

WILLIAN DOS SANTOS



**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DA VARIABILIDADE DA BUTIRILCOLINESTERASE
NA RESPOSTA À INTERVENÇÃO DIETÉTICA EM MULHERES OBESAS**

CURITIBA

2013

WILLIAN DOS SANTOS

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DA VARIABILIDADE DA BUTIRILCOLINESTERASE
NA RESPOSTA A INTERVENÇÃO DIETÉTICA EM MULHERES OBESAS**

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

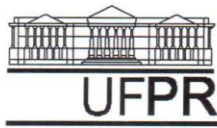
Orientadora: Lupe Furtado-Alle

CURITIBA

2013

DEDICATÓRIA

À minha família com carinho e amor.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da defesa de dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **WILLIAN DOS SANTOS**, para obtenção do título de Mestre em Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira ao candidato o conceito "A".

Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 25 de março de 2013

Doutora Lilian Pereira Ferrari
UNIBRASIL – Membro Titular

Doutor Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza
Dep. Genética/UFPR – Membro Titular

Doutora Lupe Furtado Alle
Dep. Genética/UFPR – Orientadora e Presidente da Banca

Visto



Prof^o Dr. Ricardo Lehtonen R. de Souza
Coordenador do PPG - GEN - UFPR
Matricula 176702

Professor Doutor Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Genética

AGRADECIMENTOS

Primeiramente sou grato aos meus pais, por sempre me apoiarem, incentivarem e acreditarem em mim.

À professora Dr. Lupe Furtado-Alle, pelo aceite, orientação e paciência durante esses dois anos.

Às estagiárias Caroline e Débora por todo o apoio durante o processo de desenvolvimento do projeto

Aos colegas de laboratório pelas conversas que contribuíram para realização do trabalho.

Aos professores de banca de acompanhamento, Ricardo Lehtonen R Souza e Liya Mikami, pelas correções e conselhos que contribuíram na melhoria do trabalho.

A Deus, pela vida e determinação a mim destinados.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABELAS	I
RESUMO	II
ABSTRACT	IV
1. INTRODUÇÃO	1
2. JUSTIFICATIVA	4
3. OBJETIVOS	5
3.1. OBJETIVOS GERAIS.....	5
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
4.1. COLINESTERASES.....	6
4.2. BUTIRILCOLINESTERASE (BChE).....	6
4.3. <i>LOCUS CHE2</i>	9
4.4. BChE E OBESIDADE	10
4.5. OBESIDADE	12
5. MATERIAL E MÉTODOS	14
5.1. DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	14
5.1.1. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	14
5.1.2. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	14
5.1.3. PARTICIPANTES	14
5.1.4. CRITÉRIOS ÉTICOS.....	15
5.1.5. PARÂMETROS ANTROPOMÉTRICOS E DIETÉTICOS	15
5.1.6. PARÂMETROS CLÍNICOS E BIOQUÍMICOS	16
5.1.7. MEDIDA DE ATIVIDADE DA BChE.....	16
5.1.8. ELETROFORESE EM GEL DE ÁGAR – FENOTIPAGEM DO <i>LOCUS CHE2</i>	17
5.1.9. EXTRAÇÃO DE DNA	18
5.1.10. GENOTIPAGENS	19
5.1.10.1. GENOTIPAGEM POR PCR-SSCA.....	19
5.1.10.2. GENOTIPAGEM POR Taqman	20
5.1.11. ANÁLISE DE FORMAS MOLECULARES DA ENZIMA.....	20
5.2. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	11
6. ARTIGO 1	22

6.1. ABSTRACT	22
6.2. INTRODUCTION.....	22
6.3. METHODS	23
6.4. RESULTS AND DISCUSSION.....	24
6.5. ACKNOWLEDGEMENTS	27
6.6. REFERENCES.....	27
6.7. TABLES	30
7. ARTIGO 2	32
7.1. ABSTRACT	32
7.2. INTRODUCTION.....	32
7.3. MATERIAL AND METHODS.....	33
7.4. RESULTS AND DISCUSSION.....	34
7.5. CONCLUSIONS.....	36
7.6. ACKNOWLEDGEMENTS	37
7.7. REFERENCES.....	37
7.8. TABLES	40
8. DISCUSSÃO GERAL.....	43
9. CONCLUSÕES GERAIS	46
10. REFERÊNCIAS.....	47
11. MATERIAL COMPLEMENTAR	58

LISTA DE FIGURAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1.	Evolução da obesidade na população >20anos (IBGE).....	2
Figura 2	Esquema digital dos tetrâmeros da BChE.....	7
Figura 3.	Desenho esquemático do gene <i>BCHE</i>	8

MATERIAL COMPLEMENTAR

Figura 1.	Gel de Agar Ácido para Fenotipagem do <i>locus CHE2</i>	58
Figura 2.	Gel de poliacrilamida para separação das formas moleculares da BChE.....	58
Figura 3.	Esquema de ajuste de maior intensidade nas formas moleculares da BChE.....	59
Figura 4.	Gráfico das fluorescências geradas pelas genotipagens.....	59
Figura 5.	Eletroforese com PCR-SSCA para genotipagem da variante K.....	60

LISTA DE TABELAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Tabela 1.	Classificação de obesidade segundo o IMC (OMS).	12
-----------	---	----

Artigo 1

Tabela 1.	Values of one-sided $t(p)$ for Anthropometrical and Biochemical parameters means before and after dietetic intervention.....	30
Tabela 2.	Values of one-sided $t(p)$ comparing BChE activity (KU/L) between CHE2 C5+ and C5- phenotypes and before and after the dietetic intervention.....	30
Tabela 3.	Values of one-sided $t(p)$ of BChE bands relative activity (KU/L) comparing before and after dietetic intervention and between CHE2 C5+ and C5- phenotypes.	31

Artigo 2

Tabela 1.	Values of $t(p)$ for butyrylcholinesterase (BChE) activity, of obese women in Curitiba, comparing before and after dietetic intervention and grouping the genotypes of -116 and usual.....	40
Tabela 2.	Values of $t(p)$ comparing anthropometrical and biochemical parameters, of obese women in Curitiba, before and after dietetic intervention inside the genotypes of variants for -116 and 1615.....	41
Tabela 3.	Values of $t(p)$ comparing anthropometrical and biochemical parameters, of obese women in Curitiba, before and after dietetic intervention and BCHE gene usuals and variants for -116 and 1615.....	42

RESUMO

A Butirilcolinesterase (BChE; EC 3.1.1.8) é uma esterase sérica produzida principalmente no fígado e amplamente distribuída pelo organismo. Sua função fisiológica e substrato natural ainda são desconhecidos porém há estudos que sugerem que possui papel no metabolismo lipídico e associação com IMC, razão cintura-estatura, circunferência de cintura, peso e obesidade. No plasma, a BChE pode ser encontrada na forma de monômeros (G1), monômero ligado à albumina (G1-A), dímeros (G2), trímeros (G3) e tetrâmeros (G4). Pode ser encontrada associada à um produto desconhecido do *locus CHE2*, formando dois fenótipos, CHE2 C5+ e CHE2 C5-, caracterizados, respectivamente, pela presença e ausência da banda C₅. Codificada pelo gene *BCHE* (3q26.1-q26.2) que possui mais de 65 variantes descritas, das quais -116A e a A539T (1615A, K) são duas das variantes mais frequentes e que estão em desequilíbrio de ligação, preferencialmente na conformação *cis*. Este trabalho avaliou o efeito de variantes da BChE em parâmetros bioquímicos e antropométricos de mulheres obesas participantes de uma intervenção dietética de restrição (2500 kJ/dia, por 8 semanas). Participaram dessa intervenção 147 mulheres obesas, de idade ≥ 20 , IMC $\geq 29,9$, pré-menopausa, não grávidas, não lactantes. Foram coletados dados antropométricos e sangue, para parâmetros bioquímicos (colesterol total, triglicerídeos, LDL e HDL), antes e depois da intervenção. Foi realizada a aferição da atividade da BChE, fenotipagem do *locus CHE2*, análise das formas moleculares da BChE e genotipagem para as variantes -116A e K. Após a intervenção foi verificada a diminuição significativa das médias do IMC, circunferência de cintura e abdominal. As frequências fenotípicas do *locus CHE2* e as alélicas dos sítios -116 e 1615 não diferiram de outras amostragens em Curitiba. A atividade enzimática antes da intervenção se mostrou maior do que de mulheres não obesas e depois da intervenção essa atividade se igualou à de mulheres não obesas. A banda G4 foi a única que sofreu alterações em sua atividade relativa, sendo que o fenótipo CHE2 C5+ atuou como efeito protetor da atividade, pois mulheres CHE2 C5+ não sofreram diminuição na média da atividade plasmática ou da banda G4. Após as genotipagens serem feitas, foi possível observar que mulheres usuais/usuais e com a presença da -116A/K diminuíram todos os parâmetros antropométricos, ao contrário daquelas portadoras da mutação K. Desse modo, quando a variante K está sozinha as mulheres tiveram uma dificuldade maior em emagrecer sendo que os dados antropométricos diminuíram

menos do que dos outros dois genótipos, provavelmente devido a desestabilização do tetrâmero que estaria atingindo outras vias metabólicas, diminuindo portanto a resposta à intervenção. Análise da atividade de portadoras da variante -116A antes e após a intervenção sugere que há inicialmente uma diminuição da atividade a um nível mínimo para manter as funções fisiológicas da BChE, pois quando estava presente não foi possível observar uma diminuição da atividade e as homozigotas usuais para os dois sítios (-116 e K) igualaram seus dados aos das portadoras -116A.

Palavras chave: Obesidade, Butirilcolinesterase, Intervenção Dietética, variante k, variante -116, *locus CHE2*, formas moleculares BChE.

ABSTRACT

Butyrylcholinesterase (BChE; EC 3.1.1.8) is a serum esterase produced in the liver and widely distributed in the organism, despite the fact that its physiological function and natural substrate is still unknown, there are studies which suggest that BChE has a role in lipid metabolism and its associated with BMI, waist-height ratio, waist circumference, weight and obesity. In plasma, BChE can be found in the form of monomers (G1), monomers associated with albumin (G1-A), dimers (G2), trimers (G3) and tetramers (G4). Can be associated with an unknown protein from *locus CHE2*, resulting in two phenotypes, CHE2 C5+ and CHE2 C5-, characterized by the presence and the absence of C₅ band. Codified by *BCHE* gene (3q26.1-q26.2), which has more than 65 variants described, where -116A and A539T (1615A, K) are the two most frequent variants and are in linkage disequilibrium, preferentially in cis. This study evaluated the effects of BChE variants and biochemical and anthropometrical parameters in obese women participants of an energetic restriction diet intervention (2,500 kJ/day, for 8 weeks). Participated in this intervention 147 obese women, age ≥ 20 , with BMI ≥ 29.9 , pre menopause, non-pregnant, non-lactating. Anthropometrical and blood sample, for biochemical parameters (total cholesterol, triglycerides, LDL and HDL) were collected before and after intervention. BChE activity measurement, *locus CHE2* phenotyping, molecular forms analysis and genotyping for the -116A and K variants were made. After intervention it was verified a significant decrease in means of BMI, abdominal and waist circumference. *Locus CHE2* phenotypic frequencies and -116 and 1615 sites frequencies did not differ from another sampling in Curitiba. Enzymatic activity before and after intervention showed higher than non obese women and after intervention this activity equaled to the non obese women. G4 band was the only which suffered a decrease in its relative activity, being that the CHE2 C5+ phenotype showed a protective effect for activity, because CHE2 C5+ women did not suffered a decrease in mean plasmatic BChE activity or in the activity of G4 band. After genotyping, it was possible to observe that usual/usual and -116A/K women decreased all anthropometrical parameters, unlike as the K carriers. This way, when variant K is the only present, women presented a higher difficulty to lose weight, and anthropometrical parameters decreased less than the other genotypes, probably due to the destabilization of the tetramer, which would affect another metabolic network, decreasing the response to the dietetic intervention. BChE activity analysis in -116A variant before and after intervention

suggest that when this variant is present, it sets BChE activity to its minimum values to keep with its physiological functions, because after intervention it was not possible to see a decrease in BChE activity and usual/usual women decreased their activity equating its data to -116A carriers.

Key words: Obesity, Butyrylcholinesterase, Dietetic intervention, variant -116A, variant K, *locus CHE2*, BChE molecular forms.

1. INTRODUÇÃO

Obesidade pode ser definida como um acúmulo de tecido adiposo que pode causar problemas de saúde como doenças cardiovasculares, diabetes do tipo 2, hipertensão, derrames, osteoartrite, apnéia durante o sono e alguns tipos de cânceres. Ela é medida pelo Índice de Massa Corporal (IMC), havendo evidências do aumento progressivo de comorbidades com o aumento do IMC (WHO, 2011; NIH, 1998).

A obesidade tem uma origem complexa que compõe fatores genéticos, comportamentais e ambientais. Fazem parte do seu desenvolvimento o padrão de dieta e a frequência de atividade física, pois um maior consumo calórico em relação ao gasto, aliado à predisposição genética levam a um aumento do IMC (WHO, 2011; IBGE, 2010; BRAY *et al.*, 2004; NIH, 1998). A genética da obesidade é um campo que está sendo amplamente estudado e já foram identificados vários genes relacionados à obesidade e aumento do IMC, metabolismo lipídico, adipogênese, apetite e gasto energético (DERAM *et al.*, 2009; NAKAMURA *et al.*, 2000; LEE *et al.*, 2006; MAMMÈS *et al.*, 1998; VAZQUEZ *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2007).

A maior disponibilidade e consumo de alimentos ricos em açúcares e gorduras e a diminuição das práticas de atividade física tem auxiliado no aumento da prevalência da obesidade na sociedade. As estratégias de prevenção incluem a reeducação alimentar visando um aumento de ingestão de frutas, vegetais, peixes e limitando comidas com gorduras, açúcares e equilíbrio entre ingestão e gasto com a inclusão da prática de atividade física (KUMANYIKA, JEFFERY *et al.*, 2002). Segundo pesquisas do IBGE, a obesidade vem mostrando um aumento em sua prevalência no Brasil, onde nos 34 anos de pesquisa o excesso de peso e a obesidade aumentaram como mostra a Figura 1 (IBGE, 2010). O mesmo padrão se observa no cenário internacional (NIH, 1998; OGDEN *et al.*, 2007; IBGE, 2010).

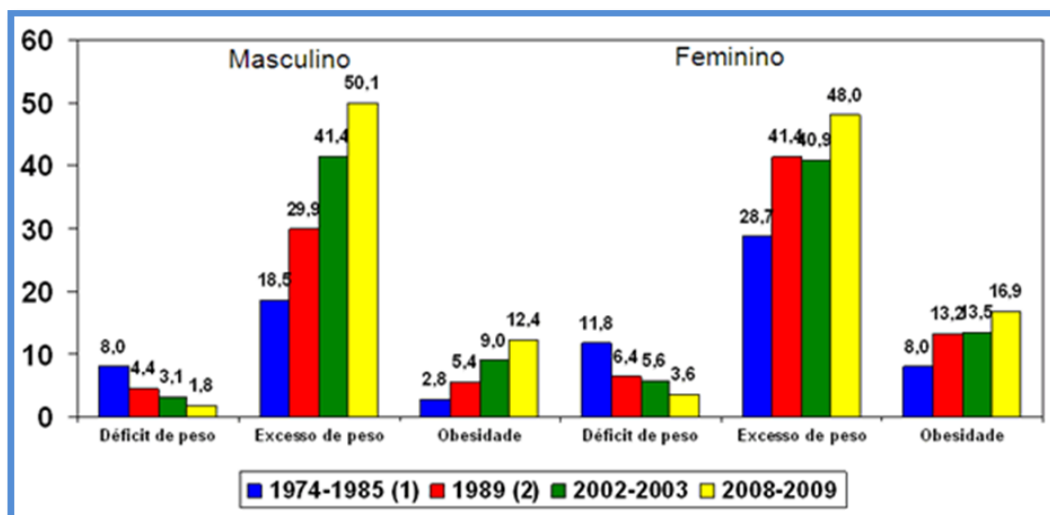


Figura 1: Estudo do IBGE da evolução da obesidade na população brasileira com mais de 20 anos nos últimos 34 anos.

Um dos genes que mostrou correlação com a obesidade e metabolismo lipídico é o gene *BCHE* que está localizado no braço longo do cromossomo 3 (3q26.1; 3q26.2), possui 64.559pb distribuídos em 4 éxons e codifica a butirilcolinesterase (BChE), uma esterase sérica com 574 resíduos de aminoácidos. Apesar da função fisiológica da BChE não ser bem definida, há trabalhos que sugerem associação com o metabolismo lipídico, obesidade, IMC e peso (KUTTY *et al*, 1977; CHAUTARD-FREIRE-MAIA *et al*, 1991; ALCANTARA *et al*, 2001, 2003; SOUZA *et al* 2005a; FURTADO-ALLE *et al*, 2008).

Rubinstein *et al.*(1978) foram os primeiros a descrever a variante K (A539T) do gene *BCHE*, que é definida como uma mutação de ponto no éxon 4 que causa uma substituição, na posição 539 do peptídeo, de uma alanina (GCA) para uma treonina (ACA). Altamirano *et al.* (2000) demonstraram que a homozigose da variante K não interfere na atividade enzimática ou na formação de tetrâmeros da BChE. Furtado-Alle *et al.* (2008) demonstraram que há alteração na atividade da BChE quando a variante K está associada com a mutação -116A (Furtado-Alle *et al*, 2008). A mutação -116 se encontra no éxon 1 e é caracterizada por uma substituição do códon TGC para TAC, apresentando relação com uma atividade enzimática diminuída em indivíduos com e sem obesidade (BARTELS, VAN DER SPEK *et al*, 1990; FURTADO-ALLE *et al*, 2008).

A BChE também pode estar associada a produtos do *locus CHE2* formando uma banda eletroforética extra (C₅) que condiciona dois fenótipos possíveis CHE2

C5+ e CHE2 C5- que são identificadas, respectivamente, pela presença ou ausência da banda C₅ (Harris *et al*, 1962; Chautard-Freire-Maia *et al*, 1991). Há estudos que evidenciam que o metabolismo anormal de lipídios, diabetes, aumento dos parâmetros bioquímicos lipídicos, excesso de ácidos graxos e a obesidade estão relacionados com o aumento da atividade da BChE (CHAUTARD-FREIRE-MAIA *et al*, 1991; KUTTY, 1980; KALMAN *et al*, 2004). Harris (1980) constatou que indivíduos fenótipo CHE2 C5+ possuíam atividade da BChE 30% maior que o fenótipo negativo e Chautard-Freire-Maia *et al* (1991) indicaram uma relação entre o fenótipo CHE2 C5- e a obesidade. Posteriormente foi verificada relação positiva entre CHE2 C5+ banda fraca, atividade da enzima e peso; no fenótipo com banda forte não foi encontrada essa relação, sendo que os indivíduos de banda forte possuíam peso e IMC mais baixos (CHAUTARD-FREIRE-MAIA *et al*, 1991; ALCANTARA *et al*, 2001).

Com base nos estudos que mostram associação entre BChE e obesidade, o objetivo do presente estudo é investigar o efeito de intervenção dietética para redução de peso em mulheres obesas, levando em conta variações da butirilcolinesterase, tais como: atividade enzimática; formas moleculares; *locus* CHE2 e variantes –G116A e A539T (variante K) do gene *BCHE*.

2. JUSTIFICATIVA

Diversos estudos (HARRIS *et al*, 1962; KUTTY *et al*, 1977; CHAUTARD-FREIRE-MAIA *et al*, 1991; ALCANTARA *et al*, 2001; KUMANYIKA, JEFFERY *et al*, 2002; ALCANTARA *et al*, 2001, 2003; SOUZA *et al* 2005a; FURTADO-ALLE *et al*, 2008) evidenciam que o produto do gene *BCHE* e do *locus CHE2* atuam nos mecanismos fisiopatológicos da obesidade, síntese de lipídeos e valores de IMC.

O presente estudo pretende investigar o papel da BChE na resposta a uma intervenção dietética em mulheres obesas. Nesta investigação serão avaliados polimorfismos do gene *BCHE*, fenotipagem do *locus CHE2*, atividade enzimática e formas moleculares da BChE em mulheres obesas submetidas a uma intervenção dietética. Considerando que as variáveis a serem analisadas já foram correlacionadas a fatores associados à obesidade em diversos estudos, esses dados serão analisados conjuntamente com dados de variáveis antropométricas, clínicas e bioquímicas, visando identificar respostas diferentes frente à intervenção dietética.

Desse modo, a hipótese a ser testada no presente estudo considera que essas variações da BChE exercem um efeito na resposta a intervenção dietética para redução de peso em mulheres obesas, a ser avaliado por meio da análise de variáveis antropométricas, clínicas e bioquímicas relacionadas à obesidade.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Investigar o efeito de intervenção dietética para redução de peso em mulheres obesas, em relação à variações da butirilcolinesterase, tais como: atividade enzimática; formas moleculares; locus *CHE2* e variantes –*G116A*, *A539T* (variante K).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Genotipar os polimorfismos –*G116A* e *A539T* (variante K) do gene *BCHE* em mulheres obesas adultas submetidas a intervenção dietética para redução de peso.
- Medir a atividade da BChE antes e após a intervenção dietética.
- Avaliar as formas moleculares da BChE antes e após a intervenção dietética.
- Comparar o efeito da intervenção dietética para a redução de peso sobre variáveis antropométricas (peso, estatura, IMC, circunferência abdominal, razão cintura estatura), clínicas (pressão arterial) e bioquímicas (colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL, triglicerídeos, glicemia de jejum) em relação às variações da BChE.
- Investigar o papel do locus *CHE2* na resposta à intervenção nutricional em adultas obesas.
- Calcular as frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos estudados e compará-las com dados da literatura.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 COLINESTERASES

As colinesterases são enzimas que hidrolisam ésteres de colina sendo representada pela acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE). A AChE também pode ser chamada de colinesterase verdadeira, pois realiza a reação de hidrólise da acetilcolina nas sinapses, e há estudos que indicam que ela possui funções extra-colinérgicas (BALASUBRAMANIAN, 1984; GREENFIELD, 1984 e GRIFMAN *et al.*, 1998).

A BChE, também chamada de pseudocolinesterase, é produzida pelas células hepáticas, pode ser encontrada no músculo liso, plasma, pâncreas, adipócitos, pele, coração e massa branca cerebral (WESCOE *et al.*, 1947). Sua síntese em adipócitos humanos foi sugerida em 1998 (POPOVIC *et al.*, 1998). Tem capacidade de hidrolisar desde acetilcolina até heptanoilcolina e possui uma maior eficácia para butirilcolina. Sua função e substratos naturais ainda permanecem desconhecidos, porém existem estudos que associam a BChE à proteção a acetilcolinesterase e ao metabolismo de lipídios (KUTTY, 1980; WHITTAKER, 1980; WHITTAKER, 1986 e CWIERTNIA *et al.*, 2010).

Em sua composição, AChE e a BChE tem similaridade de 53% sendo a região do sítio ativo bem conservada (SCHUMACHER *et al.*, 1986; LOCKRIDGE *et al.*, 1987a) e as semelhanças com outras esterases, lipases, tiroglobulinas e proteínas de adesão celular sugerem que AChE e BChE podem apresentar funções biológicas variadas (BALASUBRAMANIAN e BHANUMATHY, 1993; WEITNAUER *et al.*, 1998).

4.2 BUTIRILCOLINESTERASE (BChE)

A BChE pode se apresentar em diversas formas moleculares, classificadas pelo padrão eletroforético em C₁, C₂, C₃, C₄ (HARRIS *et al.*, 1962). C₁ é um monômero, C₂ é o monômero ligado à albumina, C₃ é o dímero e C₄ é um tetrâmero formado por dímeros de dímeros e a forma mais abundante no plasma. Os monômeros dos dímeros são ligados entre si por ligação dissulfeto entre os resíduos Cys571 e as interações entre dímeros, para formação do tetrâmero, é feita através de interações não covalentes, e mais recentemente foi descoberto um peptídeo rico em prolinas que está associado ao tetrâmero, possivelmente à sua estabilização,

esquemático na figura 2. (LOCKRIDGE *et al.*, 1979; 1987b; LOCKRIDGE e LA DU, 1982; MASSON, 1989; LI *et al.*, 2008; PAN *et al.*, 2009; BENYAMIN *et al.*, 2011).

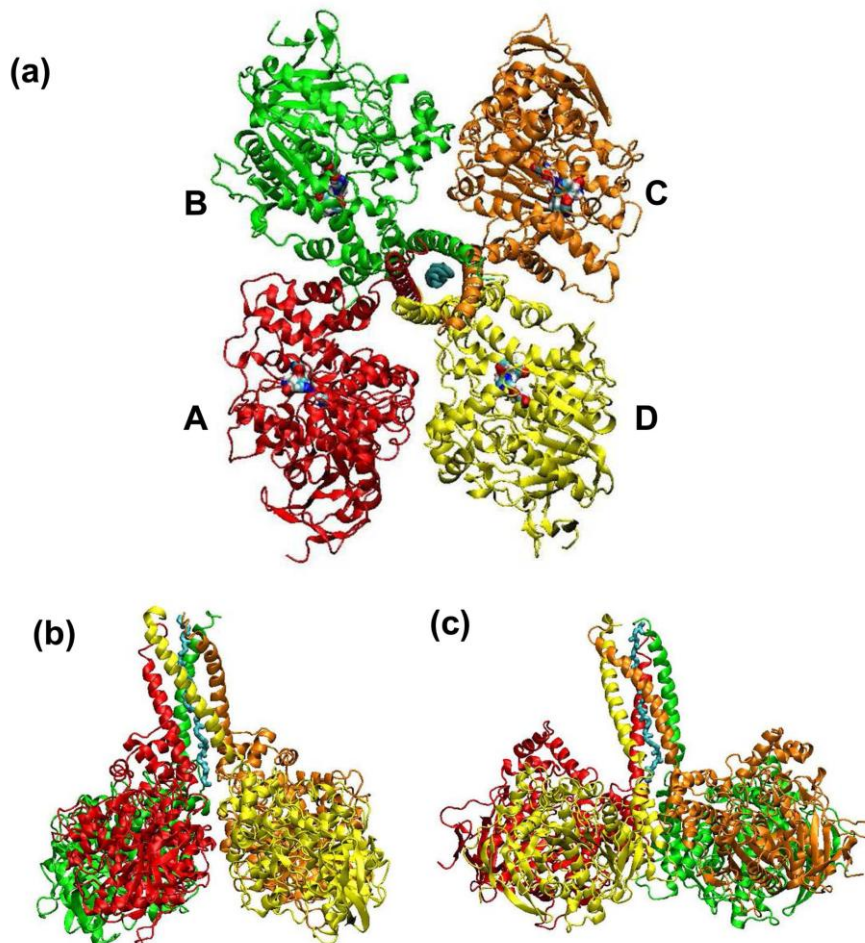


Figura 2: Desenho esquemático obtido por Simulação Dinâmica Molecular do tetrâmetro da BChE. (a) Vista de cima onde A, B, C e D correspondem a monômeros idênticos, e em azul no centro o peptídeo rico em prolina. (b) e (c) esquema com vista lateral do tetrâmetro, e em azul no centro o peptídeo rico em prolina (PAN *et al.*, 2009).

Masson (1989) sugeriu outra nomenclatura para a classificação segundo o padrão eletroforético, onde as diferentes formas são agrupadas em G1, G1-ALB, G2, G3 e G4. G1 corresponde à C1 (forma monomérica), G1-ALB corresponde a C2 (monômero ligado à albumina), G2 corresponde à forma C3 (dímero), G4 à C4 (tetrâmero) e a denominação G3 se dá ao padrão intermediário entre C3 e C4 correspondente ao trímero (MASSON, 1989).

O monômero da BChE possui 574 aminoácidos e nove cadeias laterais de oligossacarídeos ligados em 9 asparaginas, seu peso molecular é de 85.534 Da e não há diferença nas moléculas que formam os tetrâmeros (LOCKRIDGE *et al.*, 1987b). Ele possui um sítio aniônico periférico de ativação de substratos e duas regiões de ligação de substrato: (1) Asp70 e Tyr332 localizadas no sítio aniônico periférico e (2) Trp82 no sítio ativo, e são conectados pela alça ômega (Ω), formada pelos aminoácidos 65 a 92 e o sítio ativo é a Ser198 (MASSON *et al.*, 2001).

O gene *BCHE* se encontra no braço longo do cromossomo 3 (3q26.1-q26.2), possui 64.558 kb e 4 éxons (2.445 pb), como mostra o esquema da figura 3. Como a enzima final possui 574 resíduos aminoácidos, isto indica que apenas 1.722 pb estão sendo traduzidos em proteína, os outros 722 pb não traduzidos fazem parte do éxon 1 e início do éxon 2 e ao final do éxon 4. O éxon 1, apesar de não ser traduzido, possui dois possíveis sítios de início de tradução nos códons -69 e -47, o éxon 2 possui 83% de toda a enzima incluindo sítio ativo, região N-Terminal e um terceiro possível sítio de início de tradução no códon -28, o éxon 3 tem 167 nucleotídeos e o éxon 4, com 604 pb, traduz a extremidade C-Terminal da proteína e a região 3'UTR (NCBI, acessado em 21/09/2011).

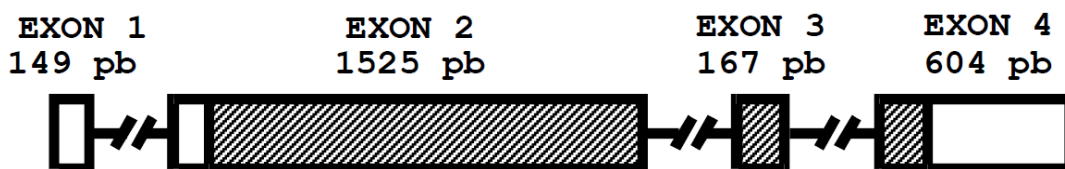


Figura 3: Desenho esquemático do gene *BCHE* com a distribuição dos éxons e íntrons. A região hachurada corresponde à sequência traduzida em proteína.

A BChE é considerada uma enzima polimórfica e sua variação foi identificada em pacientes que apresentavam apnéia e paralisia muscular quando submetidos a doses fisiológicas do relaxante muscular succinilcolina (KALOW e GENEST, 1957)

Neste estudo serão genotipados os polimorfismos: -116 (G→A) e 1.615 (GCA→ACA).

A mutação 1615A (GCA→ACA; SNP rs1803274), também conhecida como variante K (A539T), se encontra no éxon 4 e originalmente foi associada a uma diminuição no número de moléculas circulantes em 33% (RUBINSTEIN *et al.*, 1978). É caracterizada por uma mutação de ponto de guanina para adenina no nucleotídeo

1615 (G→A), levando uma substituição de Ala 539 por Thr (BARTELS *et al.*, 1992). Altamirano *et al.*, (2000) demonstraram que essa mutação não apresenta nenhum efeito na atividade ou estrutura da enzima, e quando comparada à enzima selvagem não há diferença de afinidade com substrato, taxa de catálise, secreção da célula ou na formação de tetrâmeros. O alelo *A539T* é um dos alelos mais frequentes entre as variantes não usuais da BChE com frequência de 12,8% em população norte-americana (BARTELS *et al.*, 1992), 19,6% em população escocesa (GAFFNEY e CAMPBELL, 1994), aproximadamente 17% em populações japonesas (SHIBUTA *et al.*, 1994; IZUMI *et al.*, 1994) , 18% em população dinamarquesa (JENSEN *et al.*, 1996) e 18,4% e 17,1%, em Euro-Brasileiros e Afro-Brasileiros, respectivamente (SOUZA *et al.*, 1998).

O sítio da mutação -116A (SNP rs1126680) se encontra no éxon 1, tem frequência de cerca de 8% em população norte-americana (BARTELS *et al.*, 1990), em euro-brasileiros (FURTADO-ALLE *et al.*, 2008) e em índios Guarani do Mato Grosso do Sul (NUNES *et al.*, 2008). Está associada a uma diminuição da atividade da BChE em pessoas obesas, não obesas (FURTADO-ALLE *et al.*, 2008) e em índios Guarani do Mato Grosso do Sul (NUNES *et al.*, 2008).

As duas variantes do gene *BCHE* descritas acima estão em desequilíbrio de ligação, sendo encontrados preferencialmente na conformação cis (BARTELS *et al.*, 1990).

4.3 LOCUS CHE2

Em eletroforese bidimensional em gel de ágar, além das bandas C₁ a C₄ foi observado uma quinta banda denominada C₅, que foi encontrada em apenas 4,6% da amostra e o *locus* responsável pelo aparecimento dessa banda foi chamado de *CHE2* (HARRIS *et al.*, 1962). Os alelos *CHE2**C₅⁺ e *CHE2**C₅⁻ são responsáveis, respectivamente, pela presença e ausência da banda C₅ (HARRIS *et al.*, 1962; 1963). Em Curitiba o fenótipo *CHE2* C₅⁺ foi encontrado com frequência de 10,3% (CHAUTARD-FREIRE-MAIA *et al.*, 1991). Sugimori (1986) demonstrou que o fenótipo *CHE2* C₅⁺ é menos sensível a succinilcolina e Harris (1980) relatou que indivíduos *CHE2* C₅⁺ apresentam uma atividade enzimática da BChE cerca de 30% maior do que os indivíduos *CHE2* C₅⁻ (SUGIMORI, 1986; HARRIS *et al.*, 1980).

Há estudos que correlacionam a estabilização do tetrâmero com uma cadeia rica em prolina da lamelipodina (LI *et al.*, 2008; PAN *et al.*, 2009; BENYAMIN *et al.*,

2011), e por essa proteína compartilhar a mesma região cromossômica (2q33), há a hipótese que o fenótipo CHE2 C5+ é conferido por variantes no gene da lamelipodina.

4.4 BChE E OBESIDADE

O organismo humano armazena energia através do tecido adiposo. Os lipídeos são substâncias hidrofóbicas, necessitando estar associados a carregadores com maior afinidade pela água formando um complexo lipoproteico. Existem cinco tipos de lipoproteínas classificadas conforme sua densidade: quilomicrons; lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL); lipoproteínas de densidade baixa (LDL); lipoproteínas de densidade alta (HDL) e de densidade muito alta (VHDL). Sua densidade muda conforme a quantidade de proteína e lipídeos, onde em uma maior proporção de proteína a densidade é maior.

Já foi relatado traço de atividade de BChE no LDL (LAWRENCE e MELNICK, 1961); Kutty e Acharya (1972) relataram uma desestabilização do LDL através do uso de inibidores de BChE e foi proposto que o LDL seria composto de pré-LDL ligado com a BChE (KUTTY e ACHARYA, 1972; KUTTY *et al.*, 1973). Kutty *et al.* (1977) observaram em um precipitado de LDL que a atividade da BChE é diretamente proporcional à quantidade de LDL e confirmaram a participação das BChE na síntese de lipoproteínas, em um estudo com camundongos tratados com inibidor de BChE que apresentavam diminuição de LDL e aumento de HDL (KUTTY *et al.*, 1977).

Outros estudos observaram um aumento significativo da atividade enzimática da BChE em pacientes com hiperlipidemia, indicando uma relação da BChE com a síntese lipoproteica (KÁLMÁN *et al.*, 2004). Em trabalho com adiposidade superficial, foi encontrada uma relação positiva entre a gordura subcutânea e a atividade da BChE (HUTCHINSON *et al.*, 1951). Chu *et al.* (1978) relataram atividade aumentada no precipitado de LDL em indivíduos hiperlipêmicos, e observaram um aumento de atividade da BChE conforme o aumento de LDL, colesterol e triglicerídeos no soro e no precipitado de LDL, resultando na hipótese de que parte da BChE fica no soro e parte associada ao LDL (CHU *et al.*, 1978).

Há trabalhos que indicam relação da BChE e *locus CHE2* com síndrome metabólica (ALCANTARA *et al.*, 2005) e diabetes (KUTTY *et al.*, 1981). Dentro destas predisposições a variante K em heterozigose com o alelo usual causa um

aumento considerável nos valores médios de gordura subcutânea e IMC. Como há associação da BChE na proliferação e diferenciação celular, há hipóteses que relacionam as variantes no *locus BCHE* ao IMC assim como fenótipos da BChE que alteram a proliferação celular o que diretamente está relacionado ao IMC (SOUZA *et al.*, 2005a).

Segundo Randell *et al.* (2005) a síndrome metabólica está associada a altos níveis de atividade da BChE, onde há um aumento na resistência insulínica e aumento da predisposição para doenças coronarianas, pelo aumento da concentração de triglicérides, síntese de LDL, circunferência abdominal, hiperlipemia e diminuição de HDL. Há ainda a hipótese de alteração conformacional da BChE por hiperlipidemia, o que levaria ao aumento da atividade (RANDELL *et al.*, 2005; KÁLMÁN *et al.*, 2004).

Os efeitos de hiperlipidemia e síndrome metabólica relacionados à BChE podem ser classificados de duas maneiras: de maneira direta, envolvendo expressão, sequência de aminoácidos e atividade da BChE e/ou indiretamente, quando sua atividade está associada à ação de outros alelos levando à predisposição a doenças coronarianas, dislipidemia, fígado gorduroso e resistência insulínica. Benyamin *et al.* (2011) identificaram *loci* que estão associados à atividade da BChE, sendo que três deles se encontram próximos ao *BCHE*, um em cada um dos seguintes *loci*: *ABI2-RAPH1*; *RNPEP*; *UGT1A*, e uma região intergênica no cromossomo 8. Estas situações são reforçadas pelas interações ambientais incluindo a dieta e prática de atividade física (BENYAMIN *et al.*, 2011; KUMANYIKA, JEFFERY *et al.*, 2002).

Segundo Chautard-Freire-Maia *et al.* (1991) e Alcantara *et al.* (2005) existe uma relação entre os fenótipos do *locus CHE2* e a obesidade, onde os fenótipos CHE2 C5- apresentavam forte associação com síndrome metabólica, enquanto em indivíduos CHE2 C5+ de banda forte apresentavam um valor significativamente mais baixo para as médias de peso. Indivíduos que possuíam o fenótipo CHE2 C5+ apresentavam uma atividade até 25% maior do que indivíduos com o fenótipo CHE2 C5-, independentemente da presença de síndrome metabólica, indicando que a atividade aumentada da BChE, sozinha, não indica um fator de risco para a síndrome metabólica (CHAUTARD-FREIRE-MAIA *et. al.*, 1991; ALCANTARA *et al.*, 2005).

4.5 OBESIDADE

A obesidade pode ser classificada como uma doença poligênica, pois já foi descrito que há genes envolvidos no ganho e produção de lipídeos e multifatorial, pois o meio também atua em seu desenvolvimento, dependendo dos hábitos alimentares e regularidade de prática de atividade física. Pode ser caracterizada por um desequilíbrio energético no organismo, aumentando a estocagem de gordura (FROGUEL *et al.*, 2000). A obesidade pode causar problemas de saúde como doenças cardiovasculares, diabetes do tipo 2, hipertensão, derrames, osteoartrite, apnéia durante o sono e alguns tipos de cânceres. Ela é medida pelo Índice de Massa Corporal (IMC) e se apresenta em várias classificações (Tabela 1), havendo evidências do aumento progressivo de comorbidades com o aumento do IMC (WHO, 2011; NIH, 1998).

Tabela 1. Classificação de adulto conforme o IMC (WHO 2011).

Classificação	IMC	Risco de comorbidades
Normal	18,50 - 24,99	
Pré obeso	25,00-29,99	Aumentado(Baixo)
Obeso classe I	30,00-34,99	Moderado
Obeso classe II	35,00-39,99	Grave
Obeso classe III	≥ 40,00	Muito Grave

Além do componente genético, há fatores ambientais que modulam a gravidade e grau da obesidade. Entre esses fatores, os que mais se destacam são estilo de vida e dieta, sendo a base da obesidade a ingestão de alimentos hipercalóricos e a falta de atividade física. As populações urbanas vêm sofrendo com a prevalência da obesidade por causa da disponibilidade cada vez maior de alimentos ricos em gorduras, carboidratos e açúcares, associada à falta de hábito da prática de atividades físicas. Isso leva a uma diminuição do gasto energético que é então armazenado no organismo na forma de adipócitos, caracterizando a obesidade (WHO, TECHNICAL REPORT SERIES, 2003; KUMANYIKA, JEFFERY *et al.*, 2002).

Segundo pesquisas do IBGE, a prevalência da obesidade vem mostrando um aumento no Brasil, em 34 anos de pesquisa no gênero masculino o excesso de peso

aumentou de 18,5% para 50,1% e a obesidade de 2,8% para 12,4%; no gênero feminino o excesso de peso aumentou de 28,7% para 48,0% e a obesidade de 8% para 16,9% (IBGE, 2010). O mesmo padrão é observado no cenário internacional (NIH, 1998; OGDEN *et al.*, 2007; IBGE, 2010).

Já foram identificados mais de 600 genes, marcadores e regiões cromossômicas relacionadas à obesidade e aumento do IMC, metabolismo lipídico, adipogênese, apetite e gasto energético. Sendo que recentemente já foram descritas 69 mutações distribuídas por 10 genes diretamente relacionados à obesidade (DERAM *et al.*, 2009; PERUSSE *et al.*, 2005; NAKAMURA *et al.*, 2000; LEE *et al.*, 2006; MAMMÈS *et al.*, 1998; VAZQUEZ *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2007).

O *locus ob* (obese) codifica um fator de saciedade e o *locus db* (diabetes) codifica um cofator necessário para a resposta a este fator (ZHANG *et al.*, 1994; TARTAGLIA *et al.*, 1995). Seu homólogo em camundongos, quando está mutado resulta em hiperfagia, obesidade mórbida precoce, decréscimo do gasto energético e hiperinsulinemia. O gene *ob* tem como produto a leptina que quando é injetada em animais, com distúrbios relacionados ao peso, leva a uma diminuição de ingestão alimentar, do peso e gordura corporal e correção dos distúrbios metabólicos associados (HALAAS *et al.*, 1995; PELLEYMOUNTER *et al.*, 1995).

Em 9 anos de estudos relacionados à obesidade já foram identificados 5 genes relacionados à obesidade: leptina (*LEP*, 7q32.2), receptor de leptina (*LEP-R*, 1p31.3), pro-opiomelanocortina (*POMC*, 2p24.1), receptor de melanocortina 4 (*MC4R*, 18q21.32), e convertase 1 (*PCSK1*, 5q15), todos fazendo parte da mesma via de ingestão de alimentos (FROGUEL e BUTIN, 2001). Porém, além desses, Snyder *et al.* (2004) propôs a adição do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma (*PPARG*, 3p25.2) e sub-unidade regulatória 3 da proteína fosfatase 1 (*PPP1R3A*, 7q 31.2) (SNYDER *et al.*, 2004).

A obesidade é uma doença cuja prevalência vem aumentando cada vez mais no mundo e como está associada a várias comorbidades e mortalidade seu estudo aprofundado é imprescindível. Desse modo, o presente estudo investigou o efeito de intervenção dietética para redução de peso em mulheres obesas, levando em conta variações da butirilcolinesterase, tais como: atividade enzimática; formas moleculares; locus *CHE2* e variantes *-G116A* e *A539T* (variante K) do gene *BCHE*.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Este estudo teve um delineamento do tipo ensaio clínico randomizado duplo-cego, com duração de 8 semanas de intervenção de restrição calórica.

Para o desenvolvimento do estudo a intervenção será realizada com orientação dietética individualizada com restrição calórica de 600kcal/dia (PETERSEN *et al.*, 2006; SEAGLE *et al.*, 2009), nas semanas 2, 4 e 6 foi elaborada dieta individualizada com uma lista de alimentos equivalentes, visando evitar a monotonia alimentar. Ainda, foi realizada orientação dietética em grupo, nas semanas 3, 5 e 7. Estas orientações foram na forma de palestras com temas relacionados à nutrição e ao emagrecimento. As dietas e as palestras foram elaboradas e apresentadas pela nutricionista professora e pesquisadora responsável. As orientações dietéticas individualizadas e em grupo foram realizadas por graduandos do Curso de Nutrição da PUCPR.

Foram realizadas as observações das variáveis antropométricas, bioquímicas, clínicas, dietéticas e de atividade física. Para a identificação do gene (variável independente) foram realizada a genotipagem de 2 polimorfismos do gene da BCHE.

5.1.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram considerados os seguintes critérios de inclusão: idade ≥ 20 anos, gênero feminino, portadora de obesidade classe I ou II, no período anterior ao climatério, não gestante, não lactante, com nível intermediário de alfabetização (capacidade de ler e escrever um texto breve) e aceitar participar da pesquisa.

5.1.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram considerados os seguintes critérios de exclusão: ser fumante, estar em tratamento dietoterápico ou medicamentoso para redução de peso, ser portadora de diabetes tipo I, de hipotireoidismo e / ou doença renal crônica ou de doença crônica não controlada.

5.1.3 PARTICIPANTES

Participaram do estudo 147 mulheres adultas e obesas, residentes em Curitiba e região metropolitana. Para a seleção, foi feita divulgação na mídia local

sobre uma palestra explicativa e sobre a participação na pesquisa. Os indivíduos interessados foram reunidos na Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) em data e local reservados para esta atividade. Os indivíduos interessados, que apresentaram os critérios de inclusão, que não apresentaram critérios de exclusão e que atenderam os critérios éticos, participaram da pesquisa. Os indivíduos que não participaram da pesquisa, foram convidados a fazer acompanhamento nutricional gratuito na Clínica de Nutrição da PUCPR.

5.1.4 CRITÉRIOS ÉTICOS

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (0005306/11). Os indivíduos que se apresentaram aptos a participar da pesquisa, conforme os critérios, foram esclarecidos sobre o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Participaram da pesquisa os indivíduos que leram e assinaram o TCLE.

5.1.5 PARÂMETROS ANTROPOMÉTRICOS E DIETÉTICOS

As coletas de dados antropométricos e dietéticos foram realizadas na pré-intervenção. Os dados antropométricos e dietéticos foram coletados por graduandos do Curso de Nutrição da PUCPR. Estas coletas de dados aconteceram em salas de aula reservadas para estas atividades nas instalações da PUCPR.

Durante a coleta de dados na pré-intervenção, cada participante recebeu uma identificação numérica, a qual foi utilizada para as coletas posteriores e para a tabulação de dados. A lista com os nomes e a respectiva identificação numérica, as fichas com os registros permanecerão em local seguro, uma vez que todos os dados são sigilosos, e assim a confidencialidade da identidade das participantes e dos dados foi preservada.

Para avaliação dos parâmetros antropométricos foram coletados dados de peso, estatura e circunferência da cintura e abdômen. Os dados de peso e estatura foram utilizados para calcular o Índice de Massa Corporal (IMC) ($IMC = \text{peso (kg)} / \text{estatura}^2$) para avaliar a adiposidade corporal, sendo que os indivíduos que apresentarem $IMC \geq 30$ a $34,99 \text{ kg/m}^2$ foram classificados como obeso classe I e os indivíduos com $IMC \geq 35$ a $39,99 \text{ kg/m}^2$ foram classificados como obeso classe II (WHO 1998). Em relação à circunferência da cintura das mulheres, os valores <80

cm serão considerados como baixo, e os valores entre 80 e 88 cm foram considerados como alto, e os maiores que 88 cm, como muito alto (NICE 2006).

A dieta de restrição energética teve uma duração de 8 semanas, os hábitos alimentares antes da intervenção foram documentados durante uma entrevista, durante a qual as participantes foram orientadas a fazer a dieta. Foi feita uma adequação da ingestão de macronutrientes de acordo com as recomendações atuais (BOARD *et al.*, 2002/2005; MACRONUTRIENTS *et al.*, 2005). A orientação nutricional ocorreu de forma que pudesse ser introduzido um déficit de 2.500 kJ/dia e os modelos dietéticos foram desenvolvidos de protocolos adaptados de NUGENOB (PETERSEN *et al.*, 2006) e seguindo recomendações da *American Dietetic Association* (SEAGLE *et al.*, 2009). A quantidade de cada macronutriente recomendada para classificação de dieta normoenergética foi de: gorduras entre 20% e 35%, de carboidratos entre 45% e 65% e de proteínas entre 10% e 35% (MACRONUTRIENTS *et al.*, 2005).

5.1.6 PARÂMETROS CLÍNICOS E BIOQUÍMICOS

A coleta de sangue para os dados bioquímicos ocorreu na pré-intervenção e na 8ª semana. As coletas de sangue foram realizadas por graduandos do Curso de Enfermagem da PUCPR, em laboratório específico e reservado para esta atividade na PUCPR.

Em relação aos parâmetros bioquímicos foi coletado sangue para realizar lipidograma (colesterol total, colesterol-LDL, colesterol-HDL e triglicerídeos), glicemia de jejum, atividade da BChE e fenotipagem do *locus CHE2*. Os pacientes foram orientados a comparecerem em jejum de 8 a 12h para coleta de sangue (Sposito 2007). Após a coleta as amostras de sangue foram encaminhadas para o laboratório clínica Diagnósticos do Brasil (DB), onde as aferições foram realizadas por métodos automatizados. Após as análises clínicas, para a interpretação dos resultados, foram utilizados os valores de referência do próprio laboratório.

5.1.7 MEDIDA DE ATIVIDADE DA BChE

Para a determinação da atividade da BChE foi utilizada a técnica de DIETZ *et al.* (1972), modificada por EVANS e WROE (1978), cujo princípio é a hidrólise da propioniltiocolina pela butirilcolinesterase, produzindo ácido propiônico e tiocolina, a

qual reage com o DTNB (ácido 5,5'-bisditio-2-nitrobenzóico), gerando 5-tio-2-nitrobenzoato de coloração amarela. A dosagem do produto formado foi realizada em espectrofotômetro ajustado em 410 nm e com todos os reagentes mantidos em banho-maria a 25°C.

O tampão fosfato 0,1 M utilizado na reação (pH 7,6) foi preparado pela mistura de duas soluções “a” e “b” até a obtenção do pH adequado. A solução “a” contém 4,73 g de Na₂HPO₄ anidro (PM = 141,96) em 1000 mL de água destilada. A solução “b” contém 13,61 g de KH₂PO₄ anidro (PM = 136,09) em 1000 mL de água destilada. O DTNB (0,423 mM) foi dissolvido em tampão fosfato na proporção de 167g por 1000 mL. O substrato (propionilticolina 100 mM) é preparado com 303 mg de iodeto de propionilticolina (PM = 303,2) em 10 mL de água destilada.

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

5.1.8 ELETROFORESE EM GEL DE ÁGAR – FENOTIPAGEM DO LOCUS *CHE2*

Esta técnica foi desenvolvida por ROBINSON *et al.* (1957) para fenotipagem de variantes da hemoglobina e posteriormente, foi modificada por VAN ROS E VERVOORT (1973) para aplicação dessa técnica à BChE. E foi utilizado as adaptações presentes em Souza *et. al.* (2003).

O gel de ágar foi preparado com uma solução de Bacto ágar (Difco) a 1,4% p/v em tampão citrato de sódio, pH 6,38 (solução estoque de tampão citrato de sódio 50 mM, pH 6,7; pH ajustado com ácido cítrico 1,56 M). Esta solução foi aquecida por cerca de sete minutos ou até que o ágar seja totalmente dissolvido, sendo importante não deixar a solução ferver. Após o aquecimento a solução foi vertida sobre uma placa de vidro de 230 x 160 mm. O gel deve resfriar completamente e então foi colocado na geladeira e mantido em repouso por pelo menos 12 horas a

fim de diminuir o efeito da eletroendosse. Após esse período de repouso as amostras de plasma foram aplicadas no gel através da extremidade de uma lâmina de metal (5 x 5 x 0,1 mm) onde foi colocado 1,5 µL de plasma ou soro. A placa contendo as amostras foi então submetida à eletroforese com tampão citrato pH 6,7 nas cubas, por três horas e meia (a 4°C; 75 V e 35 mA). Após a corrida eletroforética despejou-se sobre a placa o cromógeno-substrato que deve ser preparado imediatamente antes do uso. A solução cromógeno-substrato foi preparada utilizando-se Fast Red TR Salt (SIGMA F-2768) a 0,1% p/v em tampão fosfato de sódio pH 7,1 (670 mL de Na₂HPO₄, 0,2 M e 330 mL de NaH₂PO₄, 0,2 M) e solução de α-naftilacetato 30 mM (2,5% v/v). A placa com o cromógeno-substrato foi incubada por 40 minutos a 37°C. Após a revelação das bandas a placa foi lavada com água para retirar o excesso de corante. O gel foi então colocado entre uma folha de papel cartão e uma folha de papel filtro, prensado entre duas placas de vidro e levado à estufa a 37°C até completa secagem.

5.1.9 EXTRAÇÃO DE DNA

A técnica utilizada foi descrita por Lahiri *et. al.* (1991) adaptada e consiste na separação, a partir do sangue periférico, do creme de leucócitos de onde foi extraído DNA. Foram coletados 5 mL de sangue em EDTA e o creme de leucócitos, acrescido de suspensão de hemácias, foi estocado a -10°C. Desse material descongelado foi retirado o creme de leucócitos, que foi ressuspensionado em 10 mL de TKM1 (Tris-HCl 0,01 M pH 7,6; KCl 0,01 M; MgCl₂ 0,01 M; EDTA 0,002M) e 125 µL de IGEPAL CA-630. Após centrifugar a 2500 rpm por 15-20 minutos, desprezou-se o sobrenadante e completou-se novamente para 10 mL com TKM1. Repetiu-se a centrifugação e a ressuspensão em TKM1 até que o precipitado ficou bem claro. Ressuspendeu-se delicadamente o precipitado, foi adicionado 800 µL de TKM2 (Tris-HCl 0,01 M pH7,6; KCl 0,01 M; MgCl₂ 0,01 M; EDTA 0,002 M; NaCl 0,4 M) e agitou-se bem. Foi adicionado 50 µL de SDS 10% e realizada a homogeneização. Incubou-se em banho-maria a 55°C durante a noite. Retirou-se do banho-maria e foi adicionado 300 µL de NaCl saturado (6 M) e misturou-se bem. Essa solução foi centrifugada a 1200 rpm por 10-20 minutos e o sobrenadante foi transferido para um tubo de ensaio onde foi adicionado dois volumes de etanol 100%, gelado, tampou-se o tubo com parafilme e foi invertido (delicadamente) até precipitar o DNA. Pescou-

se o DNA utilizando micropipeta com ponteira de ponta cortada e colocou-se em microtubo de 1,5 mL. O DNA foi lavado com etanol 70%. E a a secagem foi realizada com o tubo semi-aberto em estufa a 37°C. Ressuspendeu-se o DNA em 200 µL de tampão TE (Tris HCl pH8,0 0,01 M e EDTA pH 8,0 0,001 M) e foi deixado em banho-maria a 55°C por uma hora. Após três dias na geladeira, foi verificado a densidade ótica e o DNA foi congelado (LAHIRI *et al.*, 1991).

5.1.10 GENOTIPAGENS

5.1.10.1 GENOTIPAGEM POR PCR-SSCA

A técnica de PCR-SSCA (polymerase chain reaction - single strand conformational analysis) consiste na amplificação da sequência de DNA que se pretende analisar e posterior desnaturação do produto amplificado que é, então, submetido à eletroforese para a análise de conformação de DNA em fita simples. Essa técnica permite a detecção de alterações no DNA ainda desconhecidas e que podem ser geradas por apenas uma mutação de ponto, sendo detectadas pela modificação do comportamento eletroforético do DNA em fita simples.

Foi analisado por PCR-SSCA o polimorfismo 1615A (GCA→ACA; SNP rs1803274), também conhecida como variante K (A539T). Os ciclos de PCR foram programados do seguinte modo: 1) 80°C /min.; 2) 94°C /min.; 3) 48°C /min.; 4) 72°C /min.; 5) repetir por 35 vezes do passo 2 ao 4; 6) 72°C /10 min. Após a amplificação, 5 µL do produto foram misturados a 6 µL de corante SSCA (4,75 mL de formamida, 0,0125 g de xilenocianol, 0,0125 g de azul de bromofenol, 125 µL de EDTA - 0,4 M -, 16,7 µL de NaOH 3 M e 108,3 µL de água bidestilada) e depois mantidos a 94°C por 5 minutos.

O produto desnaturado foi submetido a uma eletroforese em gel de poliacrilamida (29:1) a 8%, 200v por 4 horas e a revelação do gel (BUDOWLE *et al.*, 1991) é realizada em etapas, durante as quais o gel deve ser mantido em agitação. Após a eletroforese, o gel deve ser colocado em um recipiente não metálico e imerso em solução aquosa de ácido nítrico (1 %) durante três minutos. Após duas lavagens com água destilada, o gel é imerso em solução aquosa de nitrato de prata (0,2%) e aquecido por 20 segundos no micro-ondas. Depois de duas novas lavagens com água destilada, o gel é imerso em 60 mL de solução reveladora (170 mL de solução aquosa de carbonato de sódio 2,96 % e 92 µL de formaldeído) até que o

líquido escureça. Depois da retirada do líquido escurecido, deve ser acrescentado o restante da solução reveladora e o gel mantido imerso até que as bandas de DNA apareçam no gel. Após o aparecimento das bandas o gel foi digitalizado para a análise.

5.1.10.2 GENOTIPAGEM POR Taqman

Utilizando a técnica de PCR em tempo real, o polimorfismo -116A (rs1126680) do gene da *BCHE* foi identificado por meio da técnica de genotipagem *Taqman*, que utiliza na mesma reação dois primers flanqueadores da região com o SNP e duas sondas específicas para os dois SNPs com marcação fluorescente diferente para cada uma delas. Onde os homozigotos de um SNP apresentaram apenas a elevação de uma das fluorescências os heterozigotos apresentaram elevação das duas fluorescências.

A técnica de genotipagem por *Taqman* já foi padronizada para o polimorfismo -G116A (rs1126680) do gene *BCHE*. Foi utilizado o equipamento *Mastercycler ep Realplex* da Eppendorf e o kit TaqMan SNP da Applied Biosystems. Na amplificação do DNA, o uso do equipamento para este protocolo de genotipagem foi realizado em 3 etapas: na primeira etapa ocorre a pré-leitura, na qual é lida a fluorescência basal da placa antes do processo de amplificação; seguida da amplificação, realizada para todos os segmentos dentro dos seguintes padrões de PCR: 1º passo de 2 minutos a 50°C; 2º passo de 10 minutos a 95°C; 3º passo repetido 45 vezes de 15 segundos a 95°C intercalados por 60 segundos a 60°C. A terceira etapa, a pós-leitura, consiste na análise dos dados gerados antes, durante e após a amplificação, resultando no genótipo de cada indivíduo analisado e seu registro em um gráfico representativo.

5.1.11 ANÁLISE DE FORMAS MOLECULARES DA ENZIMA

Foi realizada uma eletroforese (8 horas; 100V e 11 mA; 4°C) de 7 µl de plasma misturado com 9,8 µl de azul de bromofenol em gel de poliacrilamida (170X170X0,8 mm; 29:1 solução estoque) de 5% (1 cm de gel de empilhamento) e 7% (13 cm de gel de separação) preparados com TBE 1X. A revelação das bandas foi a 37°C após a incubação de 30 em solução de 0,2% de Fast Red TR em 200 mM de tampão fosfato de sódio (pH 7,1) contendo 3,4% de acetato de alfa-naftil 30 mM dissolvido em acetona, com o volume completado com água destilada (1:1) e as intensidades relativas das bandas foram ajustadas e medidas pelo programa

KODAK 1D(BOBERG *et al.*, 2010).

5.2. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As frequências alélicas e genóticas foram obtidas por contagem direta e comparadas por meio do teste do qui-quadrado, com o auxílio do programa BioEstat versão 5.0 (Ayres, 2007).

Após a intervenção, as diferenças nas interações gene-parâmetros foram testadas por meio de análise estatística. Foi utilizada análise de variância pelo teste t de Student para amostras dependentes e independentes. Será utilizado o Excel para tabulação dos dados.

As médias \pm DP, variâncias, correlações entre as variáveis antropométricas e bioquímicas e a atividade da BChE e frequências dos fenótipos do *locus CHE2* serão realizadas nos programas Bioestat 5.0 (Ayres, 2007) e Statistica para Windows (Statsoft, Inc. 1996).

Análises de Regressão Logística Múltipla serão realizadas para estimar o efeito de cada polimorfismo analisado, no IMC pós-intervenção. Será utilizado o programa SPSS 13.0 for Windows (SPSS Inc.). O valor da probabilidade para os testes comparativos considerados significativos considerou $p < 0.05$ (5%).

6. ARTIGO 1

EFFECTS OF ENERGETIC RESTRICTION DIET ON BUTYRYLCHOLINESTERASE IN OBESE WOMEN FROM SOUTHERN BRAZIL

Willian dos Santos¹; Louise Farah Saliba^{1,2}; Caroline Schovanz Schenknecht¹; Débora Scaraboto¹; Ricardo Lehtonen R. Souza¹; Lupe Furtado-Alle^{1*}

1: Polymorphism and linkage laboratory, Department of Genetics, Federal University of Paraná

2: Department of Nutrition, Pontifical Catholic University of Paraná (PUC-PR).

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effects of an energetic restriction diet intervention of 8 week on butyrylcholinesterase (BChE) in 111 obese women from Southern Brazil, pre menopause, age ≥ 20 , with BMI ≥ 29.9 , non-pregnant and non-lactating participated in an energetic restriction diet of 2500kJ/day. Anthropometrical and biochemical parameters were analyzed before and after this intervention. The samples were phenotyped for *CHE2 locus*, parameters were compared between them, and BChE molecular forms (G1A, G1, G2 and G4) relative intensity (RI) and relative activity (RA) were measured and compared before and after intervention. Results showed that the dietetic intervention decreased BMI, WC, AC, BChE absolute activity and RA of G4 band. The CHE2 C5+ phenotype presented a different biochemical pattern when compared with CHE2 C5- phenotype. The energetic restriction diet decreased BMI, WC, AC and BChE activity, concomitantly the RA of fraction G4 suffered a decrease, which is the molecular form with the larger contribution to the activity on plasma. CHE2 C5+ phenotype showed a protective effect in absolute BChE activity and in the RA of G4 form, maintaining higher BChE activity regardless the metabolic changes. BChE has shown along the years a strong relation with obesity, BMI, WC and it has been related to lipid metabolism and these conclusions help to elucidate some of the biochemical interaction among BChE, diet and obesity.

INTRODUCTION

Human butyrylcholinesterase (BChE; EC 3.1.1.8) is an esterase encoded by *BCHE* gene (3q26.1-q26.2)⁽¹⁾, synthesized in the liver and distributed to several parts of the organism⁽²⁾. Despite the fact that BChE main function and its natural substratum remain unknown, it has been related to lipid metabolism and has been

associated to BMI, waist-hip ratio, waist circumference, weight, cholesterol and triglyceride levels⁽³⁻⁸⁾. Plasmatic BChE is mainly found in five different molecular structures: G1 (monomers), G1-A (monomers linked to albumin), G2 (dimers), G3 (trimers) and G4 (tetramers)⁽⁹⁾.

Chemically, G2 is formed by disulfide bond between two G1⁽¹⁰⁾ and G4 is formed by two G2 bonded by non covalent interactions⁽¹¹⁾, the organization and stabilization of G4 is mediated by lamellipodin proline rich peptides associated with other elements⁽¹²⁻¹⁴⁾.

The C₅ band was found only in 10.3% in Curitiba⁽¹⁵⁾ and determines two phenotypes CHE2 C5+ and CHE2 C5- characterized by the presence and the absence of the extra C₅ band, respectively⁽¹⁶⁾. Although the protein associated with G4 to form C₅ band is not known yet, its gene has been mapped to chromosome 2q33-35(*CHE2* locus). CHE2 C5+ individuals have BChE activity approximately 30% higher than individuals CHE2 C5-^(15, 17). Despite the fact that the higher enzyme activity is related with weight, obesity and BMI, CHE2 C5+ individuals presented a lower BMI and weight when compared with CHE2 C5-, suggesting that the presence of C₅ complex has a protective effect against obesity^(15, 18).

Considering the evidences connecting BChE with obesity, this work aimed to investigate the effects of an energetic restriction diet on BChE in obese women from Southern Brazil.

METHODS

Sample

This study was previously approved by the ethical committee from Pontifical Catholic University of Paraná (PUC-PR), under registration 0005306/11. Participated in the study 111 pre menopause women from Southern Brazil, age ≥ 20 , with BMI ≥ 29.9 , non-pregnant, non-lactating, and the subjects whom read, accepted and signed the term of informed consent (IC). The subjects were excluded when they were already participating in a diet, using weight control medicaments, confirmed diagnosis of diabetes type I, non controlled hypertension, hypothyroidism, renal chronic disease and have done stomach reduction surgery.

Energetic Restriction Diet

The diet comprised 8 week of energetic restriction and the eating habits before the intervention were documented in an interview, during which participants were oriented to follow the diet. It was made an adequacy of the intake of macronutrients

before the intervention to the current recommendations⁽¹⁹⁾. The nutritional orientation was made in order to provide a deficit of 2,500 kJ/day and the diet models were developed from the adapted protocol of diet intervention of Nugenob⁽²⁰⁾ and with the recommendations of American Dietetic Association⁽²¹⁾. The nutritional percentage from each macronutrient was recommended as follows: the energy from fat was in the range of 20% to 35%, from carbohydrates in the range of 45% to 65% and from proteins in the range of 10% to 35%⁽²²⁾.

Plasma analysis

Blood samples were collected after the agreement of participation and orientation of 8 to 12 hours of fasting, in two moments: before and after the dietetic intervention. Biochemical parameters, total cholesterol (TC), HDL, LDL and TAG, were obtained by standard automated methods.

Plasma BChE activity was measured using the protocol of Dietz *et al.* (1972)⁽²³⁾ modified by Evans and Wroe (1978)⁽²⁴⁾. *Locus CHE2* phenotypes were identified by acid agar gel electrophoresis (pH: 6.40)⁽²⁵⁾.

The detection of BChE bands in plasma was made according to Boberg *et al.* (2010)⁽²⁶⁾. Relative Intensity (RI) of each band was measured by KODAK 1D Image Analysis Software, and the relative activity (RA) of each band was the result of multiplication of total BChE plasma activity by the RI of each band. Samples without any detectable BChE band were excluded from the analysis.

Statistics

Statistica for Windows (StatSoft, Inc., 5.5 version; <http://www.statsoft.com>) was used to calculate means \pm SE, variances, t-test, F-test and stepwise multiple regression analysis. The adopted level of significance was of 5%.

RESULTS AND DISCUSSION

After 8 weeks of energetic restriction diet and orientation of feeding habits, women came back for the second measurements, when it was possible to compare whether the diet worked or not. Despite the fact that statistically their weight did not suffered a decrease, waist circumference (WC), abdominal circumference (AC) and BMI suffered a significantly decrease, as shown in Table 1. These results show that anthropometrically this 8 week diet was efficient, but not enough to decrease the BMI to the normal range.

Although the mean BMI remained above its normal range after the 8 week intervention, mean plasma BChE activity suffered a significant decrease (before: 5.1

SD 1.53 KU/L and after 4.88 SD 1.04 KU/L; $t= 2.44$; $p=0.01$), becoming similar to the mean activity of non obese women from Southern Brazil (after: 4.88 SD 1.04 KU/L and non obese: 4.95 SD 1.96 KU/L; $t=1.38$; $p=0.17$). These results suggest that there is a significant influence of the diet intake over plasma BChE activity, supporting the role of BChE in the lipid metabolism and obesity^(15, 18, 27-29).

There are studies suggesting that the role of BChE on lipid metabolism could be the hydrolysis of choline esters, which are results of the non-esterified fatty acid metabolism and liver lipogenesis. Considering that in obesity the increased lipogenesis from carbohydrates leads to hyperlipidemia and to increased BChE activity⁽²⁷⁻²⁹⁾, it could also explain why the energetic restriction diet, due to the decreased availability of carbohydrates in the organism, decreased BChE activity.

HDL was the only fraction which showed a significant decrease, what can be explained by the lack of physical exercise (PE) during the dietetic intervention, which may cause an excessive formation of ammonia that leads to fatigue and therefore to decreased PE habits⁽³⁰⁾. The values of the other biochemical variables (triglycerides, total cholesterol and LDL) show no significant changes, as seen in table 1, suggesting that these parameters would need a longer or a stronger intervention to decrease its values, differently from Silva *et al.* (2012)⁽³¹⁾ who demonstrated a significant reduction of biochemical parameters after a 12 week (PE) intervention in obese adolescents, showing that PE would have a more effective effect on these parameters. Considering that both interventions decreased BChE activity, it is possible that an association of PE and diet could be ideal⁽³¹⁾.

The phenotype frequencies of CHE2 C5- and CHE2 C5+ were, respectively, 90.84% SD 2.53 and 9.16% SD 2.52, which are in accordance of the frequency of CHE2 C5+ in population sample from Southern Brazil (10.26% SD 0.60; $p=0.89$)⁽¹⁵⁾. Previously, the phenotype CHE2 C5+ was associated with an increased BChE activity but with a lower weight⁽¹⁵⁾ and BMI⁽¹⁸⁾.

The comparison of mean BChE activity between CHE2 C5+ and CHE2 C5- phenotypes before the intervention did not show any difference, suggesting that obesity probably makes BChE behave equally between the phenotypes. After the intervention only CHE2 C5- phenotype suffered a significant decrease, and CHE2 C5+, besides not showing a decrease, presented approximately 23% higher activity than CHE2C5-, as seen in table 2. These results are in accordance with other works which showed an increased BChE activity in CHE2 C5+ phenotype^(15, 18) and also

suggest that the intervention do not affect the complex G4 associated with CHE2 protein, highlighting the importance of understanding the biochemical interactions of CHE2 C5+ phenotype and BChE activity.

RA did not show a significant decrease after intervention or difference between CHE2 phenotypes for G2, G1-Alb and G1 bands, as seen in table 3, meaning that the dietetic intervention was not effective on these bands. These results are different from the decreased RA of all BChE bands observed by Silva *et al.* (2012)⁽³¹⁾, probably due to the higher effect and duration of PE intervention. In the present study, only the RA of G4 band showed reduction after the intervention, probably because the G4 band is the most abundant and therefore responsible by most of plasma BChE activity. Before the intervention there was no difference between the RA of G4 of CHE2 C5+ and CHE2 C5- individuals. After the intervention CHE2 C5+ individuals maintained its RA of G4 while CHE2C5- decreased it. The analysis of total BChE activity also showed that CHE2 C5- phenotype was the only affected by the dietetic intervention, reinforcing that there is different biochemical interaction in CHE2 C5+ phenotype regarding the effects of an energetic restriction diet intervention.

Stepwise multiple regression analysis was performed to verify the relation between BChE molecular forms before and after dietetic intervention with biochemical and anthropometrical parameters. Before intervention G2 showed a relation with total cholesterol (TC) and waist-stature ratio (WSR) ($\beta(p) = 0.26(0.02)$ and $0.51 (0.04)$, respectively) and after intervention G2 showed relation with abdominal-stature ratio (ASR) with $\beta(p) = 0.35(0.001)$. G1A showed a relation with WSR $\beta(p) = 0.58(0.001)$ before intervention, and after it was possible to verify a relation with TC $\beta(p) = 0.28(0.01)$. And G1 showed a relation with WSR $\beta(p) = 0.56(0.003)$ before the intervention.

These relations between molecular forms of BChE and TC and anthropometrical parameters are probably due to its relation with lipid metabolism, BMI, WC as related before and in other studies⁽³²⁻³⁶⁾.

After the 8 week diet it was possible to observe a decrease in the BMI, WC and AC and it was possible to suggest a relation between dietetic intervention and decreasing of plasma BChE activity, which was concomitant with a reduction in RA of G4, which provides the larger portion of BChE active form. *Locus CHE2* holds a strong biochemical relation with increased BChE activity maintaining it elevated even

after the intervention. This data helped to increase the knowledge about the role of BChE in obesity and suggested that a diet intervention changes directly the enzyme activity. Other studies are still required to the full understanding of the interaction between the *Locus CHE2* products and BChE, concerning the response to metabolic changes.

ACKNOWLEDGEMENTS

Grants and scholarships were received by Araucaria foundation and CAPES. Diagnósticos do Brasil (DB) clinical laboratory performed the automated measurements of biochemical parameters. The authors declare no conflict of interest. Collection, processing and extraction of samples: Authors involved: Willian dos Santos, Caroline Schovanz Schenknecht, Débora Scaraboto, Louise Farah Saliba and Lupe Furtado-Alle. DNA and plasma techniques: Authors involved: Willian dos Santos. Nutritional orientation and evaluation: Authors involved: Louise Farah Saliba. Analysis and interpretation of data: Authors involved: Willian dos Santos, Lupe Furtado-Alle, Ricardo Lehtonen R. de Souza.

REFERENCES

1. Arpagaus M, Kott M, Vatsis KP *et al.* (1990) Structure of the gene for human butyrylcholinesterase. Evidence for a single copy. *Biochemistry* **29**, 124-131.
2. Wescoe WC, Hunt CH, Riker WF *et al.* (1947) Regeneration rates of serum cholinesterase in normal individuals and in patients with liver damage. *Am J Physiol* **149**, 549-551.
3. Rubinstein HM, Diets AA & Lubrano T (1978) Ek1, another quantitative variant at cholinesterase locus1. *J Med Genet* **15**, 27-29.
4. Bartels CF, Van der Spek AFL & La Du BN (1978) Two polymorphisms in the non-coding regions of the *BCHE* gene. *Nucleic Acids Res* **18**, 6171.
5. Lehmann DJ, Johnston C & Smith AD (1997) Synergy between the genes for butyrylcholinesterase *K* variant and apolipoprotein E4 in late onset confirmed Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* **6**, 1933-1936.
6. Souza RLR, Castro RMV, Pereira L *et al.* (1998) Frequencies of the butyrylcholinesterase *K* mutation in the Brazilian population of European and African origin. *Hum Biol* **70**, 965-970.
7. Lehmann DJ, Nagy Z, Litchfield MC *et al.* (2000) Association of butyrylcholinesterase *K* variant with cholinesterase-positive neuritic plaques in the temporal cortex in late-onset Alzheimer's disease. *Hum Genet* **106**, 447-552

8. Holmes C, Ballard C, Lehmann DJ *et al.* (2005) Rate of progression of cognitive decline in Alzheimer's disease: effect of butyrylcholinesterase *K* gene variation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **76**, 640-643.
9. Masson P (1979) Formes moléculaires multiples de la butyrylcholinesterase du plasma humain. *Biochim Biophys Acta* **578**, 493-504.
10. Lockridge O, Bartels CF, Vaughan TA *et al.* (1987) Complete aminoacid sequence of human serum cholinesterase. *J Biol Chem* **262**, 549-557.
11. Lockridge O & La Du BN (1982) Loss of the interchain disulfide peptide and dissociation of the tetramer following proteolysis of native human serum cholinesterase. *J Biol Chem* **257**, 12012-12018.
12. Li H, Schopfer LM, Masson P *et al.* (2008) Lamellipodin proline rich peptides associated with native plasma butyrylcholinesterase tetramers. *Biochem J* **411**, 425-432.
13. Pan Y, Muzykaa JL & Zhan CG (2009) Model of human Butyrylcholinesterase (BChE) Tetramer by Homology and Dynamics Simulation. *J Phys Chem B* **113(18)**, 6543-6552.
14. Benyamin B, Middelberg RP, Lind PA *et al.* (2011) GWAS of butyrylcholinesterase activity identifies four novel loci, independent effects within *BCHE*, and secondary associations with metabolic risk factors. *Hum Mol Genet* **15(20)**, 4504-4514.
15. Chautard-Freire-Maia EA, Primo-Parmo SL, Picheth G *et al.* (1991) C5 isozyme of serum cholinesterase and adult weight. *Hum Hered* **41**, 330-339.
16. Harris H, Hopkinson DA & Robson EB (1962) Two-dimensional electrophoresis of pseudocholinesterase components in human serum. *Nature* **196**, 1296-1298.
17. Harris H (1980) The principles of human biochemical genetics. Amsterdam: *Elsevier/North-Holland Biochemical*.
18. Alcântara VM, Rodrigues LC, Oliveira LC *et al.* (2001) Association of the *CHE2* locus with body mass index and butyrylcholinesterase activity. *Hum Biol* **73**, 587-595.
19. Board, NAOsIoMFaN (2002/2005) Dietary Reference Intakes For Energy, Carbohydrates, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein and Amino acids. Washington DC, *The National Academies Press (NAP)*.

20. Petersen M, Taylor MA, Saris WH *et al.* (2006) Randomized, multi-center trial of two hypo-energetic diets in obese subjects: high- versus low-fat content. *Int J Obes* **30(3)**, 552-560.
21. Seagle Hm, Strain GW, Makris A *et al.* (2009) Position of the American Dietetic Association: weight management. *J Am Diet Assoc* **109(2)**, 330-346.
22. Macronutrients, ARotPo, SoURLo *et al.* (2005) Dietary Reference Intakes For Energy, Carbohydrates, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein and Amino acids. Washington DC, *The National Academies Press (NAP)*.
23. Dietz AA, Rubinstein HM, Lubrano T *et al.* (1972) Improved method for the differentiation of cholinesterase variants. *Am J Genet* **24**, 58-64.
24. Evans RT & Wroe J (1978) Is serum cholinesterase activity a predictor of succinyl choline sensitivity? An assessment of four methods. *Clin Chem* **24**, 1762-1766.
25. Souza RLR, Furtado L, Diniz ACP, Silva ACD, Kaiss J, Petzlerler ML, Chautard-Freire-Maia EA (2003) Studies on a heterologous complex formed by human butyrylcholinesterase. *Biochem Genet New York* **41**, 141-150.
26. Boberg D, Furtado-Alle L, Souza RLR *et al.* (2010) Molecular forms of butyrylcholinesterase and obesity. *Genet Mol Biol* **33**, 452-454.
27. Clitherow JW, Mitchard M & Harper NJ (1963) The possible biological function of pseudocholinesterase. *Nature* **199**, 1000-1001.
28. Chu MI, Fontaine P, Kutty KM *et al.* (1978) Cholinesterase in serum and low density lipoprotein of hyperlipidemic patients. *Clin Chim Acta* **85**, 55-59.
29. Kutty KM, Huang SN & Kean KT (1981) Pseudocholinesterase in obesity: hypercaloric diet induced changes in experimental obese mice. *Experimentia* **37**, 1141-1142.
30. Franco LDP, Campos JADB & Demonte A (2009) Teor lipídico da dieta, lipídios séricos e peso corporal em ratos exercitados. *Ver Nutr* **22(3)**, 359-366.
31. Silva IMW, Leite N, Boberg D *et al.* (2012) Effects of physical exercise on butyrylcholinesterase in obese adolescents. *Genet Mol Biol* **35(4)**, 741-742.
32. Alcântara VM, Oliveira LC, Réa RR *et al.* (2005) Butyrylcholinesterase activity and metabolic syndrome in obese patients. *Clin Chem Lab Med* **43**, 285-288.
33. Randell EW, Mathews MS, Zhang H *et al.* (2005) Relationship between serum butyrylcholinesterase and metabolic syndrome. *Clin Biochem* **38**, 799-805.

34. Souza RLR, Mikami LR, Maegawa OB *et al.* (2005) Four new mutations in the *BCHE* gene of human butyrylcholinesterase in a Brazilian blood donor sample. *Mol Genet Metabol* **84**, 349-353.
35. Iwasaki T, yoneda M, Nakajima A *et al.* (2007) Serum butyrylcholinesterase is strongly associated with adiposity, the serum lipid profile and insulin resistance. *Intern Med* **46**, 1633-1639.
36. Furtado-Alle L, Andrade FA, Nunes K *et al.* (2008) Association of variants of the -116 site of the butyrylcholinesterase *BCHE* gene to enzyme activity and body mass index. *Chem Biol Inter* **175**, 115-118.

TABLES

Table 1. Values of one-sided $t(p)$ for Anthropometrical and Biochemical parameters means before and after dietetic intervention

Parameters	Before	After	$t(p)$
Weight (Kg)	90.76 SD 14.62	88.93 SD 15.19	1.054 (0.29)
Waist Circunference (cm)	95.70 SD 9.88	91.36 SD 13.24	3.45 (0.0008)
Abdominal Circunference (cm)	109.44 SD 11.55	102.05 SD 10.84	5.72 (<0.0001)
BMI (Kg/m ²)	35.14 SD 5.32	33.81 SD 6.04	4.04 (<0.0001)
TC ¹ (mg/dL)	192.94 SD 37.98	192.72 SD 38.09	1.0 (0.32)
HDL (mg/dL)	52.29 SD 12.78	47.68 SD 10.99	8.49 (<0.0001)
LDL (mg/dL)	112.63 SD 30.79	119.34 SD 33.67	1.73 (0.09)
TAG (mg/dL)	140.25 SD 62.48	143.3 SD 74.5	0.77 (0.44)

1. Total Cholesterol.

Table 2. Values of one-sided $t(p)$ comparing BChE activity (KU/L) between CHE2 C5+ and C5- phenotypes and before and after the dietetic intervention.

Phenotype	Before	After	$t(p)$
CHE2 C5-	5.03SD1.56	4.78SD1.0	2.12 (0.037)
CHE2 C5+	5.74SD2.14	5.89SD1.24	0.41 (0.69)
$t(p)$	1.33 (0.13)	3.24 (0.002)	

Table 3. Values of one-sided $t(p)$ of BChE bands relative activity (KU/L) comparing before and after dietetic intervention and between CHE2 C5+ and C5- phenotypes.

	CHE2 C5-	CHE2 C5+	$t(p)$
G4 (before)	3.36SD1.25	3.91SD1.86	1.19 (0.24)
G4 (after)	3.07SD0.81	3.89SD1.0	2.83 (0.006)
$t(p)$	2.37 (0.02)	0.03 (0.97)	
G2 (before)	0.55SD0.35	0.56SD0.32	0.08 (0.93)
G2 (after)	0.58SD0.32	0.72SD0.42	1.24 (0.22)
$t(p)$	0.89 (0.37)	1.28 (0.24)	
G1A (before)	0.72SD0.38	0.79SD0.39	0.53 (0.6)
G1A (after)	0.71SD0.44	0.73SD0.35	0.10 (0.92)
$t(p)$	0.28 (0.78)	0.96 (0.37)	
G1 (before)	0.46SD0.34	0.36SD0.29	0.82 (0.41)
G1 (after)	0.44SD0.32	0.44SD0.27	0.008 (0.99)
$t(p)$	0.64 (0.52)	0.92 (0.38)	

7. ARTIGO 2

Effects of *-116A* and *K* variants of butyrylcholinesterase in a caloric restriction diet in obese women of Southern Brazil

Willian dos Santos¹; Louise Farah Saliba^{1 2}; Caroline Schovanz Schenknecht¹; Débora Scaraboto¹; Ricardo Lehtonen R. Souza¹; Lupe Furtado-Alle^{1*}

1. Polymorphism and Linkage Laboratory, Department of Genetics, Federal University of Parana, Brazil

2. Department of Nutrition, Pontifical Catholic University of Paraná, Brazil.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effects of butyrylcholinesterase (BChE) variants *A539T* (*K* variant; *1615A*; rs1803274) and *-116A* (rs1126680) in a caloric restriction diet intervention (DI) of 8 week (2500kJ/day) in 136 obese women from Southern Brazil. Anthropometrical and biochemical parameters were analyzed before and after this intervention. DNA was extracted by salting-out technique and genotyping of both SNPs were performed using *TaqMan SNP Assay* (*Applied Biosystems*). Allele frequencies: *1615G* and *1615A* presented, respectively, 0.85 ± 0.008 and 0.15 ± 0.008 ; and *-116G* and *-116A* presented 0.92 ± 0.004 and 0.08 ± 0.004 , respectively. Genotypes were grouped as *-116G/G* and *1615G/G* (group 0, n=96), *-116G/G* and *K* variant (group 1, n=22) and carriers of variants for both sites (group 2, n=18). BChE activity showed a significant decrease in group 0 (Before: 5.2 ± 1.58 and After: 4.99 ± 1.06 ; $t(p)1.97(0.03)$). In group 2 the activity was maintained after the intervention, probably because *-116A* sets BChE to a minimum level necessary to the maintenance of its physiological role. Before and after intervention, group 1 showed increased anthropometrical values when compared to groups 0 and 2, probably because the presence of *K* destabilizes BChE tetramer, decreasing the effects of DI. Before DI group 2 showed decreased values when compared to group 0. Before DI in group 0 and 2 genotypes equaled parameters. DI was effective in usual subjects for both sites and *K* variant presence decreases the response to DI, suggesting that a stronger intervention associated with physical exercises would be necessary to affect *K* variant carriers.

INTRODUCTION

Butyrylcholinesterase (BChE; E.1.1.8) is a serum esterase produced by the liver and widely distributed in the organism, being found in plasma, smooth muscle,

pancreas, adipocytes, skin, white brain matter and heart [1]. Despite the fact that BChE physiologic functions are unknown, it has been associated with lipid metabolism, cholesterol and triglycerides levels, body mass index (BMI), waist circumference (WC), waist-hip ratio, weight and obesity [2-7].

BChE is coded by *BCHE* gene which is located in the long arm of chromosome 3 (3q26.1-q26.2) [8-10]. One of the most common variant of *BCHE* gene (18.4% in Southern Brazil) is *A539T (K, 1615A, rs1803274)* [2], which was originally associated with a decreased BChE activity. However, Altamirano *et al.* (2000) [11] observed that the variant *K* does not differ from the usual enzyme regarding substrate specificity and catalysis rate, cellular secretion or, tetramer formation. Furtado-Alle *e. al.* (2008) [7] observed that the decreasing of BChE activity only occurred in the presence of *-116A* variant (8% in Southern Brazil) [7, 12]. These variants are in linkage disequilibrium, preferentially found in *cis* conformation [7, 12] and had previously been associated to BChE activity, weight and BMI variance [5, 6, 7, 13].

Considering the role of BChE in lipid metabolism and obesity, including the association of variants *K* and *-116A* of *BCHE* gene, and knowing that BChE activity decreased in a physical exercise (PE) intervention [14], this work aimed to evaluate the effects of *-116* and *K* variants in obese women whom participated in a 8 week caloric restriction diet.

MATERIALS AND METHODS

Sample

This study was previously approved by the ethical committee from Pontifical Catholic University of Paraná (PUC-PR), under registration 0005306/11. Participated in this study 136 pre menopause women, age ≥ 20 from Southern Brazil with BMI ≥ 29.9 , non-pregnant, non-lactating, and the subjects whom read, accepted and signed the term of informed consent (IC). The subjects were excluded when they were already participating in a diet, using weight control medicaments, confirmed diagnosis of diabetes I, non controlled hypertension, hypothyroidism, renal chronic disease, have done stomach reduction surgery, been a vegetarian and not having availability to attend the meetings.

Caloric Restriction Diet

The diet comprised 8 week of caloric restriction and the eating habits before the intervention were documented in an interview, during which participants were

nutritionally oriented to follow a restriction of 2.500kJ/day. Diet models were developed from the adapted protocol of diet intervention of Nugenob [15] and with the recommendations of American Dietetic Association [16]. An adequacy of the intake of macronutrients before the intervention was made according to the current recommendations [17].

DNA analysis and plasma analysis

Blood samples were collected after the agreement of participation and orientation of 8 to 12 hours of fasting, in two moments: before and after the dietetic intervention (DI). Biochemical parameters were measured by automated techniques and plasma BChE activity was measured using the protocol of Dietz *et al.* (1972) [18] modified by Evans and Wroe (1978) [19].

DNA extraction was performed using a salting out protocol [20] and genotyping of -116A and 1615A variants (rs1126680 and rs1803274, respectively) were performed using *TaqMan SNP Assay (Applied Biosystems)*. Reactions were made in Mastercycler Realplex 2 with the steps: (1) 50 °C/2 minutes; (2) 95 °C/10 minutes; (3) 95 °C/15 seconds and 62 °C/1 minute repeated 50 times.

Statistics

Statistica for Windows (StatSoft, Inc., 5.5 version; <http://www.statsoft.com>) was used to calculate means \pm SE, variances, t-test, F-test. χ^2 -tests were performed using Clump [21] and a 5% level of significance was adopted.

RESULTS AND DISCUSSION

Genotype frequencies of -116 G/G genotype were of 84.51%, -116 G/A genotype of 14.79% and -116A/A genotype of 0.7%. The 1615 variant showed frequencies of 71.43% for G/G genotype, 27.14% for G/A genotype and 1.43% for A/A genotype. Genotypes were in Hardy-Weinberg equilibrium for both sites analyzed ($\chi^2=0.06$, $p>0.99$ for -116 site and $\chi^2=0.58$, $p>0.7$ for 1615 site). Allele frequencies were found as follows: -116G = 0.92 ± 0.004 and -116A = 0.08 ± 0.004 ; 1615G = 0.85 ± 0.008 and 1615A = 0.15 ± 0.008 . These frequencies did not differ from Furtado-Alle *et al.* (2008) [7] study with obese men ($\chi^2=0.25$, $p>0.7$ for -116A and $\chi^2=1.81$, $p>0.1$ for 1615A) [7]. The genotypes were grouped for better understanding of the results, as follows: women usual/usual with -116G/G and 1615G/G (group 0, n=96); women usual/K with -116G/G and 1615A/G,A/A (group 1, n=22) and variant for both sites with -116A/G, A/A and 1615A/G, A/A (group 2, n=18).

BChE activity showed no significant difference when individuals in the group 1 were compared to the group 0, before or after the intervention (before 4.59 ± 1.15 ; after 4.52 ± 0.8 ; $t(p) = 0.56(0.29)$). This data is in accordance with other works who do not relate a biochemical association with a decreased activity when only variant K is present [7, 11, 22]. As summarized in table 1, regarding group 2, it was possible to see that before the intervention BChE activity was lower than in usual individuals, in accordance with other works that obtained a decreased activity in -116A carriers [7, 23]; but after the diet only group 0 suffered a decrease in BChE activity equalizing it with group 2 which did not present a decrease in BChE activity, probably because the presence of -116A variant already sets BChE activity to its minimum value which may be necessary to keep with its physiological role.

When it was considered only the usual group 0, all anthropometrical parameters, suffered a significant decrease in response to the dietetic intervention, as seen in table 2. In the biochemical panel, total cholesterol (TC) and HDL suffered a decrease. HDL decrease could be associated to the increased production of ammonia due to the caloric restriction diet, leading to a fatigue and decreased physical exercises which would result in a reduction of HDL values [24].

The role of BChE in lipid metabolism and the association of high BChE activity with high levels of total cholesterol has been documented before [25, 26, 27], therefore with this diet intervention concomitant decreased enzyme activity and TC was expected. But for triglycerides (TG) and LDL parameters apparently this intervention was not enough to act significantly on them. All anthropometrical parameters suffered a decrease.

The analysis considering group 1 showed that the presence of K allele alone decreased abdominal circumference (AC), BMI (where none of the subjects decreased the BMI below 30 kg/m^2) and the abdominal-height ratio (AHR), as seen in table 2. This suggests that the presence of K variant decrease the effectiveness of a caloric restriction diet intervention. It was observed that for variants in group 2 TC, weight, WC, AC, BMI, waist-height ratio (WHR) and AHR suffered a decrease, different from that observed when K variant alone was present. Therefore, it is possible that these effects are probably due to the presence of -116A variant which was already associated with a decreased BChE activity [7]. These data also shows that K variant has a positive association with variables related to obesity, but when it

is found along with -116A the association is the opposite, suggesting that the -116A effect on lowering BChE activity overcomes the K variant effects.

When comparisons of variables before intervention among the genotypes were performed it was possible to observe that group 1 showed higher means of BMI and abdominal-height ratio (AHR) when compared to 0. This pattern remains, and it is stronger, when its compared 1 with 2, in which when only K is present weight, AC, BMI, WHR and AHR presented significant higher means, as seen in table 3.

Souza *et al.* (2005a) [22] found a higher frequency of K variant in the extreme higher BMI in men and Furtado-Alle *et al.* (2008) [7] found a higher BMI in obese men with the presence of K variant which is in accordance with the higher BMI in the presence of K variant found in the present study. Regarding the comparison between 2 and 0, the variant -116A showed a protective effect against obesity, once weight and WC presented a significantly decreased value, which was expected once the presence of -116A variant was associated with a decreased BChE activity [7, 22].

After the intervention when comparing 0 with 1, the BMI is still higher when K variant is present. Comparisons between 1 and 2 showed that the presence of -116A still leads to decreased parameters after the intervention, such as weight, BMI and WHR. But when comparing 0 with 2, after intervention, the parameters are statistically equal, probably due to the significant decrease in BChE activity in the usual group, which is not observed in the variant -116A carrier group. Data from present study corroborate the association of BChE activity with obesity and anthropometrical parameters, documented before [7, 22, 28-32].

Altamirano *et al.* (2000) [11] also published that the variant K did not differ in tetramerization when compared to the usual, in the other hand, Podoly *et al.* (2009) [33] in a more recent study suggested that the 1615 site is in the tetramerization domain and the estabilization of the tetramer is decreased when variant K is present. This could explain that in the presence of variant K the tetramer loses its stability and with a hydrolic activity impaired it decreased its afinity to substrates and it could affect a metabolic network, leading to a lower response to the dietetic intervention [33].

CONCLUSIONS

Our results suggests that DI was effective considering usual subjects and K variant presence decreases the response to DI. A stronger intervention associated

with PE could be necessary to affect K variant carriers. The presence of -116A suggests that this SNP sets BChE activity to its minimal value to keep with its physiological role.

ACKNOWLEDGEMENTS

Grants and scholarships were received from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and to Diagnósticos do Brasil (DB) clinical laboratory for the automated measurements of biochemical parameters.

REFERENCES

1. Wescoe WC, Hunt CH, Riker WF, Litt IC. Regeneration rates of serum cholinesterase in normal individuals and in patients with liver damage. *Am J Physiol* 1947; 149:549-551.
2. Rubinstein HM, Diets AA, Lubrano T. Ek1, another quantitative variant at cholinesterase locus1. *J Med Genet* 1978; 15:27-29.
3. Lehmann DJ, Johnston C, Smith AD. Synergy between the genes for butyrylcholinesterase *K* variant and apolipoprotein E4 in late onset confirmed Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 1997; 6:1933-1936.
4. Souza RLR, Castro RMV, Freund A, Culpi L, Chautard-Freire-Maia EA. Frequencies of the butyrylcholinesterase *K* mutation in the Brazilian population of European and African origin. *Hum Biol* 1998; 70:965-970.
5. Randell EW, Mathews MS, Zhang H, Seraj JS, Sun G. Relationship between serum butyrylcholinesterase and metabolic syndrome. *Clin Biochem* 2005; 38:799-805.
6. Iwasaki T, Yoneda M, Nakajima A, Terauchi Y. Serum butyrylcholinesterase is strongly associated with adiposity, the serum lipid profile and insulin resistance. *Intern. Med* 2007; 46:1633-1639.
7. Furtado-Alle L, Andrade FA, Nunes K, Mikami LR, Souza RLR, Chautard-Freire-Maia EA. Association of variants of the -116 site of the butyrylcholinesterase *BCHE* gene to enzyme activity and body mass index. *Chem Biol Inter* 2008; 175:115-118.
8. Soreq H, Zamir R, Zevin-Sonkin D, Zakut H. Human cholinesterase genes localized by hybridization to chromosomes 3 and 16. *Hum Genet* 1987; 77:325-328.
9. Allderdice PW, Gardner HAR, Galutira D, Lockridge O, La Du BN, McAlpine PJ. The cloned butyrylcholinesterase (BCHE) gene maps to a single chromosome site, 3q26, *Genomics* 1991; 11:452-454.

10. Gaughan G, Park H, Priddle J, Craig S. Refinement of localization of human butyrylcholinesterase to chromosome 3q26.1-q26.2 using a PCR-derived probe. *Genomic* 1991; 11:455-458.
11. Altamirano CV, Bartels CF, Lockridge O. The butyrylcholinesterase K-variant shows similar cellular protein turnover and quaternary interaction to the wild type enzyme. *J Neurochem* 2000; 74:869-877.
12. Bartels CF, Van der Spek AFL, La Du BN. Two polymorphisms in the noncoding regions of the *BCHE* gene. *Nucleic Acids Res* 1990; 18:6171.
13. Benyamin B, Middelberg RP, Lind PA, Valle AM, Gordon S, Nyholt DR, *et al.* GWAS of butyrylcholinesterase activity identifies four novel loci, independent effects within *BCHE*, and secondary associations with metabolic risk factors. *Hum Mol Genet* 2011; 15(20):4504-4514.
14. Silva IMW, Leite N, Boberg D, Chaves TJ, Einfeld GM, Einfeld GM, *et al.* Effects of physical exercise on butyrylcholinesterase in obese adolescents. *Genet Mol Biol* 2012;35(4):741-742.
15. Petersen M, Taylor MA, Saris WH, Verdich C, Toubro S, MacDonald I, *et al.* (2006) Randomized, multi-center trial of two hypo-energetic diets in obese subjects: high- versus low-fat content. *Int J Obes* 2006; 30(3):552-560.
16. Seagle Hm, Strain GW, Makris A, Reeves RS, American Dietetic Association. Position of the American Dietetic Association: weight management. *J Am Diet Assoc* 2009; 109(2):330-346.
17. Board, NAP. Dietary Reference Intakes For Energy, Carbohydrates, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein and Amino acids. Washington DC: The National Academies Press (NAP); 2002/2005.
18. Dietz AA, Rubinstein HM, Lubrano T, Hodges LK. (1972) Improved method for the differentiation of cholinesterase variants. *Am J Genet* 1972; 24:58-64.
19. Evans RT, Wroe J. Is serum cholinesterase activity a predictor of succinyl choline sensitivity? An assessment of four methods. *Clin Chem* 1978; 24:1762-1766.
20. Lahiri DK, Nurnberger JR. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res.* 1991; 19:5444.
21. Sham PC, Curtis D. Monte Carlo tests for associations between disease and alleles at highly polymorphic loci. *Annals Hum Genet* 2005; 59:97-105.

22. Souza RLR, Fadel-Picheth C, Allebrandt KV, Furtado L and Chautard-Freire-Maia EA. Possible influence of BCHE locus of butyrylcholinesterase on stature and body mass index. *Am J Phys Anthropol* 2005; 126: 329-334.
23. Chaves TJ, Leite N, Milano GE, Souza RLR, Chautard-Freire-Maia EA, Furtado-Alle L. -116 and K *BCHE* gene variants associated with obesity and hypertriglyceridemia in adolescents from Southern Brazil. *Chem Biol Interact* 2012; **12 in press**.
24. Franco LDP, Campos JADB, Demonte A. Teor lipídico da dieta, lipídios séricos e peso corporal em ratos exercitados. *Ver Nutr* 2009; 22(3):359-366.
25. Clitherow JW, Mitchard M, Harper NJ. The possible biological function of pseudocholinesterase. *Nature* 1963; 199:1000-1001.
26. Cucuianu M, Popescu TA, Haragus ST. Pseudocholinesterase in obese and hyperlipemic subjects. *Clin Chim Acta* 1968; 22:151-155.
27. Chu MI, Fontaine P, Kutty KM, Murphy D, Redheendran R. Cholinesterase in serum and low density lipoprotein of hyperlipidemic patients. *Clin Chim Acta* 1978; 85:55-59.
28. Harris H, Hopkinson DA, Robson EB. Two-dimensional electrophoresis of pseudocholinesterase components in human serum. *Nature* 1962; 196:1296-1298.
29. Kutty KM, Redheendran R, Murphy D. Serum cholinesterase: function in lipoprotein metabolism. *Experientia* 1977; 33:420-421.
30. Chautard-Freire-Maia EA, Primo-Parmo SL, Picheth G, Lourenço MA, Vieira MM. C5 isozyme of serum cholinesterase and adult weight. *Hum Hered* 1991; 41:330-339.
31. Alcântara VM, Rodrigues LC, Oliveira LC, Chautard-Freire-Maia EA. Association of the *CHE2* locus with body mass index and butyrylcholinesterase activity. *Hum Biol* 2001; 73:587-595.
32. Alcântara VM, Rodrigues LC, Oliveira LC, Chautard-Freire-Maia EA. The variable expression of the C_{4/5} complex of human Butyrylcholinesterase and body mass index. *Hum Biol* 2003; 75:47-55.
33. Podoly E, Shalev DE, Shenhar-Tsarfaty S, Bennett ER, Assayag EB, Wilgus H. The Butyrylcholinesterase K variant Confers Structurally Derived risks for Alzheimer Pathology. *J Biol Chem* 2009; 284:17170-17179.

TABLES

Table 1. Values of $t(p)$ for butyrylcholinesterase (BChE) activity, of obese women in Curitiba, comparing before and after dietetic intervention and grouping the genotypes of -116 and usuals

BChE Activity (KU/L)			
Genotypes	Before	After	$t(p)$
Grupo 1	4.59±1.15	4.52±0.80	0.56(0.58)ns
Group 0	5.2±1.58	4.99±1.06	1.97(0.03)*
Group 2	4.28±0.91	4.2±0.84	0.62(0.55)ns
$t(p)$	3.82(0.0004)**		3.35(0.001)**

ns: non significant

*: significant in 95% of probability.

** : significant in 99% of probability.

Table 2. Values of $t(p)$ for comparing anthropometrical and biochemical parameters, of obese women in Curitiba, before and after dietetic intervention inside the genotypes of variants for -116 and 1615

Parameters	Group 0 (n=96)			Group 1 (n=22)			Group 2 (n=18)		
	Before	After	$t(p)$	Before	After	$t(p)$	Before	After	$t(p)$
TC mg/dL	193.43±38.65	188.77±36.83	2.27(0.02)*	184.91±28.54	179.71±28.84	1.16(0.26)ns	198.56±46.42	189.62±38.16	2.14(0.049)*
HDL mg/dL	52.15±12.4	47.67±11.06	7.69(2.05E-11)**	49.57±11.74	46.57±12.01	2.57(0.02)*	57.5±14.31	49.62±10.57	3.32(0.005)**
TG mg/dL	138.79±61.12	143.79±79.63	0.95(0.34)ns	141.38±38.69	139.43±56.55	0.28(0.77)ns	132.62±43.41	131.87±60.39	0.08(0.93)ns
LDL mg/dL	113.5±31.11	112.34±29.25	0.62(0.54)ns	107.06±27.28	105.26±30.09	0.46(0.65)ns	114.54±35.11	113.62±28.39	0.20(0.84)ns
Weight kg	91.65±15.22	89.02±15.21	9.97(5.33E-16)**	94.51±16.07	92.5±16.07	1.90(0.07)ns	84.28±10.04	82.28±10.20	2.64(0.005)**
WC cm	96.48±9.94	91.15±13.68	5.67(1.92E-7)**	97.02±10.87	94.97±14.67	1.54(0.14)ns	91.36±9.37	86.96±10.88	5.46(4.27E-5)**
AC cm	109.46±11.35	102.09±10.68	12.91(9.71E-22)**	113.98±13.63	104.14±11.82	7.85(1.11E-7)**	105.97±10.53	98.66±9.84	6.99(2.17E-6)**
BMI kg/m ²	35.08±5.26	34.02±5.26	9.89(7.31E-16)**	38.18±5.57	37.08±5.75	2.35(0.039)*	32.92±4.14	32.11±4.32	3.42(0.003)**
WHR	0.59±0.09	0.55±0.10	5.59(2.69E-7)**	0.61±0.07	0.60±0.09	1.58(0.13)ns	0.57±0.06	0.54±0.07	5.62(3.04E-5)**
AHR	0.67±0.10	0.62±0.09	12.42(8.17E-21)**	0.72±0.09	0.66±0.07	7.71(1.47E-7)**	0.66±0.07	0.62±0.07	7.13(1.69E-6)**

ns: non significant

*: significant in 95% of probability.

** : significant in 99% of probability.

ADICIONAR O N DOS GRUPOS

Abreviations: TC: total cholesterol, TG: tryglicerides, WC: waist circumference, AC: abdominal circumference, BMI: body mass index, WHR: waist-height ratio, AHR: abdome-height ratio

Table 3. Values of $t(p)$ for comparing anthropometrical and biochemical parameters, of obese women in Curitiba, before and after dietetic intervention and *BCHE* gene usuals and variants for -116 and 1615.

Before intervention									
Parameter	Genotypes			Genotypes			Genotypes		
	0	1	$t(p)$	0	2	$t(p)$	1	2	$t(p)$
TC mg/dL	193.43±38.65	184.9±28.54	0.95 (0.34)ns	193.43±38.65	198.56±	0.47 (0.64)ns	184.9±28.54	198.56±	1.1 (0.28)ns
HDL mg/dL	52.15±12.41	49.57±11.74	0.86 (0.39)ns	52.15±12.41	57.5±14.31	1.55(0.12)ns	49.57±11.74	57.5±14.31	1.85 (0.073)ns
TG mg/dL	138.79±61.12	141.38±38.69	0.18 (0.85)ns	138.79±61.12	132.62±43.41	0.39 (0.7)ns	141.38±38.69	132.62±43.41	0.65 (0.52)ns
LDL mg/dL	113.5±31.11	107.1±27.28	0.87 (0.38)ns	113.5±31.11	114.54±35.11	0.12 (0.91)ns	107.1±27.28	114.54±35.11	0.73 (0.47)ns
Weight kg	91.82±15.1	94.5±16.07	0.74 (0.46)ns	91.82±15.1	84.28±10.04	2.02 (0.045)*	94.5±16.07	84.28±10.04	2.35 (0.024)*
WC cm	96.6±9.82	97.02±10.87	0.18 (0.86)ns	96.6±9.82	91.36±9.37	2.08 (0.039)*	97.02±10.87	91.36±9.37	1.74 (0.096)ns
AC cm	109.43±11.23	113.98±13.63	1.63 (0.11)ns	109.43±11.23	105.97±10.53	1.21 (0.23)ns	113.98±13.63	105.97±10.53	2.04 (0.048)ns
BMI kg/m ²	35.11±5.2	38.19±5.57	2.45 (0.016)*	35.11±5.2	32.92±4.14	1.68 (0.048)*	38.19±5.57	32.92±4.14	3.33 (0.0019)**
WHR	0.59±0.088	0.61±0.068	1.2 (0.23)ns	0.59±0.088	0.57±0.065	0.89 (0.38)ns	0.61±0.068	0.57±0.065	2.06 (0.046)*
AHR	0.67±0.1	0.72±0.086	2.27 (0.025)*	0.67±0.1	0.66±0.07	0.29 (0.76)ns	0.72±0.086	0.66±0.07	2.39 (0.022)*
After intervention									
Parameter	Genotypes			Genotypes			Genotypes		
	0	1	$t(p)$	0	2	$t(p)$	1	2	$t(p)$
TC mg/dL	188.62±36.65	179.7±28.84	1.04 (0.3)ns	188.62±36.65	190.23±37.03	0.17 (0.87)ns	179.7±28.84	190.23±37.03	0.98 (0.33)ns
HDL mg/dL	47.58±11.02	46.57±12.01	0.37 (0.71)ns	47.58±11.02	49.41±10.27	0.63 (0.53)ns	46.57±12.01	49.41±10.27	0.77 (0.44)ns
TG mg/dL	143.14±79.43	139.43±56.55	0.2 (0.84)ns	143.14±79.43	130.76±58.65	0.61 (0.54)ns	139.43±56.55	130.76±58.65	0.46 (0.65)ns
LDL mg/dL	112.41±29.09	105.26±30.09	1.006 (0.32)ns	112.41±29.09	114.67±27.82	0.29 (0.77)ns	105.26±30.09	114.67±27.82	0.99 (0.33)ns
Weight kg	89.67±15.7	92.5±16.07	0.76 (0.45)ns	89.67±15.7	82.28±10.2	1.91 (0.058)ns	92.5±17.07	82.28±10.2	2.34 (0.025)*
WC cm	91.98±13.99	94.97±14.67	0.89 (0.37)ns	91.98±13.99	86.95±10.87	1.44 (0.15)ns	94.97±14.67	86.95±10.87	1.92 (0.06)ns
AC cm	102.7±11.01	104.14±11.82	0.54 (0.59)ns	102.7±11.01	98.66±9.84	1.45 (0.15)ns	104.14±11.82	98.66±9.84	1.57 (0.12)ns
BMI kg/m ²	34.02±5.26	37.1±5.75	2.39 (0.02)*	34.02±5.26	32.11±4.32	1.44 (0.15)ns	37.1±5.75	32.11±4.32	3.03 (0.004)**
WHR	0.56±0.1	0.6±0.09	1.85 (0.067)ns	0.56±0.1	0.54±0.074	0.52 (0.6)ns	0.6±0.09	0.54±0.074	2.19 (0.03)*
AHR	0.62±0.09	0.66±0.07	1.66 (0.099)ns	0.62±0.09	0.62±0.068	0.33 (0.74)ns	0.66±0.07	0.62±0.068	1.92 (0.06)ns

0: Usuals for -116 and 1615

1: Usuals for -116 and Variants for 1615

2: Variants for -116 and Variants for 1615

ns: non significant

*: significant in 95% of probability. **: significant in 99% of probability.

Abbreviations: TC: total cholesterol, TG: tryglicerides, WC: waist circumference, AC: abdominal circumference, BMI: body mass index, WHR: waist-height ratio, AHR: abdome-height ratio

8. DISCUSSÃO GERAL

Este estudo buscou identificar os efeitos de uma intervenção dietética de 8 semanas em mulheres obesas, considerando variáveis da butirilcolinesterase (BChE) e associações com o *locus CHE2* e foi possível estabelecer efeitos diversificados relativos aos genótipos e fenótipos diferentes.

Após as 8 semanas de intervenção as mulheres diminuíram o IMC, circunferência de cintura e abdômen, e o único parâmetro bioquímico que sofreu uma diminuição foi o HDL, provavelmente devido à maior fadiga causada pela dieta e produção de amônia levando a uma falta de exercícios físicos (FRANCO *et al.*, 2009)

A atividade geral da BChE das mulheres obesas foi significativamente mais alta do que amostras não obesas de Curitiba, mantendo a relação reportada em trabalhos anteriores (SOUZA *et al.*, 2005a; FURTADO-ALLE *et al.* 2008), porém após a intervenção dietética a atividade sofreu uma diminuição tornando-a estatisticamente igual ao de mulheres não obesas de Curitiba, reforçando o papel da BChE no metabolismo lipídico e obesidade já descrito (CHAUTARD-FREIRE-MAIA *et al.*, 1991; ALCANTARA *et al.*, 2001, 2003; SOUZA *et al.* 2005a; FURTADO-ALLE *et al.*, 2008). Trabalhos anteriores (CLITHEROW *et al.*, 1963; CHU *et al.*, 1978; KUTTY *et al.*, 1981; CHAVES *et al.*, 2012) propuseram que o papel da BChE no metabolismo lipídico se deve pela hidrólise de ésteres de colina, que são produtos de ácidos graxos livres e lipogênese hepática. Levando em conta essa interação, uma maior disponibilidade desses ácidos graxos livres levaria aos efeitos de hiperlipidemia e uma atividade da BChE aumentada. Considerando isso, quando foi introduzida a intervenção dietética, provavelmente houve uma diminuição na disponibilidade desses ácidos graxos livres o que pode ter levado a diminuição da atividade observada após a intervenção.

As frequências fenotípicas de CHE2 C5+ não diferenciaram de outras frequências observadas em Curitiba por Chautard-Freire-Maia *et al.* (1991). Antes da intervenção a atividade dos fenótipos CHE2 C5- e CHE2 C5+ não foram diferentes, porém após a intervenção as mulheres CHE2 C5- diminuíram significativamente a atividade se mostrando menor que as CHE2 C5+, enquanto as mulheres CHE2 C5+ não apresentaram nenhuma diminuição. Estes resultados sugerem que o fenótipo CHE2 C5+ possui um efeito de aumento da atividade enzimática independente da obesidade ou do metabolismo de lipídios alterado. Antes da intervenção, a

semelhança na atividade, entre os dois fenótipos, provavelmente era atribuída ao aumento em CHE2C5- causado pela obesidade, sugerindo um comportamento semelhante da atividade em obesidade no fenótipo CHE2 C5- com a atividade de CHE2 C5+.

Quando as análises das formas moleculares da BChE foram realizadas, foi possível visualizar que as intensidades relativas (IR), se mantiveram proporcionais antes e depois da intervenção, concordando com os trabalhos de Boberg *et al.* (2010) e Silva *et al.* (2012). Com relação à atividade relativa (AR) a banda G4 foi a única afetada pela intervenção, pois embora antes não houvesse diferença entre os dois fenótipos, após a intervenção CHE2 C5- sofre um decréscimo, se tornando estatisticamente menor do que CHE2 C5+ que não sofre diminuição. Esses dados reforçam os dados da atividade plasmática do efeito que CHE2 C5+ possui em manter a atividade alta.

Silva *et al.* (2012), diferentemente, observou uma diminuição em todas as bandas e parâmetros bioquímicos, o que pode ser devido ao tempo e ao tipo de intervenção, pois no trabalho de Silva *et al.* foi utilizado um programa de exercícios físicos, o que não permitiu que o metabolismo diminuísse. Considerando esses dados, é provável que uma associação entre práticas de atividade física e acompanhamento dietético surtiriam um efeito maior do que essas intervenções isoladamente.

As frequências genótípicas e alélicas para as variantes -116 e K não foram diferentes das encontradas em outras amostragens de Curitiba (FURTADO-ALLE *et al.*, 2008). Devido ao desequilíbrio de ligação entre a -116 e a K foi possível agrupar 3 genótipos para as comparações: usuais para os sítios -116 G/G e 1615 G/G (0), usuais para -116 G/G e variantes para 1615 G/A e A/A (1) e variante para os dois sítios -116 G/A e A/A e 1615 G/A e A/A (2).

Considerando a atividade dividida nesses grupos foi possível observar que o grupo 0 diminuiu sua atividade, o grupo 1 não sofreu essa diminuição e possuiu valores iguais aos usuais, o que corrobora com outros trabalhos que atestaram que apenas a presença da K não diminui a atividade (FURTADO-ALLE *et al.*, 2008; ALTAMIRANO *et al.*, 2000; SOUZA *et al.*, 2005b). Antes da intervenção o grupo 2 apresentou uma atividade menor do que o grupo 0, corroborando com Furtado-Alle *et al.* (2008) que mostra que a presença da -116A é que faz o efeito de diminuição da atividade da BChE. E após a intervenção, o grupo 2, não apresentou uma

diminuição significativa, e a diminuição do grupo 0 se igualou ao do grupo 2, o que sugere que a diminuição da atividade devido a presença da -116A deixa a BChE numa atividade mínima para manter suas funções fisiológicas normais e por isso não ocorre diminuição com a dieta.

Considerando parâmetros bioquímicos houve uma diminuição na média de colesterol total, apenas para os grupos 0 e 2. E nos parâmetros antropométricos os grupos 0 e 2 diminuíram significativamente todos os parâmetros enquanto o grupo 1 diminuiu apenas a circunferência abdominal e a razão abdômen-estatura (RAE). Essas análises sugerem que a presença da variante K dificulta a perda de peso.

Quando comparados os parâmetros entre os grupos, antes da intervenção observou-se que a presença apenas da variante K o IMC e a RAE eram maiores do que dos usuais e quando comparados com a presença da -116A o peso, IMC, razão RAE e a razão cintura-estatura (RCE) foram maiores com a presença da K. Quando foi comparado os usuais e variantes com -116A foi possível notar que a presença da -116^a estava associada com a diminuição do peso, circunferência da cintura e IMC, sugerindo que as mulheres com a variante -116A eram mais magras do que as usuais e portadoras apenas da K.

Após a intervenção a presença da variante K comparada com as usuais ainda possui um IMC mais alto e na presença da -116A a K apresentou peso, IMC e RCE maiores. E as usuais igualaram todos os parâmetros analisados com a -116A. Altamirano *et al.* (2000) sugeriu que a variante K não influenciava na tetramerização em relação ao genótipo usual, por outro lado, Podoly *et al.* (2009), em um estudo mais recente, sugeriu que o sítio 1615 se localiza no domínio de tetramerização e a estabilização do tetrâmero está diminuída quando a variante K está presente. Isto poderia explicar porque com a presença da variante K o tetrâmero perde sua estabilidade e com uma atividade hidrolítica debilitada, sua afinidade com substrato estaria diminuída afetando uma rede metabólica, levando a uma menor resposta a intervenção dietética (ALTAMIRANO *et al.*, 2000; PODOLY *et al.*, 2009)

9. CONCLUSÕES GERAIS

- A dieta de restrição de 2500 kJ/dia, durante 8 semanas, foi eficaz para diminuição de alguns parâmetros antropométricos, mas os parâmetros bioquímicos, no geral não sofreram alterações.
- A atividade da BChE diminuiu significativamente, quando considerado o fenótipo CHE2 C5-, após a intervenção o fenótipo CHE2 C5+ não diminuiu a atividade e se manteve 23% maior do que em indivíduos CHE2 C5-.
- A intervenção dietética surtiu efeito apenas no tetrâmero de mulheres CHE2 C5-. Onde antes da intervenção a atividade relativa do tetrâmero era semelhante entre os dois fenótipos, porém apenas as CHE2 C5- apresentaram uma diminuição significativa.
- As frequências fenóticas do *locus CHE2* e as frequências alélicas das variantes K e -116A não diferiam de outras amostragens em Curitiba. Foi possível estabelecer uma relação de dificuldade em emagrecer às portadoras apenas da variante K, que em presença da -116 apresentaram parâmetros menores.
- Sugere-se que a -116 diminui a atividade da BChE em seu mínimo para se manter as funções fisiológicas, uma vez que não foi possível observar diminuição após a intervenção.
- E é proposta uma ação protetora da obesidade quando a K está presente sozinha, uma vez que as portadoras apenas da K apresentaram parâmetros maiores do que portadoras da -116 e usuais nos dois tempos, e foi o grupo que apresentou a menor diminuição de parâmetros antropométricos.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alcântara VM, Rodrigues LC, Oliveira LC and Chautard-Freire-Maia EA (2001) Association of the *CHE2* locus with body mass index and butyrylcholinesterase activity. Hum Biol **73**:587-595.

Alcântara VM, Oliveira LC, Réa RR, Suplicy HL and Chautard-Freire-Maia EA (2003) Butyrylcholinesterase and obesity in individuals with the *CHE2* C5+ and *CHE2* C5-phenotypes. Int J Obes **27**:1557-1564.

Alcântara, V.M.; Oliveira, L.C.; Réa, R.R.; Suplicy, H.L. e Chatard-Freire-Maia, E.A (2005). Butyrylcholinesterase activity and metabolic syndrome in obese patients. Clin. Chem. Lab. Med **43**: 285-288.

Altamirano, C. V., C. F. Bartels, *et al.* (2000). "The butyrylcholinesterase K-variant shows similar cellular protein turnover and quaternary interaction to the wild-type enzyme." J Neurochem **74**(2): 869-877.

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

Arpagaus, M., M. Kott, *et al.* (1990). "Structure of the gene for human butyrylcholinesterase. Evidence for a single copy." Biochemistry **29**(1): 124-131.

Balasubramanian, A.S. Have cholinesterases more than one function? (1984). Trends Neurosci. **7**,:467-468.

Balasubramanian, A.S. e Bhanumathy, C.D. (1993). "Noncholinergic functions of cholinesterases." FASEB J. **7**: 1354-58.

Barros, V. G., Reis, R.S. (2003). Análise de dados em atividade física e saúde. Demonstrando a utilização do SPSS. Londrina, Midiograf.

Bartels, C. F., A. F. van der Spek, *et al.* (1990). "Two polymorphisms in the non-coding regions of the BCHE gene." Nucleic Acids Res **18**(20): 6171.

Bartels, C.F.; Jensen, F.S.; Lockridge, O.; Van der Spek, A.F.L.; Rubinstein, H.M.; Lubrano, T. e La Du, B.N. (1992). "DNA mutation associated with the human butyrylcholinesterase K-variant and its linkage to the atypical variant mutation and other polymorphic sites." Am. J. Hum. Genet. **50**: 1086-103.

Benyamin, B.; Middelbers, R.P.; Lind, P.A.; Valle, A.M.; Gordon, S.; Nyholt, D.R. *et al.* (2011). "GWAS of butyrylcholinesterase activity identifies four novel loci, independent effects within *BCHE*, and secondary associations with metabolic risk factors". Oxford University Press. :1-40.

Bray, G. A., S. J. Nielsen, *et al.* (2004). "Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity." Am J Clin Nutr **79**(4): 537-543.

Board, NAOsIoMFaN. (2002/2005). "Dietary Reference Intakes For Energy, Carbohydrates, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein and Amino acids." Washington DC, *The National Academies Press (NAP)*.

Boberg, D., Furtado-Alle, L, Souza, R. *et al.* (2010). "Molecular forms of butyrylcholinesterase and obesity." Gen. and Mol. Biology **33**(3): 452-454.

Chautard-Freire-Maia EA, Primo-Parmo SL, Picheth G, Lourenço MAC and Vieira MM (1991) The C5 isozyme of serum cholinesterase and adult weight. Hum. Hered **41**:330-339.

Chaves TJ, Leite N, Milano GE, Souza RLR, Chautard-Freire-Maia EA, Furtado-Alle L. (2012). " -116 and K *BCHE* gene variants associated with obesity and hypertriglyceridemia in adolescents from Shouthern Brazil." Chem Biol Interact **12 in press**.

Chu, M.I.; Fontaine, P.; Kutty, K.M.; Murphy, D. e Redheendran, R. (1978). "Cholinesterase in serum and low density lipoprotein of hyperlipidemic patients." Clin. Chim. Acta. **85**: 55-59.

Clitherow JW, Mitchard M, Harper NJ. (1963). "The possible biological function of pseudocholinesterase." Nature **199**:1000-1001.

Corpeleijn, E., L. Petersen, *et al.* (2010). "Obesity-related polymorphisms and their associations with the ability to regulate fat oxidation in obese Europeans: the NUGENOB study." Obesity (Silver Spring) **18**(7): 1369-1377.

Cucuianu, M (1999). Serum gamma-glutamyltransferase and/or serum cholinesterase as markers of the metabolic syndrome. Diabetes Care **22**:1381-2.

Cwiertnia, M.M.; Alcântara, V.M.; Réa, R.R.; Faria, A.C.R.A.; Picheth, G. *et al.* (2010). Butyrylcholinesterase and diabetes mellitus in the CHE2 C5- and CHE2 C5+ phenotypes. Arq. Bras. Endocrinol. Metab. **54**: 1, 60-67.

Davis, L. M., C. Coleman, *et al.* (2010). "Efficacy of a meal replacement diet plan compared to a food-based diet plan after a period of weight loss and weight maintenance: a randomized controlled trial." Nutr J **9**: 11.

Deram, S. and S. M. Villares (2009). "Genetic variants influencing effectiveness of weight loss strategies." Arq Bras Endocrinol Metabol **53**(2): 129-138.

Franco LDP, Campos JADB & Demonte A. (2009). "Teor lipídico da dieta, lipídios séricos e peso corporal em ratos exercitados." Ver Nutr **22**(3):359-366.

Froguel, P.; Guy-Grand, B. e Clement, K. (2000). "Genetics of obesity: towards the understanding of a complex syndrome." Presse Med. **29**: 564-571.

Froguel, P. e Boutin, P. (2001). "Genetics of pathways regulating body weight in the development of obesity in humans." Exp. Biol. Med. (Maywood). **226**: 991-996.

Furtado-Alle L, Andrade FA, Nunes K, Mikami LR, Souza RLR and Chautard-Freire-Maia EA (2008) Association of variants of the -116 site of the butyrylcholinesterase *BCHE* gene to enzyme activity and body mass index. Chem Biol Interact **175**:115-118.

Gaffney, D. e Campbell, R.A. (1994). "A PCR method to determine the Kallow allele frequency and its significance in the normal population." J. Med. Genet. **31**: 248-50.

Gaughan, G., H. Park, *et al.* (1991). "Refinement of the localization of human butyrylcholinesterase to chromosome 3q26.1-q26.2 using a PCR-derived probe." Genomics **11**(2): 455-458.

Greenfield, S. A. "Acetylcholinesterase may have novel functions in the brain." (1984). Trends Neurosci., **7**: 364-368.

Grifman, M.; Galyam, N.; Seidman, S. e Soreq, H. "Functional redundancy of acetylcholinesterase and neuroligin in mammalian neuritogenesis" (1998). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **95**: 13935–13940.

Halaas, J.L.; Gajiwala, K.S.; Maffei, M.; Cohen, S.L.; Chait, B.T.; Rabinowitz, D.; Lallone, R.L.; Burley, S.K. e Friedman, J.M. (1995). "Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene." Science. **269**: 543-546.

Harris, H.; Hopkinson, D.A e Robson, E.B (1962). Two-dimensional electrophoresis of pseudochoolinesterase components in human serum. Nature **196**: 1296-98.

Harris, H.; Robson, E.B.; Glen-Bott, A.M. e Thornton, J.A. (1963). "Evidence for non-allelism between genes affecting human serum cholinesterase." Nature. **200**: 1185-87.

Harris, H. The principles of human biochemical genetics (1980). 3^a ed. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical, p. 171.

Hutchinson, A.O.; Mccance, R.A. e Widdowson, E.M. (1951). "Serum cholinesterases. In: Studies of undernutrition, Wuppertal, 1946-1949." Spec. Rep. Ser. Med. Res. Coun. (Lond.). **275**: 216-225.

IBGE (2010). Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009. Antropometria e estado nutricional de crianças e adultos no Brasil. I. B. d. G. e. E. s.-. IBGE. Rio de Janeiro, Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão.

Izumi, M.; Maekawa, M. e Kanno, T. (1994). "Butyrylcholinesterase K-variant in Japan: Frequency of allele and associated enzyme activity in serum." Clin. Chem. **40**: 1606-7.

Jakicic, J. M., K. Clark, *et al.* (2001). "Appropriate intervention strategies for weight loss and prevention of weight regain for adults. American College of Sports Medicine. Jensen, F.S.; Nielsen, L.R. e Schwartz, M. (1996). "Detection of plasma cholinesterase K-variant by PCR using an amplification created restriction site." Hum. Hered. **46**: 26-31.

Kálmán, J.; Juhásza, A.; Rakonczayb, Z.; Ábrahám, G.; Zanaa, M; Bodad, K.; Farkase, T.; Penkef, B. e Janka, Z (2004). Increased serum butyrylcholinesterase activity in type IIb hyperlipidaemic patients. Life Sci. **75**: 1195–1204.

Kalow, W. e Genest, K. (1957) "A method for the detection of atypical forms of human serum cholinesterase. Determination of dibucaine numbers." Canad. J. Biochem. Physiol. **35**: 339-346.

Kumanyika, S., R. W. Jeffery, *et al.* (2002). "Obesity prevention: the case for action." Int J Obes Relat Metab Disord **26**(3): 425-436.

Kutty, K.M. e Acharya, C.D. (1972). "Serum cholinesterase and lipoproteins: a possible relationship." Scand. J. Clin. Lab. Invest. **29**: Resumo 3.28.

Kutty, K.M.; Rowden, G. e Cox, A.R. (1973). "Interrelationship between serum b-lipoprotein and cholinesterase." Canad. J. Biochem. **51**: 883-887.

Kutty KM, Redheendran R and Murphy D (1977). Serum cholinesterase: Function in lipoprotein metabolism. Experientia **33**:420-421.

Kutty, K. M. (1980). "Biological function of cholinesterase." Clin Biochem **13**(6): 239-243.

Kutty, K.M; Huang, S.N. e Kean, K.T. (1981). "Pseudocholinesterase in obesity: hypercaloric diet induced changes in experimental obese mice." Experientia. **37**: 1141-1142.

Lahiri DK, Nurnberger JR Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. Nucleic Acids Research 1991; 19 (19): 5444.

Lawrence, S.H. e Melnick, P.J. (1961). "Enzymatic activity related to human serum beta-lipoprotein: histochemical, immuno-electrophoretic and quantitative studies." Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **107**: 998-1001.

Lee JS, Kawakubo K, Inoue S, Akabayashi A. (2006). "Effect of β 3-adrenergic receptor gene polymorphism on body weight change in middle-aged, overweight women." Environ Health Prev Med.**11**(3):69-74.

Li, H.; Schopper, L.M.; Masson, P.; Lockridge, O. (2008). "Lamellipodin proline rich peptides associated with native plasma butyrylcholinesterase tetramers." Biochem. Jour. **411**: 425-432.

Lockridge, O.; Eckerson, H.W. e La Du, B.N. (1979). "Interchain disulfide bonds and subunit organization in human serum cholinesterase." J. Biol. Chem. **254**: 8324-30.

Lockridge, O.; Bartels, C.F.; Vaughan, T.A.; Wong, C.K.; Norton, S.E. e Johnson, L.L. (1987a). "Complete aminoacid sequence of human serum cholinesterase." J. Biol. Chem. **262**: 549-557.

Lockridge, O.; Adkins, S. e La Du, B.N. (1987b). "Location of disulfid bonds within the sequence of human serum cholinesterase." J. Biol. Chem. **262**: 12945-12952.

Macronutrients, ARotPo, SoURLo *et al.* (2005). "Dietary Reference Intakes For Energy, Carbohydrates, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein and Amino acids." Washington DC, *The National Academies Press (NAP)*.

Mammès O, Betouille D, Aubert R, Giraud V, Tuzet S, Petiet A, et al. (1998). "Novel polymorphism in the 5' region of the LEP gene: association with leptin levels and response to low-calorie diet in human obesity." Diabetes. **47(3)**:487-9.

Masson P (1989) A naturally occurring molecular form of human plasma cholinesterase is an albumin conjugate. Biochim Biophys Acta **988**: 258-266.

Masson, P; Xie, W; Froment, M.T e Lockridge, O. (2001). "Effects of mutations of active site residues and amino acids interacting with the 6 loop on substrate activation of butyrylcholinesterase." Biochim. Biophys. Acta. **1544**: 166-176.

Moher, D., S. Hopewell, *et al.* (2010). "CONSORT 2010 Explanation and Elaboration: Updated guidelines for reporting parallel group randomised trials." J Clin Epidemiol **63(8)**: e1-37.

Montgomery, A. A., T. J. Peters, *et al.* (2003). "Design, analysis and presentation of factorial randomised controlled trials." BMC Med Res Methodol **3**: 26.

Nakamura M, Tanaka M, Abe S, Itoh K, Imai K, Masuda T, et al. (2000). "Association between beta 3-adrenergic receptor polymorphism and a lower reduction in the ratio of visceral fat to subcutaneous fat area during weight loss in Japanese obese women." Nutr Res. **20(1)**:25-34.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). Disponível em:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=NC_000003&from=166973395&to=167037952&strand=2&dopt=gb. Acessado em 21/09/2011.

NICE (2006). "Obesity: the prevention, identification, assessment and management of overweight and obesity in adults and children. National Institute for Health and Clinical Excellence." NICE clinical guideline. **43**.

NIH (1998). "Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults-The Evidence Report. National Institutes of Health." Obes Res **6 Suppl 2**: 51S-209S

Nunes, K.; Souza, R.L.R.; Furtado-Alle, L.; Tsuneto, L.T.; Petzl-Erler, M.L.; Chautard-Freire-Maia, E.A. (2008). "Absence of the -116^a variant of the butyrylcholinesterase *BCHE* gene in Guarani Amerindian from Mato Grosso do Sul". Gen. and Mol. Biol. **31**: 27-28.

Ogden, C. L., M. D. Carroll, *et al.* (2007). "Obesity among adults in the United States- no statistically significant change since 2003-2004." NCHS Data Brief **1**: 1-8.

Pan Y, Muzykaa JL & Zhan CG (2009). "Model of human Butyrylcholinesterase (BChE) Tetramer by Homology and Dynamics Simulation." J Phys Chem B **113(18)**, 6543-6552.

Pelleymounter, M.A.; Cullen, M.J.; Baker, M.B.; Hecht, R.; Winters, D.; Boone, T.; Collins, F. (1995). "Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice." Science. **269**: 540-543.

Perusse, L.; Rankinen, T.; Zuberi, A.; Chagnon, Y.C.; Weisnagel, S.J.; Argyropoulos, G.; Walts, B.; Snyder, E.E. e Bouchard, C. (2004). "The Human Obesity Gene Map: The 2004 Update." Obes. Res. **13**: 381-490.

Petersen, M., M. A. Taylor, *et al.* (2006). "Randomized, multi-center trial of two hypo-energetic diets in obese subjects: high- versus low-fat content." Int J Obes (Lond) **30(3)**: 552-560.

Podoly E, Shalev DE, Shenhar-Tsarfaty S, Bennett ER, Assayag EB, Wilgus H. (2009). "The Butyrylcholinesterase K variant Confers Structurally Derived risks for Alzheimer Pathology." J Biol Chem **284**:17170-17179.

Popovic, L.; Oreskovic, K.; Zupancic, B.; Petrunic, M. e Kunec-Vajic, E. (1998). "The relation between plasma lipid levels and pseudocholinesterase activity in hypothyroidism". Metab. Res. **3**: 137-140, 1998.

Rubinstein, H. M.; Dietz, A. A. e Lubrano, T (1978). E1^K, another quantitative variant at cholinesterase locus1. J. Med. Genet. **15**: 27-29.

Schumacher, M.; Camp, S.; Maulet, V.; Newton, M.; Macphee-Qquigley, K.; Taylor, S.S.; Friedmenn, T., e Taylor, P. (1986). "Primary structure of *Torpedo Californica* acetylcholinesterase deduced from its cDNA sequence." Nature (London). **319**: 407-409.

Seagle, H. M., G. W. Strain, *et al.* (2009). "Position of the American Dietetic Association: weight management." J Am Diet Assoc **109**(2): 330-346.

Shibuta, K.; Abe, M. e Suzuki, T. (1994) "A new detection method for the K variant of the butyrylcholinesterase based on PCR primer introduced restriction analysis (PCR-PIRA)." J. Med. Genet. **34**: 576-79.

Silva IMW, Leite N, Boberg D, Chaves TJ, Einfeld GM, Einfeld GM, *et al.*(2012). "Effects of physical exercise on butyrylcholinesterase in obese adolescents." Genet Mol Biol **35**(4):741-742.

Snyder, E.E.; Walts, B.; Perusse, L.; Chagnon, Y.C.; Weisnagel, J.S.; Rankinen, T. e Bouchard, C. (2004). "The Human Obesity Gene Map: The 2003 Update." Obes. Res. **12**: 369-439.

Soreq, H., R. Zamir, *et al.* (1987). "Human cholinesterase genes localized by hybridization to chromosomes 3 and 16." Hum Genet **77**(4): 325-328.

Souza, R.L.R; Castro, R.M.V.; Freund, A.A.; Culpi, L. e Chautard-Freire-Maia, E.A. (1998). "Frequencies of the butyrylcholinesterase K mutation in Brazilian populations of European and African origin." Hum. Biol. **70**: 965-70.

Souza RLR, Fadel-Picheth C, Allebrandt KV, Furtado L and Chautard-Freire-Maia EA (2005a) Possible influence of BCHE locus of butyrylcholinesterase on stature and body mass index. Am J Phys Anthropol **126**: 329-334.

Souza, R. L., L. R. Mikami, *et al.* (2005b). "Four new mutations in the BCHE gene of human butyrylcholinesterase in a Brazilian blood donor sample." Mol Genet Metab **84**(4): 349-353.

Sposito, M. C. B. F. A. H. F. B. C. A. C. (2007). "IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia." Arquivos Brasileiros de Cardiologia **88**(I): 2-19.

Sugimori, T. (1986). "Shortened action of succinylcholine in individuals with cholinesterase C5 isoenzyme." Canad. Anaesth. Soc. J. **33**: 321-27.

Tartaglia, L.A.; Dembski, M.; Weng, X.; Deng, N.; Culpepper, J.; Devos, R.; Richards, G.J.; Campfield, L.A.; Clark, F.T.; Deeds, J.; *et al.* R.I. (1995). "Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R." Cell. **83**: 1263-1271.

Vazquez Roque MI, Camilleri M, Clark MM, Tepoel DA, Jensen MD, *et al.* (2007) "Alteration of gastric functions and candidate genes associated with weight reduction in response to sibutramine." Clin Gastroenterol Hepatol. **5**(7):829-37.

Weitnauer, E.; Robitzki, A. e Layer, P.G. (1998). "Aryl acylamidase activity exhibited by butyrylcholinesterase is higher in chick than in horse, but much lower than in fetal calf serum." Neurosci. Lett. **254**: 153-156.

Wescow, W. C.; Hunt, C. H.; Riker, W. F. e Litt, I. C. (1947). Regeneration rates of serum cholinesterase in normal individuals and in patients with liver damage. Am. J. Physiol **149**: 549-51.

Whittaker, M. (1980). "Plasma cholinesterase variants and the anaesthetist." Anaesthesia. **35**: 174-97.

Whittaker, M. (1986). Cholinesterase. Karger, Basel, New York., 1-126.

WHO (1998). "The world health report 1998 - Life in the 21st century: A vision for all."

WHO (2011). "The Obesity and Overweight.". Factsheet 311. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>

Zhang, Y.; Proença, R.; Maffei, M.; Barone, M.; Leopold, L.; Friedman, J.M. (1994). "Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue." Nature. **372**: 425-432.

11. MATERIAL COMPLEMENTAR

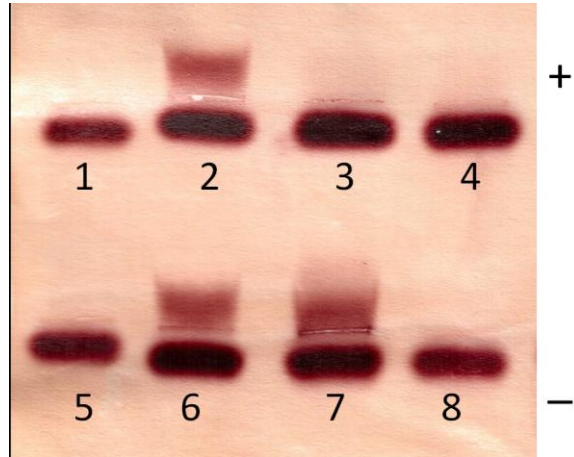


Figura 1: Digitalização de uma eletroforese em gel de Ágar 1% (pH: 6,50; 4 horas; 125V; 40mA), onde as amostras 1, 3, 4, 5, e 8 apresentam fenótipo CHE2 C5- e as amostras 2, 6 e 7 o fenótipo CHE2 C5+.

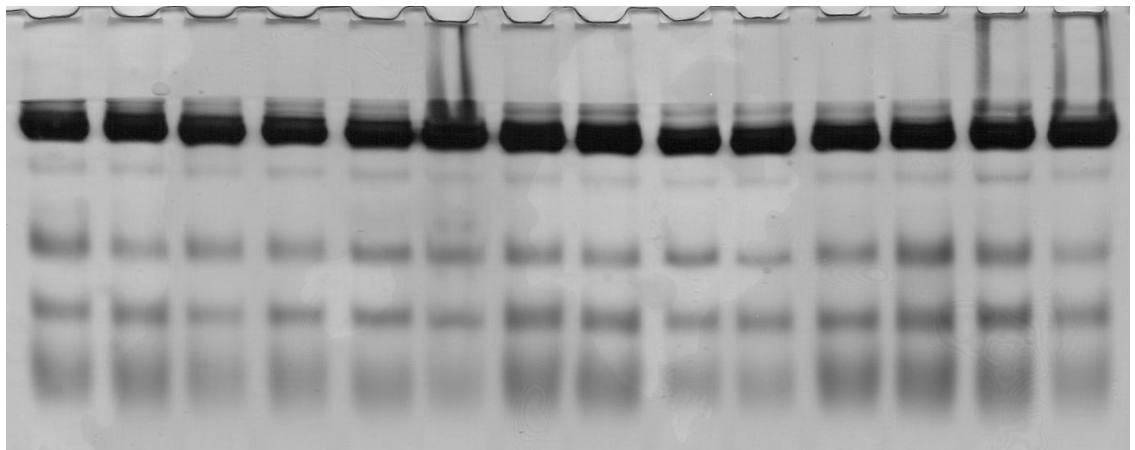


Figura 2: Digitalização de uma eletroforese em gel de poliacrilamida (Gel empilhador: 5% e Gel separador: 8%; 200v; 40mA e 8 horas), onde de cima para baixo se encontram na ordem as formas moleculares: G4, G3 (não analisada), G2, G1-Alb e G1.

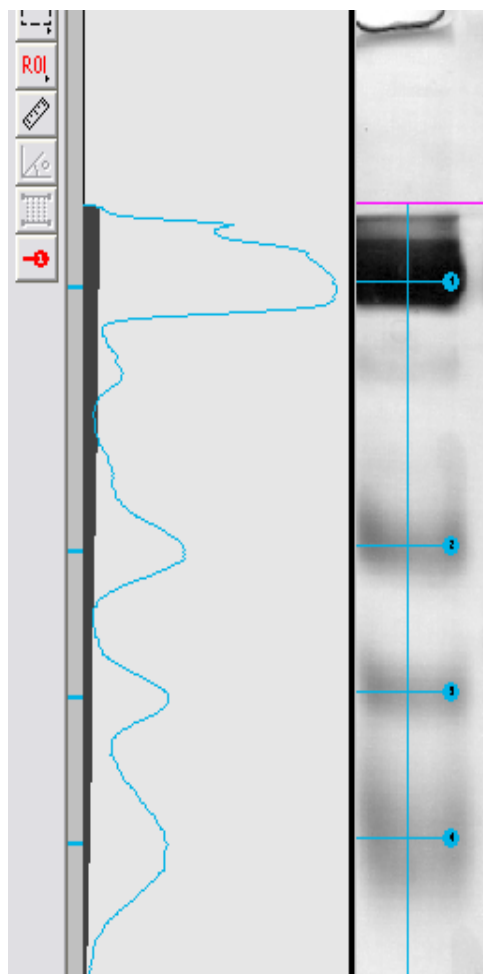


Figura 3: Imagem do programa KODAK 1D mostrando o ajuste nos picos mais altos de cada banda para que a análise da intensidade relativa seja feita.

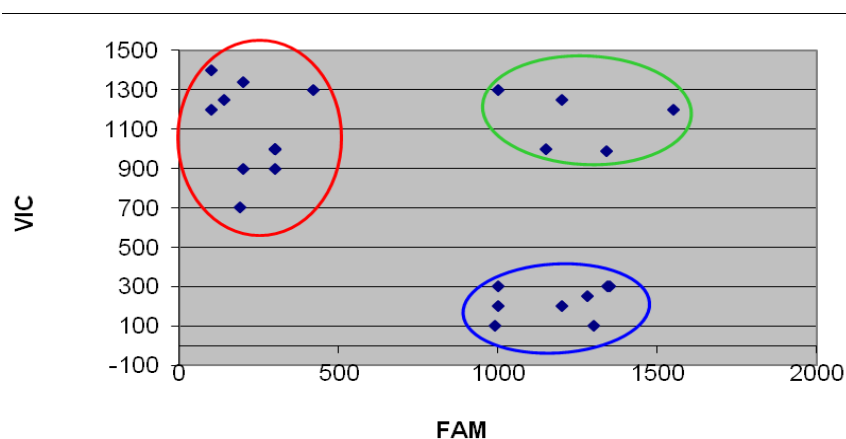


Figura 4: Imagem do gráfico com as fluorescências das genotipagens pela técnica Taqman SNP genotyping Assays geradas pelo programa REAPLEX da EPPENDORF onde os pontos no conjunto vermelho indicam as amostras homozigotas para o alelo G, os pontos do conjunto azul mostram as amostras homozigotas para o alelo A e no conjunto verde as amostras heterozigotas G/A.

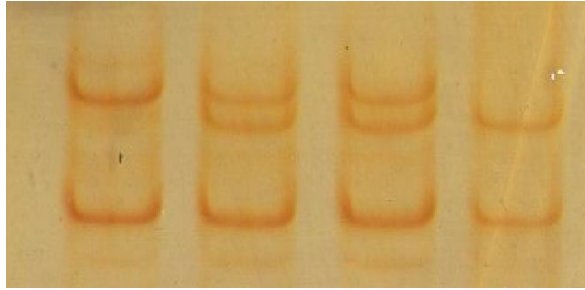


Figura 5: Digitalização de eletroforese ssca em gel de poliacrilamida 8% (200v 4 horas), onde a primeira amostra representa o genótipo homocigoto para a mutação K, a segunda e a terceira amostras representam heterocigoto e a quarta demonstra o homocigoto selvagem.