarani do Mato Grosso do Sul examinados por PCR-SSCA (N = 85), classificados por sub-tribo, nos quais não foi encontrada a mutação *IVS3-14T>C*.

	Sub-tribos	
	Ñandewa	Kaiowá
Número de identificação das amostras examinadas	2, 5, 7, 10, 12, 13, 17, 19, 21, 25, 28, 31, 32, 401, 405, 806, 805, 807, 812, 815, 818, 822, 828, 832, 833, 834, 835, 837, 840, 843, 845, 847, 848, 849, 850, 852, 853.	203, 205, 209, 212, 213, 216, 221, 225, 231, 237, 245, 247, 248, 250, 251, 255, 264, 270, 271, 277, 279, 284, 285, 287, 292, 294, 297, 300, 310, 330, 602, 604, 606, 607, 618, 619, 623, 625, 627, 631, 632, 635, 639, 643, 647, 650, 652, 653.
Total	37	48

**Tabela 5.** Ameríndios Guarani do Mato Grosso do Sul (N = 36), testados quanto à amplificação com os iniciadores P45 e P43 e que tiveram a amplificação bem sucedida.

	Sub-tribos	
	Ñandewa	Kaiowá
Número de identificação das amostras examinadas	7, 10, 12, 25, 28, 32, 812, 822, 828, 833, 834, 839, 840, 848, 850, 853.	203, 206, 212, 216, 247, 251, 252, 253, 264, 271, 310, 606, 618, 619, 625, 627, 632, 635, 639, 647.
Total	16	20

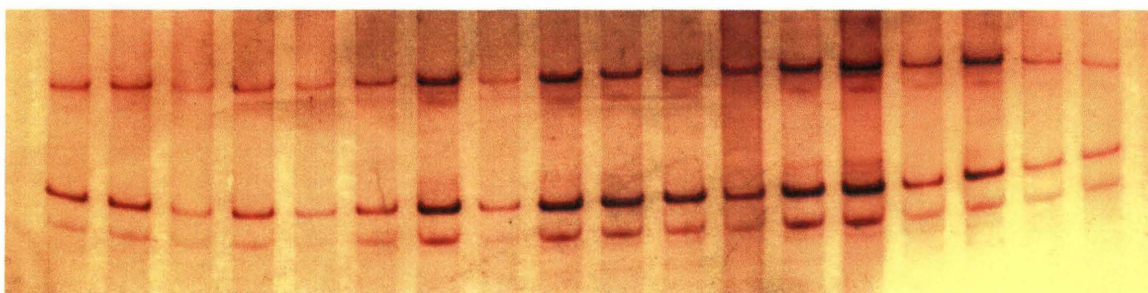


Figura 4. Reprodução de placa de gel referente a teste de amplificação em amostras de indígenas Guarani do Mato Grosso do Sul, mostrando amplificação positiva da região do gene *BCHE* que contém o sítio da mutação *A539T*. Foram utilizados os iniciadores P45 e P43.

**Tabela 6.** Diabéticos do tipo 2 (N = 41) examinados por PCR-SSCA e que não apresentaram a mutação *IVS3-14T>C*, classificados quanto ao genótipo do sítio 1615 do gene *BCHE*.

Genótipos	N	Número de identificação das amostras
<i>U/U</i>	38	22, 24, 27, 35, 36, 38, 47, 52, 57, 62, 64, 71, 73, 82, 84, 85, 98, 99, 100, 109, 114, 116, 122, 128, 137, 140, 156, 179, 184, 193, 229, 251, 252, 321, 334, 344, 375 e 399.
<i>A539T/A539T</i>	3	101, 138 e 139.
Total	41	

## V. DISCUSSÃO

A ausência da mutação *IVS3-14T->C* nos doadores de sangue, que haviam apresentado resultados discordantes de genotipagem quanto ao nucleotídeo 1615, em trabalho anterior (SOUZA, 2001), sugere a possibilidade de existência de outro tipo de mutação e que não foi detectada com a técnica de PCR-SSCA utilizada no presente trabalho. Observando-se a Tabela 7, no caso das amostras 226, 603 e 1149 é possível que em SOUZA (2001) tenha havido um erro técnico referente à técnica de PCR-SSCA, uma vez que o presente resultado é igual ao de SOUZA (2001) obtido por PCR-RFLP, com iniciadores diferentes dos do presente estudo. No caso das amostras 310 e 715, tanto pode ter havido erro técnico em SOUZA (2001), no que se refere à técnica de PCR-SSCA, como existir uma outra mutação na região de hibridização do iniciador P45. A amostra 580 teve resultado de genotipagem igual no presente trabalho e em SOUZA (2001) pela técnica de PCR-SSCA. Neste caso, tanto pode haver uma mutação na região do P43, como erro técnico na PCR-RFLP, por digestão incompleta pela enzima de restrição que corta o DNA na presença do alelo usual.

Como a mutação *IVS3-14T->C* não foi encontrada nos Ameríndios Guarani, o motivo da falta de amplificação registrada no trabalho de FURTADO (2001) ocorreu, provavelmente, por outra causa e não pela presença desta mutação, como responsável pela falta de hibridização do iniciador P45. Qual a possível razão para a falta de amplificação no trabalho de FURTADO (2001)? O sucesso da amplificação com o iniciador P45, no presente trabalho, diminui o valor da hipótese da presença de outra mutação na região de hibridização deste iniciador, porém não descarta totalmente a possibilidade de sua existência apesar de não ter sido detectada pelo método de PCR-SSCA, utilizado no presente estudo. Uma outra possibilidade é ter havido algum problema técnico com o iniciador P45, utilizado por FURTADO (2001).

**Tabela 7.** Doadores de sangue do HEMEPAR (N = 6) com resultados discordantes de genotipagem, referente à variante *A539T* do exon 4, em trabalho anterior (SOUZA, 2001) e no presente estudo. Esses indivíduos não apresentaram a variante *IVS3-14T->C*, quando examinados por PCR-SSCA.

Número de identificação (ALPE)	GENÓTIPOS (SOUZA, 2001)		GENÓTIPOS Presente estudo
	PCR- RFLP (AP5 e K13) <sup>a</sup>	PCR-SSCA (P45 e P43) <sup>a</sup>	PCR-SSCA (N45 e P43) <sup>a</sup>
226	U/U	U/A539T	U/U
310	U/A539T	U/U	U/A539T
580	U/A539T	U/U	U/U
603	U/U	U/A539T	U/U
715	U/A539T	U/U	U/A539T
1149	U/U	U/A539T	U/U

<sup>a</sup>Iniciadores.

SOARES (2003) seqüenciou 4 amostras desses Guarani, que não haviam amplificado com o uso do iniciador P45, e não registrou qualquer base diferente da esperada na região do iniciador P45.

Diante dessas considerações, a hipótese mais provável é que não exista qualquer mutação em Guarani, nessa região correspondente ao iniciador P45, e que os resultados de FURTADO (2001) sejam devidos a problemas técnicos.

Considerando-se os 41 indivíduos genotipados no presente estudo e os 23 diabéticos do tipo 2 genotipados como heterozigotos (*U/A539T*) por LEPIENSKI (2004) e que também são euro-brasileiros, podemos considerar a frequência desse alelo, nesta amostra de diabéticos, como igual a  $0,78\% \pm 0,78\%$ .

A frequência da mutação *IVS3-14T->C*, encontrada em diabéticos do tipo 2, pode ser muito mais baixa do que a calculada de  $0,78\%$ , tendo em vista o valor do erro padrão ( $0,78\%$ ). Sugere-se que essa mutação seja procurada em indivíduos da população geral, para a obtenção de uma melhor estimativa de sua frequência.

É interessante salientar que o indivíduo portador dessa mutação também é heterozigoto para outras mutações no gene *BCHE* (sítios -116, 1615 e 1914) e que

teve a atividade da BChE avaliada como igual a 1,97 KU/L, muito inferior à média da atividade dos demais diabéticos do tipo 2 de genótipo UK + KK (N = 44), que foi de  $5,76 \pm 0,16$  KU/L (LEPIENKI, 2004). Apesar da mutação -116A, presente nesse indivíduo em heterozigose, estar associada com um decréscimo na atividade da BChE (FURTADO, 2005), não nos parece que ela seria responsável por tal baixa na atividade da BChE desse paciente diabético do tipo 2.

Mesmo sendo uma mutação intrônica, a mutação *IVS3-14T>C* pode ter influência no processamento do RNAm. Apenas quatro regiões definem um íntron: a junção exon-íntron nas regiões finais 5' e 3' do íntron, a região denominada sítio de ramificação (*branch-site*), localizada a montante do terminal 3' do íntron e o trato de polipirimidinas localizado entre o terminal 3' e o sítio de ramificação. Estas regiões são reconhecidas pelo chamado spliceossomo que é formado por um grande complexo de cinco pequenos RNA nucleares (snRNA) e mais de 150 proteínas. Cada um desses cinco snRNAs junta-se com proteínas para formar pequenos complexos nucleares de proteínas e RNA (snRNP). Uma ligação coordenada destes cinco snRNPs com os sinais de *splicing* do pré-RNAm resulta na remoção de cada íntron e na ligação dos exons flanqueados (Referencia). A mutação *IVS3-14T>C* está localizada na região do trato de polipirimidinas na região terminal 3' do íntron.

ROGAN e cols. (1998) relataram que um alelo com redução de seis pares de bases na seqüência de polipirimidinas, no íntron do gene que codifica o regulador transmembrânico da fibrose cística, produziu RNAm no qual o exon a jusante tinha sido eliminado em 90% dos RNAm estudados. Nesse mesmo estudo também foi relatada diminuição da quantidade de RNAm devido a um outro alelo do mesmo gene com esta seqüência reduzida em três pares de bases. Nesse mesmo estudo ainda são relatadas várias outras mutações intrônicas que estariam alterando o processamento do RNAm dependendo da natureza do sítio de *splicing* e da mutação. Esta informação aliada à baixa atividade da BChE quantificada por LEPIENSKI (2004) no indivíduo portador da mutação *IVS3-14T>C* do presente trabalho

suscitam a possibilidade de que esta possa ter influência na expressão do gene *BCHE*.

É interessante salientar que o indivíduo portador dessa mutação também é heterozigoto para outras mutações no gene *BCHE* (sítios -116, 1615 e 1914) e que teve a atividade da BChE avaliada como igual a 1,97 KU/L, muito inferior à média da atividade dos demais diabéticos do tipo 2 de genótipo UK + KK (N = 44), que foi de  $5,76 \pm 0,16$  KU/L (LEPIENKI, 2004). Apesar da mutação -116A, presente nesse indivíduo em heterozigose, estar associada com um decréscimo na atividade da BChE (FURTADO, 2005), não nos parece que ela seria responsável por tal baixa na atividade da BChE desse paciente diabético do tipo 2.

Mesmo sendo uma mutação intrônica, a mutação *IVS3-14T>C* pode ter influência no processamento do RNAm. Em revisão sobre processamento do RNAm AST (2004) relata que apenas quatro regiões definem um íntron: a junção exon-íntron nas regiões finais 5' e 3' do íntron, a região denominada sítio de ramificação (*branch-site*), localizada a montante do terminal 3' do íntron e o trato de polipirimidinas localizado entre o terminal 3' e o sítio de ramificação. Estas regiões são reconhecidas pelo chamado spliceossomo que é formado por um grande complexo de cinco pequenos RNA nucleares (snRNA) e mais de 150 proteínas. Cada um desses cinco snRNAs junta-se com proteínas para formar pequenos complexos nucleares de proteínas e RNA (snRNP). Uma ligação coordenada destes cinco snRNPs com os sinais de *splicing* do pré-RNAm resulta na remoção de cada íntron e na ligação dos exons flanqueados. A mutação *IVS3-14T>C* está localizada na região do trato de polipirimidinas na região terminal 3' do íntron.

ROGAN e cols. (1998) relataram que um alelo com redução de seis pares de bases na seqüência de polipirimidinas, no íntron do gene que codifica o regulador transmembrânico da fibrose cística, produziu RNAm no qual o exon a jusante tinha sido eliminado em 90% dos RNAm estudados. Nesse mesmo estudo também foi relatada diminuição da quantidade de RNAm devido a um outro alelo do mesmo gene com esta seqüência reduzida em três pares de bases. Nesse mesmo estudo ainda

são relatadas várias outras mutações intrônicas que estariam alterando o processamento do RNAm dependendo da natureza do sítio de *splicing* e da mutação. Esta informação aliada à baixa atividade da BChE quantificada por LEPIENSKI (2004) no indivíduo portador da mutação *IVS3-14T>C* do presente estudo suscitam a possibilidade de que esta possa ter influência na expressão do gene *BCHE*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 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. *J. Neurochem.* 74:869-877, 2000.
2. 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* 29:124-131, 1990.
3. Ast, G. How did alternative splicing evolve? *Nature Reviews Genetics* 5:773-782, 2004.
4. Augustinsson, K. B., Nachmansohn, D. Distinction between acetylcholinesterase and other choline ester-splitting enzymes. *Science* 110:98-99, 1949.
5. Bartels, C. F., James, K., La Du, B. N. DNA mutations associated with the human butyrylcholinesterase J-variant. *American Journal of Human Genetics* 50:1104-1114, 1992a.
6. Bartels, C. F., Jensen, F. S., Lockridge, O., van der Spek, A. F. L., Rubinstein, H. M., Lubrano, T., La Du, B. N. DNA mutation associated with the human butyrylcholinesterase K-variant and its linkage to the atypical variant mutation and other polymorphic sites. *American Journal of Human Genetics* 50:1086-1103, 1992b.
7. Bartels, C. F., van der Spek, A. F. L., La Du, B. N. Two polymorphisms in the non coding regions of the BCHE gene. *Nucleic Acids Research* 18:6171, 1990.
8. Bauld, H. W., Gibson, P. F., Jebson, P. J., Brown, S. S. Aetiology of prolonged apnoea after suxamethonium. *B. J. Anaesth.* 46:273-281, 1974.
9. Boeck, A. T., Fry, D. L., Sastre, A., Lockridge, O. Naturally occurring mutation, Asp70His, in human butyrylcholinesterase. *Annals of Clinical Biochemistry* 39:154-156, 2002.
10. Budowle, B., Chakraborty, R., Giusti, A. M., Eisenberg, A. J., Allen, R. C. Analylis of the VNTR locus DIS 80 by the PCR followed by right resolution PAGE. *Am. J. Hum. Genet.* 48:137-144, 1991.
11. Chattonet, A., Lockridge, O. Comparision of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochem. J.* 260:625-634, 1989.
12. Dey, D. C., Kanno, T., Sudo, K., Maekawa, M. Genetic analysis of 6 patients with no detectable butyrylcholinesterase activity – three novel silent genes and heterogeneities of mutations in *BCHE* gene in Japan. *American Journal of Human Genetics* 61(supp): 2307, 1997.
13. Dey, D. C., Maekawa, M., Sudo, K., Kanno, T. Butyrylcholinesterase genes in individuals with abnormal inhibition numbers and with trace activity: one common mutation and two novel silent genes. *Annals of Clinical Biochemistry (Part 2)* 35:302-310, 1998.
14. Furtado, L. *Variabilidade da butirilcolinesterase em índios Guarani do Mato Grosso do Sul*. Curitiba, 124p. Tese. Mestrado. Universidade Federal do Paraná, 2001.

15. Furtado, L. *Variabilidade Genética da butirilcolinesterase e Obesidade*. Tese. Doutorado. Universidade Federal do Paraná, 2005.
16. Gaffney, D., Campbell, R. A. A PCR method to determine the Kallow allele frequency and its significance in the normal population. *J. Med. Genet.* 31:248-250, 1994.
17. Gätke, M. R., Østergaard, D., Bundgaard, J. R., Varin, F., Viby-Mogensen, J. Response to mivacurium in a patient compound heterozygous for novel and a known silent mutation in the butyrylcholinesterase gene: genotyping by sequencing. *Anesthesiology* 95:600-606, 2001.
18. Gnat, A., Prody, C. A., Zamir R., Lieman-Hurwitz, J., Zakut, H., Soreq, H. Expression of alternatively terminated unusual human butyrylcholinesterase messenger-RNA transcripts, mapping to chromosome 3q26-ter, in nervous-system tumors. *Cancer Research* 50:1983-1987, 1990.
19. Greenberg, C. P., Primo-Parmo, S. L., Pantuck, E. J., La Du, B. N. Prolonged response to succinylcholine: a new variant of plasma cholinesterase that is identified as normal by traditional phenotyping methods. *Anesthesia and Analgesia* 81:419-421, 1995.
20. Hada, T., Muratani, K., Ohue, T., Imanishi, H., Moriwaki, Y., Ito, M., Amuro, Y., Higashino, K. A variant serum cholinesterase and a confirmed point mutation at Gly-365 to Arg found in a patient with liver cirrhosis. *Internal Medicine* 31:357-362, 1992.
21. Harris, H., Hopkinson, D.A., Robson, E. B. Two-dimensional electrophoresis of pseudocholinesterase components in human serum. *Nature* 196:1296-1298, 1962.
22. Hidaka, K., Iuchi, I., Tomita, M., Watanabe, Y., Minatogawa, Y., Iwasaki, K., Gotoh, K., Shimizu, C. Genetic analysis of a Japanese patient with butyrylcholinesterase deficiency. *Annals of Human Genetics* 61:491-496, 1997a.
23. Hidaka, K., Iuchi, I., Yamasaki, T., Ohhara, M., Shoda, T., Primo-Parmo, S. L., La Du, B. N. Identification of two different genetic mutations associated with silent phenotypes for human serum cholinesterase in Japanese. *Japanese Journal of Clinical Pathology* 40:535-540, 1992.
24. Hidaka, K., Iuchi, I., Yamasaki, T., Ueda, N., Hukano, K. Nonsense mutation in exon 2 of the butyrylcholinesterase gene: a case of familial cholinesterasemia. *Clinica Chimica Acta* 261:27-34, 1997b.
25. Hidaka, K., Watanabe, Y., Tomita, M., Ueda, N., Higashi, M., Minatogawa, Y., Iuchi, I. Gene analysis of genomic DNA from stored serum by polymerase chain reaction: identification of three missense mutations in patients with cholinesterasemia and ABO genotyping. *Clinica Chimica Acta* 303:61-67, 2001.
26. Iwahana, H., Yoshimoto, K., Itakara, M. Detection of point mutations by SSCP of PCR-amplified DNA after endonuclease digestion. *Biotechniques* 12:64-66, 1992.

27. Izumi, M., Maekawa, M., Kanno, T. Butyrylcholinesterase K variant in Japan: Frequency of allele and associated enzyme activity in serum. *Clin. Chem.* 40:1606-1607, 1994.
28. Jensen, F. S., Bartels, C. F., La Du, B. N. Structural basis of the butyrylcholinesterase H-variant segregating in two Danish families. *Pharmacogenetics* 2: 234-240, 1992.
29. Jensen, F. S., Nielsen, L. R., Schwartz, M. Detection of plasma cholinesterase K variant by PCR using an amplification-created restriction site. *Hum. Hered.* 46:26-31, 1996.
30. Kallow, W. Familial incidence of low pseudocholinesterase levels. *Lancet* ii:576-577, 1956.
31. Kallow, W., Genest, K. A method for the detection of atypical forms of human serum cholinesterase. Determination of dibucaine numbers. *Canad. J. Biochem. Physiol.* 35:339-346, 1957.
32. Lahiri, D. K., Nurnberger Jr, J. I. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucl. Acids Res.*, 19:5444, 1991.
33. Lepienski, L. M. *Variante K da butirilcolinesterase e diabetes mellitus*. Curitiba, 114p. Tese. Mestrado. Universidade Federal do Paraná, 2004.
34. Levano, S., Ginz, H., Siegemund, M., Miodrag, F., Voronkov, E., Urwyler, A., Girard, T. Genotyping the butyrylcholinesterase in patients with prolonged neuromuscular block after succinylcholine. *Anesthesiology* 102:531-535, 2005.
35. Liu, W., Cheng, J., Iwasaki, A., Imanishi, H., Hada, T. Novel mutation and multiple mutations found in the human butyrylcholinesterase gene. *Clinica Chimica Acta* 326: 193-199, 2002.
36. Lu, W. D., Hada, T., Fukui, K., Imanishi, H., Matsuoka, N., Iwasaki, A., Higashino, K. Familial hypocholinesterasemia found in a family and a new confirmed mutation. *Internal Medicine* 36:9-13, 1997.
37. Maekawa, M., Sudo, K., Kanno, T., Kotani, K., Dey, D. C., Ishikawa, J., Izume, M. Genetic mutations of butyrylcholine esterase identified from phenotypic abnormalities in Japan. *Clinical Chemistry* 43:924-929, 1997.
38. Maekawa, M., Sudo, K., Kanno, T., Kotani, K., Dey, D. C., Ishikawa, J., Izume, M., Etoh, K. Genetic basis of the silent phenotype of serum butyrylcholinesterase in three compound heterozygotes. *Clinica Chimica Acta* 235:41-57, 1995.
39. Maekawa, M., Taniguchi, T., Ishikawa, J., Toyoda S., Takahata, N. Problem with detection of an insertion-type mutation in the *BCHE* gene in a patient with butyrylcholinesterase deficiency. *Clinical Chemistry* 50:2410-2411, 2004.
40. McGuire, M. C., Nogueira, C. P., Bartels, C. F., Lightstone, A. 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. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 86:953-957, 1989.
41. Mendel, B., Mundell, D. B., Rudney, H. Studies on cholinesterase. III Specific tests for cholinesterase and pseudocholinesterase. Bioch. J. 37:473-476, 1943.
  42. Mikami, L. R., Souza, R. L. R., Chautard-Freire-Maia, E. A., Lockridge, O. New genetic variants of human butyrylcholinesterase in the Brazilian population. VIII International Meeting on Cholinesterases, Abstract 60:23, 2004.
  43. Muratani, K., Hada, T., Yamamoto, Y., Kaneko, T., Shigeto, Y., Ohue, T., Furuyama, J., Higashino, K. Inactivation of the cholinesterase gene transposition. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 88:11315-11319, 1991.
  44. Nogueira, C. P., Bartels, C. F., McGuire, M. C., Adkins, S., Lubrano, T., Rubinstein, H. M., Lightstone, H., van der Spek, A. F. L., Lockridge, O., La Du, B. N. Identification of two different point mutations associated with the fluoride-resistant phenotype for human butyrylcholinesterase. American Journal of Human Genetics 51:821-828, 1992.
  45. Nogueira, C. P., McGuire, M. C., Graeser, C., Bartels, C. F., Arpagaus, M., van der Spek, A. F. L., Lightstone, H., Lockridge, O., La Du, B. N. Identification of a frameshift mutation responsible for the silent phenotype of human serum cholinesterase, GLY 117 (GGT → GGAG). American Journal of Human Genetics 40:934-940, 1990.
  46. On-Kei Chan, A., Lam, C. W., Tong, S. F., Man Tung, C., Yung, K., Chan, Y. W., Au, K. M., Yuen, Y. P., Hung, C. T., Ng, K. P., Shek, C. C. Novel mutations in the *BCHE* gene in patients with no butyrylcholinesterase activity. Clinica Chimica Acta 351:155-159, 2005.
  47. Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., Sekiya, T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86:2766-2770, 1989.
  48. Primo-Parmo, S. L., Bartels, C. F., Wiersema, B., van der Spek, A. F. L., Innis, J. W., La Du, B. N. Characterization of 12 silent alleles of the human butyrylcholinesterase (*BCHE*) gene. American Journal of Human Genetics 58:52-64, 1996.
  49. Primo-Parmo, S. L., Lightstone, H., La Du, B. N. Characterization of an unstable variant (BChE115D) of human butyrylcholinesterase. Pharmacogenetics 7:27-34, 1997.
  50. Robson, E. B., Sutherland, I., Harris, H. Evidence for linkage between the transferrin (*TF*) and serum cholinesterase locus (*E<sub>1</sub>*) in man. Ann. Hum. Genet. 29:325-336, 1966.
  51. Rogan, P. K., Faux, B. M., Schneider, T. D. Information analysis of human splice site mutations. Human Mutation 12:153-171, 1998.

52. Rubinstein, H. M., Dietz, A. A., Lubrano, T.  $E_1^k$ , another quantitative variant at cholinesterase locus 1. *J. Med. Genet.* 15:27-29, 1978.
53. Sakamoto, N., Hidaka, K., Fujisawa, T., Maeda, M., Iuchi, I. Identification of a point mutation associated with a silent phenotype of human serum butyrylcholinesterase - a case of a familial cholinesterasemia. *Clinica Chimica Acta* 274:159-166, 1998.
54. Shibuta, K., Abe, M., Suzuki, T. A new detection method for the K variant of butyrylcholinesterase based on PCR primer introduced restriction analysis (PCR-PIRA). *J. Med. Genet.* 31:576-579, 1994.
55. Soares, N. M. A. *Investigação de suposta mutação nova no gene BCHE da Butirilcolinesterase em tribo Guarani do Mato Grosso do Sul*. Monografia. Bacharelado. Universidade Federal do Paraná, 2003.
56. Souza, R. L. R. *Variação fenotípica e genotípica da butirilcolinesterase humana e sua relação com altura e índice de massa corporal*. 146p. Tese. Doutorado. Universidade Federal do Paraná, 2001.
57. Souza, R. L. R., Castro R. M. V., Pereira, L., Freund, A. A., Culpi, L., Chautard-Freire-Maia, E. A. Frequencies of the butyrylcholinesterase K mutation in Brazilian populations of European and African origin. *Hum. Biol.* 70:965-970, 1998.
58. Souza, R. L. R., Fadel-Picheth, C., Allebrandt, K. V., Furtado. L., Chautard-Freire-Maia, E. A. Possible influence of the *BCHE* locus of butyrylcholinesterase on stature and body mass index. *Am. J. Phys. Anthropol.* 126:329-334, 2005a.
59. Souza, R. L. R., Mikami, L. R., Maegawa R. O. B., Chautard-Freire-Maia, E. A. Four new mutations in the *BCHE* gene of human butyrylcholinesterase in a Brazilian blood donor sample. *Molecular Genetics and Metabolism* 84:349-353, 2005b.
60. Sudo, K., Maekawa, M., Akizuki, S., Magara, T., Ogasawara, H., Tanaka, T. Human butyrylcholinesterase L330I mutation belongs to a fluoride-resistant gene, by expression in human fetal kidney cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 240:372-375, 1997.
61. Sudo, K., Maekawa, M., Kanno, T., Akizuki, S., Magara, T. Three different point mutations in the butyrylcholinesterase gene of three Japanese subjects with a silent phenotype: Possible Japanese type alleles. *Clinical Biochemistry* 29:165-169, 1996.
62. Takagi, H., Narahara, A., Takayama, H., Shimoda, R., Nagamine, T., Mori, M. A new point mutation in cholinesterase: relationship between multiple mutation sites and enzyme activity. *International Hepatology Communications* 6:288-293, 1997.
63. Yang, F., Lum, J. B., McGill, J. R., Moore, C. M., Naylor, S. L., Van Bragt, P. H., Baldwin, W. D., Bowman, B. H. Human transferrin: cDNA characterization and chromosomal localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81:2752-2756, 1984.

64. Yen, T., Nightingale, B. N., Burns, J. C., Sullivan, D. R., Stewart, P. M. Butyrylcholinesterase (BCHE) genotyping for post-succinylcholine apnea in an Australian population. *Clinical Chemistry* 49:1297-1308, 2003.