

LUPE FURTADO

VARIABILIDADE DA BUTIRILCOLINESTERASE
EM ÍNDIOS GUARANI DO MATO GROSSO DO SUL

Dissertação apresentada ao Curso de
Pós Graduação em Genética da
Universidade Federal do Paraná, como
requisito parcial para obtenção do
título de Mestre em Ciências
Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Eleidi A.
Chautard Freire Maia.

CURITIBA

2001

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

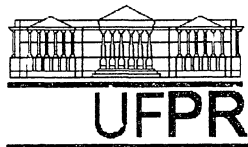
VARIABILIDADE DA BUTIRILCOLINESTERASE
EM ÍNDIOS GUARANI DO MATO GROSSO DO SUL

Dissertação apresentada ao Curso de
Pós Graduação em Genética da
Universidade Federal do Paraná, como
requisito parcial para obtenção do
título de Mestre em Ciências
Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Eleidi A.
Chautard Freire Maia.

CURITIBA

2001



Ministério da Educação e Desporto
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
Curso de Pós-Graduação em Genética

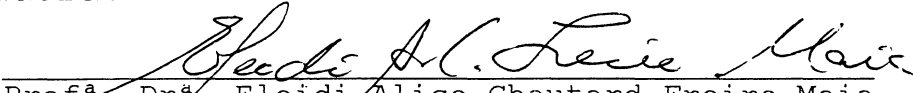
P A R E C E R

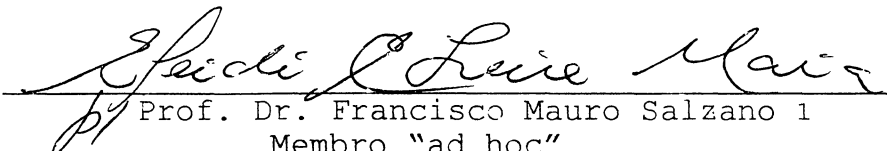
Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da defesa de dissertação de Mestrado, a que se submeteu **LUPE FURTADO**, para fins de adquirir o título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Genética da Universidade Federal do Paraná, no Curso de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira à candidata o conceito " A ".

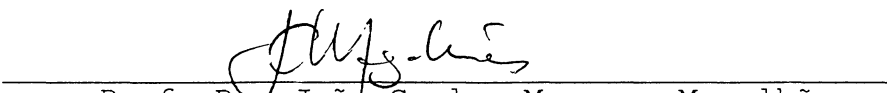
Secretaria da Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 20 de fevereiro de 2001.

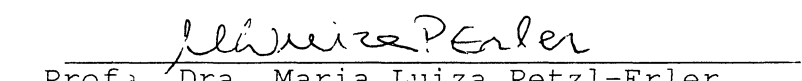
Banca Examinadora:


Prof.^a Dr.^a Eleidi Alice Chautard-Freire-Maia
Orientador e Presidente


Prof. Dr. Francisco Mauro Salzano 1
Membro "ad hoc"


Prof. Dr. João Carlos Marques Magalhães
Membro

Visto:


Prof.^a Dra. Maria Luiza Petzl-Erler
Membro do Colegiado do Curso de Pós-Graduação
em Genética

1 Membro "ad hoc", parecer anexo.





Ministério da Educação e Desporto
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
Curso de Pós-Graduação em Genética

FORMULÁRIO DE JULGAMENTO DE DISSERTAÇÃO – MESTRADO

Título da dissertação: *"Variabilidade da Butirilcolinesterase em Índios Guarani do Mato Grosso do Sul"*.

Autor (a): *Lupe Furtado*

Orientador (a): *Doutora Eleidi Alice Chautard-Freire Maia*

Análise de Dissertação: outorgar os conceitos parciais e o global segundo a seguinte escala:

A (Excelente = 9,0 a 10,0);

B (Bom = 8,0 a 8,9);

C (Regular = 7,0 a 7,9) e

D (Insuficiente = 0,0 a 6,9).

Somente será aprovada a dissertação que atingir conceito global C ou superior.

Conceitos

1. Execução da parte experimental, aplicação correta de métodos adequados à solução do problema proposto.
2. Análise e aproveitamento dos resultados
3. Revisão da bibliografia especializada
4. Relacionamento dos resultados obtidos com os conhecimentos atuais
5. Apresentação geral, consistência e adequação da linguagem, uso de Figuras, tabelas e gráficos

A

B

A

A

A

A

APRECIÇÃO FINAL GLOBAL

Assinatura: *Francisco M. Salzano*

Examinador: *FRANCISCO M. SALZANO*

Universidade: *FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL*

Data do envio do julgamento: *12 / 02 / 01* Obs.: (Data de defesa = 20/02/01).

OBSERVAÇÕES:

- a) Favor apresentar, em folha anexa, suas críticas e sugestões sobre os itens acima e outros aspectos que julgar convenientes.
- b) A escolha do problema, seu equacionamento, o plano de pesquisa e sua adequação ao nível de Mestrado são responsabilidades da Profa. Orientadora, que agradecerá se V. S^a. quiser enviar sugestões e críticas.



A todos os cidadãos do mundo.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Eleidi Alice Chautard Freire Maia pela orientação nesse trabalho e pela iniciação na pesquisa científica.

A todos os colegas de Laboratório e do Departamento de Genética, que de algum modo participaram nesse trabalho.

Ao Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza pela incontável e inestimável ajuda.

À Profa. Dra Maria Luiza Petzl-Erlar e à doutoranda Luisa Tamie Tsuneto pelas amostras de plasma e de ADN e pelos dados de tipagem do loco *HLA-DRB1*.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à CAPES pelo Auxílio financeiro ao projeto de pesquisa e bolsas de mestrado.

À FUNPAR por Auxílio financeiro ao projeto de pesquisa.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	VI
LISTA DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS	XIII
RESUMO.....	XIV
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 ASPECTOS GERAIS.....	3
2.2 FUNÇÃO FISIOLÓGICA DA BChE	4
2.3 ESTRUTURA DA BChE HUMANA.....	6
2.4 PROPRIEDADES CATALÍTICAS DA BChE.....	8
2.5 O GENE <i>BCHE</i>	9
2.5.1 Variabilidade do loco <i>BCHE</i>	11
2.5.1.1 Variante A.....	12
2.5.1.2 Variante K.....	16
2.5.1.3 Variante J.....	17
2.5.1.4 Variante F	18
2.5.1.5 Variante H.....	19
2.5.1.6 Variante SC.....	20
2.5.1.7 Variantes Silenciosas	21
2.6 LOCO <i>CHE2</i>	22
3 OBJETIVOS.....	27
4. MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 AMOSTRA.....	28
4.2 METODOLOGIA	32
4.2.1 Fenotipagem do loco <i>CHE2</i>	32
4.2.2 Fenotipagem do loco <i>BCHE</i>	33

4.2.3 Atividade da BChE.....	35
4.2.4 Extração do ADN.....	37
4.2.5 PCR-SSCA.....	38
4.2.5.1 PCR-SSCA do Exon 2.....	39
4.2.5.1.1 PCR-SSCA do Exon 2a.....	39
4.2.5.1.2 PCR-SSCA do Exon 2b.....	43
4.2.5.2 PCR-SSCA do Exon 3.....	43
4.2.5.3 PCR-SSCA do Exon 4.....	44
4.2.6 Análise estatística.....	46
5. RESULTADOS.....	47
5.1 RESULTADOS MOLECULARES.....	47
5.1.1 Exon 2.....	47
5.1.1.1 Exon 2a.....	47
5.1.1.2 Exon 2b.....	49
5.1.2 Exon 3.....	51
5.1.3 Exon 4.....	52
5.2 FENOTIPAGEM DO LOCO <i>CHE2</i>	54
5.3 FENOTIPAGEM DO LOCO <i>BCHE</i>	56
5.4 ATIVIDADE DA BChE.....	57
6. DISCUSSÃO.....	62
6.1 EXON 2 E FENOTIPAGEM DO LOCO <i>BCHE</i>	62
6.1.1 Exon 2a e fenotipagem do loco <i>BCHE</i>	63
6.1.2 Exon 2b e fenotipagem do loco <i>BCHE</i>	67
6.2 EXON 3.....	78
6.3 EXON 4.....	80
6.4 LOCO <i>CHE2</i>	85
6.5 ATIVIDADE DA BChE.....	90
7. CONCLUSÕES.....	95
7.1 LOCO <i>BCHE</i>	95
7.2 PCR-SSCA E FENOTIPAGEM POR INIBIÇÃO ENZIMÁTICA DO LOCO <i>BCHE</i>	96

7.3 LOCO <i>CHE2</i>	97
7.4 ATIVIDADE DA BChE.....	97
8. APÊNDICE 1	998
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	1132

LISTA DE TABELAS

Pág.

01.	Lista de variantes já descritas do gene <i>BCHE</i> , incluindo nome, fenótipo, alteração de aa, alteração de ADN, nome do alelo e referências bibliográficas	13
02.	Coordenadas geográficas (latitude e longitude) e proporção (% $\pm$ E.P.) de ADN e de plasma (ADN/plasma) de cada uma das localidades representadas na amostra	29
03.	Número de amostras de ADN e de plasma de indivíduos classificados por sub-tribo e demais grupos étnicos	30
04.	Proporção sexual (% $\pm$ E.P.) nas amostras de ADN e de plasma (ADN/plasma), no total e nas três localidades mais representadas	30
05.	Número de amostras de ADN e de plasma (ADN/plasma) de cada sub-tribo e outros grupos étnicos por localidade.	31
06.	Protocolo para o Método de Fenotipagem	35
07.	Números de inibição observados usando-se os inibidores DL-Propranolol (PN) e Ro2-0683 (RON)	35
08.	Número de amostras amplificadas e analisadas para o fragmento 2a do exon 2 do gene <i>BCHE</i> e número de amostras contendo a mutação <i>BCHE*70G</i> em cada sub-tribo e outros grupos étnicos e na amostra total	48
09.	Número de amostras amplificadas e analisadas para o fragmento 2b do exon 2 do gene <i>BCHE</i> e número de amostras contendo a mutação <i>BCHE*390V</i> em cada sub-tribo e outros grupos étnicos e na amostra total	50

10.	Número de indivíduos amplificados e analisados para o exon 3 do gene <i>BCHE</i> , classificados por sub-tribo e demais grupos étnicos	51
11.	Frequência ($\pm$ E.P.) de amostras amplificadas e não amplificadas para o exon 4, através dos dois diferentes pares de iniciadores	52
12.	Número de indivíduos analisados em cada sub-tribo e no total de amostras, indicando os genótipos encontrados e, quando encontrado, a frequência do alelo <i>BCHE</i> *539T.....	53
13.	Número total de amostras, número de amostras CHE2 C5+ e frequência $\pm$ E.P. do fenótipo CHE2 C5+ na amostra total, nas sub-tribos Kaiowá, Nandewa e demais grupos étnicos	54
14.	Frequência (N, % $\pm$ E.P.) de indivíduos CHE2 C5+ por localidade	54
15.	Número (N) e frequência (% $\pm$ E.P.) do fenótipo CHE2 C5+, separados por sub-tribo e por localidade	55
16.	Resultados da fenotipagem por inibição enzimática, indicando número de indivíduos por fenótipo e frequências dos fenótipos (% $\pm$ E.P.) do loco <i>BCHE</i>	56
17.	Número de indivíduos, classificados nas três classes fenotípicas, separados por sub-tribo e por localidade	56
18.	Amostra de indivíduos com resultados de medida de atividade da BChE, classificados por sub-tribo e por localidade	58
19.	Médias ($\pm$ E.P.) de atividade (KU/L) da BChE de amostras classificadas por fenótipo	58

20.	Médias ($\pm$ E.P.) de atividade (KU/L) da BChE de amostras classificadas por genótipo do exon 2.	59
21.	Atividade da BChE e relações de consangüinidade dos indivíduos identificados como variantes do loco <i>BCHE</i> encontrados na amostra da população Guarani do Mato Grosso do Sul.	59
22.	Valores de p, obtidos através do teste t, referentes à comparação das médias de atividade da BChE de indivíduos com fenótipo BCHE U (N=68), BCHE UA (N=2) e BCHE UF (N=8).	60
23.	Valores de p, obtidos através do teste t, referentes à comparação das médias de atividade da BChE de indivíduos com genótipo <i>BCHEU/BCHEF2</i> (N=14), <i>BCHEU/BCHEA</i> (N=3) e <i>BCHEU/BCHEU</i> (N=40) do exon 2 do gene <i>BCHE</i>	60
24.	Valores de p, obtidos através do teste t, referentes à comparação das médias de atividade da BChE de indivíduos com genótipo <i>BCHE*U/BCHE*U</i> (N = 68), <i>BCHE*U/BCHE*UK</i> (N = 15) e <i>BCHE*K/BCHE*K</i> (N = 02)	61
25.	Médias ($\pm$ E.P.) de atividade (KU/L) da BChE de amostras classificadas por genótipo do exon 4 do gene <i>BCHE</i>	61
26.	Comparação das médias (teste t) de atividade da BChE (KU/L) em indivíduos com fenótipo CHE2 C5+ e CHE2 C5-	61
27.	Número de amostras e caracterização, através do cruzamento com os demais dados obtidos por fenotipagem e genotipagem do loco <i>BCHE</i> , do sub-grupo amostral amplificado e analisado para os fragmentos 2a e 2b	62

28.	Números de inibição enzimática pelo DL-propranolol (PN) e pelo Ro2-0683 (RON) dos três indivíduos portadores da mutação <i>BCHE*70G</i> (A)	63
29.	Comparação (X^2 ; p) entre as frequências do alelo <i>BCHE*70G</i> nos Guarani do Mato Grosso do Sul, calculadas com base em dados de análise direta de ADN (0,58% $\pm$ 0,3%), e em outras populações mundiais	64
30.	Dados de tipagem sanguínea para o grupo ABO e de tipagem de HLA- DRB1 para os 03 indivíduos portadores da mutação <i>BCHE*70G</i>	67
31.	Números de inibição enzimática pelo DL-propranolol (PN) e pelo Ro2-0683 (RON) dos indivíduos portadores da mutação <i>BCHE*390V</i> (F2) fenotipados como BCHE U e dos indivíduos fenotipados como BCHE UF	69
32.	Comparação da frequência obtida nesse estudo (1,55% $\pm$ 0,54%) através de inibição enzimática com as frequências descritas para outras tribos indígenas brasileiras e para outras populações mundiais	71
33.	Comparação entre a frequência obtida nesse estudo através de PCR-SSCA (6,98% $\pm$ 1,12%) e as frequências descritas para outras populações ameríndias	73
34.	Dados de tipagem sanguínea para o grupo ABO e de tipagem de <i>HLA-DRB1</i> para os 14 indivíduos genotipados como <i>BCHE*U/BCHE*390V</i>	76
35.	Frequências do alelo <i>BCHE*539T</i> em diferentes populações mundiais e comparações com a frequência alélica obtida nos Guarani do Mato Grosso do Sul (3,8% $\pm$ 0,8%)	81

36.	Dados de tipagem sanguínea para o grupo ABO e de tipagem de <i>HLA-DRB1</i> para os 17 indivíduos portadores da mutação <i>BCHE*539T</i>	83
37.	Comparações (X^2 ; p) das freqüências do fenótipo CHE2 C5+ entre as três localidades mais representadas (Amambaí, Porto Lindo e Limão Verde) e entre as demais localidades da amostra	86
38.	Freqüências do fenótipo CHE2 C5+ (% $\pm$ E.P.) em diferentes grupos étnicos indígenas e comparações (X^2 , p) dessas freqüências com a freqüência obtida nesse estudo (14,34% $\pm$ 2,18%)	88
39.	Distribuição da freqüência (%) do fenótipo CHE2 C5+ em 30 populações indígenas brasileiras	89
40.	Freqüência do fenótipo CHE2 C5+ em populações da Europa, Ásia, Américas, África e Oceania	89
41.	Freqüências do fenótipo CHE2 C5+ (% $\pm$ E.P.) em população de Curitiba e comparação (X^2 , p) dessa freqüência com aquela obtida nesse estudo (14,34% $\pm$ 2,18%)	90

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
01. Desenho esquemático do gene <i>BCHE</i> , mostrando os quatro exons e o número de pares de bases que os compõem. A região hachurada corresponde à proteína madura	10
02. Representação esquemática do exon 2 do gene <i>BCHE</i> , indicando os dois fragmentos amplificados (2a e 2b) nesse estudo e os sítios das mutações até hoje identificadas	40
03. Reprodução de uma placa de gel de poliacrilamida após eletroforese-SSCA de amostras amplificadas para o fragmento 2a do exon 2 do gene <i>BCHE</i> . As amostras 1, 2 e 5 são <i>BCHE*U/BCHE*U</i> , as amostras 3 e 4 são <i>BCHE*U/BCHE*70G</i> (UA)	49
04. Reprodução de uma placa de gel de poliacrilamida após eletroforese-SSCA de amostras amplificadas para o exon 2b do exon 2 do gene <i>BCHE</i> . As amostras 1, 3 e 4 são <i>BCHE*U/BCHE*390V</i> (UF2), as amostras 2 e 5 são <i>BCHE*U/BCHE*U</i>	50
05. Reprodução de placa de gel de poliacrilamida após eletroforese-SSCA de amostras amplificadas para o exon 3 do gene <i>BCHE</i> . Todas as amostras são <i>BCHE*U/BCHE*U</i>	52

06. Reprodução de placa de gel de poliacrilamida após eletroforese-SSCA de amostras amplificadas para o exon 4 do gene *BCHE*. A amostra 1 é *BCHE*U/BCHE*U*, as amostras 2 e 3 são *BCHE*539T/BCHE*539T* (KK) e as amostras 4 e 5 são *BCHE*U/BCHE*539T* (UK).....53
07. Reprodução de uma placa de gel de ágar, pH 6,5, após eletroforese de amostras de plasma. As amostras 2, 3, 5, 9, 10 e 12 têm fenótipo CHE2 C5+ e as demais amostras têm fenótipo CHE2 C5-.....55

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

AChE	Acetilcolinesterase
ADN	Ácido desoxiribonucléico
Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
B	Brasileiro
BChE	Butirilcolinesterase (colinesterase do soro)
BCHE	Loco da butirilcolinesterase
BW 284C51	1,5-bis-(4-alildi-metilamoniofenil)
CHE2	Loco condicionador do complexo C5 da butirilcolinesterase
Cys	Cisteína
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
EP	Erro padrão
Gln	Glutamina
Glu	Ácido glutâmico
Gly	Glicina
HEMEPAR	Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná
His	Histidina
Ile	Isoleucina
IMC	Índice de massa corporal
Iso-OMPA	Tetraisopropilpirofosforamida
Km	Constante de Michaelis
KW	Guarani Kaiowá
Leu	Leucina
Lys	Lisina
MC	Mulato Claro
Met	Metionina
NaCl	Cloreto de sódio
ND	Número de dibucaína
ÑW	Guarani Ñandewa
P	Paraguaio
PCR	"Polymerase Chain Reaction"
Phe	Fenilalanina
PN	Número de DL-propranolol
Pro	Prolina
RNA	Ácido ribonucléico
Ro2-0683	Dimetilcarbamato do brometo de 2-hidroxi-5-fenil- benziltrimetil amônio
RON	Número de Ro2-0683
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Ser	Serina
SSCA	"Single Strand Conformational Analyses"
T	Terena
TBE	Tris-ácido bórico-EDTA
Thr	Treonina
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
Val	Valina

RESUMO

Nesse estudo foi analisada a variabilidade dos locos *BCHE* e *CHE2* e a atividade da butirilcolinesterase (BChE; EC 3.1.1.8) em indígenas Guarani Kaiowá e Nandewa do Mato Grosso do Sul. A variabilidade do loco *BCHE* foi analisada através de fenotipagem por inibição enzimática e de PCR-SSCA. Foram analisados, por PCR-SSCA, dois fragmentos do exon 2, exons 3 e 4 do gene *BCHE*. A fenotipagem por inibição enzimática apresentou uma falha de cerca de 80% na detecção do alelo *BCHE*390V* (*BCHE*F2*; exon 2) responsável por um dos fenótipos resistente ao fluoreto. As frequências desse alelo foram de $1,55\% \pm 0,54\%$ e de $6,98\% \pm 1,12\%$ ($X^2 = 18,6$; $p < 0,1\%$), obtidas respectivamente por fenotipagem e por PCR-SSCA. Esses dados demonstram que, no caso da detecção da mutação *BCHE*390V*, a análise direta de ADN é preferível à fenotipagem por inibição enzimática. A mutação *BCHE*70G* (*BCHE*A*; exon 2), foi encontrada com frequência de $0,58\% \pm 0,30\%$. A análise do exon 3 não indicou a presença de nenhuma mutação. No exon 4 foi identificada, pela primeira vez em população ameríndia, a mutação *BCHE*539T* (*BCHE*K*) com frequência de $3,80\% \pm 0,80\%$. As atividades médias do grupo heterozigoto para mutação A e do grupo homozigoto para a mutação K são significativamente menores que a dos usuais. A análise do loco *CHE2* indicou a presença do fenótipo *CHE2 C5+* com frequência de $14,34\% \pm 2,18\%$, dentro do intervalo descrito na literatura para populações indígenas brasileiras. Não foi encontrada diferença significativa entre as médias de atividade enzimática dos indivíduos *CHE2 C5+* (4,40 KU/L) e *CHE2 C5-* (4,27 KU/L). A atividade média da BChE dessa amostra Guarani ($4,19\% \pm 1,39\%$) é significativamente menor que a média encontrada em Curitiba ($4,89\% \pm 1,87\%$).

1 INTRODUÇÃO

A butirilcolinesterase (BChE; EC 3.1.1.8), também chamada colinesterase do soro, pseudocolinesterase, colinesterase não específica e colinesterase do tipo S, é uma esterase sérica que hidrolisa diversos ésteres de colina, sendo mais eficiente na hidrólise da butirilcolina. A BChE é sintetizada no fígado e é amplamente distribuída no organismo, sendo encontrada na pele, pâncreas, massa branca do cérebro, coração, músculo liso e adipócitos (WESCOE e cols., 1947). A função fisiológica e o substrato natural da BChE permanecem desconhecidos, mas existem várias hipóteses que a relacionam ao metabolismo de lipídios, à condução nervosa lenta, à regulação de níveis de colina e acetilcolina no plasma, à proteção da acetilcolinesterase e ao controle da permeabilidade e transporte de sódio e outros íons pela membrana.

Na década de 50, o uso de succinilcolina, como relaxante muscular pré-operatório, possibilitou a descoberta da variabilidade genética da butirilcolinesterase. A variante atípica dessa enzima é incapaz de hidrolisar a succinilcolina em doses fisiológicas, causando paralisia muscular e apnéia respiratória prolongada nos pacientes portadores dessa variante, submetidos a doses fisiológicas de succinilcolina.

A BChE é codificada pelo gene *BCHE*, localizado no braço longo do cromossomo 3 (GAUGHAN e cols., 1991; ALLDERDICE e cols., 1991). Os diversos alelos do loco *BCHE*, que são identificados através de inibição enzimática e de seqüenciamento ao nível de ADN,

determinam enzimas com diferentes comportamentos frente a diversos inibidores e substratos.

O loco *CHE2* codifica uma substância, cuja natureza permanece desconhecida, que se associa ao tetrâmero da BChE formando o complexo C5 (HARRIS e cols., 1962). Esse loco apresenta os alelos *CHE2**C5+ e *CHE2**C5- responsáveis, respectivamente, pela presença e pela ausência do complexo C5.

Nesse estudo foi analisada a variabilidade dos locos *BCHE* e *CHE2* e a atividade da BChE em indígenas Guarani do Mato Grosso do Sul. Essa mesma amostra está sendo analisada pelo grupo da Professora Dr^a Maria Luiza Petzl-Erler do Laboratório de Genética Molecular e Humana da Universidade Federal do Paraná. Os resultados obtidos pelos dois grupos de pesquisa podem vir a trazer informações a respeito dessa população indígena, permitindo o entendimento de algumas características genéticas originais dessa população e dos efeitos da miscigenação com outros grupos étnicos.

A maioria dos estudos populacionais de frequências das mutações do loco *BCHE* baseia-se em dados de inibição enzimática. A análise por PCR-SSCA, de vários segmentos de ADN do gene *BCHE*, realizada no presente estudo, permite a detecção de mutações através de alterações conformacionais no ADN em fita simples. A análise realizada nesse estudo fornece os primeiros dados populacionais das mutações K e F2 do loco *BCHE*, não identificadas por inibição enzimática. Nesse estudo, o loco *BCHE* foi também analisado através de inibição enzimática, permitindo a comparação dos resultados obtidos por essa técnica e por PCR-SSCA.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ASPECTOS GERAIS

Ésteres de diferentes tipos são encontrados no plasma dos animais e são hidrolisados por enzimas chamadas de esterases. As esterases são classificadas em três tipos principais de acordo com seu substrato preferencial. As esterases aromáticas hidrolisam ésteres aromáticos, as aliesterases hidrolisam, preferencialmente, ésteres alifáticos e as colinesterases hidrolisam, com maior eficiência, ésteres de colina.

Nos vertebrados existem dois tipos de colinesterase: a acetilcolinesterase (AChE) e a butirilcolinesterase (BChE). A acetilcolinesterase (EC 3.1.1.7) hidrolisa acetilcolina na membrana pós-sináptica nas junções neuromusculares. A butirilcolinesterase hidrolisa vários ésteres de colina, inclusive acetilcolina, sendo mais eficiente na hidrólise da butirilcolina. É também chamada colinesterase do soro, pseudocolinesterase, colinesterase não específica e colinesterase do tipo S. Segundo a Comissão de Enzimas da União Internacional de Bioquímica, a butirilcolinesterase é denominada acilcolina-acilhidrolase (EC 3.1.1.8).

A fisostigmina na concentração de 10^{-5} M inibe somente as colinesterases, diferenciando-as das demais esterases (AUGUSTINSSON, 1963). A diferenciação entre AChE e BChE pode ser feita através das respostas frente a diferentes inibidores. Doses terapêuticas de bambuterol (bisdimetilcarbamato de terbutalina) inibem somente a BChE e, em altas concentrações, somente a AChE. Iso-OMPA

(tetraisopropilpirofosforamida) é um inibidor específico da BChE e BW 284C51 [1,5-bis-(4-alildi-metilamoniofenil)] é específico da AChE.

A síntese da BChE ocorre no fígado, em células hepáticas funcionais, e a enzima é amplamente distribuída no organismo: plasma, músculo liso, pâncreas, adipócitos, pele, massa branca do cérebro e coração (WESCOE e cols., 1947).

2.2 FUNÇÃO FISIOLÓGICA DA BChE

Todos os animais possuem algum tipo de enzima capaz de hidrolisar acetilcolina, mas a distinção entre AChE e BChE aparece apenas nos vertebrados. Em *Drosophila* existe apenas uma colinesterase com especificidade intermediária entre AChE e BChE, sugerindo que a duplicação do gene que deu origem às duas enzimas ocorreu durante o aparecimento dos vertebrados (revisão em CHATONNET e LOCKRIDGE, 1989).

A função colinérgica da AChE na transmissão de impulsos nervosos é bem conhecida, mas apesar da grande homologia estrutural verificada entre AChE e BChE, a função fisiológica da BChE e seu substrato natural permanecem desconhecidos. Existem hipóteses que relacionam a BChE à condução nervosa lenta, à regulação de níveis de colina e acetilcolina no plasma, à proteção da acetilcolinesterase, à remoção de ésteres de colina produzidos no metabolismo, à assimilação de alimentos e ao metabolismo de lipídios (revisão em KUTTY, 1980; WHITTAKER, 1980; WHITTAKER, 1986).

Diversos estudos sugerem que as colinesterases, além de hidrolisar ésteres de colina, têm outras funções catalíticas, ou

seja, AChE e BChE exibem mais de uma atividade biológica (revisão em BALASUBRAMANIAN e BHANUMATHY, 1993). LAYER e SPORNS (1987) sugerem uma relação entre BChE e proliferação celular durante o desenvolvimento de células nervosas em galinhas. Um trabalho posterior (LAYER e cols. 1988) mostrou que o efeito da BChE no crescimento de células nervosas de galinha não depende diretamente da sua atividade enzimática, podendo residir em outra parte da molécula, como seqüências homólogas às moléculas de adesão celular que participam do processo de crescimento das células nervosas. JIBILO e cols. (1994) estudaram a expressão da BChE durante o desenvolvimento embrionário em coelhos e verificaram que a BChE é transitoriamente expressa durante os últimos estágios de proliferação celular, enquanto a expressão da AChE está associada às células em processo de diferenciação. Os autores sugerem que a expressão primária e transitória da BChE é um pré-requisito para que seja iniciada a expressão da AChE.

Os glicoalcalóides solanáceos são esteróides naturais de batatas e plantas relacionadas que são inibidores das colinesterases. KRASOWSKI e cols. (1997) verificaram que, em determinadas doses, esses glicoalcalóides têm efeito tóxico ao organismo em decorrência da inibição da AChE e BChE. Observaram, também, que a mutação atípica (*BCHE*70G*) do gene *BCHE* confere resistência frente a esses inibidores e que a distribuição mundial dos glicoalcalóides solanáceos é paralela à distribuição dessa mutação. Esses resultados levaram à sugestão de que esses esteróides de ocorrência natural sejam responsáveis pela

manutenção e distribuição da mutação atípica (*BCHE*70G*) do gene *BCHE*.

O loco *BCHE* apresenta diferentes mutações responsáveis pela ausência total ou por níveis inferiores a 10% dos níveis normais de atividade enzimática no plasma, caracterizando o fenótipo silencioso. A frequência desse fenótipo é de cerca de 1/100.000 e os indivíduos portadores dessas mutações são fisiologicamente normais, o que pode servir de contra argumento quanto à existência de uma função fisiológica real para a BChE (revisão em WHITTAKER, 1986). É sabido, porém, que a desativação ("knockout") de muitos genes não produz efeitos fenotípicos óbvios, pois os sistemas biológicos possuem mecanismos redundantes. Desse modo, é possível que, em indivíduos com fenótipo silencioso, outras enzimas, como a AChE ou outras esterases, possam exercer a função da BChE (SMALL, 1995).

Embora existam diversos estudos que fornecem muita informação a respeito das similaridades entre AChE e BChE, da distribuição intra e inter-específica, das propriedades químicas e da variabilidade molecular da BChE, nenhuma hipótese, até hoje, mostrou-se conclusiva quanto à função e substrato natural da enzima.

2.3 ESTRUTURA DA BChE HUMANA

A BChE humana, encontrada no plasma, é formada por uma cadeia de 574 resíduos de aminoácidos ligada a nove cadeias de oligossacarídeos. O peso molecular, que é calculado com base na sequência de aminoácidos e oligossacarídeos, é de 85.534, concordando com estimativas obtidas por ultracentrifugação (MUENSCH

e cols., 1971) e eletroforese em poliacrilamida (LOCKRIDGE e LA DU, 1982).

As seqüências de aminoácidos da BChE e da AChE apresentam um alto grau de similaridade. A BChE humana e a AChE de *Torpedo* apresentam 54% de identidade e 73% de homologia (revisão em CHATONNET e LOCKRIDGE, 1989). MILLARD e BROOMFIELD (1992), a partir da grande homologia observada entre AChE e BChE, propuseram um modelo para a BChE humana derivado por análise computacional. Nesse modelo as nove cadeias de oligossacarídeos estão distribuídas longe da entrada do sítio ativo, indicando ausência de interações entre essas cadeias e as moléculas do substrato. Os ésteres de colina são direcionados até o fundo de um túnel profundo ao longo de um campo elétrico forte até que alcancem o sítio ligador de colina. Nesse ponto, os ésteres de colina são expostos à tríade catalítica do sítio ativo da BChE (resíduos de serina, histidina e ácido glutâmico) que medeia a quebra dos ésteres de colina (revisão em JIBILO e cols., 1994). As diferentes especificidades frente a substratos verificadas entre AChE e BChE podem decorrer do menor número de resíduos aromáticos presentes na BChE. Na entrada do túnel que conduz ao sítio ativo da BChE existe apenas um resíduo aromático, enquanto na AChE existem três. O sítio ativo da BChE, também devido à ausência de resíduos aromáticos, é mais espaçoso, permitindo à BChE hidrolisar substratos de cadeias mais longas.

Existem diversas formas moleculares da BChE presentes em um mesmo organismo. A BChE humana apresenta quatro formas moleculares principais, identificáveis através de eletroforese em gel de amido, denominadas C₁, C₂, C₃, C₄ (HARRIS e cols., 1962). A forma C₁

é um monômero, C_2 é um monômero ligado à albumina através de ligação covalente e C_3 é um dímero. C_4 é a forma mais freqüentemente encontrada no plasma, correspondendo a um tetrâmero formado por um dímero de dímeros, onde cada dímero é constituído por dois monômeros unidos por uma ligação dissulfeto entre os resíduos Cys571. A ligação entre os dímeros que se unem para formar o tetrâmero C_4 se processa através de interações não covalentes (LOCKRIDGE e cols., 1979; 1987; MASSON, 1979; LOCKRIDGE e LA DU, 1982).

Outra nomenclatura, baseada na estrutura molecular da BChE, foi sugerida em contraponto à nomenclatura baseada na mobilidade eletroforética e propõe as designações G_1 , G_2 , G_3 e G_4 , de acordo com o número de subunidades moleculares (MASSON, 1989). A forma C_1 corresponde à forma globular monomérica, sendo denominada de G_1 , a forma C_2 , que é um monômero ligado à albumina, é referido como G_1 -ALB, o dímero C_3 é denominado G_2 e o tetrâmero C_4 corresponde à G_4 . A designação G_3 corresponde ao trímero de mobilidade intermediária entre C_3 e C_4 que se forma progressivamente a partir de C_4 submetido à tripsina, plasmina e certas proteases.

2.4 PROPRIEDADES CATALÍTICAS DA BChE

O passo inicial da hidrólise dos ésteres de colina pela BChE consiste numa transacilação. O grupo acil do substrato é transferido para o resíduo de serina da tríade catalítica que libera álcool. Ocorre, então, a adição de uma molécula de água e a concomitante deacilação do complexo acil-enzima (revisão em TAYLOR e cols., 1995).

A menor especificidade da BChE, em relação à AChE, na hidrólise de ésteres de colina é explicada pelas diferenças observadas na constituição do sítio ativo. A BChE é capaz de hidrolisar diversos ésteres de colina, desde acetil até heptanoilcolina, sendo que os valores de K_m decrescem com o aumento da cadeia do ácido. A BChE é mais eficiente na hidrólise de butirilcolina, contrastando com a AChE que hidrolisa a acetilcolina com maior eficiência. O uso de tio-ésteres equivalentes, permite melhor detecção das reações de hidrólise mediadas pela AChE e BChE, de modo que é utilizado o método desenvolvido por ELLMAN e cols. (1961) de detecção de grupos sulfidril. A BChE hidrolisa, também, outros substratos carregados positivamente como a procaína, heroína e cocaína, substratos neutros como o acetato de α -naftil e substratos carregados negativamente como a aspirina (revisão em LOCKRIDGE, 1990).

2.5 O GENE *BCHE*

As evidências de que um único gene codifica a BChE, bem como a estrutura desse gene, foram demonstradas por ARPAGAUSS e cols. (1990). O gene *BCHE* está localizado no cromossomo 3 (3q26.1-q26.2), tem cerca de 73 quilobases, possui quatro exons, formados por 2.416 pares de bases, e três introns. A figura 1 mostra um desenho esquemático do gene *BCHE*.

O mRNA da BChE humana possui 40% de C+G, que é, aproximadamente, a proporção dessas bases no genoma humano. Comparações entre as proteínas colinérgicas de mamíferos e aves (BChE, AChE, receptores nicotínicos e muscarínicos de acetilcolina

e colina acetiltransferase) mostram que o gene da BChE possui um conteúdo menor de C+G em relação a outras proteínas colinérgicas. O conteúdo de C+G pode ser importante para a regulação ao nível transcricional, pois o genoma de animais homeotermos pode ser dividido em domínios com conteúdos altos e baixos de C+G chamados de isocoros. A posição dos genes em isocoros é conservada durante a evolução, o que pode ser constatado na BChE humana e de coelho que conservam o baixo conteúdo de C+G. Como os isocoros não são igualmente transcritos em diferentes tecidos, AChE e BChE, que possuem conteúdos de bases opostos e que provavelmente pertencem a duas unidades transcricionais distintas do genoma, podem ser utilizadas sucessiva ou alternadamente em tecidos diferentes (revisão em CHATONNET e LOCKRIDGE, 1989).

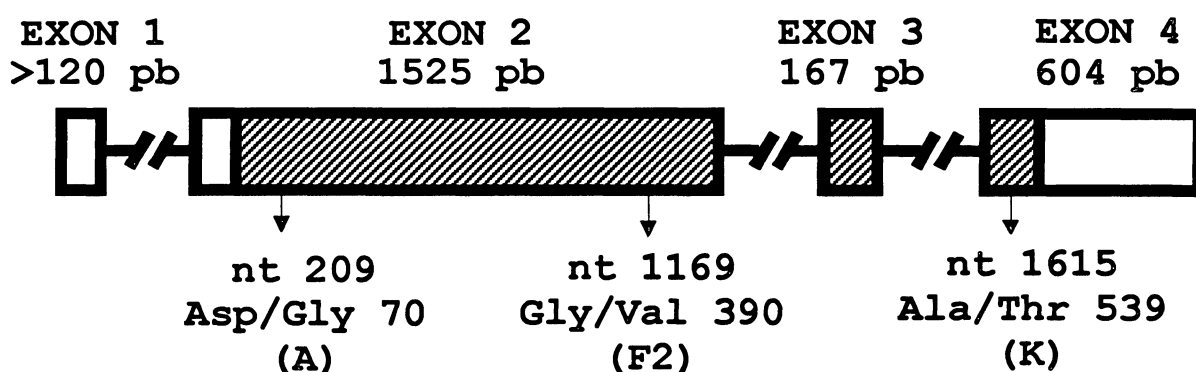


FIGURA 1. Desenho esquemático do gene *BCHE*, mostrando os quatro exons e o número de pares de bases que os compõem. A região hachurada corresponde à proteína madura.

2.5.1 Variabilidade do loco *BCHE*

A BChE é uma enzima polimórfica, sendo a maioria das variantes genéticas codificada pelo loco *BCHE*. Durante a década de 50, o início do uso da succinilcolina como relaxante muscular pré-operatório, causou, em alguns pacientes, paralisia muscular e apnéia respiratória prolongada. Essa resposta incomum, observada em alguns pacientes submetidos à succinilcolina em doses fisiológicas, possibilitou a descoberta da variabilidade genética do loco *BCHE*.

Os diversos alelos do loco *BCHE*, já identificados, são: *BCHE*U*; *BCHE*K*; *BCHE*A*; *BCHE*F1*; *BCHE*F2*; *BCHE*J*; *BCHE*H*; *BCHE*NFDL* e vários alelos silenciosos. Alguns alelos do loco *BCHE* podem ser identificados por inibição enzimática (KALOW e STARON, 1957). O uso dos inibidores DL-propranolol e Ro2-0683 [dimetilcarbamato de brometo de (2-hidroxi-5-fenil-benzil) trimetil amônio] e de acetato de α -naftila como substrato (ALCÂNTARA e cols., 1991b; PICHETH e cols., 1994) fornece uma boa separação dos diversos fenótipos. Dibucaína e fluoreto de sódio também podem ser utilizados como inibidores para evidenciar variantes fenotípicas da BChE. A análise direta de ADN vem permitindo a identificação de uma gama maior de variantes do loco *BCHE*. PRIMO-PARMO (1993) sugere uma classificação em três grupos para as variantes da BChE: as variantes qualitativas determinam variantes qualitativamente diferentes da enzima normal, chamada usual, e que podem ser identificadas por métodos de inibição enzimática; as variantes quantitativas apresentam características usuais, mas estão

presentes no plasma em concentrações mais baixas que a usual e só podem ser detectadas por testes de inibição em algumas combinações genotípicas; as variantes silenciosas têm atividade inferior a 10% do nível da enzima usual. A tabela 1 mostra essas mutações, a nomenclatura formal de cada uma delas e os fenótipos correspondentes.

2.5.1.1 Variante A

A forma atípica (A), também chamada de resistente à dibucaína, foi a primeira variante genética a ser identificada. Foi inicialmente detectada em pacientes submetidos a doses fisiológicas de succinilcolina, utilizada como relaxante muscular pré-operatório. Esses pacientes, devido à incapacidade da enzima atípica da BChE de hidrolisar succinilcolina, sofriam de paralisia muscular e apnéia respiratória prolongadas. KALOW e DAVIES (1958) verificaram que a enzima atípica é menos inibida que a usual frente à dibucaína. O número de dibucaína (DN), que corresponde à percentagem de inibição pela dibucaína, da BChE atípica é de aproximadamente 20 e o DN da enzima usual é de aproximadamente 80. Alguns indivíduos consangüíneos aos atípicos apresentaram ND em torno de 60, sugerindo que esse valor intermediário corresponderia aos heterozigotos para a mutação A e que os valores extremos corresponderiam aos dois grupos homozigotos (KALOW e STARON, 1957; HARRIS e cols., 1960).

TABELA 1. Lista de variantes já descritas do gene *BCHE*, incluindo nome, fenótipo, alteração de aa, alteração de ADN, nome do alelo e referências bibliográficas.

NOME	FENÓTIPO	ALTERAÇÃO DE AA	ALTERAÇÃO DE ADN	ALELO	REFERÊNCIA
Usual	Normal	Nenhuma	Nenhuma	<i>BCHE</i>	
Neutra rara	Normal	255Glu->Asp	nt764 GAG->GA?	<i>BCHE*255D</i>	Primo-Parmo e cols.1996
RESISTENTES A INIBIDORES					
Atípica	dibucaína	70Asp->Gly	nt209 GAT->GGT	<i>BCHE*70G</i>	McGuire e cols. 1989
Fluoreto-1	fluoreto	243Thr->Met	nt728 ACG->ATG	<i>BCHE*243M</i>	Nogueira e cols. 1992
Fluoreto-2	fluoreto	390Gly->Val	nt1169 GGT->GTT	<i>BCHE*390V</i>	Nogueira e cols. 1992
ATIVIDADE DIMINUÍDA FRENTE A DETERMINADO SUBSTRATO					
SC	Succinil-colina	184Ala->Val	nt551 GCC->GTC	<i>BCHE*184V</i>	Greenberg e cols. 1995
ATIVIDADE DIMINUÍDA EM GERAL					
K (Kalow)	70%	539Ala->Thr	nt1615 GCA->ACA	<i>BCHE*539T</i>	Bartels e cols. 1992b
J (James)	30%	497Glu->Val	nt1490 GAA->GTA	<i>BCHE*497V</i>	Bartels e cols. 1992a
H (Hamersmith)	10%	142Val->Met	nt424 GTG->ATG	<i>BCHE*142M</i>	Jensen e cols. 1992
ATIVIDADE MENOR QUE 10% DA USUAL OU AUSENTE					
Silenciosa	Reduzida ¹	330Leu->Ile	nt 988 TTA->ATA	<i>BCHE*330I</i>	Sudo e cols. 1997
Silenciosa	Ausente	117Gly-> Códon stop ² no aa 129	nt 351 GGT->GGAG	<i>BCHE*FS117</i>	Nogueira e cols. 1990
Silenciosa	Enzima inativa ³	33Tyr->Cys	nt 98 TAT->TGT	<i>BCHE*33C</i>	Primo-Parmo e cols.1996
Silenciosa	Enzima inativa	198Ser->Gly	nt 592 AGT->GGT	<i>BCHE*198G</i>	Primo-Parmo e cols.1996
Silenciosa	Enzima inativa	201Ala->Thr	nt 601 GCA->ACA	<i>BCHE*201T</i>	Primo-Parmo e cols.1996
Silenciosa	Truncada	271Glu->stop	nt 811 GAA->TAA	<i>BCHE271*STOP</i>	Primo-Parmo e cols.1996
Silenciosa	Truncada	500Tyr->stop	nt 1500 TAT->TAA	<i>BCHE*500STOP</i>	Primo-Parmo e cols.1996

continua

NOME	FENÓTIPO	ALTERAÇÃO DE AA	ALTERAÇÃO DE ADN	ALELO	REFERÊNCIA
Silenciosa	Truncada	Desloc. no códon 6 ⁴	nt 16 <u>ATT</u> -> <u>_TT</u>	<i>BCHE*FS6</i>	Primo-Parmo e cols.1996
Silenciosa	Truncada	Process. alterado	nt -8 ⁵ <u>T</u> -> <u>G</u>	<i>BCHE*12E3-8G</i>	Primo-Parmo e cols.1996
Silenciosa	Expressão reduzida	37Pro->Ser	nt109 <u>CCT</u> -> <u>TCT</u>	<i>BCHE*37S</i>	Primo-Parmo e cols.1996
Silenciosa	Expressão reduzida	125Leu->Phe	nt 375 <u>TTA</u> -> <u>TTT</u>	<i>BCHE*125F</i>	Primo-Parmo e cols.1996
Silenciosa	Expressão reduzida	170Asp->Glu	nt 510 <u>GAT</u> -> <u>GAG</u>	<i>BCHE*170E</i>	Primo-Parmo e cols.1996
Silenciosa	Expressão reduzida	471Trp->Arg	nt 1411 <u>TGG</u> -> <u>CGG</u>	<i>BCHE*471R</i>	Primo-Parmo e cols.1996
Silenciosa	Expressão reduzida	518Gln->Leu	nt 1553 <u>CAA</u> -> <u>CTA</u>	<i>BCHE*518L</i>	Primo-Parmo e cols.1996
Silenciosa	Sem atividade	355Lys->Alu (stop) 6	nt 1062 - 1076	<i>BCHE*355ALU</i>	Muratani e cols. 1991
Silenciosa	Sem atividade	315Thr->stop aa 330 ⁷	ACC -> <u>AACC</u>	<i>BCHE*FS315</i>	Hidaka e cols. 1992
Silenciosa	Sem atividade	465Arg->stop	nt 1393 <u>AGA</u> -> <u>TGA</u>	<i>BCHE*465STOP</i>	Maekawa e cols. 1995
Silenciosa		365Gly->Arg	nt 1093 <u>GGA</u> -> <u>CGA</u>	<i>BCHE*365R</i>	Hada e cols. 1992
Silenciosa		250Thr->Pro	nt 748 <u>ACT</u> -> <u>CCT</u>	<i>BCHE*250P</i>	Maekawa e cols. 1995
Silenciosa		418Phe->Ser	nt 1253 <u>TTC</u> -> <u>TCC</u>	<i>BCHE*418S</i>	Maekawa e cols. 1995
Silenciosa		119Gln->stop	nt 355 <u>CAA</u> -> <u>TAA</u>	<i>BCHE*119STOP</i>	Sudo e cols. 1996
Silenciosa		515Arg->Cys	nt 1543 <u>CGT</u> -> <u>TGT</u>	<i>BCHE*515C</i>	Maekawa e cols. 1995
Silenciosa	Expressão reduzida	4 Deleção Ile	nt 9-11 <u>CATCAT</u> -> <u>CAT</u>	<i>BCHE*FS4</i>	Maekawa e cols. 1997
Silenciosa	Expressão reduzida	24Thr->Met	nt 71 <u>ACG</u> -> <u>ATG</u>	<i>BCHE*24M</i>	Maekawa e cols. 1997
Silenciosa	Expressão reduzida	267Lys->Arg	nt 800 <u>AAA</u> -> <u>AGA</u>	<i>BCHE*267RC</i>	Maekawa e cols. 1997
Silenciosa	Expressão reduzida	100Pro->Ser	nt 298 <u>CCA</u> -> <u>TCA</u>	<i>BCHE*100S</i>	Maekawa e cols. 1997
Silenciosa	Ausente	400Cys->stop	nt 1200 <u>TGC</u> -> <u>TGA</u>	<i>BCHE*400STOP</i>	Hidaka e Iuchi, 1995

continua

NOME	FENÓTIPO	ALTERAÇÃO DE AA	ALTERAÇÃO DE ADN	ALELO	REFERÊNCIA
Silenciosa		315Cys->stop	nt 944 <u>ACC</u> -> <u>AACC</u>	<i>BCHE*315STOP</i>	Hidaka e Iuchi, 1995
Silenciosa		128Tyr->Cys	nt 383 <u>TAT</u> -> <u>TGT</u>	<i>BCHE*128C</i>	Hidaka e Iuchi, 1995
Silenciosa	Expressão reduzida	199Ala->Val	nt 596 <u>GCA</u> -> <u>GTA</u>	<i>BCHE*199V</i>	Sakamoto e cols. 1998
MUTAÇÃO COM EXPRESSÃO NÃO DESCRITA					
ND	Não descrita	425Ser->Pro	nt 1273 <u>TCC</u> -> <u>CCC</u>	<i>BCHE*425P</i>	Gnatt e cols. 1990
MUTAÇÃO SINÔNIMA					
Sinônima	Usual	470Arg->Arg	nt 1410 <u>CGT</u> -> <u>CGG</u>	<i>BCHE</i>	Maekawa e cols. 1995
MUTAÇÕES EM REGIÕES NÃO CODIFICADORAS					
Exon1	Usual ⁸		nt 116 G->A	<i>BCHE</i>	Bartels e cols. 1992a
Exon4	Usual ⁹		nt 1914 A->G	<i>BCHE</i>	Bartels e cols. 1992a

¹ O alelo silencioso *BCHE*330I* é resistente ao fluoreto. ² Deslocamento na matriz de leitura (frameshift mutation). ³ BChE é produzida em quantidade normal. ⁴ O alelo *BCHE*FS6* apresenta deleção do nucleotídeo 16. ⁵ Sítio acceptor do intron 2. ⁶ Inserção de Alu (códon stop). ⁷ Deslocamento na matriz de leitura. Códon stop no aa 330. ⁸ Frequência de 8%. ⁹ Frequência de 26%.

LOCKRIDGE e LA DU (1978) verificaram que a enzima atípica apresenta afinidade reduzida frente a inibidores e substratos carregados positivamente, enquanto não demonstra alterações de afinidade por substratos neutros. GOEDDE e ALTLAND (1971) demonstraram que a enzima atípica apresenta um Km cerca de 100 vezes mais alto para a succinilcolina, sendo incapaz de hidrolisá-la nas concentrações fisiológicas geralmente utilizadas nas práticas anestésicas.

O alelo A, responsável pelo fenótipo atípico da BChE, foi identificado molecularmente como uma mutação de ponto no

nucleotídeo 209 que altera o códon 70 de GAT para GGT (Asp70->Gly; *BCHE*70G*). McGUIRE e cols. (1989) sugeriram que esta mutação de ponto poderia, alterando apenas um aminoácido, gerar uma modificação estrutural no sítio aniônico da enzima. Tal modificação explicaria a afinidade reduzida pelos ésteres de colina que normalmente se ligam ao sítio aniônico da enzima.

Existem diversos estudos populacionais da frequência da variante atípica da BChE. McGUIRE e cols. (1989) estimaram a frequência do alelo A em população caucasóide em cerca de 2%. PRIMO-PARMO e cols. (1986) analisaram sete tribos indígenas quanto à frequência do alelo A da BChE e verificaram que a variante atípica não estava presente. As populações tri-híbridas Tapuá e Canutama apresentaram o alelo A com frequências de 0,3% e 2,4%, respectivamente.

2.5.1.2 Variante K

A enzima variante K é caracterizada por uma redução de cerca de 30% no número de moléculas circulantes que pode ser devida à síntese retardada ou à degradação acelerada da enzima variante K (RUBINSTEIN e cols., 1978). BARTELS e cols. (1992b) identificaram a mutação responsável pelo fenótipo K no nucleotídeo 1615, alterando alanina 539 para treonina (GCA ->ACA; Ala539->Thr; *BCHE*539T*). No mesmo trabalho, os autores observaram a presença da mutação K em 89% dos genes que continham a mutação de ponto *BCHE*70G*, responsável pelo fenótipo atípico da BChE (GAT->GGT; Asp70->Gly). A presença conjunta das mutações K e A na mesma molécula não altera qualitativamente a enzima variante atípica, mas parece

levar a uma redução de cerca de um terço da $V_{\text{máx}}$ da atividade da enzima atípica. Os testes de inibição enzimática não permitem a discriminação dos fenótipos BCHE UK e BCHE KK, a não ser em heterozigotos compostos para o alelo atípico.

Os estudos populacionais, baseados em análise direta de ADN, mostram que o alelo K é o mais freqüente dentre as variantes não-usuais da BChE. BARTELS e cols. (1992b), em população norte-americana, encontraram o alelo K com freqüência de 12,8%. GAFFNEY e CAMPBELL (1994) observaram o alelo K com freqüência de 19,6% em população escocesa. Em população japonesa, SHIBUTA e cols. (1994) e IZUMI e cols. (1994) relataram as freqüências de 16,4% e 17,5%, respectivamente. JENSEN e cols. (1996), analisando população dinamarquesa, verificaram o alelo K com freqüência de 18%. No Brasil, SOUZA e cols. (1998), estudando amostras de brancos e miscigenados (branco X negro), obtiveram as freqüências de 18,4% e 17,1%, respectivamente.

2.5.1.3 Variante J

O fenótipo J da butirilcolinesterase humana leva a uma queda de cerca de 66% da enzima circulante e a um decréscimo correspondente na atividade enzimática. A queda na atividade da BChE, da mesma forma que na variante K, não é devida a alterações na estrutura da enzima, mas sim à quantidade reduzida de enzima circulante.

BARTELS e cols. (1992a) encontraram o fenótipo J associado a duas mutações de ponto na região codificadora do gene da BChE. Uma das mutações correspondia àquela previamente identificada (BARTELS e

cols., 1992b) como mutação K (GCA->ACA; Ala539->Thr) e a outra, denominada mutação J, localizava-se no nucleotídeo 1490, alterando o aminoácido 497 de ácido glutâmico para valina (Glu497->Val). A comparação da sequência de aminoácidos de diferentes colinesterases mostrou que o sítio da mutação J (Glu497) é conservado na BChE humana, de coelho e de camundongo, bem como na AChE de *Torpedo*. Os autores concluíram, então, que o fenótipo J é o resultado da mutação K (GCA->ACA; Ala539->Thr) ligada à mutação J (GAA->GTA; Glu497->Val). A mutação K causa uma redução de 33% das moléculas de BChE circulante e a variante JK, chamada de fenótipo J, leva a uma queda de 66%. A mutação J não foi encontrada sem a mutação K, impossibilitando a determinação do seu papel, por si só, na queda da quantidade de moléculas da enzima circulante.

2.5.1.4 Variante F

A variante F (resistente ao fluoreto), assim como a variante A, é incapaz de hidrolisar succinilcolina em doses fisiológicas devido a alterações na estrutura da enzima. O fenótipo F é caracterizado através de inibição enzimática, sendo resistente à inibição pelo fluoreto e mostrando números baixos de inibição pela dibucaína (HARRIS e WHITTAKER, 1961).

NOGUEIRA e cols. (1992) identificaram duas diferentes mutações associadas ao fenótipo F. A variante F1 (BCHE*243M) resulta de uma mutação de ponto no nucleotídeo 828 que altera treonina 243 para metionina e a variante F2 (BCHE*390V) é determinada por uma

mutação de ponto no nucleotídeo 1169 que altera glicina 390 para valina.

A frequência do alelo F, o que inclui F1 e F2, na maioria das populações estudadas é de cerca de 0,5% (WHITTAKER, 1986). ALCÂNTARA e cols. (1995) analisaram 17 grupos indígenas brasileiros encontrando o alelo F apenas nas tribos Urubu-Kaapor, Asurini, Mura e Sateré-Mawé. As frequências encontradas entre os Mura (0,7%) e Sateré-Mawé (0,5%) são similares às aquelas descritas para outras amostras brasileiras predominantemente brancas (0,6%, ALCÂNTARA e cols. 1991b; 0,61, FADEL-PICHETH 1991), negróide (0,49%, ALCÂNTARA e cols. 1991a) ou composição negra-indígena-branca (0,49%, SIMPSON e KALOW, 1965).

2.5.1.5 Variante H

O fenótipo H foi identificado por WHITTAKER e BRITTEN (1987) em dois pacientes do Hospital Hammersmith em Londres, que mostravam uma queda de 90% na atividade da BChE. Estes pacientes apresentavam alta sensibilidade à succinilcolina e pareciam ser heterozigotos para o alelo atípico (A) e para o alelo usual (U). Análises das famílias dos dois pacientes mostraram que uma variante da BChE, responsável por uma atividade muito baixa, fora herdada por diversos membros.

JENSEN e cols. (1992) fenotiparam quatro indivíduos pertencentes a duas famílias não aparentadas, por meio de técnicas de análise sorológica de atividade e inibição enzimática, verificando serem todos heterozigotos para a variante H (H) e para a variante A (A). Através de PCR e posterior sequenciamento do

ADN, os autores encontraram uma mutação de ponto no nucleotídeo 424, alterando o aminoácido 142 de valina para metionina (*BCHE*142M*). A mutação *BCHE*70G* (atípica) foi encontrada em cis nos quatro indivíduos portadores da mutação H.

2.5.1.6 Variante SC

GREENBERG e cols. (1995) identificaram a variante SC da butirilcolinesterase humana como pertencente à categoria das mutações que levam a uma capacidade diminuída de hidrolisar succinilcolina, porém com afinidade normal por substratos substitutos e com resistência normal aos inibidores diferenciais. A análise de ADN levou à identificação de uma mutação no nucleotídeo 551 (GCC->GTC), levando à substituição de valina por alanina. O nome formal do alelo é *BCHE*184V*, indicando a substituição da valina no aminoácido 184 da extremidade N da enzima. A alteração na estrutura da enzima variante SC leva a um decréscimo na habilidade de hidrolisar succinilcolina similar àquela da variante F2.

GREENBERG e cols. (1995) identificaram a variante SC em uma paciente que apresentou hipersensibilidade à succinilcolina em doses fisiológicas e, após investigação molecular, em seu pai. Os genótipos dos dois indivíduos foram identificados como *BCHE/BCHE*184V* e *BCHE*390V/BCHE*184V* para pai e filha, respectivamente.

2.5.1.7 Variantes Silenciosas

O fenótipo silencioso da BChE humana é caracterizado por uma queda de mais de 90% da atividade da enzima em relação à média do fenótipo usual, ou, pela ausência total de atividade enzimática. A existência de alelos silenciosos da BChE foi sugerida, inicialmente, para explicar a herança anômala do fenótipo atípico (KALOW e STARON, 1957; HARRIS e cols., 1960) e somente mais tarde foram identificados indivíduos sem atividade da BChE (HART e MITCHELL 1962; LIDDELL e cols. 1962) ou com apenas 2%-3% da atividade da enzima usual (GOEDDE e cols., 1965).

RUBINSTEIN e cols. (1970) realizaram análises bioquímicas e imunológicas no soro de 25 indivíduos classificados como homozigotos para alelo silencioso e verificaram que a maioria dos soros com fenótipo silencioso podia ser classificada em dois grupos. O primeiro grupo, chamado de tipo I, não apresentava nem atividade da BChE, nem proteína imunoreativa. O segundo grupo ou tipo II, apresentava atividade da BChE em torno de dois por cento em relação à média usual, bem como presença de proteína imunoreativa.

NOGUEIRA e cols. (1990) identificaram, através de seqüenciamento de ADN, uma substituição e uma inserção [GGT (Gly)->GGAG (Gly + 1 base)] que alteravam a matriz de leitura referente à Glicina 117, formando um códon de finalização na posição 129. PRIMO-PARMO e cols. (1996), analisando um grupo de 17 indivíduos não aparentados, caracterizaram 12 diferentes alelos silenciosos do gene da BChE, dentre os quais oito levavam à substituição de

apenas um aminoácido e quatro codificavam enzimas truncadas na extremidade C, devido a códons de terminação prematuros. A grande variedade de alelos silenciosos identificados dentre um número pequeno de pacientes indica alta heterogeneidade do fenótipo silencioso da BChE.

Existem 30 diferentes alelos silenciosos da BChE identificados molecularmente, 14 deles em população norte-americana e 16 em população japonesa (ver tabela 1). A frequência do fenótipo silencioso da BChE é estimada em cerca de 1/100.000 na maioria das populações já investigadas, representando homozigotos e heterozigotos compostos (revisão em WHITTAKER, 1986). Nos Esquimós e em população de Andhra Pradesh, Índia, a frequência dos alelos silenciosos chega a 11%. Nas populações dos Países Baixos a frequência chega a 2% e em certas populações francesas pode atingir 1% (revisão em PRIMO-PARMO, 1993).

2.6 LOCO *CHE2*

Em eletroforese bidimensional em papel e gel de amido, além das bandas C₁ a C₄, HARRIS e cols. (1962) e HARRIS e cols. (1963b) encontraram uma banda que foi denominada C₅. Esta banda encontrava-se presente em apenas 4,6% da amostra e não apresentava alelismo em relação às variantes do loco *BCHE*. O loco responsável pela banda C₅ foi chamado *CHE2* e apresenta os alelos *CHE2**C5+ e *CHE2**C5- responsáveis, respectivamente, pela presença e pela ausência da banda C₅. SUGIMORI (1986) demonstrou que os indivíduos *CHE2* C5+ são menos sensíveis à succinilcolina que os indivíduos *CHE2* C5-. HARRIS

(1980) relata que indivíduos com fenótipo CHE2 C5+ apresentam atividade média da BChE cerca de 30% superior à de indivíduos CHE2 C5-.

Foi proposto um padrão de herança autossômico dominante para a presença da banda C₅ (HARRIS e cols., 1962). Existem, porém, registros de famílias onde são observados filhos CHE2 C5+ provenientes de casais CHE2 C5-.

É possível uma melhor separação entre a banda C₅ e o conjunto de bandas C₁-C₄ através da técnica de eletroforese em gel de ágar ácido originalmente desenvolvida por ROBINSON e cols. (1957) para variantes de hemoglobina e aplicada por VAN ROS e VERVOORT (1973) para a BChE. A banda C₅ migra para o polo positivo e a outra banda, formada pelas demais formas moleculares da BChE, migra para o polo negativo devido à eletroendosmose causada pelo ágar.

A estrutura da molécula que condiciona a banda eletroforética C₅ permanece desconhecida. HARRIS e cols. (1963a) estudaram a segregação em duas famílias com alelos *BCHE*U* e *BCHE*A* e verificaram sua independência em relação à banda C₅. A banda C₅ é determinada, em parte pelo loco *BCHE*, em parte pelo loco *CHE2*. A participação do loco *BCHE* na determinação da banda C₅ é verificada pelo uso do inibidor Ro2-0683 que inibe as bandas C₄ e C₅, totalmente em soros *BCHE U* e parcialmente em soros *BCHE A*.

SCOTT e POWERS (1974) sugerem que a banda C₅ seja formada através de associação entre BChE e uma outra substância. TORTOLERO e MEDINA (1978) propõem que a banda C₄, através de modificações que

não alteram o seu peso molecular, dá origem à banda C₅. OHKAWA e cols. (1988) sugerem que C₅ seja um conjugado entre C₄ e lipídio.

MASSON (1991), baseado em seu trabalho anterior (MASSON, 1989) onde demonstrou que a isoenzima C₂ é formada pela associação entre BChE e albumina, considera que é possível supor uma origem semelhante para a formação de C₅ e sugere que C₅ seja uma banda híbrida, formada pelo tetrâmero C₄ associado a outra proteína (X). Vários experimentos foram realizados na tentativa de estabelecer a estrutura de C₅. Eletroforese em gel de poliacrilamida e comparação com um padrão de peso molecular mostrou que o peso molecular de C₅ é de 400 KDa. Este valor de 400 KDa é 60 KDa maior que o peso molecular de C₄, podendo esta diferença ser atribuída à proteína X que se liga à C₄ para a formação de C₅. O logaritmo da mobilidade de C₄ e C₅ frente à concentração do gel fornece a razão carga/massa. Uma comparação entre a razão carga/massa de C₅ e a razão carga/massa de C₁, C₂ e C₄ demonstrou que o valor verificado em C₅ era diferente dos demais. O tratamento com tripsina, bem como altas concentrações de sal (NaCl 1,5-4,0 M) causam a dissociação de C₅ originando C₄. A banda C₅ não se dissocia sob a ação de agentes redutores ou pressão de 3,5 Kbar. O ponto isoelétrico de C₄ é de 3,50 e o ponto isoelétrico de C₅ foi estimado em 3,95. Todos estes resultados indicam que C₅ é formado pela associação entre C₄, através de ligações não covalentes e com predomínio de interações iônicas, e uma proteína. Neste mesmo trabalho, MASSON (1991) procurou identificar a proteína X. Os resultados obtidos não

permitiram a identificação desta proteína mas descartaram várias hipóteses. A análise de géis corados após eletrofereses de plasmas CHE2 C5+ incubados por 30 minutos em soluções tamponadas do inibidor bambuterol (10^{-8} - 10^{-4} M) mostrou curvas de inibição paralelas para C₄ e C₅. Essas curvas de inibição paralelas, frente a um inibidor específico da BChE, demonstram que a banda C₅ não é um híbrido de AChE/BChE. Experimentos por imunoadsorção e imunodeteção descartaram a possibilidade de C₅ ser um agregado de C₂. A possibilidade de que C₅ poderia ser uma imunoglobulina foi considerada desde que GALLANGO e ARENDS (1969) detectaram C₅ em sangue de pacientes com mieloma, porém anticorpos contra cadeias k e l de imunoglobulina não detectaram tal fragmento. A banda C₅ não se apresentou sensível à colagenase, descartando a possibilidade da substância X ser identificada como colágeno. O mapeamento do gene da fibronectina como pertencente ao cromossomo 2 (KOCH e cols., 1982; *apud* MASSON, 1991), próximo à região designada para CHE2 (EIBERG e cols., 1989), levantou a possibilidade de C₅ ser formado pela associação de C₄ com fragmento de fibronectina. Esta hipótese foi rejeitada pois C₅ não foi reconhecido por anticorpos policlonais para fibronectina humana.

PRIMO-PARMO e cols. (1986) estudaram onze tribos indígenas brasileiras e quatro comunidades rurais tri-híbridas (Negro/Indígena/Branco) e verificaram que o fenótipo CHE2 C5+ era observado com frequências variando de zero a 13,1%. ALCÂNTARA e cols. (1995) examinaram nove tribos indígenas brasileiras quanto à

variabilidade genética do loco *CHE2* e observaram que o fenótipo *CHE2 C5+* variava em frequência de 1,4% em população Zoró a 45,9% em Guaraní. Analisando as frequências do fenótipo *CHE2 C5+*, obtidas em 29 amostras de populações indígenas brasileiras (ARENDs e cols., 1970; GUERREIRO e cols., 1985, 1987, 1989; PRIMO-PARMO e cols., 1986; GUERREIRO e SANTOS, 1987 e ALCÂNTARA e cols., 1995), os autores sugerem que a deriva genética seja o principal fator evolutivo responsável pelo padrão de distribuição da frequência do fenótipo *CHE2 C5+* entre as tribos indígenas brasileiras.

3 OBJETIVOS

1 - Investigar a variabilidade genética dos locos *BCHE* e *CHE2* da butirilcolinesterase em indígenas da tribo Guarani do Mato Grosso do Sul.

2 - Verificar a atividade da BChE em indígenas da tribo Guarani do Mato Grosso do Sul.

3 - Comparar os resultados obtidos através do cumprimento dos objetivos 1 e 2 desse estudo com resultados presentes na literatura referentes a indígenas Guarani ou de outras tribos e às demais populações.

4 - Comparar os resultados obtidos através de fenotipagem por inibição enzimática com os resultados obtidos por PCR-SSCA.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRA

Foram utilizadas 258 amostras de plasma e 264 de ADN de indivíduos Guarani do Mato Grosso do Sul das seguintes localidades: Amambaí; Porto Lindo; Limão Verde; Campanaria; Campestre; Caraapo; Cerrito; Dourados; Guaimbé; Jacaré; Lagoa Bonita; Miranda; Panambi; Pirajui; Sapucaia; Sossoro; Tacuru e Taquapiri. Na tabela 2 podem ser observadas as coordenadas geográficas (latitude e longitude) e a proporção ($\% \pm \text{E.P.}$) de cada uma das localidades representadas na amostra.

Todos os indivíduos dessa amostra pertencem à tribo Guarani e às sub-tribos Kaiowá (KW) e Ñandewa (ÑW). Alguns indivíduos pertencem, também, a outros grupos étnicos, como: paraguaios (P); brasileiros (B); índios Terena (T) e mulatos claros (MC). A tabela 3 mostra os números totais de amostras de plasma e de ADN, classificados pelo sexo dos indivíduos, indicando as sub-tribos e demais grupos étnicos. Na tabela 4 podem ser observadas as proporções sexuais ($\% \pm \text{E.P.}$) referentes às amostras de ADN e de plasma, no total e nas três localidades mais representadas. A tabela 5 mostra os números de amostras de ADN e de plasma, classificados tanto por sub-tribo e outros grupos étnicos, como por localidade. Com base nos dados da tabela 5, é possível calcular a proporção das sub-tribos na amostra total de ADN e de plasma (ADN/plasma). A sub-tribo Kaiowá representa 56,8%/56,2% e a sub-tribo Ñandewa representa 31,8%/32,2%.

TABELA 2. Coordenadas geográficas (latitude e longitude)¹ e proporção (% $\pm$ E.P.) de ADN e de plasma (ADN/plasma) de cada uma das localidades representadas na amostra.

LOCALIDADE	LATITUDE	LONGITUDE	PROPORÇÃO DA LOCALIDADE NO TOTAL AMOSTRAL (% $\pm$ E.P.) ²
Amambai	23,10 S	55,22 W	51,89 $\pm$ 3,07 / 51,16 $\pm$ 3,11
Porto Lindo	23,93 S	55,15 W	19,32 $\pm$ 2,43 / 19,77 $\pm$ 2,48
Limão Verde	23,18 S	55,56 W	14,01 $\pm$ 2,14 / 14,34 $\pm$ 2,18
Campanaria	22,78 S	55,08 W	0,38 $\pm$ 0,38 / 0,39 $\pm$ 0,39
Campestre	22,75 S	55,80 W	0,38 $\pm$ 0,38 / 0,39 $\pm$ 0,39
Caraapo	22,63 S	54,82 W	0,76 $\pm$ 0,53 / 0,77 $\pm$ 0,54
Cerrito	23,10 S	56,55 W	0,38 $\pm$ 0,38 / 0,39 $\pm$ 0,39
Dourados	22,22 S	54,80 W	2,27 $\pm$ 0,92 / 2,33 $\pm$ 0,94
Guaimbé	22,24 S	55,51 W	0,38 $\pm$ 0,38 / 0,39 $\pm$ 0,39
Jacaré	23,75 S	54,58 W	0,76 $\pm$ 0,53 / 0,77 $\pm$ 0,54
Lagoa Bonita	21,12 S	56,48 W	0,38 $\pm$ 0,38 / 0,00 $\pm$ 0,00
Miranda	20,24 S	56,37 W	0,38 $\pm$ 0,38 / 0,39 $\pm$ 0,39
Panambi	22,09 S	54,77 W	0,38 $\pm$ 0,38 / 0,39 $\pm$ 0,39
Pirajuí	23,22 S	54,68 W	1,14 $\pm$ 0,65 / 1,16 $\pm$ 0,67
Sapucaia	23,27 S	55,48 W	0,76 $\pm$ 0,53 / 0,77 $\pm$ 0,54
Sossoro	23,52 S	54,75 W	0,38 $\pm$ 0,38 / 0,39 $\pm$ 0,39
Tacuru	23,63 S	55,01 W	3,03 $\pm$ 1,06 / 3,10 $\pm$ 1,08
Taquapiri	23,35 S	55,89 W	3,03 $\pm$ 1,06 / 3,10 $\pm$ 1,08

¹ Fontes: IBGE (ibge@gov.br) e INPE (dpi@inpe.br). ² ADN/plasma

TABELA 3. Número de amostras de ADN e de plasma de indivíduos classificados por sub-tribo e demais grupos étnicos.

SUB-TRIBO	N (ADN)			N (PLASMA)		
	Homens	Mulheres	Total	Homens	Mulheres	Total
Kaiowá	31	119	150	29	116	145
Ñandewa	26	58	84	25	58	83
Kaiowá + Ñandewa	04	18	22	04	18	22
Kaiowá + Brasileiro	01	-	01	01	-	01
Kaiowá + Terena	-	01	01	-	01	01
Ñandewa + Mulato Claro	-	01	01	-	01	01
Ñandewa + Brasileiro	01	-	01	01	-	01
Ñandewa + Paraguaio	-	04	04	-	04	04
Total	63	201	264	60	198	258

TABELA 4. Proporção sexual (% $\pm$ E.P.) nas amostras de ADN e de plasma (ADN/plasma), no total e nas três localidades mais representadas.

PROPORÇÃO SEXUAL (% $\pm$ E.P.)				
SEXO	AMAMBAI	PORTO LINDO	LIMÃO VERDE	TOTAL
Mulheres	79,6 $\pm$ 2,5/	56,9 $\pm$ 3,1/	91,9 $\pm$ 1,7/	76,1 $\pm$ 2,6/
	80,3 $\pm$ 2,5	56,9 $\pm$ 3,1	91,9 $\pm$ 1,7	76,4 $\pm$ 2,6
Homens	20,4 $\pm$ 2,5/	43,1 $\pm$ 3,1/	8,1 $\pm$ 1,7/	23,9 $\pm$ 2,6/
	19,70 $\pm$ 2,5	43,1 $\pm$ 3,1	8,1 $\pm$ 1,7	23,3 $\pm$ 2,6

TABELA 5. Número de amostras de ADN e de plasma (ADN/plasma) de cada sub-tribo e outros grupos étnicos por localidade.

LOCALIDADE	KW	ÑW	KW + ÑW	KW + B	KW + T	ÑW + B	ÑW + P	ÑW + MC	TOTAL
Amambai	94/90	26/25	13/13	01/01	01/01	-/-	01/01	01/01	137/132
Porto Lindo	01/01	46/46	01/01	-/-	-/-	01/01	02/02	-/-	51/51
Limão Verde	32/32	-/-	05/05	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	37/37
Campanaria	01/01	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	01/01
Campestre	01/01	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	01/01
Caraapo	02/02	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	02/02
Cerrito	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	01/01	-/-	01/01
Dourados	01/01	05/05	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	06/06
Guaimbé	01/01	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	01/01
Jacaré	01/01	-/-	01/01	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	02/02
Lagoa Bonita	01/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	01/-
Miranda	01/01	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	01/01
Panambi	01/01	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	01/01
Pirajuí	-/-	03/03	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	03/03
Sapucaia	01/01	-/-	01/01	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	02/02
Sossoro	01/01	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	01/01
Tacuru	05/05	03/03	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	08/08
Taquapiri	06/06	01/01	01/01	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	08/08
Total	150/145	84/83	22/22	01/01	01/01	01/01	04/04	01/01	264/258

KW = Kaiowá; ÑW = Ñandewa; B = Brasileiro; T = Terena; P = Paraguaio e MC = Mulato Claro

A definição do sub-grupo de 71 amostras a serem analisadas para o exon 2 foi efetuada a partir dos seguintes critérios: as amostras escolhidas apresentam dados completos de fenotipagem do loco *CHE2*, fenotipagem do loco *BCHE* por inibição enzimática, medida de atividade enzimática e genotipagem dos exons 3 e 4 do loco *BCHE*; todas as amostras que indicaram qualquer variação nas demais análises foram incluídas na sub-amostra do exon 2; foi incluído, também, um grupo de amostras que não apresentou qualquer variação, mas com dados completos para as demais análises.

4.2 METODOLOGIA

4.2.1 Fenotipagem do loco *CHE2*

Esta técnica de eletroforese em gel de ágar ácido foi desenvolvida por ROBINSON e cols. (1957) para fenotipagem de variantes da hemoglobina e posteriormente, foi modificada por VAN ROS e VERVOORT (1973) para aplicação à BChE. Adaptações subseqüentes foram introduzidas por FADEL-PICHETH (1991) e SOUZA (1995).

O gel de ágar é preparado com uma solução de bacto ágar (Difco) a 1,4% p/v em tampão citrato de sódio, pH 6,38 (solução estoque de tampão citrato de sódio 50 mM, pH 6,7; pH ajustado com ácido cítrico 1,56 M). A solução é 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 é vertida sobre uma placa de vidro de 230 x 160 mm. O gel deve resfriar completamente e então ser colocado na geladeira e mantido em repouso por pelo menos 12 horas a fim de diminuir o efeito da eletroendosmose. Após esse período de repouso as amostras de plasma são aplicadas no gel através da extremidade de uma lâmina de metal (5 x 5 x 0,1 mm) onde é colocado 1,5 µL de plasma ou soro. A placa contendo as amostras é então submetida à eletroforese com tampão citrato pH 6,7 nas cubas, por três horas e meia. A corrida eletroforética é realizada a 4°C com aplicação de cerca de 75 V e 35 mA. Após a corrida eletroforética despeja-se sobre a placa o cromógeno-substrato que deve ser preparado imediatamente antes do uso. A solução cromógeno-substrato é

preparada utilizando-se Fast Red TR Salt (SIGMA F-2768) a 0,1% p/v em tampão fosfato de sódio pH 7,1 (670 mL de Na_2HPO_4 , 0,2 M e 330 mL de NaH_2PO_4 , 0,2 M) e solução de α -naftilacetato 30 mM (2,5% v/v). A placa com o cromógeno-substrato deve ser incubada por uma hora a 37°C. Após a revelação das bandas a placa é lavada com água para retirar o excesso de corante. O gel é então colocado entre uma folha de papel cartão e uma folha de papel filtro, prensado entre duas placas de vidro e levado à estufa a 37°C até completa secagem. A folha de papel filtro deve ser trocada após 10 minutos para retirar o excesso de umidade. O fenótipo CHE2 C5- é identificado pela presença de uma única banda, que se move para o pólo negativo, enquanto o fenótipo CHE2 C5+ apresenta, além dessa banda, outra banda (C_5) que se move em direção ao pólo positivo.

4.2.2 Fenotipagem do loco *BCHE*

A técnica de PICHETH e cols.(1994), que é uma modificação da técnica de ALCÂNTARA e cols. (1991b), utiliza como substrato α -naftilacetato e, como inibidores da butirilcolinesterase, DL-propranolol e Ro2-0683 [dimetilcarbamato de brometo de (2-hidroxil-5-fenil-benzil)-trimetil amônio], que permitem a identificação dos fenótipos BCHE U; BCHE UF; BCHE UA; BCHE AF e BCHE A. O reagente de cor utilizado é o sal de Fast Red TR (Sigma F-1500), diluído em água destilada e adicionado de lauril sulfato de sódio a 3% (Duponal, Sigma L-5750). O tampão utilizado é o tampão fosfato, 0,2 M, pH 7,1. A leitura das reações é feita em espectrofotômetro em absorbância de 540 nm.

O tampão fosfato, 0,2 M, pH 7,1, é preparado misturando-se 670 mL de Na_2HPO_4 (0,2 M) com 330 mL de NaH_2PO_4 (0,2 M).

A solução estoque de Ro2-0683, 10^{-3} M é preparada dissolvendo-se 39,3 mg de Ro2-0683 em 100 mL de tampão fosfato (estável por muitos meses a 4°C e por muitos anos a -20°C). A solução de uso é diluída em tampão fosfato.

A solução estoque de DL-propranolol $3,38 \times 10^{-3}$ M é preparada dissolvendo-se 10 mL de hidrocloreto de DL-propranolol em 10 mL de tampão fosfato (estável por seis meses a -20°C). A solução de uso é diluída em tampão fosfato.

A solução estoque do substrato, 0,03 M é preparada dissolvendo-se 56 mg de α -naftilacetato em 10 mL de acetona 50% aquosa (estável por um mês a 4°C). Imediatamente antes de usar, diluir 1 mL da solução estoque em 20 mL de tampão fosfato, completando o volume para 100 mL com água destilada para que a concentração final seja de 3×10^{-4} M.

O reagente de cor é preparado dissolvendo-se 40 mg de sal de Fast Red TR em 6 mL de água destilada e adicionando-se 4 mL de Duponal.

A tabela 6 mostra o protocolo detalhado para a técnica de fenotipagem utilizando-se α -naftilacetato como substrato. A tabela 7 mostra os números de inibição de DL-propranolol e Ro2-0683, indicando os prováveis fenótipos. Os números de inibição foram definidos do seguinte modo:

Número de inibição = $100 \times \text{Ac-Ai}/\text{Ac}$, onde: Ac é a absorbância da amostra controle e Ai é a absorbância dos tubos contendo inibidor.

TABELA 6. Protocolo para o Método de Fenotipagem.

REAGENTE (mL)	CONTROLE	Ro ¹	Pr ²	BRANCO
Tampão fosfato (0,2 M, pH 7,1)	0,2	-	-	0,7
Ro2-0683 (5 x 10 ⁻⁶ M)	-	0,2	-	-
DL-propranolol (1,35 x 10 ⁻⁴ M)	-	-	0,2	-
α -naftilacetato (3 x 10 ⁻⁴ M)	2,0	2,0	2,0	2,0
Incubar por 5 min a 37°C	////	////	////	////
Soro (1/200 em tampão fosfato) ³	0,5	0,5	0,5	-
Incubar por 25 min a 37°C	////	////	////	////
Reagente de cor	0,2	0,2	0,2	0,2
Misturar evitando que espume. Após 10 minutos, ler as absorbâncias em 540 nm.				

¹ Tubos contendo o inibidor Ro2-0683. ² Tubos contendo o inibidor DL-propranolol.

³ Allebrandt e cols. (1998).

TABELA 7. Números de inibição¹ observados usando-se os inibidores DL-Propranolol (PN) e Ro2-0683 (RON)².

FENÓTIPOS	NÚMEROS DE INIBIÇÃO DE DL-PROPRANOLOL (PN)	NÚMEROS DE INIBIÇÃO DE Ro2-0683 (RON)
BCHE U	69-79	86-93
BCHE UF	55-70	76-87
BCHE UA	43-56	54-67
BCHE AF	24	46
BCHE A	2-3	10-11

¹ Limites de variação para identificação dos fenótipos.

² De acordo com Picheth e cols., 1994.

4.2.3 Atividade da BChE

Foi utilizada a técnica de DIETZ e cols.(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, gerando o íon de coloração amarela 5-tio-2-nitrobenzoato. A medida de atividade

enzimática é 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, tem pH 7,6 e é preparado através da 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 [5,5'-bisditio (2-ácido nitrobenzóico)] é dissolvido em tampão fosfato na proporção de 167g por 1000 mL.

O substrato (propioniltiocolina 100 mM) é preparado com 303 mg de iodeto de propioniltiocolina (PM = 303,2) em 10 mL de água destilada.

Os tubos contendo 2,2 mL de tampão-DTNB, 0,05 mL de substrato e 0,25 mL de soro (1/100 em água destilada) devem ser mantidos por três minutos no banho-maria a 25°C antes da leitura em espectrofotômetro. A primeira leitura, chamada A0, deve ser efetuada imediatamente após a colocação dos reagentes na cubeta termostatizada do espectrofotômetro. As leituras A1, A2 e A3 são efetuadas com um, dois e três minutos a partir da leitura A0. Após as quatro leituras, deve ser calculado o DE/minuto médio.

$$\text{DE/min.médio} = \frac{(A1 - A0) + (A2 - A1) + (A3 - A2)}{3}$$

Cálculo do Fator:

$$\frac{\text{DE}}{\text{Dt}} \times \frac{1}{\text{E.d}} \times \frac{\text{VT}}{\text{VA}} = 75,53$$

onde:

E = coeficiente de extinção milimolar do DTNB em cubeta de 1 cm a 410 nm = 13,6

d = diâmetro da cubeta (1 cm)

VT = volume total da cubeta (2,5 mL)

VA = volume da amostra (0,0025 mL)

Definição de Unidade: 1 U/L corresponde à degradação de 1 mMol de substrato por minuto por litro de soro.

Atividade (KU/L) = $DE/min.médio \times 75,53$

4.2.4 Extração do ADN

Essa técnica (LAHIRI e NURNBERG, 1991) consiste na separação, a partir do sangue periférico, do creme de leucócitos ("buffy-coat") que contém os leucócitos de onde será extraído ADN. São coletados 10 mL de sangue em EDTA e o creme de leucócitos é retirado e ressuscitado em 10 mL de IGEPAL CA-630 e quantidade suficiente para 100 mL de TKM1 (5 mL de Tris HCl 1 M, pH 7,6; 5 mL de KCl 1 M; 5 mL de MgCl₂ 1 M; 10 mL de EDTA 0,1 M, pH 8,0 e água destilada em quantidade suficiente para completar 500 mL). O pH do tampão de extração é próximo de 8,0, visando evitar o pH ótimo de enzimas degradativas como as lipases e lipogenases, cujo pH ótimo varia entre 5,0 e 6,0 e as ADNases nucleares que têm pH ótimo em torno de 7,0. Após centrifugar a 2500 rpm por 15 minutos, desprezar o sobrenadante e completar novamente para 10 mL com TKM1. A ressuspensão do creme de leucócitos no tampão solubiliza as membranas celulares lipoprotéicas e desnatura as proteínas, mantendo o ADN protegido da ação das enzimas degradativas. Repetir a centrifugação e a ressuspensão em TKM1 até que o "pellet" fique

bem claro. Ressuspender delicadamente o "pellet", adicionar 800 µL de TKM2 (0,5 mL de Tris HCl 1 M, pH 7,6; 0,5 mL de KCl 1 M; 0,5 mL de MgCl₂ 1M; 1 mL de EDTA 0,1 M, pH 8,0, 20 mL de solução de NaCl 1 M e água destilada em quantidade suficiente para completar 50 mL) e agitar bem. Adicionar 50 µL de SDS 10% e misturar. Incubar em banho-maria a 55°C por 20 minutos para facilitar a solubilização e a homogeneização. Retirar do banho-maria e adicionar, misturando bem, 300 µL de solução saturada de NaCl (6 M), necessária para a solubilização e para a ação do detergente. Centrifugar a 1200 rpm por 10 minutos, passar o sobrenadante para um tubo de ensaio e adicionar dois volumes de etanol 100% gelado, tampar o tubo com parafilme e invertê-lo várias vezes (delicadamente) até precipitar o DNA. Pescar o DNA utilizando micropipeta com ponteira de ponta cortada e colocar em eppendorf que é mantido semi-aberto na estufa a 37°C, até evaporar todo o etanol. Ressuspender o DNA em 200 µL de tampão Tris-EDTA (0,5 mL de Tris HCl 1 M, pH 8,0 e 0,5 mL de EDTA 1 M) que degrada seletivamente RNA, e deixar no banho-maria a 55°C por uma hora. Após três dias na geladeira, verificar a densidade ótica e congelar.

4.2.5 PCR-SSCA

A técnica de PCR-SSCA ("polymerase chain reaction - single strain conformational analysis") consiste na amplificação da sequência de ADN que se pretende analisar e posterior desnaturação do produto amplificado. Esse produto desnaturado é submetido à

eletroforese para a análise de conformação de ADN em fita simples. A técnica de SSCA permite também a detecção de alterações no ADN ainda desconhecidas. Tais alterações conformacionais podem ser geradas por apenas uma mutação de ponto, o que poderá ser percebido pela modificação do comportamento eletroforético do ADN em fita simples. As técnicas de PCR-SSCA utilizadas nesse estudo foram desenvolvidas pelo grupo do Laboratório de Polimorfismos e Ligação da Universidade Federal do Paraná.

4.2.5.1 PCR-SSCA do Exon 2

O exon 2, o maior dos quatro exons do gene *BCHE*, é constituído por 1525 pares de bases. Nesse estudo o exon 2 foi analisado parcialmente, sendo amplificados dois diferentes fragmentos (2a e 2b), como mostra a figura 2. Para melhor compreensão da metodologia utilizada, as descrições dos procedimentos técnicos para os dois fragmentos do exon 2 seguem separadamente.

4.2.5.1.1 PCR-SSCA do Exon 2a

O primeiro fragmento do exon 2, chamado de exon 2a foi amplificado através dos iniciadores N25 (38,88% GC; $T_M = 50^\circ\text{C}$) e N23 (38,88% GC; $T_M = 50^\circ\text{C}$), descritos a seguir:

N25: 5'GGT CTG ATA TTT GGA ATG 3'

N23: 3'CCA CCA TAA ATC CAT ATC5' (inverso)

Cada amostra de 1 μL de ADN (cerca de 50 ng) foi misturada a 9 μL de Supermix (Gibco BRL), 0,14 μL (10 pmoles) de N25 e 0,12 μL (10 pmoles) de N23.

EXON 2

aaatcaatatgcatagcaaagtcac

aatcatatgcatcagatttctcttttggtttcttttgctctgcatgcttattgggaagtcacatact

17 GAA GAT GAC ATC ATA ATT GCA ACA AAG AAT GGA AAA GTC AGA GGG ATG

33 AAC TTG ACA GTT TTT GGT GGC ACG GTA ACA GCC TTT CTT GGA ATT CCC

49 TAT GCA CAG CCA CCT CTT GGT AGA CTT CGA TTC AAA AAG CCA CAG TCT

65 CTG ACC AAG TGG TCT GAT ATT TGG AAT GCC ACA AAA TAT GCA AAT TCT

81 TGC TGT CAG AAC ATA GAT CAA AGT TTT CCA GGC TTC CAT GGA TCA GAG

97 ATG TGG AAC CCA AAC ACT GAC CTC AGT GAA GAC TGT TTA TAT CTA AAT

113 GTA TGG ATT CCA GCA CCT AAA CCA AAA AAT GCC ACT GTA TTG ATA TGG

129 ATT TAT GGT GGT GGT TTT CAA ACT GGA ACA TCA TCT TTA CAT GTT TAT

145 GAT GGC AAG TTT CTG GCT CGG GTT GAA AGA GTT ATT GTA GTG TCA ATG

161 AAC TAT AGG GTG GGT GCC CTA GGA TTC TTA GCT TTG CCA GGA AAT CCT

177 GAG GCT CCA GGG AAC ATG GGT TTA TTT GAT CAA CAG TTG GCT CTT CAG

193 TGG GTT CAA AAA AAT ATA GCA GCC TTT GGT GGA AAT CCT AAA AGT GTA

209 ACT CTC TTT GGA GAA AGT GCA GGA GCA GCT TCA GTT AGC CTG CAT TTG

225 CTT TCT CCT GGA AGC CAT TCA TTG TTC ACC AGA GCC ATT CTG CAA AGT

241 GGA TCC TTT AAT GCT CCT TGG GCG GTA ACA TCT CTT TAT GAA GCT AGG

257 AAC AGA ACG TTG AAC TTA GCT AAA TTG ACT GGT TGC TCT AGA GAG AAT

273 GAG ACT GAA ATA ATC AAG TGT CTT AGA AAT AAA GAT CCC CAA GAA ATT

289 CTT CTG AAT GAA GCA TTT GTT GTC CCC TAT GGG ACT CCT TTG TCA GTA

305 AAC TTT GGT CCG ACC GTG GAT GGT GAT TTT CTC ACT GAC ATG CCA GAC

321 ATA TTA CTT GAA CTT GGA CAA TTT AAA AAA ACC CAG ATT TTG GTG GGT

337 GTT AAT AAA GAT GAA GGG ACA GCT TTT TTA GTC TAT GGT GCT CCT GGC

353 TTC AGC AAA GAT AAC AAT AGT ATC ATA ACT AGA AAA GAA TTT CAG GAA

369 GGT TTA AAA ATA TTT TTT CCA GGA GTG AGT GAG TTT GGA AAG GAA TCC

385 ATC CTT TTT CAT TAC ACA GAC TGG GTA GAT GAT CAG AGA CCT GAA AAC

401 TAC CGT GAG GCC TTG GGT GAT GTT GTT GGG GAT TAT AAT TTC ATA TGC

417 CCT GCC TTG GAG TTC ACC AAG AAG TTC TCA GAA TGG GGA AAT AAT GCC

433 TTT TTC TAC TAT TTT GAA CAC CGA TCC TCC AAA CTT CCG TGG CCA GAA

449 TGG ATG GGA GTG ATG CAT GGC TAT GAA ATT GAA TTT GTC TTT GGT TTA

465 CCT CTG GAA AGA AGA GAT AAT TAC ACA AAA GCC GAG GAA ATT TTG AGT

AGA TCC ATA GTG AAA CGT TGG GCA AAT TTT GCA AAA TAT GG

FIGURA 2. Representação esquemática do exon 2 do gene *BCHE*, indicando os dois fragmentos amplificados (2a e 2b) nesse estudo e os sítios das mutações até hoje identificadas.

Verde: Iniciadores. O par N25 e N23 amplifica o fragmento 2a (193 pb). O par N75 e N73 amplifica o fragmento 2b (236 pb).

Azul: Sítios de Mutações (ver tabela 1).

A coluna da esquerda se refere ao número do aa do primeiro triplete de cada linha.

Os ciclos de amplificação do exon 2a 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.

O fragmento amplificado, denominado exon 2a, possui 193 pb e contém o sítio da mutação *BCHE*70G*. Após a amplificação, 5 µL das amostras são misturadas 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 mantidas a 94°C por 5 minutos. Após a desnaturação, as amostras são submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida por quatro horas a 35 mA e cerca de 250 V. O gel é elaborado a partir de uma solução estoque de poliacrilamida (30%) que contém 29 g de acrilamida, 1 g de bisacrilamida, 5 mL de glicerol (100%) e água bidestilada em quantidade suficiente para completar 100 mL. A concentração final de poliacrilamida (acrilamida + bisacrilamida) no gel é chamada de T e a concentração de bisacrilamida no total de poliacrilamida da solução estoque é denominada C. O gel utilizado nesse experimento é feito com 6 mL de TBE 5X, 15 mL de água bidestilada e 9 mL da solução estoque 30% (T = 9% e C = 3,3%). O tampão do gel (TBE 5X) é preparado com 54 g de Tris, 27,5 g de ácido bórico, 20 mL de EDTA (0,5 M, pH 8,0) e água destilada em quantidade suficiente para completar 1000 mL. O tampão utilizado na cuba eletroforética é TBE 1X, ou seja, TBE 5X diluído para 1X com água destilada.

A revelação do gel é realizada em etapas, durante as quais o gel deve ser mantido em agitação. Após a eletroforese, o gel é colocado em um recipiente e imerso em solução aquosa de ácido nítrico (1 %) durante três minutos. O gel é lavado duas vezes com água destilada e então imerso em solução aquosa de nitrato de prata (0,2 %) por 20 minutos. Após duas 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 μ L de formaldeído) até que o líquido escureça. Depois da retirada do líquido escurecido, acrescentar o restante da solução reveladora e manter o gel imerso até que as bandas de ADN apareçam no gel. Quando a revelação estiver terminada, lavar o gel duas vezes com água destilada e mantê-lo em solução de ácido acético (10 %) por cinco minutos. Lavar por duas vezes o gel com água destilada e acrescentar solução aquosa de glicerol (5 %), na qual o gel deve ser mantido por pelo menos dez minutos.

A secagem do gel pode ser realizada logo após o término da revelação e consiste em preparar o gel para um secador a vácuo que permite o armazenamento do gel sem que se quebre ou que ocorra perda de coloração. O gel deve ser embebido em solução de metanol (30 %) e glicerol (5 %) e colocado sobre papel celofane, previamente embebido na mesma solução. O papel celofane deve ser esticado sobre uma superfície lisa para que não se formem bolhas de ar que prejudicam a secagem do gel. Após o gel estar colocado sobre o celofane, deve ser coberto com uma folha de papel filtro e levado ao secador a vácuo até que esteja completamente seco. O

gel, depois de completamente seco, pode ser guardado, por tempo indeterminado, sem que ocorra perda de coloração.

4.2.5.1.2 PCR-SSCA do Exon 2b

O exon 2b corresponde a um fragmento do exon 2 formado por 236 pb que contém a mutação *BCHE**243M (F2). Esse fragmento é amplificado através dos iniciadores N75 e N73, descritos a seguir.

N75: 5'GCT CCT GGC TTC AGC AAA 3'

N73: 3'CAT TCT GAG AAC TTC TTG 5' (inverso)

O programa de amplificação é o mesmo descrito na metodologia do exon 2a. Após a PCR, o produto amplificado é misturado ao corante SSCA nas mesmas proporções já descritas e mantido a 94°C por cinco minutos. Após a desnaturação as amostras devem ser colocadas no gelo e aplicadas no gel de poliacrilamida (T = 9% e C = 3,3%) e submetidas à corrida eletroforética, realizada a 35 mA e cerca de 250 V durante 4 horas. A revelação e secagem do gel procedem como já descrito.

4.2.5.2 PCR-SSCA do Exon 3

O exon 3 do gene *BCHE* é amplificado através de PCR, sendo utilizado o seguinte par de iniciadores:

P35: 5'CAA TTT TAC TAT AAT GTC TC 3'

P33: 3'TCT ATT AAA TAA CCA AAC AC 5' (inverso)

Para cada amostra, foram utilizados 9 µL de Supermix (Gibco BRL), 0,15 µL (10 pmoles) de cada iniciador (P33 e P35) e 1 µL de

ADN. Os ciclos de amplificação foram os mesmos descritos nas metodologias anteriores.

O produto da PCR (5 μ L) deve ser misturado a 6 μ L de um corante para SSCA e desnaturado através do calor (94°C por cinco minutos). Após a desnaturação as amostras devem ser colocadas no gelo e imediatamente aplicadas no gel de poliacrilamida. O gel (T = 8%, C = 3,3%) é preparado com 8 mL de uma solução estoque de poliacrilamida 30%, 22 mL de tampão ácido (pH 4,6), 230 μ L de persulfato de amônia (10%) e 30 μ L de TEMED. O tampão utilizado na cuba tem pH 8,0 (TBE 1X), de forma que a corrida eletroforética é descontínua. A eletroforese (40 mA, 240 V) é interrompida após 50 minutos e o gel é revelado e seco, seguindo a metodologia já descrita.

4.2.5.3 PCR-SSCA do Exon 4

A amplificação do exon 4 do gene *BCHE* foi realizada através de dois tipos de PCR, devido à elevada frequência de falta de amplificação no primeiro tipo de PCR. No primeiro tipo de PCR foi utilizado o seguinte par de iniciadores:

P45: 5'TGA TTA ATA CAA CTT ATT CC 3'

P43: 3'GAA AAT ATG TTC TAT AAA GGG 5'(inverso)

Para cada amostra, são utilizados 9 μ L de Supermix (Gibco BRL), 0,2 μ L (10 pmoles) do iniciador P45, 0,12 μ L (10 pmoles) do iniciador P43 e 1 μ L de ADN (cerca de 50 ng). Os ciclos de

amplificação seguem os mesmos passos descritos nas demais metodologias.

A segunda PCR utiliza o par de iniciadores descrito abaixo:

K25S: 5'CGA AAT TAT TTT TCA GTT AAT GAA ACA GAT AAA AAT TT 3'

P43: 3'GAA AAT ATG TTC TAT AAA GGG 5' (inverso)

Cada amostra de 1 μ L de ADN é misturada a 9 μ L de Supermix (Gibco BRL), 0,04 μ L (10 pmoles) de K25S e 0,2 μ L (10 pmoles) de P43. Os ciclos de amplificação para os iniciadores K25S e P43 são os mesmos descritos para os iniciadores P45 e P43. Para definir qual dos pares de iniciadores produz amplificação de melhor qualidade, foi realizado um teste, utilizando-se, além dos iniciadores já descritos (P45, P43 e K25S), um quarto iniciador:

K13S: 3'CCT GCT TTC CAC TCC CAT GCT G 5' (inverso)

Os testes de amplificação utilizaram os seguintes pares de iniciadores: P45 e P43; K25S e K13S; K25S e P43; P45 e K13S. As quantidades, por amostra, de cada um dos iniciadores são as mesmas descritas anteriormente. Para o iniciador K13S devem ser utilizados 0,04 μ L (10 pmoles) para 1 μ L de ADN e 9 μ L de Supermix (Gibco BRL). Os ciclos da PCR foram os mesmos definidos anteriormente. Os produtos da PCR foram submetidos à corrida eletroforética em gel de agarose (1%) e revelados em brometo de etídio.

Como descrito na metodologia do exon 2, os produtos do primeiro tipo de PCR devem ser misturados ao corante para SSCA e desnaturados antes de serem aplicados no gel. O gel (T = 8%, C =

3,4%) deve ser preparado com 8 mL da solução estoque de poliacrilamida (30%), 16 mL de água destilada, 6 mL de TBE 5X, 230 μ L de persulfato de amônia e 30 μ L de TEMED. O tampão utilizado no aparato eletroforético (TBE 1X) tem pH 8,0 e a corrida eletroforética é realizada a 240 V e cerca de 35 mA e tem duração de quatro horas e 30 minutos. A revelação e secagem do gel procedem como descrito para o exon 2a.

Os produtos do segundo tipo de PCR foram analisados através de eletroforese SSCA. O gel (T = 10%, C = 2%) é preparado com 6 mL de solução estoque de poliacrilamida 50% (49 g de acrilamida, 1 g de bisacrilamida, 5 mL de glicerol e água destilada para completar 100 mL), 6 mL de água destilada e 18 mL de TBE 5X. O tampão da cuba eletroforética (TBE 1X) tem pH 8,0 e a corrida é efetuada a 60 V e 10 mA por 19 horas e a 240 V por mais duas horas. A revelação e secagem do gel procedem como descrito anteriormente.

4.2.6 Análise estatística

As comparações entre as médias de atividade enzimática foram realizadas através do teste t e as comparações entre as frequências alélicas e fenotípicas através do teste χ^2 com correção de Yates. Todos os resultados foram analisados com 95% de confiança.

5. RESULTADOS

O apêndice 1 mostra a numeração das amostras incluídas nesse estudo, indicando as informações disponíveis para cada amostra e incluindo um quadro geral dos resultados obtidos. Algumas vezes, durante a descrição dos resultados e a discussão, será referida a numeração das amostras que se encontra indicada no apêndice 1. Para melhor compreensão dos resultados desse estudo, os dados obtidos foram divididos de acordo com a abordagem técnica efetuada. Dessa forma, os dados das análises moleculares são descritos em um sub-tópico e os dados referentes às demais metodologias em outros.

5.1 RESULTADOS MOLECULARES

Nesse estudo os exons 2, 3 e 4 do gene *BCHE* foram amplificados e analisados através das metodologias descritas anteriormente. Os resultados de cada um dos fragmentos analisados são mostrados nos sub-ítems a seguir.

5.1.1 Exon 2

O exon 2 do gene *BCHE* foi parcialmente amplificado, da maneira descrita na metodologia (ver figura 2), produzindo dois fragmentos denominados 2a e 2b. Foram amplificadas e analisadas 71 amostras para os fragmentos 2a e 2b e os resultados referentes a cada um desses dois fragmentos são mostrados em sub-ítems separados.

5.1.1.1 Exon 2a

O fragmento 2a, que tem 193 pares de bases e contém o sítio da mutação *BCHE*70G*, foi amplificado e analisado em 71 amostras de

ADN de indígenas Guarani do Mato Grosso do Sul. As 71 amostras analisadas para o fragmento 2a não apresentaram nenhuma outra variação, além da mutação *BCHE*70G*. A tabela 8 mostra o número total de indivíduos analisados e o número de indivíduos que apresentaram a mutação *BCHE*70G* em cada sub-tribo e na amostra total.

TABELA 8. Número de amostras amplificadas e analisadas para o fragmento 2a do exon 2 do gene *BCHE*, número de amostras contendo a mutação *BCHE*70G* e frequência dessa mutação em cada sub-tribo e outros grupos étnicos e na amostra total.

SUB-TRIBO	N (TOTAL)	N (<i>BCHE*70G</i>)
Kaiowá	43	02
Ñandewa	19	01
Kaiowá/Ñandewa	05	-
Ñandewa/Paraguaio	03	-
Kaiowá/Branco	01	-
Total	71	03

Para o cálculo da frequência da mutação *BCHE*70G* nos Guarani do Mato Grosso do Sul é considerada a amostra fenotipada total ($N = 258$). Desse modo, a frequência da mutação *BCHE*70G* nos Kaiowá é de $0,69\% \pm 0,48$ e nos Ñandewa é de $0,60\% \pm 0,59$ e as duas sub-tribos não apresentam diferença significativa quanto à frequência dessa mutação ($X^2 = 0,012$; $p > 0,90$). Para os demais cálculos apresentados nesse trabalho, será utilizada a frequência da mutação *BCHE*70G* na amostra total ($0,58\% \pm 0,33$). A figura 3 mostra uma placa de gel de poliacrilamida após eletroforese de amostras amplificadas para o fragmento 2a.

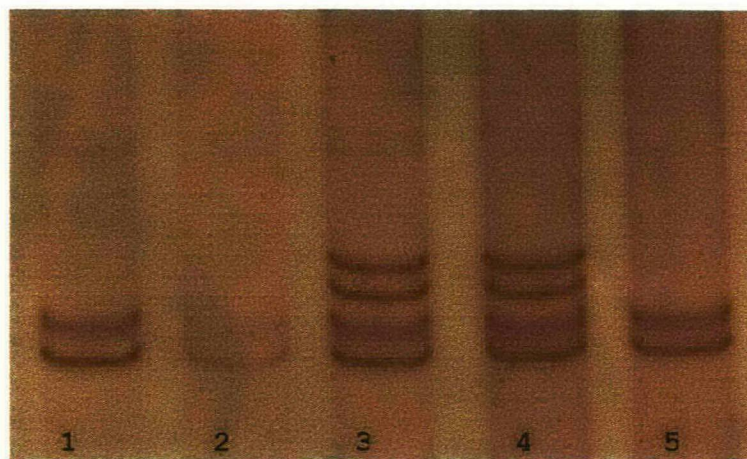


Figura 3. Reprodução de uma placa de gel de poliacrilamida após eletroforese-SSCA de amostras amplificadas para o fragmento 2a do exon 2 do gene *BCHE*. As amostras 1, 2 e 5 são *BCHE**U/*BCHE**U, as amostras 3 e 4 são *BCHE**U/ *BCHE**70G (UA).

5.1.1.2 Exon 2b

Foram amplificadas e analisadas 71 amostras para o fragmento 2b do exon 2 do gene *BCHE*. As 71 amostras amplificadas e analisadas para o fragmento 2b não apresentaram outra variação, além da mutação *BCHE**390V. A tabela 9 mostra o resultado da amplificação e análise do fragmento 2b em cada sub-tribo e demais grupos étnicos e no total amostral.

TABELA 9. Número de amostras amplificadas e analisadas para o fragmento 2b do exon 2 do gene *BCHE*, número de amostras contendo a mutação *BCHE*390V* em cada sub-tribo e outros grupos étnicos e na amostra total.

SUB-TRIBO	N (TOTAL)	N (<i>BCHE*390V</i>)
Kaiowá	43	6
Ñandewa	19	4
Kaiowá/Ñandewa	05	2
Ñandewa/Paraguaio	03	1
Kaiowá/Branco	01	1
Total	71	14

Algumas considerações devem ser levadas em conta para o cálculo da frequência da mutação *BCHE*390V* na população Guarani do Mato Grosso do Sul, de modo que esse cálculo é apresentado na discussão dos resultados obtidos nesse estudo. A figura 4 mostra uma placa de gel de poliacrilamida após eletroforese de amostras amplificadas para o fragmento 2b.

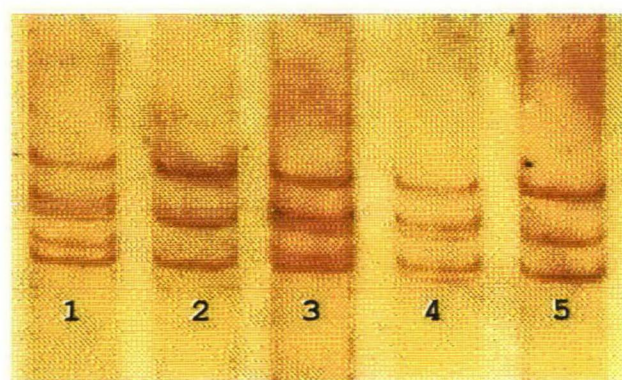


Figura 4. Reprodução de uma placa de gel de poliacrilamida após eletroforese-SSCA de amostras amplificadas para o exon 2b do exon 2 do gene *BCHE*. As amostras 1, 3 e 4 são *BCHE*U/BCHE*390V* (UF2), as amostras 2 e 5 são *BCHE*U/BCHE*U*.

5.1.2 Exon 3

O exon 3 do gene *BCHE* foi amplificado em 262 amostras de ADN de indígenas do Mato Grosso do Sul e os produtos de PCR foram submetidos a eletroforeses SSCA. Através da análise das bandas eletroforéticas das 262 amostras analisadas, foi verificado que, dentro das condições metodológicas já descritas, o exon 3 do gene *BCHE* mostrou-se homogêneo, não apresentando variabilidade detectável. A tabela 10 indica o número de amostras amplificadas e analisadas para o exon 3, classificadas por sub-tribo e demais grupos étnicos. A figura 5 mostra uma eletroforese SSCA do exon 3, na qual é possível observar a homogeneidade das amostras.

TABELA 10. Número de amostras amplificadas e analisadas para o exon 3 do gene *BCHE*, classificados por sub-tribo e demais grupos étnicos.

SUB-TRIBO	NÚMERO DE AMOSTRAS	GENÓTIPO
Kaiowá	149	<i>BCHE*U/BCHE*U</i>
Ñandewa	83	<i>BCHE*U/BCHE*U</i>
Kaiowá/Ñandewa	22	<i>BCHE*U/BCHE*U</i>
Kaiowá/Brasileiro	01	<i>BCHE*U/BCHE*U</i>
Kaiowá/Terena	01	<i>BCHE*U/BCHE*U</i>
Ñandewa/Paraguaio	04	<i>BCHE*U/BCHE*U</i>
Ñandewa/Brasileiro	01	<i>BCHE*U/BCHE*U</i>
Ñandewa/Mulato Claro	01	<i>BCHE*U/BCHE*U</i>
Total	262	<i>BCHE*U/BCHE*U</i>

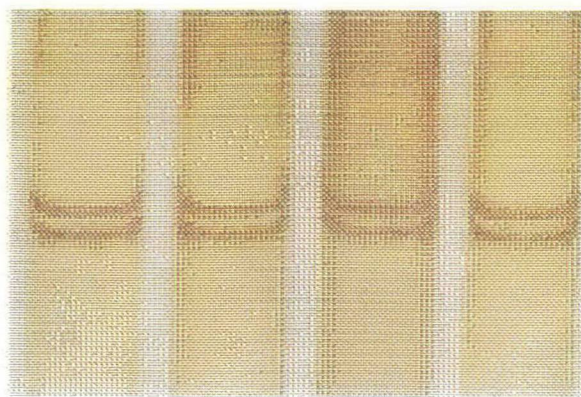


FIGURA 5. Reprodução de placa de gel de poliacrilamida após eletroforese-SSCA de amostras amplificadas para o exon 3 do gene *BCHE*. Todas as amostras são *BCHE**U/*BCHE**U.

5.1.3 Exon 4

O exon 4 do gene *BCHE* foi amplificado através de duas reações de PCR diferentes, utilizando-se diferentes pares de iniciadores. A tabela 11 mostra a quantidade de amostras amplificadas para cada um dos dois pares de iniciadores.

TABELA 11. Frequência ($\pm$ E.P.) de amostras amplificadas e não amplificadas para o exon 4, através dos dois diferentes pares de iniciadores.

INICIADORES	AMOSTRAS AMPLIFICADAS		AMOSTRAS NÃO AMPLIFICADAS		TOTAL
	N	%	N	%	
P43 e P45	48	18,2	216	81,8	264
P43 e K25S	252	95,5	12	4,5	264

A utilização do par de iniciadores P43 e K25S permitiu a amplificação de 252 amostras de ADN para o exon 4 do gene *BCHE*. A tabela 12 mostra os número de indivíduos por genótipo e as frequências do alelo *BCHE**539T, classificados por sub-tribo e

demaís grupos étnicos. A figura 6 mostra uma placa de gel de poliacrilamida após eletroforese SSCA de produtos amplificados do exon 4 do gene *BCHE*.

TABELA 12. Número de indivíduos analisados em cada sub-tribo e no total de amostras, indicando os genótipos encontrados e, quando encontrado, a frequência do alelo *BCHE**539T.

SUB-TRIBO	<i>BCHE</i> *U/ <i>BCHE</i> *U	<i>BCHE</i> *U/ <i>BCHE</i> *539T	<i>BCHE</i> *539T/ <i>BCHE</i> *539T	<i>BCHE</i> *539T (% ± E.P.)
KW	137	07	02	3,8 ± 1,1
ÑW	69	07	-	4,6 ± 1,7
KW/ÑW	21	01	-	2,3 ± 2,3
KW/B	01	-	-	-
KW/T	01	-	-	-
ÑW/P	04	-	-	-
ÑW/B	01	-	-	-
ÑW/MC	01	-	-	-
TOTAL	235	15	02	3,8 ± 0,8

KW = Kaiowá; ÑW = Nandewá; B = Brasileiro; T = Terena; P = Paraguaio e MC = Mulato Claro.

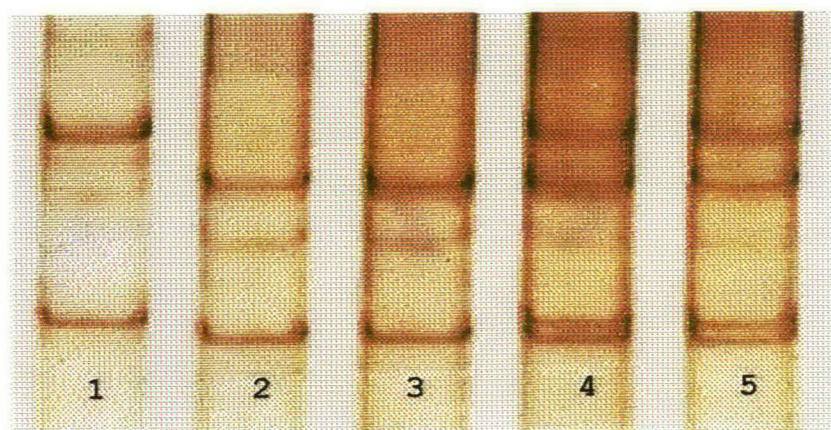


FIGURA 6. Reprodução de placa de gel de poliacrilamida após eletroforese-SSCA de amostras amplificadas para o exon 4 do gene *BCHE*. A amostra 1 é *BCHE**U/*BCHE**U, as amostras 2 e 3 são *BCHE**539T/*BCHE**539T (KK) e as amostras 4 e 5 são *BCHE**U/*BCHE**539T (UK) .

5.2 FENOTIPAGEM DO LOCO *CHE2*

A fenotipagem do loco *CHE2* foi efetuada em 258 amostras de plasma de indivíduos Guarani do Mato Grosso do Sul. Os resultados da fenotipagem são mostrados nas tabelas 13, 14 e 15. A figura 7 mostra uma placa de gel de ágar, pH 6,5, após eletroforese de amostras de plasma.

TABELA 13. Número total de amostras, número de amostras *CHE2* C5+ e frequência $\pm$ E.P. do fenótipo *CHE2* C5+ na amostra total, nas subtribos Kaiowá, Nandewa e demais grupos étnicos¹.

SUB-TRIBO	N	<i>CHE2</i> C5+	<i>CHE2</i> C5+ ($\% \pm$ E.P.)
Kaiowá	145	20	13,8 $\pm$ 2,9
Nandewa	83	15	18,1 $\pm$ 4,2
Kaiowá + Terena	01	01	-
Nandewa + Paraguaio	04	01	-
Outros	25	0	0
Total	258	37	14,3 $\pm$ 2,2

¹ O número total de indivíduos apresentando as miscigenações Kaiowá/Terena (N = 01) e Nandewa/Paraguaio (N = 04) é muito pequeno, impossibilitando o cálculo de frequência fenotípica nessas sub-amostras.

TABELA 14. Frequência (N, $\% \pm$ E.P.) de indivíduos *CHE2* C5+ por localidade.

<i>CHE2</i> C5+		
LOCALIDADE	N	$\% \pm$ E.P.
Amambai	08	6,1 $\pm$ 2,1
Porto Lindo	16	31,4 $\pm$ 6,5
Limão Verde	06	16,2 $\pm$ 6,1
Outras	07	18,4 $\pm$ 6,3
Total	37	14,3 $\pm$ 2,2

TABELA 15. Número (N) e frequência (% $\pm$ E.P.) do fenótipo CHE2 C5+, separados por sub-tribo e por localidade.

Localidade	KAIOWÁ		ÑANDEWA		OUTRAS ETNIAS	
	N	% $\pm$ E.P.	N	% $\pm$ E.P.	N	% $\pm$ E.P.
Amambai	07	7,8 $\pm$ 2,8	-	-	01	5,9 $\pm$ 5,7
Porto Lindo	01	100 $\pm$ 0	14	30,4 $\pm$ 6,8	01	25,0 $\pm$ 21,6
Limão Verde	06	18,7 $\pm$ 6,9	-	-	-	0,0
Jacaré	01	100,0 $\pm$ 0	-	-	-	0,0
Sossoro	01	100,0 $\pm$ 0	-	-	-	-
Tacuru	01	20,0 $\pm$ 17,9	01	33,3 $\pm$ 27,2	-	-
Taquapiri	03	50,0 $\pm$ 20,4	-	-	-	-
Outras	-	-	-	-	-	0,0
Total	20	13,8 $\pm$ 2,9	15	18,1 $\pm$ 4,2	02	6,7 $\pm$ 4,5

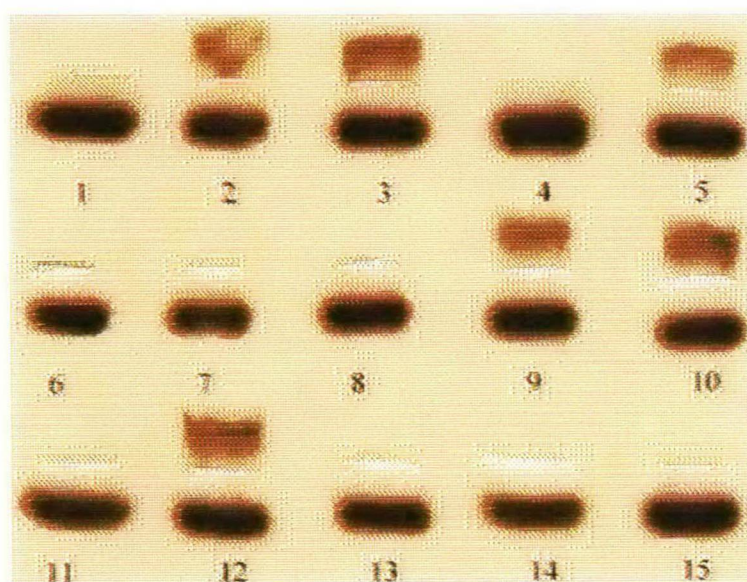


FIGURA 7. Reprodução de uma placa de gel de ágar, pH 6,5, após eletroforese de amostras de plasma. As amostras 2, 3, 5, 9, 10 e 12 têm fenótipo CHE2 C5+ e as demais amostras têm fenótipo CHE2 C5-.

5.3 FENOTIPAGEM DO LOCO *BCHE*

A análise do loco *BCHE* através de inibição enzimática permitiu a classificação fenotípica de 258 indivíduos. A tabela 16 mostra os três fenótipos identificados na amostra e as respectivas frequências fenotípicas. A tabela 17 mostra o número de indivíduos observados em cada classe fenotípica, classificados por localidade e sub-tribo.

TABELA 16. Resultados da fenotipagem por inibição enzimática, indicando número de indivíduos por fenótipo e frequências dos fenótipos ($\% \pm \text{E.P.}$) do loco *BCHE*.

FENÓTIPO	N	% + E.P.
BCHE UA	02	0,78% $\pm$ 0,55
BCHE UF	08	3,10% $\pm$ 1,08
BCHE U	248	96,12% $\pm$ 1,20
TOTAL	258	100,00%

TABELA 17. Número de indivíduos, classificados nas três classes fenotípicas, separados por sub-tribo e por localidade.

LOCALIDADE	KAIOWÁ			ÑANDEWA			KAIOWÁ/ ÑANDEWA			OUTRAS ETNIAS			TOTAL
	U	UF	UA	U	UF	UA	U	UF	UA	U	UF	UA	
Amambai	87	01	02	24	01	-	12	01	-	04	-	-	132
Porto Lindo	01	-	-	46	03	-	01	-	-	-	-	-	51
Dourados	01	-	-	04	01	-	-	-	-	-	-	-	06
Guaimbé	-	01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01
Outras	52	-	-	04	-	-	08	-	-	04	-	-	68
Total	141	02	02	78	05	-	21	01	-	08	-	-	258

5.4 ATIVIDADE DA BChE

A medida de atividade enzimática foi realizada em 95 indivíduos, representando 36,8% da amostra total. A tabela 18 indica a sub-tribo e a localidade às quais pertencem esses indivíduos. A comparação das médias de atividade enzimática das sub-tribos Kaiowá ($3,92 \pm 1,41$ KU/L; $N = 49$) e Nandewá ($4,41 \pm 1,63$ KU/L; $N = 28$) não indicou diferença significativa ($p > 5\%$), de modo que as duas sub-tribos serão consideradas conjuntamente nas demais análises referentes à atividade da BChE. Nas tabelas 19 e 20 podem ser observadas as médias ($\pm$ E.P.) da atividade da BChE (KU/L) classificadas por fenótipo e por genótipo do exon 2 do gene *BCHE*, respectivamente. A tabela 21 mostra as relações de consangüinidade, as sub-tribos e os valores individuais de atividade da BChE de indivíduos identificados como variantes do loco *BCHE*. A tabela 22 mostra os resultados do teste de comparação das médias de atividade da BChE dos indivíduos pertencentes a cada uma das três classes fenotípicas. A tabela 23 mostra as comparações entre as atividades médias dos grupos genotípicos do exon 2 do gene *BCHE*.

Na tabela 24 podem ser observadas as médias de atividade enzimática dos indivíduos portadores da mutação K. A tabela 25 mostra os valores de p referentes às comparações das médias de atividade enzimática entre os indivíduos com genótipos *BCHE*U/BCHE*U*, *BCHE*U/BCHE*K* e *BCHE*K/BCHE*K*, obtidos através do teste t.

A tabela 26 mostra as médias de atividade da BChE (KU/L) nos indivíduos com fenótipo CHE2 C5+ e CHE2 C5-. O resultado da comparação entre as médias, através do teste t, não indicou diferença significativa entre as duas classes fenotípicas ($t = 2,0$, $p > 5\%$).

TABELA 18. Amostra de indivíduos com resultados de medida de atividade da BChE, classificados por sub-tribo e por localidade.

LOCALIDADE	KAIOWÁ	ÑANDEWA	KAIOWÁ/ ÑANDEWA	OUTROS GRUPOS ÉTNICOS	TOTA
Amambai	35	10	06	03	54
Porto Lindo	01	16	01	02	20
Limão Verde	06	-	01	-	07
Cerrito	-	01	-	-	01
Dourados	-	02	-	-	02
Guaimbé	01	-	-	-	01
Jacaré	01	-	01	-	02
Miranda	01	-	-	-	01
Sapucaia	-	-	01	-	01
Tacuru	03	-	-	-	03
Taquapiri	02	01	-	-	03
Total	49	28	10	05	95

TABELA 19. Médias ($\pm$ E.P.) de atividade (KU/L) da BChE de amostras classificadas por fenótipo.

FENÓTIPO	N	Média $\pm$ E.P.
BCHE UA	02	1,56 $\pm$ 1,90
BCHE UF	08	3,56 $\pm$ 0,97
BCHE U	68	4,35 $\pm$ 1,42
TOTAL ¹	78	4,19 $\pm$ 1,39

¹ O total da tabela 19 é menor que o da tabela 18, pois foram excluídos 17 indivíduos genotipados como portadores da mutação BCHE*539T.

TABELA 20. Médias ($\pm$ E.P.) de atividade (KU/L) da BChE de amostras classificadas por genótipo do exon 2.

GENÓTIPO	N	Média $\pm$ E.P.
<i>BCHE*U/BCHE*A</i>	03	1,99 $\pm$ 1,54
<i>BCHE*U/BCHE*F2</i>	14	4,01 $\pm$ 1,27
<i>BCHE*U/BCHE*U</i>	40	4,25 $\pm$ 1,22
TOTAL¹	57	4,14 $\pm$ 1,38

¹ Foram excluídas 14 das 17 amostras genotipadas como portadoras da mutação K do exon 4. As três amostras portadoras da mutação K que foram mantidas, apresentam também a mutação F2.

TABELA 21. Atividade da BChE e relações de consangüinidade dos indivíduos identificados como variantes do loco *BCHE* encontrados na amostra da população Guarani do Mato Grosso do Sul¹.

AMOSTRA	SUB-TRIBO	FENÓTIPO	GENÓTIPO	ATIV. (KU/L)	CONSANGÜINIDADE ¹
286	KW	BCHE UA	<i>BCHE*U/BCHE*A</i>	0,22	mãe de 287
287	KW	BCHE UA	<i>BCHE*U/BCHE*A</i>	2,90	filha de 286
402	ÑW	BCHE UF	<i>BCHE*K/BCHE*A</i> ²	2,87	
313	KW	BCHE UF	<i>BCHE*U/BCHE*F2</i>	4,75	
016	ÑW	BCHE UF	<i>BCHE*U/BCHE*F2</i>	2,02	
814	ÑW	BCHE UF	<i>BCHE*U/BCHE*F2</i>	3,08	
281	KW/ÑW	BCHE UF	<i>BCHE*U/BCHE*F2</i>	4,67	
290	KW	BCHE UF	<i>BCHE*U/BCHE*F2</i>	4,05	
816	ÑW	BCHE UF	<i>BCHE*U/BCHE*F2</i>	4,08	irmão de 817
817	ÑW	BCHE UF	<i>BCHE*U/BCHE*F2</i>	2,92	irmão de 816
020	ÑW	BCHE U	<i>BCHE*K/BCHE*F2</i>	3,53	mãe de 022 e irmã de 024
202	KW/B	BCHE U	<i>BCHE*U/BCHE*F2</i>	3,62	
295	KW	BCHE U	<i>BCHE*U/BCHE*F2</i>	6,34	
309	KW	BCHE U	<i>BCHE*K/BCHE*F2K</i>	1,99	
606	KW	BCHE U	<i>BCHE*U/BCHE*F2</i>	4,86	irmão de 604 e 609
607	KW	BCHE U	<i>BCHE*U/BCHE*F2</i>	4,34	
628	KW/ÑW	BCHE U	<i>BCHE*U/BCHE*F2</i>	5,86	
004	Ñ	BCHE U	<i>BCHE*U/BCHE*K</i>	2,98	
011	Ñ	BCHE U	<i>BCHE*U/BCHE*K</i>	3,20	
030	Ñ	BCHE U	<i>BCHE*U/BCHE*K</i>	2,01	
218	KW	BCHE U	<i>BCHE*U/BCHE*K</i>	1,96	
245	KW	BCHE U	<i>BCHE*U/BCHE*K</i>	3,54	

continua

continuação da tabela 21

AMOSTRA	SUB-TRIBO	FENÓTIPO	GENÓTIPO	ATIV. (KU/L)	CONSANGÜINIDADE ¹
318	KW	BCHE U	<i>BCHE*U/BCHE*K</i>	2,89	
328	KW	BCHE U	<i>BCHE*U/BCHE*K</i>	3,78	
330	KW	BCHE U	<i>BCHE*K/BCHE*K</i>	2,02	
332	KW	BCHE U	<i>BCHE*U/BCHE*K</i>	4,03	
333	KW	BCHE U	<i>BCHE*U/BCHE*K</i>	3,98	
334	KW/ÑW	BCHE U	<i>BCHE*U/BCHE*K</i>	4,02	
403	ÑW	BCHE U	<i>BCHE*U/BCHE*K</i>	2,99	filha de 638
601	KW	BCHE U	<i>BCHE*U/BCHE*K</i>	3,22	irmã de 619
846	ÑW/P	BCHE U	<i>BCHE*U/BCHE*K</i>	3,42	irmã de 814

¹ Ver apêndice 1. 2 Posição trans inferida.

TABELA 22. Valores de p, obtidos através do teste t, referentes à comparação das médias de atividade da BChE de indivíduos com fenótipo BCHE U (N=68), BCHE UA (N=2) e BCHE UF (N=8).

CLASSES FENOTÍPICAS COMPARADAS	TESTE t
BCHE U X BCHE UA	p < 5%
BCHE U X BCHE UF	p > 5%
BCHE UA X BCHE UF	p < 5%

TABELA 23. Valores de p, obtidos através do teste t, referentes à comparação das médias de atividade da BChE de indivíduos com genótipo *BCHEU/BCHEF2* (N=14), *BCHE*U/BCHE*A* (N=3) e *BCHE*U/BCHE*U* (N=40) do exon 2 do gene *BCHE*.

GENÓTIPOS COMPARADOS	TESTE t
<i>BCHE*U/BCHE*U</i> X <i>BCHE*U/BCHE*A</i>	p < 5%
<i>BCHE*U/BCHE*U</i> X <i>BCHE*U/BCHE*F2</i>	p > 5%
<i>BCHE*U/BCHE*A</i> X <i>BCHE*U/BCHE*F2</i>	p < 5%

TABELA 24. Médias ($\pm$ E.P.) de atividade (KU/L) da BChE de amostras classificadas por genótipo do exon 4 do gene *BCHE*.

GENÓTIPO	N	Média $\pm$ E.P.
<i>BCHE</i> *K/ <i>BCHE</i> *K	02	2,00 $\pm$ 0,02
<i>BCHE</i> *U/ <i>BCHE</i> *K	15	3,23 $\pm$ 0,64
<i>BCHE</i> *U/ <i>BCHE</i> *U	68	4,35 $\pm$ 1,42
TOTAL ¹	85	4,10 $\pm$ 1,25

¹ Foram excluídas as amostras fenotipadas como BChE UA (N = 02) e BChE UF (N = 08).

TABELA 25. Valores de p, obtidos através do teste t, referentes à comparação das médias de atividade da BChE de indivíduos com genótipo *BCHE**U/*BCHE**U (N = 68), *BCHE**U/*BCHE**UK (N = 15) e *BCHE**K/*BCHE**K (N = 02).

GENÓTIPOS COMPARADOS	TESTE t
<i>BCHE</i> *U/ <i>BCHE</i> *U X <i>BCHE</i> *U/ <i>BCHE</i> *K	p > 5%
<i>BCHE</i> *U/ <i>BCHE</i> *U X <i>BCHE</i> *K/ <i>BCHE</i> *K	p < 5%
<i>BCHE</i> *U/ <i>BCHE</i> *K X <i>BCHE</i> *K/ <i>BCHE</i> *K	p < 5%

Tabela 26. Comparação das médias (teste t) de atividade da BChE (KU/L) entre indivíduos com fenótipo CHE2 C5+ e CHE2 C5-.

FENÓTIPO	N	Média
CHE2 C5+	16	4,40
CHE2 C5-	55	4,27

6. DISCUSSÃO

6.1 EXON 2 E FENOTIPAGEM DO LOCO *BCHE*

A amplificação e análise do exon 2 do gene *BCHE* foi realizada em 71 amostras de ADN, correspondendo a 27,2% das amostras analisadas para o exon 3 e 28,2% das amostras analisadas para o exon 4. A tabela 27 caracteriza o sub-grupo amostral amplificado e analisado para os fragmentos 2a e 2b do exon 2, indicando os resultados dos exons 3 e 4 e da fenotipagem.

Tabela 27. Número de amostras e caracterização, através do cruzamento com os demais dados obtidos por fenotipagem e genotipagem do loco *BCHE*, do sub-grupo amostral amplificado e analisado para os fragmentos 2a e 2b.

FENÓTIPO	EXON 3	EXON 4	EXON 2a	EXON 2b	N
BCHE U	BCHE*U/BCHE*U	BCHE*U/BCHE*U	BCHE*U/BCHE*U	BCHE*U/BCHE*U	40
BCHE U	BCHE*U/BCHE*U	BCHE*U/BCHE*U	BCHE*U/BCHE*U	BCHE*U/BCHE*390V	05
BCHE U	BCHE*U/BCHE*U	BCHE*U/BCHE*539T	BCHE*U/BCHE*U	BCHE*U/BCHE*U	13
BCHE U	BCHE*U/BCHE*U	BCHE*U/BCHE*539T	BCHE*U/BCHE*U	BCHE*U/BCHE*390V	01
BCHE U	BCHE*U/BCHE*U	BCHE*539T/BCHE*539T	BCHE*U/BCHE*U	BCHE*U/BCHE*390V	01
BCHE U	BCHE*U/BCHE*U	BCHE*539T/BCHE*539T	BCHE*U/BCHE*U	BCHE*U/BCHE*U	01
BCHE UA	BCHE*U/BCHE*U	BCHE*U/BCHE*U	BCHE*U/BCHE*70G	BCHE*U/BCHE*U	02
BCHE UF	BCHE*U/BCHE*U	BCHE*U/BCHE*U	BCHE*U/BCHE*U	BCHE*U/BCHE*390V	07
BCHE UF	BCHE*U/BCHE*U	BCHE*U/BCHE*539T	BCHE*U/BCHE*70G	BCHE*U/BCHE*U	01

Essa tabela mostra que os dados fenotípicos, obtidos através de inibição enzimática, não apresentam total correspondência com os dados obtidos através de análise direta de ADN. A fenotipagem do loco *BCHE* indicou oito indivíduos com fenótipo *BCHE* UF e dois com fenótipo *BCHE* UA. Dentre as oito amostras fenotipadas como *BCHE* UF, sete apresentaram a mutação *BCHE*390V* (F2). Observando a tabela 27 é possível perceber que uma das amostras fenotipadas como *BCHE* UF não apresenta a mutação *BCHE*390V*, mas apresenta as mutações *BCHE*70G* (A) e *BCHE*539T* (K).

6.1.1 Exon 2a e fenotipagem do loco *BCHE*

A fenotipagem do loco *BCHE* indicou dois indivíduos com fenótipo *BCHE* UA (ver tabela 16) e a genotipagem da sub-amostra de 71 indivíduos (ver tabela 27) confirmou a presença da mutação *BCHE*70G* (A) nessas duas amostras, bem como numa terceira amostra fenotipada como *BCHE* UF. Esse indivíduo fenotipado como *BCHE* UF não apresenta a mutação *BCHE*390V* (F2), mas apresenta as mutações *BCHE*70G* (A) e *BCHE*539T* (K). A tabela 28 mostra os números de inibição dos três indivíduos portadores da mutação *BCHE*70G*.

TABELA 28. Números de inibição enzimática pelo DL-propranolol (PN) e pelo Ro2-0683 (RON) dos três indivíduos portadores da mutação *BCHE*70G* (A).

AMOSTRA	NÚMEROS DE INIBIÇÃO		FENÓTIPO	GENÓTIPO
	PN	RON		
286	44,00	56,40	<i>BCHE</i> UA	<i>BCHE*U/BCHE*A</i>
287	54,81	56,60	<i>BCHE</i> UA	<i>BCHE*U/BCHE*A</i>
402	68,89	86,47	<i>BCHE</i> UF	<i>BCHE*K/BCHE*A</i>

Os valores de PN e de RON das amostras 286 e 287 encontram-se dentro dos limites de variação característicos do fenótipo BCHE UA (ver tabela 7). A amostra 402, apesar de não apresentar o alelo BCHE*F, mostra valores de PN e RON característicos do fenótipo BCHE UF. A falha na fenotipagem pode decorrer de fatores individuais dessa amostra, como por exemplo uma outra mutação no gene *BCHE*.

A frequência do alelo *BCHE*70G* obtida através de inibição enzimática ($0,39\% \pm 0,3\%$) não difere significativamente ($X^2 = 0,2$; $p > 0,70$) da frequência obtida através dos dados genotípicos ($0,58\% \pm 0,3\%$), de modo que as comparações com as frequências do alelo em outras populações serão realizadas a partir dos dados genotípicos. A tabela 29 mostra as comparações entre as frequências do alelo *BCHE*70G*, obtidas nesse estudo, com base nos dados genotípicos, e em outras populações mundiais.

TABELA 29. Comparação (X^2 ; p) entre as frequências do alelo *BCHE*70G* nos Guarani do Mato Grosso do Sul, calculadas com base em dados de análise direta de ADN ($0,58\% \pm 0,3\%$), e em outras populações mundiais¹.

POPULAÇÃO	N	<i>BCHE*70G</i> (% $\pm$ E.P.)	X^2 ; p
Europa	35770	1,69 $\pm$ 0,04	3,85; < 0,05
Ásia	7441	0,73 $\pm$ 0,06	0,16; > 0,50
Américas	19544	1,04 $\pm$ 0,04	2,10; > 0,10
África	6467	0,46 $\pm$ 0,05	0,17; > 0,50
Oceania	4244	1,44 $\pm$ 0,13	2,60; > 0,05

¹ Revisão em WHITTAKER, 1986.

Os dados populacionais da tabela 29 foram obtidos através de testes de inibição enzimática, de modo que a frequência do alelo *BCHE*70G* foi calculada com base na frequência do fenótipo BCHE UA. As comparações dessas frequências com aquela obtida nesse estudo, através de dados de análise direta de ADN, indicaram que a frequência da mutação *BCHE*70G* é significativamente mais alta na população da Europa, enquanto que nas demais populações não foram encontradas diferenças significativas.

ALCÂNTARA e cols. (1995) analisaram, através de inibição enzimática, nove tribos indígenas brasileiras e encontraram o alelo *BCHE*70G* apenas nos Mura provenientes de Guapenu ($1,4\% \pm 1,0$). Nos Mura provenientes de Autazes e Murutinga o alelo não foi encontrado. Estudos anteriores, englobando 2334 indivíduos, mostram que o alelo *BCHE*70G* não foi encontrado em 21 tribos indígenas brasileiras. Em outros grupos indígenas Sul-americanos o alelo foi encontrado com frequências variando de $0,2\% \pm 0,2$ nos Mataco-Charote da Argentina a $3,1\% \pm 0,6$ nos Makiritare da fronteira Venezuela-Brasil. O alelo foi também encontrado em índios Mexicanos com frequências de $0,9\% \pm 0,4$, $0,5\% \pm 0,1$ e $3,8\% \pm 1,0$. Nas duas tribos Norte-americanas analisadas (Apache e Navajo) o alelo não foi encontrado (revisão em ALCÂNTARA e cols., 1995). A frequência do alelo *BCHE*70G* nos Guarani do Mato Grosso do Sul encontra-se dentro dos limites de frequência já descritos para índios Sul-americanos.

A presença do alelo *BCHE*70G* nos Guarani do Mato Grosso do Sul é o segundo relato do alelo em populações indígenas brasileiras.

As frequências do alelo nos dois grupos de indígenas brasileiros onde foi encontrado não diferem significativamente ($X^2 = 2,02$; $p < 0,20$).

ALCÂNTARA e cols. (1995) sugerem que a ocorrência do alelo *BCHE*70G* em populações indígenas é devida a fluxo gênico de populações caucasóides. Baseiam sua hipótese na baixa incidência do alelo em populações indígenas e na predominância do alelo em populações caucasóides.

LA DU e cols. (1990) observaram que 90% dos alelos *BCHE*70G* estão em cis com a mutação *BCHE*539T* em populações caucasóides. Nos Guarani do Mato Grosso do Sul, dos três indivíduos portadores da mutação *BCHE*70G*, apenas um apresentava também a mutação *BCHE*539T*. É bastante provável que esse indivíduo que tem as duas mutações (*BCHE*70G* e *BCHE*539T*) não as apresente em cis, uma vez que se espera uma única origem de *BCHE*70G* e que a frequência de recombinação entre os dois sítios é extremamente baixa.

A tabela 30 mostra alguns dados referentes aos 03 indivíduos portadores da mutação *BCHE*70G*, encontrados na população Guarani do Mato Grosso do Sul, que podem servir de marcadores de miscigenação com outros grupos étnicos.

TABELA 30. Dados de tipagem sanguínea para o grupo ABO e de tipagem de *HLA-DRB1* para os 03 indivíduos portadores da mutação *BCHE*70G*.

AMOSTRA ¹	GRUPO ABO ²	PRESENÇA DE ALELOS NÃO AMERÍNDIOS NO LOCO <i>HLA-DRB1</i> ²
286	O	NÃO
287	O	NÃO
402	NT	NÃO

¹ Ver Apêndice 1.

² Tsuneto (comunicação pessoal, 2000).

NT = Não tipado.

Os dados mostrados na tabela acima não são indicativos de miscigenação, pois nenhum dos três indivíduos portadores da mutação *BCHE*70G* apresentou alelo não ameríndio no loco *DRB1*, ou tipagem de ABO que indicasse miscigenação. Apesar dos dados não indicativos da tabela 30, sabe-se que essa tribo apresenta miscigenação (Loco *HLA-DRB1*: 16% em Ñandewa e 2,4% em Kaiowá Tsuneto, comunicação pessoal, 2000). Considerando os aspectos anteriormente discutidos, a nossa hipótese é de que o alelo *BCHE*70G* tenha entrado na população Guarani do Mato Grosso do Sul por fluxo gênico de populações caucasóides, concordando com a hipótese anteriormente proposta por ALCÂNTARA e cols. (1995).

6.1.2 Exon 2b e fenotipagem do loco *BCHE*

A análise do sub-grupo amostral, escolhido para genotipagem dos fragmentos 2a e 2b do exon 2, indica que a fenotipagem deixou de detectar a presença da mutação *BCHE*390V*. Dentre os 61 indivíduos fenotipados como usuais, que foram genotipados para o fragmento 2b, sete foram identificados como portadores da mutação *BCHE*390V* (ver tabela 27).

Considerando que a análise molecular do exon 2 foi efetuada em apenas parte da amostra fenotipada, é possível inferir que na amostra total de indivíduos fenotipados como usuais ($N = 248$) não foram detectados cerca de $11,5\% \pm 4,1\%$, ou seja, cerca de 29 indivíduos heterozigotos para a mutação *BCHE*390V*. Se somarmos esses 29 indivíduos, aos sete *BCHE*UF2* anteriormente detectados, encontramos a frequência de $6,98\% \pm 1,12\%$ para o alelo *BCHE*390V*. A comparação das frequências obtidas através de fenotipagem ($1,55\% \pm 0,54\%$) e de PCR-SSCA, corrigida como sugerido anteriormente ($6,98\% \pm 1,12\%$), indica diferença significativa entre as duas frequências ($X^2 = 18,6$; $p < 0,001$).

A tabela 31 mostra os números de inibição pelo DL-propranolol e pelo Ro2-0683 dos indivíduos portadores da mutação *BCHE*390V* que foram fenotipados como usuais, bem como dos indivíduos fenotipados como *BCHE UF*. Nessa tabela é possível observar que os oito indivíduos fenotipados como *BCHE UF* apresentam valores de PN dentro dos limites de variação que identificam o fenótipo *BCHE UF*. As amostras 281 e 817 apresentam valores de RON um pouco acima do limite de variação esperado para o fenótipo *BCHE UF*, porém a análise conjunta dos números de inibição de PN e de RON indicam o fenótipo *BCHE UF*. As sete amostras fenotipadas como usuais e genotipadas como portadoras da mutação *BCHE*390V* apresentam números de inibição, tanto PN como RON, característicos do fenótipo *BCHE U* (ver tabela 07). Nenhuma dessas amostras apresentou valores críticos, que pudessem sugerir um resultado duvidoso por se encontrarem na faixa de sobreposição dos limites de variação dos números de inibição característicos de cada fenótipo.

TABELA 31. Números de inibição enzimática pelo DL-propranolol (PN) e pelo Ro2-0683 (RON) dos indivíduos heterozigotos quanto à mutação *BCHE*390V* (F2) fenotipados como BCHE U e como BCHE UF¹.

AMOSTRA	NÚMEROS DE INIBIÇÃO		FENÓTIPO	GENÓTIPOS NÃO USUAIS EM OUTROS SÍTIOS
	PN	RON		
020	72,95	90,30	BCHE U	<i>BCHE*U/BCHE*K</i>
202	71,91	88,63	BCHE U	-
295	76,68	92,75	BCHE U	-
309	76,63	89,67	BCHE U	<i>BCHE*K/BCHE*K</i>
606	77,66	93,68	BCHE U	-
607	80,50	93,62	BCHE U	-
628	72,96	92,27	BCHE U	-
016	56,84	86,31	BCHE UF	-
281	64,45	87,20	BCHE UF	-
290	67,57	82,86	BCHE UF	-
313	66,55	86,05	BCHE UF	-
402	68,89	86,47	BCHE UF	<i>BCHE*U/BCHE*A; BCHE*U/BCHE*K</i>
814	68,08	85,88	BCHE UF	-
816	63,70	85,18	BCHE UF	-
817	64,60	87,24	BCHE UF	-

¹ Todas as amostras fenotipadas como BCHE UF foram submetidas a três diferentes testes de inibição que confirmaram os números de inibição para os dois inibidores.

Considerando todos os resultados e análises anteriormente mostrados nesse estudo, é possível sugerirmos três hipóteses para justificar a diferença verificada entre as técnicas de fenotipagem e de PCR-SSCA. A primeira hipótese está relacionada a problemas de ordem técnica. Como verificado nesse estudo, a técnica de fenotipagem por inibição enzimática detecta apenas cerca de 20% (7/36 inferidos) dos indivíduos heterozigotos para a mutação *BCHE*390V*. Desse modo, é possível que essa metodologia permita a

detecção da mutação *BCHE*390V* em apenas parte dos casos. A segunda hipótese sugere que uma outra mutação no gene *BCHE*, não identificada nesse estudo, possa alterar a afinidade dos inibidores DL-propranolol e Ro2-0683 pela BChE, levando a uma falha na detecção do fenótipo *BCHE* UF, ou, especificamente, da mutação *BCHE*390V*. Uma terceira hipótese é de que uma variação em outra enzima, que não a BChE, possa estar interferindo, indiretamente, na afinidade da BChE frente aos inibidores utilizados nesse estudo. Como a população desse estudo é relativamente pequena e isolada, é possível supor que a presença de variante dessa outra enzima, que supostamente alteraria a afinidade da BChE frente ao DL-propranolol e ao Ro2-0683, poderia estar ocorrendo em frequências maiores que em outras populações já analisadas. Fenotipagem por método cego, de indivíduos já genotipados por análise direta de ADN, poderá ajudar a esclarecer se esse problema é de ordem técnica. Estudos populacionais realizados através de análise molecular virão a acrescentar mais informação a esse respeito, permitindo uma discussão melhor fundamentada dessa questão. Os dados populacionais encontrados na literatura referem-se a frequências alélicas calculadas a partir de frequências fenotípicas obtidas por testes de inibição enzimática, que não permitem a distinção dos alelos *BCHE*243M* (F1) e *BCHE*390V* (F2), ambos responsáveis pelo fenótipo resistente ao fluoreto. A nomenclatura utilizada para os alelos resistentes ao fluoreto, que são detectados conjuntamente através dos testes de inibição enzimática, é *BCHE*F*, englobando os alelos *BCHE*390V* (F2)

e *BCHE*243M* (F1). São mostradas, a seguir, as comparações relacionadas às frequências obtidas por fenotipagem e por análise molecular.

A comparação da frequência obtida nesse estudo, através de inibição enzimática (*BCHE*F* = 1,55% ± 0,54%; ver tabela 16), com as frequências descritas para outras quatro tribos indígenas brasileiras e para outras populações mundiais é mostrada na tabela 32.

TABELA 32. Comparação da frequência obtida nesse estudo (1,55% ± 0,54%) através de inibição enzimática com as frequências descritas para outras tribos indígenas brasileiras¹ e para outras populações mundiais².

POPULAÇÃO	N	<i>BCHE*F</i> ³ (% ± E.P.)	X ² ; p
Europa	35770	0,21 ± 0,01	41,80; < 0,001
Ásia	7441	0,40 ± 0,05	15,33; < 0,001
Américas	19544	0,07 ± 0,01	126,63; < 0,001
África	6467	1,35 ± 0,10	0,14; > 0,70
Oceania	4244	0,15 ± 0,03	40,81; < 0,001
Urubu-Kaapor	28	7,1 ± 3,4	7,7; p < 0,001
Asurini	52	2,9 ± 1,6	0,9; p > 0,30
Mura	69	0,7 ± 0,7	0,6; p > 0,50
Sateré-Mawé	191	0,5 ± 0,4	2,1; p > 0,10

¹ ALCÂNTARA e cols. (1995).

² Revisão em WHITTAKER, 1986.

³ Os cálculos das frequências alélicas foram baseados em resultados de inibição enzimática, não permitindo a distinção entre os diferentes fenótipos resistentes ao fluoreto, por isso é utilizada a nomenclatura *BCHE*F* que se refere a todos os alelos responsáveis pelo fenótipo.

Os dados da tabela 32 mostram que a frequência do alelo *BCHE*F* nos Guarani do Mato Grosso do Sul não difere da frequência do alelo em população africana, e é significativamente mais alta que em populações da Europa, Ásia, Américas e Oceania. Essa frequência mais alta pode decorrer de características da população Guarani do Mato Grosso do Sul, tais como: tamanho reduzido e maior isolamento relativo. A tabela 32 também indica diferenças significativas na frequência de *BCHE*F* entre os Guarani do Mato Grosso do Sul e os Urubu-Kaapor, enquanto que nas demais tribos não foram encontradas diferenças significativas. Nos Guarani do Paraná não foram encontrados indivíduos com fenótipo *BCHE UF*. Essas variações na frequência de *BCHE*F* parecem ocorrer ao acaso, de modo que a deriva genética pode ser o principal fator evolutivo envolvido no estabelecimento dessas frequências.

Entre os Ameríndios a frequência do fenótipo *BCHE UF* varia de 0 a 7,1% $\pm$ 3,4% e as frequências obtidas nesse estudo, através de dados fenotípicos (1,55% $\pm$ 0,54%) e considerando a perda de indivíduos heterozigotos (6,98% $\pm$ 1,12%), se encontram dentro desse intervalo. Como os dados da literatura baseiam-se em testes de inibição enzimática, é possível que algumas das frequências alélicas já descritas estejam sub-estimadas devido à perda de heterozigotos (*BCHE/BCHE*390V*).

Os dados referentes à mutação *BCHE*390V* obtidos através de PCR-SSCA e corrigidos com a inclusão dos heterozigotos (*BCHE/BCHE*390V*) detectados como usuais, sugerem que a frequência

dessa mutação se encontre no seguinte intervalo: 3%-11%, com 95% de confiança, levando-se em conta a perda de aproximadamente 53% a 88%, respectivamente. As comparações entre a frequência da mutação *BCHE*390V* estimada nesse estudo e as frequências em outras populações mundiais ficam comprometidas em decorrência das diferenças entre as técnicas, como discutido anteriormente. O trabalho de ALCÂNTARA e cols. (1995), que indica as frequências do alelo *BCHE*F* em diferentes populações ameríndias, foi realizado pelo mesmo laboratório e de acordo com a mesma técnica de fenotipagem do loco *BCHE* que foi utilizada nesse estudo. Desse modo, é possível recalcular as frequências da mutação *BCHE*390V* nessas tribos, inferindo que a técnica detecta apenas cerca de 20% dos casos, com base no estimado para os Guarani do Mato Grosso do Sul. A tabela 33 mostra essas frequências corrigidas e as comparações com a frequência, também corrigida, da mutação *BCHE*390V* nos Guarani do Mato Grosso do Sul.

TABELA 33. Comparação entre a frequência alélica obtida nesse estudo através de PCR-SSCA (6,98% $\pm$ 1,12%) e as frequências descritas para outras populações ameríndias¹.

POPULAÇÃO	N	<i>BCHE*F</i> (%) ²	X ² ; p
Urubu-Kaapor	28	35,7	47,2; < 0,001
Asurini	52	14,4	6,4; < 0,02
Mura	69	3,6	2,1; > 0,10
Sateré-Mawé	191	2,6	8,6; < 0,01

¹ ALCÂNTARA e cols. (1995).

² Valores corrigidos com base no erro de cerca de 80% discutido anteriormente.

A frequência significativamente mais alta observada nos Urubu-Kaapor já tinha sido observada na comparação das frequências estimadas a partir de dados fenotípicos. As frequências corrigidas do alelo *BCHE*F* nos Assurini e nos Sateré-Mawé passam a mostrar diferenças significativas em relação à frequência da mutação nos Guarani do Mato Grosso do Sul. O intervalo da frequência corrigida de *BCHE*F* nos Ameríndios analisados por ALCÂNTARA e cols. (1995) é, aproximadamente, o seguinte: 3% a 36%. Esse intervalo engloba o valor corrigido da frequência de *BCHE*390V* ($6,98\% \pm 1,12\%$) estimada para os Guarani do Mato Grosso do Sul.

ALCÂNTARA e cols. (1995) sugerem que o alelo *BCHE*F* não é de origem indígena e que tenha entrado nas populações Ameríndias através de fluxo gênico. Os autores basearam essa hipótese nas seguintes considerações: o seu estudo foi o primeiro a indicar a presença do alelo *BCHE*F* em populações Ameríndias; das 19 tribos analisadas, somente quatro apresentaram o alelo resistente ao fluoreto, três delas pertencentes ao grupo linguístico Tupi-Guarani (Urubu-Kaapor, Asurini e Sateré-Mawé); essas quatro tribos apresentam características de miscigenação com grupos não indígenas (SALZANO e cols., 1990); a incidência do alelo *BCHE*F* é restrita geograficamente (Urubu-Kaapor = $46^{\circ}18'O, 2^{\circ}18'S$, Asurini = $49^{\circ}40'O, 3^{\circ}35'S$, Sateré-Mawé = $57^{\circ}20'O, 3^{\circ}50'S$ e Mura = $59^{\circ}13'O, 3^{\circ}35'S$).

A população Guarani do Mato Grosso do Sul pertence ao grupo linguístico Tupi-Guarani, mas não tem a mesma localização geográfica das tribos que apresentaram o alelo *BCHE*F* (ver tabela

2). ALCÂNTARA e cols. (1995) analisaram a população Guarani do Paraná e não encontraram o alelo *BCHE*F*, de modo que as duas tribos do Paraná e do Mato Grosso do Sul diferem quanto à presença do alelo. É importante frisar que a maioria dos estudos encontrados na literatura baseiam-se em dados de inibição enzimática, o que pode estar acarretando uma perda de heterozigotos (*BCHE/BCHE*390V*) e, desse modo, levando a frequências sub-estimadas do alelo *BCHE*F*, ou mesmo à ausência do alelo nas populações. Estudos populacionais, através de análise direta de ADN, podem levar às frequências reais dos alelos *BCHE*390V* e *BCHE*343M*, bem como de outros alelos que possam ser responsáveis pelo fenótipo resistente ao fluoreto.

ALCÂNTARA e cols. (1991a) e FADEL-PICHETH (1991) estimaram, através de dados obtidos por inibição enzimática, a frequência do alelo *BCHE*F* na população de Curitiba em $0,51\% \pm 0,15\%$ e $0,61\% \pm 0,13\%$, respectivamente. SOUZA e cols. (1998) analisaram, através de análise direta de ADN, uma amostra, selecionada após fenotipagem por inibição enzimática, de doadores de sangue de Curitiba e encontraram a mutação *BCHE*390V* com frequência de $0,34\% \pm 0,12\%$. Considerando os dois estudos prévios de frequência do alelo *BCHE*F* na população de Curitiba, SOUZA e cols. (1998) sugerem que pelo menos metade dos fenótipos resistentes ao fluoreto sejam determinados pela mutação *BCHE*390V*. A frequência obtida por SOUZA e cols. (1998) para a mutação *BCHE*390V* é significativamente mais baixa ($X^2 = 160,5$; $p < 0,001$) que a frequência detectada, por inibição enzimática, nos Guarani do Mato Grosso do Sul ($1,55\% \pm$

0,54%). Os dados de Souza podem ser corrigidos com base no erro estimado para os Guarani, pois a população analisada foi previamente fenotipada pela mesma técnica utilizada nesse estudo. A frequência corrigida do alelo *BCHE*390V* passa a ser de $1,69\% \pm 0,26\%$, diferindo significativamente da frequência corrigida dos Guarani ($6,98\% \pm 1,12\%$; $X^2 = 46,6$; $p < 0,001$).

A tabela 34 mostra alguns dados referentes aos 14 indivíduos portadores da mutação *BCHE*390V*, encontrados na população Guarani do Mato Grosso do Sul, que podem servir de marcadores de miscigenação com outros grupos étnicos.

TABELA 34. Dados de tipagem sanguínea para o grupo ABO e de tipagem de *HLA-DRB1* para os 14 indivíduos genotipados como *BCHE*U/BCHE*390V*.

AMOSTRA ¹	GRUPO ABO ²	PRESENÇA DE ALELOS NÃO AMERÍNDIOS DO LOCO <i>HLA-DRB1</i> ²
016	NT	SIM
020	NT	SIM
202	NT	SIM
281	O	NÃO
290	O	NÃO
295	O	NÃO
309	NT	NÃO
313	NT	NÃO
606	NT	NÃO
607	NT	NÃO
628	NT	NÃO
814	O	SIM
816	O	SIM
817	O	SIM

¹ Ver Apêndice 1.

² Tsuneto (comunicação pessoal, 2000).

NT = Não tipado.

De acordo com SALZANO e CALLEGARI-JACQUES (1988), a maioria dos índios americanos, especialmente de regiões tropicais, tem apenas o tipo O. Os dados apresentados na tabela 34, embora incompletos, mostram que todos os indivíduos tipados para o grupo ABO, são do tipo O. Esses dados não são conclusivos, mas servem como um indicador negativo de miscigenação, uma vez que o tipo O é característico dos Ameríndios.

Os dados de TSUNETO (comunicação pessoal, 2000) são informativos quanto à presença de alelos não ameríndios no loco *DRB1*. A tabela 34 mostra que, dos 14 indivíduos com genótipo *BCHE/BCHE*390V*, seis apresentam alelos não ameríndios no loco *DRB1*, ou seja, apresentam indicação de miscigenação com grupos étnicos não indígenas. Os outros oito indivíduos portadores do alelo *BCHE*390V* não apresentam alelos não Ameríndios.

Sugerimos duas hipóteses para a origem do alelo *BCHE*390V* nos Ameríndios. A primeira sugestão é que o alelo *BCHE*390V* possa ter entrado na população Guaraní do Mato Grosso do Sul através de fluxo gênico de populações não ameríndias e aumentado sua frequência por deriva genética, apoiando a hipótese já levantada por ALCÂNTARA e cols. (1995). A nossa segunda hipótese sugere que a mutação seja antiga e que estava presente entre os Paleoíndios. Baseamos essa hipótese nas altas frequências do alelo verificadas nos Urubu-Kaapor, Assurini e Guaraní do Mato Grosso do Sul, que, embora pertençam ao grupo lingüístico Tupi-Guarani, apresentam localização geográfica distinta.

6.2 EXON 3

A análise do exon 3 (237 pb) do gene *BCHE* através de SSCA, de acordo com a metodologia utilizada nesse estudo, não mostrou variabilidade molecular nesse segmento de ADN. A primeira consideração é de caráter técnico e diz respeito à qualidade das eletroforeses SSCA. Nessas eletroforeses ocorreu ótima separação das bandas de ADN desnaturado (ver figura 5), permitindo a visualização das duas fitas do segmento amplificado. De acordo com HAYASHI e YANDELL (1993) há uma probabilidade de cerca de 90% de detecção de mutação em um segmento de cerca de 237 pb. Nesse estudo, não tivemos acesso a nenhuma amostra controle para as raras mutações já identificadas no exon 3 do gene *BCHE*. Desse modo, a não detecção de mutação poderia ser devida aos 10% de possibilidade de falha na metodologia utilizada. Entretanto, de acordo com o que foi comentado sobre a separação eletroforética, seria pouco provável a perda de qualquer mutação presente no segmento analisado. A segunda consideração remete às mutações, até hoje identificadas, no segmento em questão: *BCHE*497V*, *BCHE*500STOP*, *BCHE*518L* e *BCHE*12E3-8G*. Essas quatro mutações são idiomórficas, podendo, portanto, não estarem presentes na amostra desse estudo, simplesmente por serem raras. A terceira consideração a ser feita está relacionada ao caráter da amostra. A amostra desse estudo é de população indígena, ou seja, de uma população cujas características a diferem de outras populações. Tais características, que a tornam particular, são: o alto grau de isolamento e o tamanho populacional. Esse grau de isolamento

permite a manutenção de grande parte da identidade genética original da população, impedindo sua perda em decorrência de miscigenações. O tamanho reduzido da população acentua o efeito da deriva genética, levando a fixações ou perdas de alelos.

Uma última colocação pode ser feita, tendo como base a frequência da mutação *BCHE*539T* localizada no exon 4 do gene *BCHE*. Essa mutação, encontrada nesse estudo com frequência de $3,77\% \pm 0,85\%$, mostrou-se significativamente menos freqüente na população Guarani do Mato Grosso do Sul, que em outras populações já analisadas. A mutação *BCHE*497V* do exon 3, até hoje só foi identificada ao nível de ADN, em apenas uma família (BARTELS e cols., 1992a). Nessa família a mutação *BCHE*497V* encontrava-se em ligação absoluta com a mutação *BCHE*539T*, do exon 4. Assim, a possibilidade de detectar a mutação *BCHE*497V* deve ser maior em indivíduos que possuam a mutação *BCHE*539T*. Cazarote (1999), em estudo com doadores de sangue de Curitiba, investigou 1870 cromossomos, contendo a mutação *BCHE*539T*, quanto à variabilidade do exon 3, e não encontrou nenhuma das mutações anteriormente descritas, concluindo que essas variações são idiomórficas. Como na população Guarani a frequência do alelo *BCHE*539T* é bastante baixa ($3,8\% \pm 0,8\%$; tabela 12), considera-se improvável a ocorrência da mutação *BCHE*497V*.

6.3 EXON 4

A amplificação do exon 4 do gene *BCHE*, como já mostrado no item referente aos resultados, foi realizada em duas etapas, devido a problemas de amplificação com o par de iniciadores P43 e P45. Como pode ser observado na tabela 11, a proporção de amplificação foi de apenas 18,2% para esse par de iniciadores. Considerando que as amostras não amplificadas através de P43 e P45 já haviam sido amplificadas anteriormente para o exon 3 do gene *BCHE*, descartamos a possibilidade de problemas com as amostras de ADN e concentramos a atenção no par de iniciadores que estava sendo utilizado.

Como descrito na metodologia referente ao exon 4, foram realizados alguns testes para definição de um novo par de iniciadores. Através desses testes foi constatado que a falha na amplificação era decorrente do iniciador P45 que, aparentemente, não se anelava ao sítio correspondente no segmento de ADN a ser amplificado. O par de iniciadores P43 e P45 já havia sido utilizado para amplificação de amostras de ADN de doadores de sangue de Curitiba, sem apresentar problemas na amplificação do exon 4 do gene *BCHE*, de modo que é possível sugerirmos uma alteração no sítio de anelamento do iniciador P45 própria da população Guarani do Mato Grosso do Sul. O iniciador utilizado para substituir P45, denominado K25S, por ser mais externo, amplifica o sítio de anelamento de P45.

A análise das eletroforeses-SSCA, do fragmento amplificado através do par de iniciadores P43 e K25S, não permitiu a

identificação de nenhuma alteração conformacional que pudesse corresponder a uma mutação no sítio de anelamento de P45. Embora nossos resultados não sejam conclusivos, nossa hipótese é de que uma mutação de ponto na região do sítio de anelamento de P45 possa ter levado à falta de amplificação do exon 4 do gene *BCHE* através do iniciador P45. O seqüenciamento dessa região do gene *BCHE* pode trazer mais informações a respeito dessa questão.

Os resultados utilizados para as análises e cálculos de frequências alélicas referentes ao exon 4 são todos relacionados às amplificações realizadas através do par de iniciadores P43 e K25S. Os resultados da análise do exon 4 do gene *BCHE* mostram que a frequência do alelo *BCHE*539T* nessa amostra Guarani do Mato Grosso do Sul é de $3,8\% \pm 0,8\%$ (tabela 12). A tabela 35 mostra as diferenças observadas (X^2 , p) entre a frequência do alelo *BCHE*539T* na população desse estudo e em outras populações anteriormente analisadas.

TABELA 35 Frequências do alelo *BCHE*539T* em diferentes populações mundiais¹ e comparações com a frequência alélica obtida nos Guarani do Mato Grosso do Sul ($3,8\% \pm 0,8\%$).

POPULAÇÃO	N	<i>BCHE*539T</i> (% $\pm$ E.P.)	X^2	p
América do Norte	94	12,8 $\pm$ 3,4	19,1	< 0,001
Escócia	102	19,6 $\pm$ 3,9	47,9	< 0,001
Japão	232	16,4 $\pm$ 3,9	43,7	< 0,001
Japão	280	17,5 $\pm$ 2,3	51,4	< 0,001
Dinamarca	50	18,0 $\pm$ 5,4	29,5	< 0,001
Euro-brasileiros	190	18,4 $\pm$ 2,8	41,52	< 0,001
Afro-brasileiros	164	17,1 $\pm$ 2,9	33,68	< 0,001

¹ SOUZA e cols., 1998.

A tabela 35 mostra as diferenças observadas entre a população desse estudo e as populações Euro-brasileiras ($18,4\% \pm 2,8\%$) e Afro-brasileiras ($17,1\% \pm 2,9\%$), indicando que a frequência do alelo *BCHE*539T* é significativamente menor nos Guarani do Mato Grosso do Sul. Assim como nas comparações com populações brasileiras não indígenas (ver tabela 35), a frequência do alelo *BCHE*539T* nos Guarani do Mato Grosso do Sul mostrou-se significativamente mais baixa que nas demais populações mundiais já analisadas. Essas diferenças podem ser justificadas por se tratar de uma população pequena e isolada, aumentando o efeito da deriva genética e gerando uma frequência diferenciada para o alelo *BCHE*539T* nos Guarani do Mato Grosso do Sul.

Os dados da tabela 12 mostram que a população Guarani do Mato Grosso do Sul está em desequilíbrio de Hardy-Weinberg ($X^2 = 4,02$, $p < 0,05$) quanto às frequências genotípicas do exon 4 do gene *BCHE*. A análise, em separado, das sub-tribos Kaiowá e Nandewa, indicou que a população Nandewa está em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($X^2 = 0,72$, $p > 50\%$). A população Kaiowá está em desequilíbrio de Hardy-Weinberg ($X^2 = 8,99$, $p < 0,01$) em decorrência de dois indivíduos homozigotos para a mutação K (*BCHE*539T/BCHE*539T*). Embora não exista indicação de consangüinidade entre os dois indivíduos homozigotos, ambos pertencem à sub-tribo Kaiowá e são provenientes de Amambai. A ocorrência do desequilíbrio pode estar relacionada ao tamanho reduzido e ao isolamento da população, ou seja, ao não cumprimento

de premissas básicas do teorema de Hardy-Weinberg. Apesar da ocorrência de desequilíbrio de Hardy-Weinberg, como não foi encontrada diferença significativa na frequência da mutação *BCHE*539T* entre os Kaiowá e os Nandewa ($X^2 = 0,01$, $p > 0,90$), as duas sub-tribos podem ser consideradas como uma única população.

A tabela 36 mostra alguns dados referentes aos 17 indivíduos portadores da mutação *BCHE*539T*, encontrados na população Guarani do Mato Grosso do Sul, que podem servir de marcadores de miscigenação com outros grupos étnicos.

TABELA 36. Dados de tipagem sanguínea para o grupo ABO e de tipagem de *HLA-DRB1* para os 17 indivíduos portadores da mutação *BCHE*539T*.

AMOSTRA ¹	GRUPO ABO ²	PRESENÇA DE ALELOS NÃO AMERÍNDIOS NO LOCO <i>HLA-DRB1</i> ²
004	NT	NÃO
011	NT	SIM
020	NT	SIM
030	O	NÃO
218	O	NÃO
245	O	NÃO
309	NT	NÃO
318	NT	NÃO
328	O	NÃO
330	O	NÃO
332	O	NÃO
333	O	NÃO
334	O	NÃO
402	NT	NÃO
403	NT	NÃO
601	NT	NÃO
846	O	SIM

¹ Ver Apêndice 1.

² Tsuneto (comunicação pessoal, 2000).
NT = Não tipado.

Todos os indivíduos tipados para ABO são do tipo O, ou seja, não indicativo de miscigenação, uma vez que o tipo O é característico dos ameríndios (SALZANO e CALLEGARI-JACQUES, 1988). A presença de alelos não ameríndios no loco DRB1 foi detectada em três indivíduos portadores da mutação *BCHE*539T*, indicando miscigenação com outros grupos étnicos. Embora seja possível que o alelo *BCHE*539T* tenha entrado na população Guarani do Mato Grosso do Sul através de fluxo gênico de populações não indígenas, as informações a respeito da distribuição e frequências dessa mutação em outros grupos étnicos sugerem uma hipótese alternativa.

A mutação *BCHE*539T* é de difícil identificação através de testes de inibição enzimática, de modo que os dados apresentados na tabela 35 representam as frequências, até hoje estabelecidas, para essa mutação. Esse estudo é o primeiro relato de identificação, através de análise direta de ADN, da mutação *BCHE*539T* em populações ameríndias. Dessa forma, apesar de não dispormos de informações a respeito da presença e da distribuição da mutação *BCHE*539T* em outras populações indígenas, sabemos que essa mutação é amplamente distribuída em diferentes grupos étnicos (ver tabela 35), sugerindo que essa seja uma mutação antiga. A nossa hipótese, baseada nessa distribuição ampla, aliada ao fato da mutação *BCHE*539T* ser encontrada em frequências altas, é que provavelmente estava presente entre os paleoíndios.

A tabela 31 mostra que o indivíduo 309 é homozigoto para a mutação *BCHE*539T* e heterozigoto para a mutação *BCHE*390V*, de modo que, em um dos cromossomos, apresenta essas mutações em cis. A frequência de recombinação entre esses sítios é inferida como de cerca de 1/1500 por geração, levando em conta apenas o número de

nucleotídeos entre eles. Considerando que a mutação *BCHE*539T*, presente nesses Guarani, tenha tido uma única origem, esse caso parece ser indicativo do raro fenômeno de recombinação.

6.4 LOCO *CHE2*

A tabela 15 mostra os resultados da fenotipagem do loco *CHE2*, indicando as frequências do fenótipo *CHE2 C5+* obtidas nesse estudo, nas sub-tribos Kaiowá (13,8% $\pm$ 2,9%) e Ñandewa (18,1% $\pm$ 4,2%). Com base nesses dados foi possível verificar que não existe diferença significativa ($X^2 = 0,74$, $p > 5\%$) entre as frequências do fenótipo *CHE2 C5+* obtidas nas duas sub-tribos.

Dentre a amostra total Kaiowá ($N = 145$), 62,07% $\pm$ 4,03% são provenientes de Amambai, 22,07% $\pm$ 3,44% de Limão Verde e os demais 15,86% $\pm$ 3,03% são provenientes das demais localidades representadas na amostra Kaiowá (ver tabela 5). Dos indivíduos Ñandewa 55,42% $\pm$ 5,04% são provenientes de Porto Lindo, 30,12% $\pm$ 5,04% são provenientes de Amambai e os demais 14,46% $\pm$ 3,9% das demais localidades representadas na amostra Ñandewa (ver tabela 5). Dos 37 indivíduos com fenótipo *CHE2 C5+*, 54,05% $\pm$ 8,19% pertencem à sub-tribo Kaiowá e 40,54% $\pm$ 8,07% à sub-tribo Ñandewa (ver tabela 15). Dentre a amostra Kaiowá com fenótipo *CHE2 C5+*, 35% $\pm$ 10,66% são provenientes de Amambai, 30% $\pm$ 10,25% de Limão Verde, 15% $\pm$ 7,98% de Taquapiri, os demais 20% $\pm$ 8,94% são provenientes de Porto Lindo, Jacaré, Sossoro e Tacuru, cada uma delas, representando, isoladamente, 5% $\pm$ 4,87%. Dos indivíduos Ñandewa fenotipados como *CHE2 C5+*, 93,33% $\pm$ 6,44% são provenientes de Porto Lindo e 6,67% $\pm$ 6,44% de Tacuru. Os dados da tabela 15

mostram que a localidade mais representada dentre os indivíduos com fenótipo CHE2 C5+ é Porto Lindo (43,24% $\pm$ 8,14%), seguida de Amambai, (21,62% $\pm$ 6,77%) e Limão Verde (16,22% $\pm$ 6,06%). Embora Amambai tenha uma representação maior no que se refere à amostra total (51,16% $\pm$ 3,11%), Porto Lindo aparece como a localidade mais representada nos indivíduos com fenótipo CHE2 C5+. A amostra Kaiowá, proveniente de Porto Lindo, é constituída de apenas um indivíduo, com fenótipo CHE2 C5+. Os resultados das comparações das frequências do fenótipo CHE2 C5+ entre as três localidades mais representadas na amostra total (tabela 14) podem ser observados na tabela 37.

TABELA 37. Comparações (X^2 ; p) das frequências do fenótipo CHE2 C5+ entre as três localidades mais representadas (Amambai, Porto Lindo e Limão Verde) e entre as demais localidades da amostra.

CHE2 C5+		
LOCALIDADES COMPARADAS	X^2	p
Amambai/Porto Lindo	20,68	< 0,1%
Amambai/Limão Verde	3,92	< 5%
Amambai/Outras	17,60	< 0,1%
Porto Lindo/Limão Verde	2,63	> 10%
Porto Lindo/Outras	0,19	> 50%
Limão Verde/Outras	2,99	> 5%

Os dados da tabela 37 indicam que a frequência do fenótipo CHE2 C5+ é significativamente menor em Amambai, tanto em relação a Porto Lindo e Limão Verde como às demais localidades. Como não existe diferença significativa, em relação ao fenótipo CHE2 C5+, entre as sub-tribos Kaiowá e Nandewa, a diferença observada entre as localidades não é devida a frequências diferentes nessas duas sub-tribos. Desse modo, nos demais cálculos e discussões, é

utilizada a frequência total do fenótipo CHE2 C5+, estimada na população Guarani do Mato Grosso do Sul (14,34% $\pm$ 2,18%). A tabela 38 mostra as frequências do fenótipo CHE2 C5+ em outros grupos indígenas e as comparações com a frequência obtida nesse estudo. A tabela 39 mostra a distribuição da frequência do fenótipo CHE2 C5+ em 30 populações indígenas brasileiras.

As tabelas 38 e 39 mostram que o fenótipo CHE2 C5+ é encontrado em outras populações ameríndias, além da população Guarani do Mato Grosso do Sul, indicando uma ampla distribuição entre as diferentes populações indígenas brasileiras e sugerindo que o fenótipo estava presente nos paleo-índios. Considerando a distribuição geral do fenótipo entre as diferentes populações já analisadas e a diferença significativa ($X^2 = 52,28$; $p < 0,1\%$) verificada entre os Guarani do Paraná e do Mato Grosso do Sul, a deriva genética parece ser o principal fator evolutivo responsável pelo padrão de distribuição observado. Dentre as 17 tribos, cujas frequências foram comparadas àquela obtida nesse estudo, nove mostraram-se significativamente diferentes (52,9%), enquanto as demais não apresentaram diferença significativa. Os resultados dessas comparações, assim como aqueles que mostram diferenças entre as localidades dos Guarani do Mato Grosso do Sul, reforçam a hipótese de que a deriva genética esteja atuando como fator evolutivo, não apenas na distribuição dos fenótipos entre as diferentes populações, como também na determinação das frequências fenotípicas. Os resultados obtidos nesse estudo, bem como os demais dados encontrados na literatura, não parecem indicar que

esteja ocorrendo seleção favorável ou desfavorável ao fenótipo CHE2 C5+.

TABELA 38. Frequências do fenótipo CHE2 C5+ (% $\pm$ E.P.) em diferentes grupos étnicos indígenas e comparações (X^2 , p) dessas frequências com a frequência obtida nesse estudo (14,34% $\pm$ 2,18%).

TRIBO	N	CHE2 C5+ (% $\pm$ E.P.)	X^2	VALORES DE p
Wai Wai ¹	163	14,7 $\pm$ 2,8	0,01	> 90%
Urubu-Kaapor ²	210	26,2 $\pm$ 3,0	10,29	< 1%
Asurini ²	162	0	25,48	< 0,1%
Mura ^{3a}	112	1,8 $\pm$ 1,3	13,06	< 1%
Mura ^{1b}	68	5,9 $\pm$ 2,9	3,50	> 5%
Sateré-Mawé ³	188	0	29,40	< 0,1%
Tenharim ³	23	8,7 $\pm$ 5,9	0,06	> 80%
Krahó ³	94	8,5 $\pm$ 2,9	2,10	> 10%
Gavião ¹	176	8,0 $\pm$ 2,0	4,11	< 5%
Zoró ¹	71	1,4 $\pm$ 1,4	9,11	< 1%
Suruí ¹	97	4,1 $\pm$ 2,0	7,20	< 1%
Pacaas Novos ³	219	15,0 $\pm$ 2,4	0,05	> 80%
Xavante ¹	94	20,2 $\pm$ 4,1	1,76	> 10%
Kaingang ^{3c}	57	24,6 $\pm$ 5,7	3,60	> 5%
Kaingang ^{1d}	123	8,1 $\pm$ 2,5	2,97	> 5%
Kaingang ^{1e}	120	4,2 $\pm$ 1,8	8,58	< 1%
Guarani M'bya ^{1f}	172	45,9 $\pm$ 3,8	52,28	< 0,1%

¹ ALCÁNTARA e cols., 1995. ² PRIMO-PARMO e cols., 1986. ³ GUERREIRO e cols., 1987. ^a Mura provenientes de Atuares e Murutinga. ^b Mura provenientes de Guapenu. ^c Kaingang provenientes de Tamarana. ^d Kaingang provenientes de Ivaí. ^e Kaingang provenientes de Rio das Cobras. ^f Guarani M'bya provenientes de Rio das Cobras.

TABELA 39. Distribuição da frequência (%) do fenótipo CHE2 C5+ em 30 populações indígenas brasileiras¹.

CHE2 C5+ (%) ²												
	0	0 5	5 10	10 15	15 20	20 25	25 30	30 35	35 40	40 45	45 50	50 55
Nº de locais	6	4	6	5	2	3	2	0	0	0	1	1

¹ ARENDS e cols. (1970); Guerreiro e cols. (1985, 1987, 1989); PRIMO-PARMO e cols. (1986); GUERREIRO e SANTOS (1987); ALCÂNTARA e cols. (1995); presente estudo. ² Tabela adaptada de ALCÂNTARA e cols. (1995).

A tabela 40 mostra que o fenótipo CHE2 C5+ é encontrado com diferentes frequências, em diferentes populações mundiais, estando ausente na amostra da Oceania (revisão em WHITTAKER, 1986). Esses dados não diferem daqueles observados nas populações indígenas brasileiras, ou seja, ampla distribuição geográfica do fenótipo CHE2 C5+.

TABELA 40. Frequência do fenótipo CHE2 C5+ em populações da Europa, Ásia, Américas, África e Oceania¹.

POPULAÇÃO	N	CHE2 C5+ (N)	CHE2 C5+ (% ± E.P.)
Europa	14.361	1.288	9,0 ± 0,2
Ásia	8.555	260	3,0 ± 0,2
Américas	7.090	514	7,2 ± 0,3
África	4.703	255	5,4 ± 0,3
Oceania	686	0	0

¹ Revisão em WHITTAKER, 1986.

Os dados apresentados na tabela 41 indicam que existe diferença significativa entre a frequência do fenótipo CHE2 C5+ na população de Curitiba e na população Guarani do Mato Grosso do

Sul. Essa diferença pode decorrer da constituição original das duas populações e da dinâmica, ao longo do tempo, de cada população.

TABELA 41. Frequências do fenótipo CHE2 C5+ (% $\pm$ E.P.) em população de Curitiba e comparação (X^2 , p) dessa frequência com aquela obtida nesse estudo (14,34% $\pm$ 2,18%).

	N ²	CHE2 C5+ (% $\pm$ E.P.)	X ²	p
POPULAÇÃO DE CURITIBA ¹	2541	10,23 $\pm$ 0,60%	4,17	< 1 %

¹ Chautard-Freire-Maia e cols., 1991a.

² 93,0% brancos; 0,4% mulatos; 2,2% negros e 4,4% não classificados.

6.5 ATIVIDADE DA BChE

Os dados da atividade enzimática podem servir como indicadores da presença de mutações no loco *BCHE* que levem ao efeito fenotípico de diminuição quantitativa ou qualitativa da BChE. Podem também indicar características populacionais, como no caso de populações indígenas que apresentam, em média, atividade enzimática menor quando comparadas às médias de populações caucasóides. Em relação ao loco *CHE2*, a atividade média é, em geral maior em indivíduos com fenótipo CHE2 C5+, o aumento dependendo de características de cada população e da técnica utilizada para medida de atividade enzimática.

Os resultados de atividade enzimática obtidos nesse estudo fornecem algumas informações de caráter geral da população e também informações particulares das variantes dos locos *BCHE* e *CHE2*.

A atividade média da população Guarani do Mato Grosso do Sul ($4,19 \pm 1,39$) é significativamente menor ($p < 5\%$) que a média da população de Curitiba ($4,89 \pm 1,87$) verificada por ALCÂNTARA (2000), através da mesma técnica de medida de atividade utilizada no presente estudo. Esse resultado concorda com a literatura que indica que a atividade média da BChE em certas populações indígenas pode ser menor (PRIMO-PARMO e cols., 1986).

Os dados de atividade enzimática das variantes do loco *BCHE*, obtidos através de inibição enzimática, podem ser observados nas tabelas 19, 21 e 22. A atividade da BChE mostrou-se significativamente menor ($p < 5\%$) em indivíduos com fenótipo BCHE UA ($1,56 \pm 1,90$ KU/L) em relação aos indivíduos fenotipados como BCHE U ($4,35 \pm 1,42$ KU/L) e BCHE UF ($3,56 \pm 0,97$ KU/L).

Como pode ser observado na tabela 21, as duas pessoas com fenótipo BCHE UA são mãe e filha e ambas apresentaram o alelo *BCHE*70G* (mutação A) em heterozigose com o alelo *BCHE* (usual) e não apresentaram a mutação *BCHE*539T* no exon 4 (ver sub-ítem resultados moleculares). A tabela 21 mostra, também, que a atividade da amostra 286 ($0,22$ KU/L) corresponde a $5,06\%$ da atividade enzimática média observada na amostra usual ($4,35 \pm 1,39$ KU/L), incluindo o indivíduo no grupo caracterizado como silencioso, ou seja, com atividade enzimática menor que 10% da atividade média da população. A análise molecular realizada nesse estudo para a amostra 286 não permitiu a detecção de qualquer outra mutação que pudesse justificar o fenótipo silencioso. Como o exon 2, o maior dos quatro exons do gene *BCHE*, não foi analisado

por inteiro, é possível que outra mutação, responsável pela diminuição na atividade enzimática, esteja presente nesse exon, mas não nos fragmentos analisados nesse estudo. O seqüenciamento do gene *BCHE* poderia determinar se realmente há alguma mutação responsável pela diminuição da atividade enzimática verificada na amostra 286 e se tal mutação já foi descrita. A amostra 287 (filha de 286) apresenta atividade enzimática mais alta (2,90 KU/L), correspondendo a 66,7% da média da população Guarani do Mato Grosso do Sul, o que pode indicar que recebeu da mãe apenas o alelo *BCHE*70G* e não a mutação responsável pelo fenótipo silencioso. Como o grupo *BCHE* UA é composto por somente duas amostras e uma delas apresenta fenótipo silencioso quanto à atividade da BChE, é possível que a significância observada seja decorrente da presença de outra mutação e não da mutação A (*BCHE*70G*). Outra possível justificativa para a atividade extremamente baixa da BChE observada na amostra 286, é de alteração fisiológica, pois além dos fatores genéticos, diversos outros fatores relacionados à diminuição da atividade da BChE são citados na literatura. WHITTAKER (1986) lista os seguintes fatores relacionados à diminuição da atividade da BChE: anemias crônicas; carcinoma; diálise renal; doenças debilitantes crônicas; doença do colágeno; doenças hepáticas; estrógenos; infarto do miocárdio; infecções agudas; mixedema; subnutrição; tuberculose; hiperpirexia e uremias.

O grupo de indivíduos fenotipados como *BCHE* UF não apresentou diferença significativa na média de atividade em relação à média

da população desse estudo. Desse modo, o fenótipo resistente ao fluoreto não acarreta em perda significativa na atividade da BChE. Esse grupo, assim como o grupo BCHE U, mostrou atividade enzimática significativamente maior ($p < 5\%$) que o grupo BCHE UA.

A comparação das médias de atividade dos indivíduos genotipados como variantes do exon 2 do gene *BCHE* (ver tabelas 20, 21 e 23) levou aos mesmos resultados obtidos entre as classes fenotípicas referentes à fenotipagem do loco *BCHE*. As diferenças só são significativas em relação à classe genotípica dos indivíduos que apresentam a mutação *BCHE*70G* (A), levando às mesmas considerações anteriormente discutidas dos resultados referentes às classes fenotípicas.

A tabela 25 mostra que a comparação das médias de atividade da BChE não indicou diferença significativa ($p > 5\%$) entre os indivíduos com genótipo *BCHE/BCHE* e *BCHE/BCHE*539T*. Diferenças significativas ($p < 5\%$) foram encontradas entre as médias de atividade enzimática dos indivíduos com genótipos *BCHE/BCHE* e *BCHE*539T/BCHE*539T* e entre *BCHE/BCHE*539T* e *BCHE*539T/BCHE*539T*. A mutação *BCHE*539T* leva a uma perda de cerca de 30% da atividade da BChE em homozigotos e 15% em heterozigotos, indicando que seriam esperadas perdas correspondentes nas médias de atividade enzimática nos homozigotos (*BCHE*539T/BCHE*539T*) e heterozigotos (*BCHE/BCHE*539T*) encontrados nesse estudo. A média do grupo heterozigoto corresponde a 74,25% e a do grupo homozigoto a 45,97% da média de atividade da BChE da população Guarani. A perda nos homozigotos foi de 54,03%, ou seja cerca do dobro da perda observada no grupo heterozigoto (25,75%).

A análise da atividade da BChE quanto aos fenótipos do loco *CHE2* não indicou diferença significativa (ver tabela 26) entre as médias de atividade enzimática dos indivíduos *CHE2* C5+ (4,40 KU/L) e *CHE2* C5- (4,27 KU/L). PRIMO-PARMO e cols.(1986), analisando índios Pacaás, relataram um aumento de 50% na atividade da BChE nos indivíduos com fenótipo *CHE2* C5+ e SUGIMORI (1986) verificou um aumento de 30% em população *CHE2* C5+ do Japão quando comparada com *CHE2* C5-.

Os resultados dos Guarani do Mato Grosso do Sul parecem indicar que, nessa população, a presença da banda C5 não é suficiente para levar a um aumento significativo da atividade da BChE. Embora o fenótipo *CHE2* C5+ seja amplamente distribuído nas populações humanas, geralmente levando ao aumento da atividade enzimática, a composição da banda C5 ainda é desconhecida e o fenótipo *CHE2* C5+ tem expressividade variável (HARRIS e cols., 1980; CHAUTARD-FREIRE-MAIA e cols., 1991b; ALCÂNTARA, 2000). A expressão da banda C5 é caracterizada pela sua intensidade, que pode variar de muito intensa a muito fraca. ALCÂNTARA (2000) observou que o aumento de cerca de 30% na atividade de indivíduos *CHE2* C5+, em relação a *CHE2* C5-, não decorre apenas da presença da banda C5, mas de um possível efeito do alelo *CHE2**C5+ aumentando a atividade de outras formas moleculares da BChE presentes no plasma. Nossa hipótese é que a magnitude da influência do alelo *CHE2**C5+ na atividade total da BChE parece depender da população estudada, devido tanto a diferenças ambientais como genéticas.

7. CONCLUSÕES

7.1 LOCO *BCHE*

A análise do gene *BCHE*, por PCR-SSCA, na amostra Guarani do Mato Grosso do Sul permitiu a identificação de duas mutações no exon 2 e uma no exon 4: *BCHE*70G* (A); *BCHE*390V* (F2) e *BCHE8539T* (K), respectivamente. O exon 3 não apresentou nenhuma variação.

A frequência da mutação *BCHE*70G* ($0,58\% \pm 0,38\%$) é semelhante às frequências observadas em outras populações mundiais e encontra-se dentro dos limites de frequência já descritos para índios sul-americanos ($0 - 3,1\% \pm 0,6\%$). Quanto à origem e frequência dessa mutação, sugerimos que tenha entrado por fluxo gênico de populações caucasóides e estabelecido sua frequência por deriva genética.

A frequência do alelo *BCHE*390V* ($6,98\% \pm 1,12\%$), é significativamente mais alta que aquela observada na população de Curitiba ($1,69\% \pm 0,26\%$; $X^2 = 46,6$; $p < 0,001$) e encontra-se dentro do intervalo descrito na literatura para outras populações ameríndias (3% a 36%). Sugerimos duas hipóteses referentes à origem do alelo nos ameríndios: 1) entrada por fluxo gênico de populações não ameríndias e deriva genética atuando no estabelecimento das frequências alélicas; 2) mutação antiga, presente nos paleo-índios, e deriva genética atuando no estabelecimento das frequências alélicas.

O exon 3 do gene *BCHE* não apresentou nenhuma variação detectável pela metodologia empregada nesse estudo. Considerando

que todas as mutações já descritas para esse exon são idiomórficas, nossa hipótese é que estejam ausentes na população Guarani do Mato Grosso do Sul.

Em relação à falta de amplificação do exon 4 através dos iniciadores P43 e P45, nossa hipótese é de que exista uma mutação de ponto na região do sítio de anelamento de P45, que pode ser própria dessa população ou ter atingido frequências mais altas em decorrência da deriva genética. O sequenciamento dessa região do gene *BCHE* pode trazer mais informações a respeito dessa questão. A frequência da mutação *BCHE*539T* (3,80% $\pm$ 0,80%) é significativamente mais baixa que em outras populações mundiais. Nossa hipótese é que essa seja uma mutação antiga que estava presente entre os paleoíndios.

7.2 PCR-SSCA E FENOTIPAGEM POR INIBIÇÃO ENZIMÁTICA DO LOCO *BCHE*

Os dados de inibição enzimática, referentes ao fenótipo resistente ao fluoreto (*BCHE* UF), não apresentam total correspondência com os dados obtidos através de PCR-SSCA referentes à mutação *BCHE*390V* (F2), resistente ao fluoreto. A falha na detecção, por inibição enzimática, de indivíduos heterozigotos para a mutação *BCHE*390V* foi de cerca de 80%. Das hipóteses aventadas, consideramos que a ocorrência de problemas metodológicos seja a mais provável e sugerimos que a fenotipagem detecte apenas parte dos indivíduos heterozigotos para a mutação *BCHE*390V* (F2). Não foi encontrada diferença significativa, entre as técnicas de inibição enzimática e de PCR-SSCA, na detecção da mutação *BCHE*70G*.

7.3 LOCO *CHE2*

A frequência do fenótipo *CHE2* C5+ (14,34% $\pm$ 2,18%) está dentro do intervalo descrito na literatura para populações indígenas brasileiras (0 - 55%). Nossa hipótese é que a deriva genética atue como fator evolutivo na distribuição dos fenótipos entre as diferentes populações e na determinação das frequências fenotípicas.

7.4 ATIVIDADE DA BChE

A atividade média da população Guarani do Mato Grosso do Sul (4,19 $\pm$ 1,39) é significativamente menor que a média da população de Curitiba (4,89 $\pm$ 1,87; $p < 5\%$). As atividades médias do grupo heterozigoto para mutação *BCHE*70G* e do grupo homozigoto para a mutação *BCHE*539T* são significativamente menores que a média do grupo usual.

Não foi encontrada diferença significativa entre as médias de atividade enzimática dos indivíduos *CHE2* C5+ (4,40 KU/L) e *CHE2* C5- (4,27 KU/L), o que nos leva à hipótese de que a magnitude da influência do alelo *CHE2**C5+ na atividade total da BChE parece depender da população estudada, devido tanto a diferenças ambientais como genéticas.

8. APÊNDICE 1

Apêndice 1. Numeração das amostras, indicando sub-tribo, sexo, local de proveniência e resultados individuais.

Amostra	Fenótipo	Exon2a	Exon2b	Exon3	Exon4	Atividade	CHE2	Sub-tribo	Sexo	Localidade
001	U			U	U		-	ÑW	M	Dourados
002	U			U	U		-	ÑW	F	Amambai
003	U			U	U		-	ÑW	F	Amambai
004	U	U	U	U	UK	2,98	-	ÑW	F	Amambai
005	U			U	U		-	ÑW	F	Amambai
006	U			U	U		-	ÑW	F	Amambai
007	U			U	U		-	ÑW	M	Porto Lindo
008	U			U	U		-	ÑW	F	Amambai
009	U			U	U		-	ÑW	F	Amambai
010	U			U	U		-	ÑW	F	Amambai
011	U	U	U	U	UK	3,19	-	ÑW	F	Amambai
012	U			U	U		-	ÑW	F	Amambai
013	U			U	U		-	ÑW	F	Amambai
014	U			U	U		-	ÑW	F	Amambai
015	U	U	U	U	U	3,80	-	ÑW	F	Amambai
016	UF	U	UF2	U	U	2,03	-	ÑW	F	Amambai

Continua

Amostra	Fenótipo	Exon2a	Exon2b	Exon3	Exon4	Atividade	CHE2	Sub-tribo	Sexo	Localidade
017	U			U	U		-	ÑW	F	Amambai
018	U			U	U		-	ÑW	F	Amambai
019	U			U	U		-	ÑW	M	Amambai
020	U	U	UF2	U	UK	3,53	-	ÑW	F	Amambai
021	U	U	U	U	U	4,98	-	ÑW	M	Amambai
022	U			U	U		-	ÑW	F	Amambai
023	U			U	U		-	ÑW	F	Amambai
024	////			U	U	////	////	ÑW	M	Amambai
025	U			U	U		-	ÑW	F	Amambai
026	U	U	U	U	U	3,74	-	P+ÑW	F	Amambai
027	U	U	U	U	U	4,20	-	ÑW	F	Tacuru
028	U			U	U		-	ÑW	F	Amambai
029	U			U	U	2,59	-	KW+ÑW	F	Amambai
030	U	U	U	U	UK	2,01	-	ÑW	F	Dourados
031	U			U	U		-	ÑW	F	Dourados
032	U			U	U		-	ÑW	F	Amambai
033	U			U	U		-	ÑW	F	Amambai
201	U			U	U	3,93	-	KW	F	Amambai
202	U	U	UF2	U	U	3,62	-	KW+B	M	Amambai
203	U	U	U	U	U	2,93	+	KW	F	Porto Lindo

Continua

Amostra	Fenótipo	Exon2a	Exon2b	Exon3	Exon4	Atividade	CHE2	Sub-tribo	Sexo	Localidade
204	U	U	U	U	U	3,45	-	KW	M	Amambai
205	U	U	U	U	U	4,68	-	KW	F	Amambai
206	U			U	U		-	KW	F	Limão Verde
207	U			U	U	3,06	+	KW	F	Limão Verde
208	U			U	U		-	KW	M	Amambai
209	U			U	U		-	KW	F	Amambai
210	U			U	U		-	kW	F	Amambai
211	U			U	U		-	KW	F	Amambai
212	U			U	U		-	KW	F	Amambai
213	U			U	U		+	KW	F	Amambai
214	U			U	U		-	KW	F	Amambai
215	U			U	U		-	KW	F	Amambai
216	U			U	U		-	KW	M	Amambai
217	U			U	U		-	KW	F	Amambai
218	U	U	U	U	UK	1,96	+	KW	M	Amamabai
219	////			U	U	////	/////	KW	M	Amambai
220	U			U	U		-	KW	F	Amambai
221	U			U	U		-	KW	F	Amambai
222	U			U	U		-	KW	F	Amambai
223	U			U	U		-	KW	F	Amambai

Continua

Amostra	Fenótipo	Exon2a	Exon2b	Exon3	Exon4	Atividade	CHE2	Sub-tribo	Sexo	Localidade
224	////			U	U	////	////	KW	F	Amambai
225	U	U	U	U	U	1,07	-	KW	F	Amambai
226	U			U	U		-	KW	F	Amambai
227	U	U	U	U	U	4,33	+	KW	F	Amambai
228	U	U	U	U	U	4,68	-	KW	F	Amambai
229	U			U	U		+	KW	M	Amambai
230	U	U	U	U	U	3,34	-	KW	F	Amambai
231	U			U	U		-	KW	M	Amambai
232	U			U	U		-	KW	F	Amambai
233	U			U	U		-	KW	F	Amambai
234	U			U	U		-	KW	F	Amambai
235	U			U	U		-	KW	F	Amambai
236	U			U	U		-	KW	M	Amambai
237	U			U	U		-	KW	F	Amambai
238	U			U	U		-	KW	F	Amambai
239	////			U	U	////	////	KW	F	Amambai
240	U			U	U		-	KW	F	Amambai
241	U			U	U		-	KW+ÑW	M	Amambai
242	U			U	U		-	KW	M	Amambai
244	U			U	U		-	KW	F	Amambai

Continua

Amostra	Fenótipo	Exon2a	Exon2b	Exon3	Exon4	Atividade	CHE2	Sub-tribo	Sexo	Localidade
245	U	U	U	U	UK	3,54	-	KW	M	Amambai
247	U			U	U	2,93	-	KW	M	Amambai
248	U			U	U	3,64	-	KW	F	Amambai
249	U			U	U		-	KW	F	Amambai
250	U	U	U	U	U	4,19	-	KW	F	Amambai
251	U			U	U		-	KW	F	Amambai
252	U			U	U		-	KW	F	Amambai
253	U	U	U	U	U	4,43	+	KW	F	Amambai
254	U			U	U		-	KW	F	Amambai
255	U	U	U	U	U	4,59	-	KW	F	Amambai
256	U			U	U		+	KW	F	Amambai
257	U	U	U	U	U	1,46	-	KW	F	Amambai
258	U			U	U		-	KW	F	Amambai
262	U			U	U		-	KW	F	Amambai
263	U	U	U	U	U	2,78	-	KW+ÑW	F	Amambai
264	U			U	U	7,62	-	KW	F	Amambai
266	U			U	N		-	KW	F	Amambai
268	U			U	U		-	KW	F	Amambai
269	U			U	U	3,06	-	KW+ÑW	F	Amambai
270	U			U	U		-	KW	F	Amambai

Continua

Amostra	Fenótipo	Exon2a	Exon2b	Exon3	Exon4	Atividade	CHE2	Sub-tribo	Sexo	Localidade
271	U	U	U	U	U	5,24	-	KW	F	Amambai
273	U			U	U		-	KW+ÑW	F	Amambai
275	U			U	U		-	KW	F	Amambai
276	U			U	U		-	KW+ÑW	F	Amambai
277	U			U	U		-	KW	F	Amambai
279	U			U	U		-	KW	F	Amambai
280	U			U	U	4,05	-	KW+ÑW	F	Amambai
281	UF	U	UF2	U	U	4,67	-	KW+ÑW	F	Amambai
284	////			U	N	////	////	KW	F	Amambai
285	U			U	U	2,40	-	KW	F	Amambai
286	UA	UA	U	U	U	0,23	-	KW	F	Amambai
287	UA	UA	U	U	U	2,90	-	KW	F	Amambai
288	U			U	U		-	KW	M	Amambai
289	U			U	U	4,59	-	KW	M	Amambai
290	UF	U	UF2	U	U	4,05	-	KW	M	Guaimbé
291	U			U	U	3,88	-	ÑW+MC	F	Amambai
292	U	U	U	U	U	2,54	-	KW	F	Amambai
293	U			U	U		-	KW	M	Caraapo
294	U			U	U		+	KW	F	Taquapiri
295	U	U	UF2	U	U	6,34	-	KW	F	Amambai

Continua

Amostra	Fenótipo	Exon2a	Exon2b	Exon3	Exon4	Atividade	CHE2	Sub-tribo	Sexo	Localidade
296	U			U	U		-	KW	M	Amambai
297	U			U	U		-	KW	F	Amambai
298	U			U	U		-	KW	F	Amambai
299	U			U	U		-	KW	F	Amambai
300	U			U	U		-	KW	F	Amambai
301	U			U	N		-	KW	F	Amambai
302	U			U	U		+	KW	F	Amambai
303	U			U	U		-	KW	F	Amambai
304	U			U	U		-	KW	F	Amambai
305	U			U	U		-	KW	F	Amambai
306	U	U	U	U	U	3,17	-	KW	F	Amambai
307	U	U	U	U	U	5,02	-	KW	F	Amambai
308	U			U	U		-	KW	M	Amambai
309	U	U	UF2	U	KK	1,99	+	KW	F	Jacaré
310	U			U	U		-	KW	M	Amambai
311	U			U	U		-	KW	M	Amambai
312	////			U	U	////	////	KW	M	Lagoa Bonit
313	UF	U	UF2	U	U	4,75	-	KW	M	Amambai
314	U			U	U		-	KW	M	Amambai
315	U	U	U	U	U	3,83	-	KW	F	Amambai

Continua

Amostra	Fenótipo	Exon2a	Exon2b	Exon3	Exon4	Atividade	CHE2	Sub-tribo	Sexo	Localidade
316	U			U	U		-	KW+G	F	Amambai
317	U			U	U		-	KW+ÑW	M	Amambai
318	U	U	U	U	UK	2,88	+	KW	F	Taquapiri
319	U	U	U	U	U	4,17	-	KW	F	Amambai
320	U			U	U		-	KW	M	Sapucaia
321	U			U	U		-	KW	F	Amambai
322	U			U	U		-	KW	F	Amambai
324	U			U	U		-	KW	F	Amambai
325	U			U	U		-	KW+ÑW	M	Amambai
326	U			U	U		-	KW	F	Campestre
327	U			U	U		-	KW	F	Campanari
328	U	U	U	U	UK	3,78	-	KW	M	Amambai
329	U			U	U		-	KW	F	Caraapo
330	U	U	U	U	KK	2,02	-	KW	M	Amambai
331	U			U	U		+	KW+T	F	Amambai
332	U	U	U	U	UK	4,03	-	KW	F	Amambai
333	U	U	U	U	UK	3,98	-	KW	F	Amambai
334	U	U	U	U	UK	4,02	-	KW+ÑW	F	Amambai
401	U			U	U	5,04	-	ÑW	F	Dourados
402	UF	UA	U	U	UK	2,87	-	ÑW	F	Dourados

Continua

Amostra	Fenótipo	Exon2a	Exon2b	Exon3	Exon4	Atividade	CHE2	Sub-tribo	Sexo	Localidade
403	U	U	U	U	UK	2,99	-	ÑW	F	Taquapiri
404	U			U	U		+	ÑW	F	Tacuru
405	U			U	U		-	ÑW	F	Tacuru
601	U	U	U	U	UK	3,22	-	KW	F	Limão Verde
602	U			U	U		-	KW	F	Taquapiri
603	U			U	U		-	KW	F	Limão Verde
604	U			U	U		-	KW	F	Limão Verde
605	U	U	U	U	U	6,02	-	KW	F	Limão Verde
606	U	U	UF2	U	U	4,86	-	KW	F	Limão Verde
607	U	U	UF2	U	U	4,34	+	KW	F	Sossoro
608	U			U	U		-	KW	F	Limão Verde
609	U			U	U		-	KW	M	Limão Verde
610	U			U	U		-	KW	F	Limão Verde
611	U			U	U		-	KW	F	Limão Verde
612	U			U	U		-	KW	F	Panambi
613	U			U	U		-	KW	M	Dourados
614	U	U	U	U	U	4,86	-	KW	F	Limão Verde
615	U	U	U	U	U	6,43	-	KW	F	Tacuru
616	U			U	N		-	KW	F	Limão Verde
617	U			U	U		-	KW	M	Limão Verde

Continua

Amostra	Fenótipo	Exon2a	Exon2b	Exon3	Exon4	Atividade	CHE2	Sub-tribo	Sexo	Localidade
618	U			U	U		-	KW	F	Limão Verde
619	U			U	U		-	KW	F	Limão Verde
620	U			U	U		-	KW+ÑW	F	Limão Verde
621	U			U	U		-	KW+ÑW	F	Amambai
622	U			U	U		-	KW	F	Limão Verde
623	U			U	U		+	KW	F	Limão Verde
624	U	U	U	U	U	5,07	+	KW	F	Limão Verde
625	U			U	U		-	KW	F	Limão Verde
626	U			U	U		+	KW	F	Tacuru
627	U			U	U		-	KW	F	Limão Verde
628	U	U	UF2	U	U	5,86	-	KW+ÑW	M	Jacaré
629	U	U	U	U	U	5,16	-	KW	F	Limão Verde
630	U			U	U		-	KW	F	Tacuru
631	U	U	U	U	U	3,35	-	KW	F	Tacuru
632	U	U	U	U	U	5,83	-	KW	F	Limão Verde
633	U			U	U		+	KW	F	Limão Verde
634	U			U	U		+	KW	F	Limão Verde
635	U			U	U		-	KW	F	Limão Verde
636	U			U	U		-	KW+ÑW	F	Taquapiri
637	U			U	U	5,49	-	KW+ÑW	F	Sapucaia

Continua

Amostra	Fenótipo	Exon2a	Exon2b	Exon3	Exon4	Atividade	CHE2	Sub-tribo	Sexo	Localidade
638	U			U	U		-	KW+ÑW	F	Limão Verde
639	U	U	U	U	U	4,11	-	KW	F	Tacuru
640	U	U	U	U	U	4,47	-	KW+ÑW	F	Limão Verde
641	U			U	U		-	KW+ÑW	F	Limão Verde
642	U			U	U		-	KW	F	Limão Verde
643	U	U	U	U	U	4,37	-	KW	F	Miranda
644	U			U	U		-	KW	F	Limão Verde
645	U			U	U		-	KW+ÑW	F	Limão Verde
646	U			U	U		-	KW	M	Limão Verde
647	U			U	U		-	KW	M	Taquapiri
648	U			U	U		-	KW	M	Taquapiri
649	U			U	U		-	KW	F	Limão Verde
650	U	U	U	U	U	3,66	+	KW	F	Taquapiri
651	U			U	U		+	KW	F	Limão Verde
652	U			U	U		-	KW	F	Limão Verde
801	U			U	U		+	ÑW	F	Porto Lindo
802	U	U	U	U	U	3,02	-	ÑW	F	Porto Lindo
803	U			U	U		-	ÑW+B	M	Porto Lindo
804	U			U	U		+	ÑW	M	Porto Lindo
805	U			U	U		-	ÑW	M	Porto Lindo

Continua

Amostra	Fenótipo	Exon2a	Exon2b	Exon3	Exon4	Atividade	CHE2	Sub-tribo	Sexo	Localidade
806	U			U	U		-	ÑW	M	Porto Lindo
807	U			U	U		-	ÑW	M	Porto Lindo
808	U	U	U	U	U	5,78	-	ÑW	M	Porto Lindo
809	U			U	U	3,65	+	ÑW	M	Porto Lindo
810	U			U	U		+	ÑW	M	Porto Lindo
811	U			U	U		-	ÑW	M	Porto Lindo
812	U			U	U		-	ÑW	M	Porto Lindo
813	U	U	U	U	U	4,27	-	ÑW	M	Porto Lindo
814	UF	U	UF2	U	U	3,08	-	ÑW+P	F	Cerrito
815	U	U	U	U	U	3,43	-	ÑW	M	Porto Lindo
816	UF	U	UF2	U	U	4,08	-	ÑW	M	Porto Lindo
817	UF	U	UF2	U	U	2,92	-	ÑW	M	Porto Lindo
818	U			U	U		-	ÑW	M	Porto Lindo
819	U			U	U		-	ÑW	F	Porto Lindo
820	U			U	U	7,90	-	ÑW	M	Porto Lindo
821	U			U	U		-	ÑW	M	Porto Lindo
822	U			U	U	4,82	+	ÑW	F	Porto Lindo
823	U			U	U		-	ÑW	F	Porto Lindo
824	U			U	U		-	ÑW	F	Porto Lindo
825	U			U	U		-	ÑW	F	Porto Lindo

Continua

Amostra	Fenótipo	Exon2a	Exon2b	Exon3	Exon4	Atividade	CHE2	Sub-tribo	Sexo	Localidade
826	U			U	U		-	ÑW	F	Porto Lindo
827	U			U	U	1,90	-	KW+ÑW	F	Porto Lindo
828	U			U	U		-	ÑW	F	Pirajui
829	U			U	U		-	ÑW	M	Pirajui
830	U			U	U		+	ÑW	F	Porto Lindo
831	U			U	U	7,88	+	ÑW+P	F	Porto Lindo
832	U			N	N		-	ÑW	F	Porto Lindo
833	U	U	U	U	U	6,19	+	ÑW	M	Porto Lindo
834	U			U	U		-	ÑW	F	Porto Lindo
835	U			U	U	2,93	-	ÑW	F	Porto Lindo
836	U			U	U		+	ÑW	F	Porto Lindo
837	U			U	U	5,05	+	ÑW	F	Porto Lindo
838	U			U	U	6,67	-	ÑW	F	Porto Lindo
839	U			U	U		+	ÑW	F	Porto Lindo
840	U	U	U	U	U	6,59	+	ÑW	F	Porto Lindo
841	U			U	N		-	ÑW	F	Porto Lindo
842	U			U	N		+	ÑW	M	Porto Lindo
843	U	U	U	U	U	4,68	-	ÑW	F	Porto Lindo
844	U			U	N		-	ÑW	F	Porto Lindo
845	U			U	U	5,97	+	ÑW	F	Porto Lindo

Continua

Amostra	Fenótipo	Exon2a	Exon2b	Exon3	Exon4	Atividade	CHE2	Sub-tribo	Sexo	Localidade
846	U	U	U	U	UK	3,42	-	ÑW+P	F	Porto Lindo
847	U			U	N		-	ÑW	M	Porto Lindo
848	U			U	N		-	ÑW	M	Porto Lindo
849	U			U	N		-	ÑW	F	Porto Lindo
850	U			U	N		-	ÑW	F	Porto Lindo
851	U			U	U		+	ÑW	F	Porto Lindo
852	U			U	U		-	ÑW	F	Pirajui
853	U			U	U		-	ÑW	F	Porto Lindo

N = não amplificado; /// = amostra de plasma ou de ADN ausente; KW = Kaiowá; NW = Nandewa.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCÂNTARA, V.M. *Fenótipos da butirilcolinesterase e suas relações com dados antropométricos, bioquímico-hormonais e pressão arterial em obesos e na população geral de Curitiba, PR.* Curitiba, 2000. Tese de Doutorado. Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná.
- ALCÂNTARA, V.M.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.; CULPI, L. CHE1 UF serum cholinesterase phenotype in whites and nonwhites from southern Brazil as determined by a new method. *Hum. Hered.*, v. 19, p. 233, 1991a
- ALCÂNTARA, V.M.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.; PICHETH, G.; VIEIRA, M.M. Method for serum cholinesterase phenotyping. *Rev. Bras. Genet.*, v. 14, p. 841-846, 1991b.
- ALCÂNTARA, V.M.; LOURENÇO, M.A.C.; SALZANO, F.M.; PETZL-ERLER, M.L.; COIMBRA JR., C.E.A.; SANTOS, R.V.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Butyrylcholinesterase polymorphisms (BCHE and CHE2 Loci) in Brazilian indian and admixed populations. *Hum. Biol.*, v. 67, p. 717-26, 1995.
- ALLDERDICE, P.W.; GARDNER, H.A.R.; GALUTIRA, D.; LOCKRIDGE, O.; LA DU, B.N.; MCALPINE, P.J. The cloned butyrylcholinesterase (BCHE) gene maps to a single chromossome site, 3q26. *Genomics*, v. 11, p. 452-54, 1991.
- ALLENBRANDT, K.V.; SOUZA, R.L.R.; CAZAROTE, H.B.; SOARES, N.A.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Frequência das mutações BCHE UF1 e BCHE UF2 em amostras de doadores de sangue de Curitiba. *Anais do IV Evinci*, Universidade Federal do Paraná, 1998.

- ARENDS, T.; WEITKAMP, L.R.; GALLANGO, M.L.; NEEL, J.W.; SCHULTZ, J. Gene frequencies and micro-differentiation among the Makiritare Indians. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 22, p. 526-32, 1970.
- ARPAGAU, M.; KOTT, M.; VATSIS, K.P.; BARTELS, C.F.; LA DU, B.N.; LOCKRIDGE, O. Structure of the gene for human butyrylcholinesterase. Evidence for a single copy. *Biochemistry.*, v. 29, p. 124-31, 1990.
- AUGUSTINSSON, K.B. Cholinesterase and anticholinesterase agents. In: *Handbook of experimental pharmacology*. Koelle, G.B. (org). Springer-Verlag, Berlin e Nova York, p.89-128, 1963.
- BALASUBRAMANIAN, A.S.; BHANUMATHY, C.D. Noncholinergic functions of cholinesterases. *FASEB J.*, v. 7, p. 1354-58, 1993.
- BARTELS, C.F.; JAMES, K.; LA DU, B.N. DNA mutations associated with the human butyrylcholinesterase J-variant. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 50, p. 1104-14, 1992a.
- BARTELS, C.F.; JENSEN, F.S.; LOCKRIDGE, O.; VAN DER SPEK, A.F.L.; RUBINSTEIN, H.M.; LUBRANO, T.; LA DU, B.N. DNA mutation associated with the human butyrylcholinesterase K-variant and its linkage to the atypical variant mutation and other polymorphic sites. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 50, p. 1086-103, 1992b.
- CAZAROTE, H.B. Variabilidade do gene da butirilcolinesterase humana quanto ao exon 3 e suas junções intrônicas. Curitiba, 1999. Monografia, Bacharelado em Ciências Biológicas - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná.
- CHATTONET, A.; LOCKRIDGE, O. Comparision of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochem. J.*, v. 260, n. 3, p. 625-34, 1989.

- CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.; PRIMO-PARMO, S.L.; PICHETH, G.; LOURENÇO, M.A.C.; VIEIRA, M.M. The isozyme C5 of serum cholinesterase and adult weight. *Hum. Hered.*, v. 41, p. 330-39, 1991a.
- CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.; VIEIRA, M.M.; PRIMO-PARMO, S.L. A expressividade do fenótipo CHE2 C5+ da butirilcolinesterase em relação a sexo e peso. *Rev. Bras. Genet.*, v. 14, supl., p. 149, 1991b.
- DIETZ, A.A.; RUBINSTEIN, H.M.; LUBRANO, T. E HODGES, L.K. Improved method for the differentiation of cholinesterase variants. *Am. J. Genet.*, v.24, p.58-64, 1972.
- EIBERG, H.; NIELSEN, L.S.; KLAUSEN, J.; DAHLÉN, M.; KRISTENSEN, M.; BISGGARD, M.L.; MOLLER, N.; MOHR, J. Linkage between serum cholinesterase 2 (CHE2) and crystallin gene cluster (CRYG): assignment to chromosome 2. *Clin. Genet.*, v.35, p. 313-321, 1989.
- ELLMAN, G.L.; COURTNEY, K.D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetyl-cholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, v. 7, p. 88-95, 1961.
- EVANS, R.T.; WROE, J. Is serum cholinesterase activity a predictor of succinyl choline sensitivity? An assessment of four methods. *Clin. Chem.*, v. 24, p. 1762-1766, 1978.
- FADEL-PICHETH, C. Variabilidade do loco BCHE da butirilcolinesterase e peso do adulto em amostra de Curitiba. Curitiba, 1991, 107 p. Tese de Mestrado. Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná.
- GAFFNEY, D.; CAMPBELL, R.A. A PCR method to determine the Kallow allele frequency and its significance in the normal population. *J. Med. Genet.*, v. 31, p. 248-50, 1994.

- GALLANGO, M.L.; ARENDS, T. Phenotypical variants of pseudocholinesterase in myeloma patients. *Human. Genet.*, v. 7, p. 104-108, 1969.
- GAUGHAN, G.; PARK, H.; PRIDDLE, J.; CRAIG, S. Refinement of the localization of human butyrylcholinesterase to chromosome 3q26.1-q26.2 using a PCR-derived probe. *Genomics*, v. 11, p. 455-58, 1991.
- GNATT, A.; PRODY, C. A.; ZAMIR, R.; LIEMAN-HURWITZ, J.; ZAKUT, H.; SOREQ, H. Expression of alternatively terminated unusual human butyrylcholinesterase messenger-RNA transcripts, mapping to chromosome 3q26-ter, in nervous-system tumors. *Cancer Res.* v. 50, p. 1983-1987, 1990.
- GOEDDE, H.W.; GEHRING, D.; HOFMAN, R.A. On the problem of a silent gene in pseudocholinesterase polymorphism. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 107, p. 391-93, 1965.
- GOEDDE, H.W.; ALTLAND, K. Suxamethonium sensitivity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 179, p. 695-703, 1971.
- GREENBERG, C.P.; PRIMO-PARMO, S.L.; PANTUCK, E.J.; LA DU, B.N. Prolonged response to succinylcholine: a new variant of plasma cholinesterase that is identified as normal by traditional phenotyping methods. *Anesth. Analg.*, v. 81, p. 419-421, 1995.
- GUERREIRO, J.F.; SANTOS, S.E.B. Studies on serum cholinesterase (*CHE1* and *CHE2* loci) among Indians from the Amazon region of Brazil: Munduruku e Parakaña tribes. *Rev. Bras. Genet.*, v. 10, p. 559-63, 1987.
- GUERREIRO, J.F.; SANTOS, S.E.B.; AGUIAR, G.F.S. Serum cholinesterase polymorphism (*CHE1* and *CHE2* loci) among several indian groups from Amazon region of Brazil, and segregation of the C5 variant in families. *Gene Geogr.*, v. 3, p. 11-20, 1989.

- GUERREIRO, J.F.; SANTOS, S.E.B.; BLACK, F.L. Frequencies of the atypical and C5 variants of serum cholinesterase in Wayana-Apalai Indians. *Rev. Bras. Genet.*, v. 8, p. 123-29, 1985.
- GUERREIRO, J.F.; SANTOS, S.E.B.; LOURENÇO, M.A.C.; PRIMO-PARMO, S.L.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Serum cholinesterase polymorphism (*CHE1* and *CHE2* loci) in Indians from the Amazon region of Brazil: Urubu-Kaapor and Assurini tribes. *Rev. Bras. Genet.*, v. 10, p. 781-85, 1987.
- HADA, T.; MURATANI, K.; OHUE, T.; IMANISHI, H.; MORIWAKI, Y.; ITOH, M.; AMURO, Y.; HIGASHINO, K. A variant serum cholinesterase and a confirmed point mutation at Gly-365 to Arg found in a patient with liver cyrrhosis. *Intern. Med.*, v. 31, p. 357-62, 1992.
- HARRIS, H. *The principles of human biochemical genetics*. 3^a ed. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical, 1980, p. 171.
- HARRIS, H.; HOPKINSON, D.A.; ROBSON, E.B. Two-dimensional electrophoresis of pseudocholinesterase components in human serum. *Nature*, v.196, p. 1296-98, 1962.
- HARRIS, H.; ROBSON, E.B.; GLEN-BOTT, A.M.; THORNTON, J.A. Evidence for non-allelism between genes affecting human serum cholinesterase. *Nature*, v. 200, p. 1185-87, 1963a.
- HARRIS, H.; ROBSON, E.B.; HOPKINSON, D.A. E WHITTAKER, M. Genetical studies on a new variant of serum pseudocholinesterase detected by electrophoresis. *Ann. Hum. Genet.*, v. 26, p. 359-82, 1963b.
- HARRIS, H.; WHITTAKER, M. Differential inhibition of human serum cholinesterase with fluoride. Recognition of two new phenotypes. *Nature.*, v. 191, p. 496-8, 1961.

- HARRIS, H.; WHITTAKER, M.; LEHMAN, H.; SILK, E. The pseudocholinesterase variants. Esterase levels and dibucaine numbers in families selected through suxamethonium-sensitive individuals. *Acta. Genet. Stat. Med.*, v. 10, p. 1-6, 1960.
- HART, S.M.; MITCHELL, J.V. Suxamethonium in the absence of pseudocholinesterase. *Br. J. Anaesth.* v. 34, p. 207-209, 1962.
- HAYASHI, K; YANDELL, D.W. How sensitive is PCR-SSCP? *Hum. Mutat.* v. 2, p. 338-346, 1993.
- HIDAKA, K.; IUCHI, I.; YAMASAKI, T.; OHHARA, M.; SHODA, T.; PRIMO-PARMO, S.L.; LA DU, B.N. Identification of two different genetic mutations associated with silent phenotypes for human serum cholinesterase in Japanese. *Rinsho Byori*, v. 40, p. 535-40, 1992.
- HIDAKA, K.; IUCHI, I. Determination of gene mutation of silent serum cholinesterase and its epidemiologic characters in the Japanese. *Rinsho Byori*, v. 43, p. 786-91, 1995.
- IZUMI, M.; MAEKAWA, M.; KANNO, T. Butyrylcholinesterase K-variant in Japan: Frequency of allele and associated enzyme activity in serum. *Clin. Chem.*, v. 40, p. 1606-7, 1994.
- JENSEN, F.S.; BARTELS, C.F.; LA DU, B.N. Structural basis of the butyrylcholinesterase H-variant segregating in two Danish families. *Pharmacogenetics*, v. 2, p. 234-240, 1992.
- JENSEN, F.S.; NIELSEN, L.R.; SCHWARTZ, M. Detection of plasma cholinesterase K-variant by PCR using an amplification created restriction site. *Hum. Hered.*, v. 46, p. 26-31, 1996.
- JIBILO, O.; L'HERMITE, Y.; TALES, V.; TOUTANT, JP.; CHATONNET, A. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase expression in adult rabbit tissues and during development. *Eur. J. Biochem.*, v. 225, p. 115-24, 1994.

- KALOW, W.; STARON, N. On distribution and inheritance of atypical forms of human cholinesterase as indicated by dibucaine numbers. *Canad. J. Biochem. Physiol.*, v. 35, p. 1305-20, 1957.
- KALOW, W.; DAVIES, R. O. The activity of various esterase inhibitors towards atypical human serum cholinesterase. *Biochem. Pharmacol.*, v. 1, p. 183-92, 1958.
- KRASOWSKI, M.D.; McGehee, D.S.; Moss, J. Natural inhibitors of cholinesterases: implications for adverse drug reaction. *Can. J. Anaesth.*, v. 44, n. 5, p. 525-34, 1997.
- KUTTY, K.M. Review: Biological function of cholinesterase. *Clin. Biochem.*, v. 13, p. 239-43, 1980.
- LA DU, B.N.; BARTELS, C.F.; NOGUEIRA, C.P.; HAJRA, A.; LIGHTSTONE, H.; VAN DER SPEK, A.; LOCKRIDGE, O. Phenotypic and molecular biological analysis of human butyrylcholinesterase variants. *Clin. Biochem.*, v. 23, p. 423-31, 1990.
- LAHIRI, D. K.; NURNBERGER JR., J. L. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res.*, v. 19, p. 5444, 1991.
- LAYER, P.G.; ALBER, R.; RATHJEN, F.G. Sequential activation of butyrylcholinesterase in rostral half somites and acetylcholinesterase in motoneurons and myotones preceding growth of motor axons. *Development*, v. 102, p. 387-96, 1988.
- LAYER, P.G.; SPORNS, O. Spatiotemporal relationship of embryonic cholinesterases with cell proliferation in chicken brain and eye. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 84, p. 284-88, 1987.
- LIDDELL, J.; LEHMANN, H.; SILK, E. A silent pseudocholinesterase gene. *Nature, Lond.*, v. 193, p. 561-62, 1962.
- LOCKRIDGE, O. Genetic variants of human serum cholinesterase influence metabolism of the muscle relaxant succinylcholine. *Pharmacol. Ther.*, v. 47, p. 35-60, 1990.

- LOCKRIDGE, O.; BARTELS, C.F.; VAUGHAN, T.A.; WONG, C.K.; NORTON, S.E.; JOHNSON, L.L. Complete aminoacid sequence of human serum cholinesterase. *J. Biol. Chem.*, v. 262, p. 549-57, 1987.
- LOCKRIDGE, O.; ECKERSON, H.W.; LA DU, B.N. Interchain disulfide bonds and subunit organization in human serum cholinesterase. *J. Biol. Chem.*, v. 254, p. 8324-30, 1979.
- LOCKRIDGE, O.; LA DU, B.N. Comparison of atypical and usual serum cholinesterase. *J. Biol. Chem.*, v. 253, p. 361-66, 1978.
- LOCKRIDGE, O.; LA DU, B.N. Loss of the interchain disulfide peptide and dissociation of the tetramer following proteolysis of native human serum cholinesterase. *J. Biol. Chem.*, v. 257, p. 12012-18, 1982.
- MAEKAWA, M.; SUDO, K.; KANNO, T.; KOTANI, K.; DEY, D.C.; ISHIKAWA, J.; IZUME, M. Genetic mutations of butyrylcholine esterase identified from phenotypic abnormalities in Japan. *Clin. Chem.*, v. 43, p. 924-9, 1997.
- MAEKAWA, M.; SUDO, K.; KANNO, T.; KOTANI, K.; DEY, D.C.; ISHIKAWA, J.; IZUME, M.; ETOH, K. Genetic basis of the silent phenotype of serum butyrylcholinesterase in three compound heterozygotes. *Clin. Chim. Acta.*, v. 235, p. 41-57, 1995.
- MASSON, P. Formes moléculaires multiples de la butyrylcholinesterase du plasma humain. *Biochim. Biophys. Acta.*, v. 578, p. 493-504, 1979.
- MASSON, P. A naturally occurring molecular form of human plasma cholinesterase is an albumin conjugate. *Biochim. Biophys. Acta.*, v. 988, p. 258-66, 1989.
- MASSON, P. Molecular heterogeneity of human plasma cholinesterase. In: MASSOULIÉ J. et al. *Cholinesterases: Structure, Function, Mechanisms, Genetics and Cell Biology*. Washington: American Chemical Society, p. 42-45, 1991.

- MCGUIRE, M.C.; NOGUEIRA, C.P.; BARTELS, C.F.; LIGHTSTONE, H.; HAJRA, A.; VAN DER SPEK, A.F.L.; LOCKRIDGE, O.; LA DU, B.N. Identification of the structural mutation responsible for the dibucaine-resistant (atypical) variant form of human serum cholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 86, p. 953-57, 1989.
- MILLARD, C.B.; BROOMFIELD, C.A. A computer model of glycosylated human butyrylcholinesterase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 189, p. 1280-86, 1992.
- MUENSCH, H.; GOEDDE, H.W.; YOSHIDA, A. Human serum cholinesterase subunit and number of active sites of the major component. *Eur. J. Biochem.*, v. 70, p. 218-23, 1971.
- MURATANI, K.; HADA, T.; YAMAMOTO, Y.; KANEKO, T.; SHIGETO, Y.; OHUE, T.; FURUYAMA, J.; HIGASHINO, K. Inactivation of the cholinesterase gene by Alu insertion: possible mechanism for human gene transposition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 88, p. 11315-19, 1991.
- NOGUEIRA, C.P.; BARTELS, C.F.; MCGUIRE, M.C. Identification of two different point mutations associated with the fluoride-resistant phenotype for human butyrylcholinesterase. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 51, p. 821-8, 1992.
- NOGUEIRA, C.P.; MCGUIRE, M.C.; GRAESER, C.; BARTELS, C.F.; ARPAGAU, M.; VAN DER SPEK, A.F.L.; LIGHTSTONE, H.; LOCKRIDGE, O.; LA DU, B.N. Identification of a frameshift mutation responsible for the silent phenotype of human serum cholinesterase, Gly 117 (GGT->GGAG). *Am. J. Hum. Genet.*, v. 46, p. 934-42, 1990.
- OHKAWA, J.; FURUYA, I.; TABATA, S.; SAEKI, S.; OIMOMI, T.; BABA, S. Chemical characterization of C₅ cholinesterase isoenzyme. *Enzyme (suppl.1)*, v. 40, p. 37-38, 1988.

- PICHETH, G.; FADEL-PICHETH, C.; PRIMO-PARMO, S.L.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.; VIEIRA, M.M. An Improved method for butyrylcholinesterase phenotyping. *Biochem. Genet.*, v. 32, p. 83-89, 1994.
- PRIMO-PARMO, S.L. *Caracterização de nove alelos silenciosos novos da butirilcolinesterase humana a nível de ADN*. Curitiba, 1993. Tese de Doutorado. Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná.
- PRIMO-PARMO, S.L.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.; LOURENÇO, M.A.C.; SALZANO, F.M.; FREITAS, M.J.M. Studies on serum cholinesterase (*CHE1* and *CHE2*) in brazilian indian and admixed populations. *Rev. Bras. Genet.*, v. 3, p. 467-78, 1986.
- PRIMO-PARMO, S.L.; BARTELS, C.F.; WIERSEMA, B.; VAN DER SPEK, A.F.L.; INNIS, J.W.; LA DU, B.N. Characterization of 12 silent alleles of the human butyrylcholinesterase (*BCHE*) gene. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 58, p. 52-64, 1996.
- ROBINSON, A.R.; ROBSON, M.; HARRISON, A.P.; ZUELZER, W.W. A new technique for differentiation of hemoglobin. *J. Lab. Clin. Med.*, v. 50, p. 745-52, 1957.
- RUBINSTEIN, H.M.; DIETZ, A.A.; HODGES, L.K.; LUBRANO, T.; CZEBOTAR, V. Silent cholinesterase gene: variations in the properties of the serum enzyme in apparent homozygotes. *J. Clin. Invest.*, v. 49, p. 479-86, 1970.
- RUBINSTEIN, H.M.; DIETZ, A.A.; LUBRANO, T. $E1^k$, Another quantitative variant at cholinesterase locus1. *J. Med. Genet.*, v. 15, p. 27-29, 1978.
- SAKAMOTO, N.; HIDAKA, K.; FUJISAWA, T.; MAEDA, M.; IUCHI, I. Identification of a point mutation associated with a silent phenotype of human serum butyrylcholinesterase - a case of a familial cholinesterasemia. *Clin. Chim. Acta.*, v. 274, p. 159-66, 1998.

- SALZANO, F.M.; CALLEGARI-JACQUES, S.M. South American Indians: A Case Study in Evolution. *Oxford: Claredon Press*, 1988, p. 259.
- SALZANO, F.M.; CALLEGARI-JACQUES, S.M.; MESTRINER, M.A. Reconstructing hystory: The Amazonian Mura Indians. *Hum. Biol.* v. 62, p. 619-35, 1990.
- SCOTT, E.M.; POWERS, R.F. Properties of the C₅ variant form of human serum cholinesterase. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 26, p. 189-94, 1974.
- SHIBUTA, K.; ABE, M.; SUZUKI, T. A new detection method for the K variant of the butyrylcholinesterase based on PCR primer introduced restriction analysis (PCR-PIRA). *J. Med. Genet.*, v.34, p. 576-79, 1994.
- SIMPSON, N.E.; KALOW, W. Comparision of two methods for typing of serum cholinesterase and prevalence of its variants in a Brazilian population. *Am. J. Hum. Genet.* v. 17, p. 156-162, 1965.
- SMALL, D.H. A function for butyrylcholinesterase? *J. Neurochem.*, v. 64, p. 466-67, 1995.
- SOUZA, R.L.R. Estudos sobre nova banda da butirilcolinesterase humana (C_{4/5}) verificada em eletroforese. Curitiba, 1995. Tese de Mestrado. Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná.
- SOUZA, R.L.R; CASTRO, R.M.V.; FREUND, A.A.; CULPI, L.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Frequencies of the butyrylcholinesterase K mutation in Brazilian populations of European and African origin. *Hum. Biol.*, v. 70, n. 5, p. 965-70, 1998.
- SUDO, K.; MAEKAWA, M.; AKIZUKI, S.; MAGARA, T.; KANNO, T. Three different point mutations in the butytrylcholinesterase gene of three Japanese subjects with a silent phenotype. *Clin. Biochem.*, v. 29, n. 2, p. 165-69, 1996.

- SUDO, K.; MAEKAWA, M.; AKIZUKI, S.; MAGARA, T.; OGASAWARA, H. E TANAKA, T. Human butyrylcholinesterase L3301 mutation belongs to a fluoride-resistant gene, by expression in human fetal kidney cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 240, p. 372-75, 1997.
- SUGIMORI, T. Shortened action of succinylcholine in individuals with cholinesterase C₅ isoenzyme. *Canad. Anaesth. Soc. J.*, v. 33, p. 321-27, 1986.
- TAYLOR, P.; RADIC, Z.; HOSEA, N.A.; CAMP, S.; MARCHOT, P.; BERMAN, H.A. Structural bases for the specificity of cholinesterase catalysis and inhibition. *Toxicol. Lett.*, v. 82/83, p. 453-58, 1995.
- TORTOLERO, M.; MEDINA, J.R. Las isoenzimas C₄ y C₅ de la pseudocolinesterasa humana. *Sangra*, v. 23, p. 157-62, 1978.
- VAN ROS, G.; VERVOORT, T. Frequencies of the "atypical" and C₅ variants of serum cholinesterase in Zairians and Belgians. Detection of the C₅ variant by agar gel electrophoresis with an acid buffer. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.*, v. 53, p. 633-44, 1973.
- WESCOE, W.C.; HUNT, C.H.; RIKER, W.F.; LITT, I.C. Regeneration rates of serum cholinesterase in normal individuals and in patients with liver damage. *Am. J. Physiol.*, v. 149, p. 549-51, 1947.
- WHITTAKER, M. Plasma cholinesterase variants and the anaesthetist. *Anaesthesia*, v. 35, p. 174-97, 1980.
- WHITTAKER, M. Cholinesterase. *Karger, Basel, New York.*, v. 11, p. 1-126, 1986.
- WHITTAKER, M.; BRITTEN, J.J. E^h₁, a new allele at cholinesterase locus 1. *Hum. Hered.*, v. 37, p. 54-58, 1987.