

**FABIANA ANTUNES DE ANDRADE**

**VARIANTES DOS SÍTIOS -116 E 1615 DO GENE *BCHE* DA  
BUTIRILCOLINESTERASE HUMANA E ÍNDICE DE MASSA CORPORAL**

Dissertação de Mestrado do Programa de Pós Graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

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

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo L. R. de Souza.

CURITIBA  
2007

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Para minha mãe.  
Com amor e gratidão.

## AGRADECIMENTOS

Sou extremamente grata à professora Dra. Eleidi Alice Chautard Freire Maia e ao seu amor pela ciência, seu entusiasmo e dedicação acompanharam desde a criação até a conclusão desse trabalho.

Ao professor Dr. Ricardo Lethonen Rodrigues de Souza, pela atenção que sempre dedicou a esse trabalho e, em especial pelo apoio nas dificuldades diárias do laboratório.

À Dra. Lupe Futado Alle por ter me iniciado na pesquisa científica e em especial pela boa vontade com que me ouviu falar tantas vezes sobre esse trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Polimorfismo e Ligação pela contribuição inestimável e estímulo diário.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPS), pela bolsa de mestrado.

À minha família, em especial à minha mãe e ao meu esposo, por todo apoio, incentivo e compreensão.

A Deus por me proporcionar tudo isso.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> -----	<b>VI</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> -----	<b>VIII</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS</b> -----	<b>X</b>
<b>RESUMO</b> -----	<b>XIII</b>
<b>ABSTRACT</b> -----	<b>XIV</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> -----	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> -----	<b>3</b>
2.1 COLINESTRERASES -----	3
2.2 BUTIRILCOLINESTERASE -----	5
2.2.1 Formas Moleculares da BChE -----	5
2.2.2. Estrutura da BChE humana-----	7
2.3 GENE <i>BCHE</i> -----	10
2.4 VARIABILIDADE GENÉTICA -----	12
2.4.1 Loco <i>CHE2</i> -----	12
2.4.2 Loco <i>BCHE</i> -----	13
2.5. RELAÇÕES DA BChE COM LÍPIDES E LIPOPROTEÍNAS -----	16
2.6 BCHE E VARIÁVEIS ASSOCIADAS AO PESO E IMC -----	18
2.7 BChE E VARIÁVEIS ASSOCIADAS A OBESIDADE -----	20
2.8. BChE E GRELINA DESACILADA-----	22
<b>3. OBJETIVOS</b> -----	<b>25</b>
3.1. OBJETIVO GERAL -----	25
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS -----	25

<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> -----	<b>26</b>
4.1 NOMENCLATURA-----	26
4.2 AMOSTRA -----	26
4.3 METODOLOGIA-----	28
4.3.1 Aspectos Gerais-----	28
4.3.2 PCR-SSCA do Exon 1 -----	28
4.3.3 Medida de atividade enzimática -----	31
4.3.4 Análise Estatística -----	32
<b>5. RESULTADOS</b> -----	<b>33</b>
5.1. DISTRIBUIÇÕES GENOTÍPICAS -----	33
5.1.1. Exon 1 do Gene <i>BCHE</i> -----	33
5.1.2. Exon 1 e 4 do gene <i>BCHE</i> -----	34
5.2. VARIANTES DOS SÍTIOS -116 e 1615 DO GENE <i>BCHE</i> E PESO-----	38
5.3. VARIANTES DOS SÍTIOS -116 e 1615 DO GENE <i>BCHE</i> E ALTURA -----	40
5.4. VARIANTES DOS SÍTIOS -116 e 1615 DO GENE <i>BCHE</i> E IMC -----	42
5.5 ATIVIDADE DA BChE -----	44
5.5.1 VARIANTES DOS SÍTIOS -116 E 1615 E ATIVIDADE DA BChE -----	44
<b>6. DISCUSSÃO</b> -----	<b>52</b>
6.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE AS ANÁLISES DOS EXONS 1 E 4 DO GENE <i>BCHE</i> -----	52
6.2. PESO, IMC e BUTIRILCOLINESTERASE -----	53
6.3. VARIANTES DOS SÍTIOS -116 E 1615 DO GENE <i>BCHE</i> - PESO E IMC -----	56
<b>7. CONCLUSÕES</b> -----	<b>61</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> -----	<b>62</b>

**LISTA DE TABELAS**

	Página
<b>Tabela 1</b> - Lista de variantes já descritas do gene <i>BCHE</i> , incluindo a alteração de nucleotídeo e o nome do alelo.	14
<b>Tabela 2</b> - Valores do índice de massa corporal (IMC) e suas respectivas categorias de peso.	19
<b>Tabela 3.</b> Número e frequência (% $\pm$ EP) dos indivíduos <i>-116GG</i> , <i>-116GA</i> e <i>-116AA</i> do exon 1, nas amostras genotipadas como <i>1615GA</i> , <i>1615GG</i> e <i>1615AA</i> quanto ao exon 4.	34
<b>Tabela 4.</b> Comparações das distribuições de sexo entre os grupos genotípicos que serão comparados em relação às variáveis antropométricas.	35
<b>Tabela 5.</b> Comparações das distribuições de etnia entre os grupos genotípicos que serão comparados em relação às variáveis antropométricas.	36
<b>Tabela 6.</b> Comparações das médias de idade entre grupos genotípicos que serão comparados em relação às variáveis antropométricas.	37
<b>Tabela 7.</b> Médias, variâncias, amplitudes e coeficientes de variação de peso, bem como valores de t e F, em amostras classificadas de acordo com os genótipos relativos às variantes dos nucleotídeos <i>-116</i> do exon 1 e <i>1615</i> do exon 4.	38
<b>Tabela 8.</b> Médias, variâncias, amplitudes e coeficientes de variação de altura, bem como valores de t e F, em amostras classificadas de acordo com os genótipos relativos às variantes dos nucleotídeos <i>-116</i> do exon 1 e <i>1615</i> do exon 4.	40
<b>Tabela 9.</b> Médias, variâncias, amplitudes e coeficientes de variação de IMC, bem como valores de t e F, em amostras classificadas de acordo com os genótipos relativos às variantes dos nucleotídeos <i>-116</i> do exon 1 e <i>1615</i> do exon 4.	42
<b>Tabela 10.</b> Médias, variâncias, amplitudes e coeficientes de variação de atividade da butirilcolinesterase, bem como valores de t e F, em amostras classificadas de acordo com os genótipos relativos aos nucleotídeos <i>-116</i> do exon 1 e <i>1615</i> do exon 4.	45

<b>Tabela 11.</b> Valores de p obtidos com o uso do teste Tukey, após análise de variância com o programa ANOVA, para as comparações das médias de atividade enzimática nos genótipos relativos aos nucleotídeos -116 do exon 1 e 1615 do exon 4.	45
<b>Tabela 12.</b> Valores de t(p) para comparação das médias de atividade da BChE nas classes genótípicas <i>-116GG; 1615GG, -116GG; 1615GA e -116GA; 1615GA</i> divididas quanto à mediana de peso.	49
<b>Tabela 13.</b> Valores de t(p) para comparação das médias de atividade da BChE nas classes genótípicas <i>-116GG; 1615GG, -116GG; 1615GA e -116GA; 1615GA</i> divididas quanto à mediana de IMC.	50
<b>Tabela 14.</b> Comparações das distribuições de categorias de peso normal ( $18,5 \leq \text{IMC} < 25$ ), excesso de peso ( $25 \leq \text{IMC} < 30$ ) e obesidade ( $\text{IMC} \geq 30$ ), entre as classes genótípicas.	51



## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Representação da superposição da BChE (azul claro), TcAChE (azul escuro) e AChE de <i>Drosophila melanogaster</i> (verde) na região da entrada do sítio ativo (Fonte: NICOLET et al., 2003).	8
<b>Figura 2.</b> Alça $\Omega$ da BChE e aminoácidos que interagem com ela.	9
<b>Figura 3.</b> Representação do gene <i>BCHE</i> com os quatro exons e seus respectivos pares de bases. A região hachurada corresponde à seqüência que codifica a proteína madura e a região não hachurada do exon 2 corresponde ao peptídeo líder.	10
<b>Figura 4.</b> Representação esquemática da estrutura da grelina humana, mostrando os 28 aminoácidos e o ácido n-octanóico na Ser3 (Fonte: KOJIMA et al., 2005).	23
<b>Figura 5.</b> Percentagem de indivíduos, por categoria de IMC de acordo com a OMS, na amostra de 440 doadores de sangue.	27
<b>Figura 6.</b> Representação do final da região regulatória do gene <i>BCHE</i> , exon 1 e início do intron 1.	29
<b>Figura 7.</b> Reprodução de uma placa de gel de poliacrilamida submetida à eletroforese, contendo os fragmentos do exon 1, amplificados pelos iniciadores E1F e E1R. A amostra 1 é -116AA, a amostra 2 é -116GA e a amostra 3 é -116GG.	33
<b>Figura 8.</b> Distribuição (%) de peso (kg) em 91 amostras -116GA; 1615GA, 129 amostras -116GG; 1615GA e em 218 -116GG; 1615GG.	39
<b>Figura 9.</b> Distribuição de altura (cm) em 91 amostras -116GA; 1615GA, 129 -116GG; 1615GA e 218 -116GG; 1615GG.	41
<b>Figura 10.</b> Distribuição de Índice de Massa Corporal em 91 amostras -116GA; 1615GA, 129 amostras -116GG; 1615GA e em 218 -116GG ; 1615GG.	43
<b>Figura 11.</b> Distribuição de atividade enzimática (KU/L) em 100 amostras -116GG; 1615GG, 40 amostras -116GG; 1615GA e em 40 -116GA; 1615GA.	46
<b>Figura 12.</b> Gráfico mostrando a correlação positiva ( $r = 0,45$ ; $p < 0,05$ ) entre IMC e atividade da BChE na classe genotípica -116GG; 1615GA.	48

**Figura 13.** Gráfico mostrando a correlação positiva ( $r = 0,36$ ;  $p < 0,05$ ) entre peso e atividade da BChE na classe genotípica *-116GG; 1615GA*.

**LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS**

AAA	Arilacilamidase
AChE	Acetilcolinesterase
<i>ACHE</i>	Gene da acetilcolinesterase
Ala (A)	Alanina
Arg (R)	Arginina
Asn (N)	Asparagina
Asp (D)	Ácido aspártico
AV	Amplitude de Variação
BChE	Butirilcolinesterase
<i>BCHE</i>	Gene da butirilcolinesterase
<i>CHE2</i>	Loco condicionador do complexo C5 da butirilcolinesterase
CV	Coefficiente de Variação
Cys (C)	Cisteína
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
<i>GHRL</i>	Gene da grelina
GHS-R	Receptor do secretagogo do hormônio de crescimento
Gln (Q)	Glutamina
Glu (E)	Ácido glutâmico
Gly (G)	Glicina
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HEMEPAR	Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná
His (H)	Histidina
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
Ile (I)	Isoleucina

IMC	Índice de massa corporal
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
Iso-OMPA	Tetraisopropilpirofosforamida
IUBMB	<i>International Union of Biochemistry &amp; Molecular Biology</i>
Leu (L)	Leucina
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
Lys (K)	Lisina
Met (M)	Metionina
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
Phe (F)	Fenilalanina
PRIMA	<i>Proline-rich membrane anchor</i>
Pro (P)	Prolina
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Ser (S)	Serina
SNPs	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>
SSCA	<i>Single Strand Conformational Analysis</i>
TBE	Tris-ácido bórico-EDTA
Thr (T)	Treonina
Trp (W)	Triptofano
Tyr (Y)	Tirosina
Val (V)	Valina
VHDL	Lipoproteína de densidade muito alta

VLDL Lipoproteína de densidade muito baixa

WHO *World Health Organization*

## RESUMO

A butirilcolinesterase humana (BChE; EC 3.1.1.8) é uma esterase sintetizada pelas células hepáticas e codificada pelo gene *BCHE* (3q26.1-q26.2). Apesar de sua função fisiológica não ter sido completamente esclarecida, a BChE já foi associada a peso, índice de massa corporal (IMC), obesidade, lipoproteínas e metabolismo de lípidos. No presente trabalho foi analisada a possível influência das mutações *-116A* do exon 1 e *1615A* do exon 4 do gene *BCHE* sobre variáveis antropométricas – peso, altura e IMC – (N = 220 *1615GA*; N = 220 *1615GG*) e sobre a atividade da BChE (N = 100 *1615GG* e N = 80 *1615GA*). Essas amostras, previamente tipadas para o sítio 1615, foram genotipadas, por meio de PCR-SSCA, para o sítio 1615

**ABSTRACT**

Human butyrylcholinesterase (BChE; EC 3.1.1.8) is an esterase synthesized by hepatic cells, codified by the *BCHE* gene (3q26.1-q26.2). Although its physiologic function is still not completely understood, BChE has already been associated to weight, body mass index (BMI), obesity, li

## INTRODUÇÃO

A butirilcolinesterase (BChE; EC 3.1.1.8) é uma esterase sérica que hidrolisa diversos ésteres de colina e que utiliza a butirilcolina como substrato preferencial. A BChE é sintetizada pelas células hepáticas e amplamente distribuída no organismo. Sua função fisiológica, bem como seu substrato natural, não foram completamente esclarecidos, no entanto a BChE já foi associada a lípidos, lipoproteínas, peso, índice de massa corporal (IMC) e obesidade (KÁLMÁN et al., 2004; KUTTY e PAYNE, 1994; STUEBER-ODEBRECHT et al., 1985; SOUZA et al., 2005a e ALCÂNTARA et al., 2003, respectivamente).

O gene *BCHE* está localizado no braço longo do cromossomo três (3q26.1-q26.2; SOREQ et al., 1987; ALLDERDICE et al., 1991; GAUGHAN et al., 1991) e sua estrutura de 4 exons e seqüenciamento de nucleotídeos foram estabelecidos por ARPAGAUSS et al. (1990). O sítio promotor e o de início de transcrição do gene *BCHE* foram elucidados por JBILO et al. (1994).

O loco *CHE2* (2q33-35) codifica uma substância cuja natureza permanece desconhecida, que se associa ao tetrâmero da BChE formando o complexo C<sub>5</sub> (HARRIS et al., 1962; MASSON, 1991). Esse loco apresenta dois alelos: *CHE2*\*C<sub>5</sub><sup>+</sup> e *CHE2*\*C<sub>5</sub><sup>-</sup> responsáveis, respectivamente, pela presença e ausência do complexo C<sub>5</sub>.

O uso de succinilcolina, como relaxante muscular pré-operatório, durante a década de 50, possibilitou a descoberta da primeira variante genética do gene *BCHE*, denominada de atípica. A variante atípica é incapaz de hidrolisar a succinilcolina em doses fisiológicas, causando paralisia muscular e apnéia respiratória prolongada nos pacientes portadores dessa variante. O seqüenciamento do gene *BCHE* (ARPAGAUSS et al., 1990) possibilitou a análise do DNA, o que vem permitindo a identificação de muitas outras variantes do gene *BCHE*.

O índice de massa corporal (IMC) e o peso têm padrão de herança multifatorial. Assim, o fenótipo de um indivíduo será o resultado da interação entre vários genes de predisposição e fatores ambientais. Por não apresentarem um padrão de herança simples, a detecção dos genes envolvidos na etiologia do peso e do IMC é mais complexa, entretanto, mesmo a detecção de parte deles é de importância para se



conhecer melhor a etiologia genética dessas características e, também colabora para se entender mais a respeito das funções dos genes implicados.

Dados de nosso laboratório mostraram correlação positiva entre a atividade da BChE e peso em indivíduos do fenótipo CHE2 C5- (CHAUTARD-FREIRE-MAIA et al., 1990) e sobre, respectivamente, médias de peso e de IMC inferiores em indivíduos CHE2 C5+, quando comparados a seus controles CHE2 C5- (CHAUTARD-FREIRE-MAIA et al., 1991 e ALCÂNTARA et al., 2001).

No presente estudo avaliou-se, em amostra de doadores de sangue selecionada ao acaso quanto ao IMC, a possível influência das mutações *-116A* do exon 1 e *1615A* do exon 4 do gene *BCHE* sobre variáveis antropométricas (peso, altura e IMC) e sobre a atividade da BChE. Foram utilizadas amostras de DNA de 220 heterozigotos *1615GA* e 220 controles homozigotos usuais (*1615GG*), bem como de 22 homozigotos *1615AA* e seus 22 controles homozigotos *1615GG*, sendo que o plasma de 204 desses indivíduos foi analisado quanto à atividade da BChE.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 COLINESTRERASES

As colinesterases são esterases capazes de hidrolizar ésteres de colina, sendo inibidas pela fisostigmina na concentração de  $10^{-5}$ M (AUGUSTINSSON, 1963). Nos vertebrados existem dois tipos de colinesterases: a acetilcolinesterase (AChE; EC 3.1.1.7) e a butirilcolinesterase (BChE; EC 3.1.1.8). A acetilcolinesterase, que hidrolisa preferencialmente o neurotransmissor acetilcolina, originando acetato e colina, é encontrada nos eritrócitos, sistema nervoso central e placa motora de músculos esqueléticos. A butirilcolinesterase utiliza como substrato preferencial a butirilcolina, mas também é capaz de hidrolisar desde acetilcolina até heptanoilcolina. A seqüência de aminoácidos da BChE humana tem 54% de identidade com a AChE da raia *Torpedo californica* (LOCKRIDGE et al., 1987a).

Além da hidrólise de ésteres de colina, a AChE e a BChE exibem outras atividades catalíticas. As seqüências similares entre diferentes esterases, lipases, tiroglobulina, proteínas de adesão celular e colinesterases sugerem que as colinesterases têm a capacidade de exibir mais de uma atividade biológica e funções biológicas mais amplas (BALASUBRAMANIAN e BHANUMATHY, 1993).

A AChE e a BChE possuem atividade de aril-acilamidase amino sensível (AAA), ou seja, têm capacidade de hidrolizar ligações acil-amida. A atividade AAA, em ambas enzimas, é inibida por inibidores de colinesterases e serotonina (5-hidroxitriptamina). Além disso, a atividade AAA da BChE é estimulada pela presença de tiramina.

Como a ligação acil-amida, clivada pela atividade AAA, é similar àquelas encontradas em drogas que atuam no alívio a dor, como o paracetamol e o fenacetin, se algumas dessas drogas sintéticas é clivada pela atividade AAA então, a serotonina que inibe a atividade AAA, pode ajudar a prolongar a vida dessas drogas na circulação, melhorando seu efeito analgésico. A serotonina é conhecida por ter efeito no processo de alívio da dor. Tentativas para demonstrar a desacilação da droga fenacetin pela atividade AAA não têm tido sucesso. Entretanto é possível supor a existência de um analgésico endógeno não conhecido, que contenha ligação acil-amida

suscetível à atividade AAA e que seja modulada pela acetilcolina e pela serotonina, sugerindo uma função para a atividade AAA das colinesterases no mecanismo da dor (BALASUBRAMANIAN e BHANUMATHY, 1993).

A enxaqueca já foi correlacionada ao excesso de tiramina. Apesar de não ser clara a relação existente entre a enxaqueca e a tiramina é possível especular que um aumento de tiramina estimule a ação de AAA na circulação, levando à degradação de um analgésico endógeno composto por acil-amida, resultando no transtorno de um mecanismo natural de alívio da dor. Assim, pode-se supor uma possível função para a BChE no mecanismo da dor, já que o excesso de tiramina estimula a atividade AAA da BChE que seria modulada pela serotonina e pela tiramina (BALASUBRAMANIAN e BHANUMATHY, 1993).

Há evidências de que a BChE seja a principal enzima atuando na desintoxicação do organismo pela cocaína, sendo capaz de hidrolisar a cocaína convertendo-a em derivados menos ativos. Os primeiros experimentos que identificaram a BChE como uma enzima capaz de hidrolisar a cocaína mostraram que, na presença de três característicos inibidores da BChE, a hidrólise da cocaína também era inibida (STEWART et al., 1977 e INABA et al., 1978 *apud* Xie et al., 1998). Experimentos realizados em ratos mostraram que a administração da BChE humana purificada protegeu esses animais dos efeitos tóxicos da cocaína (HOFFMAN et al., 1996). Esses autores observaram que os efeitos da cocaína causaram ataques de epilepsia e morte em 100% dos animais que não tiveram prévia administração da BChE. Em contraste, o pré-tratamento com BChE protegeu 70% dos animais da morte e evitou 60% dos ataques de epilepsia. Essas evidências mostram que a BChE pode ser utilizada no tratamento de desintoxicação do organismo como uma alternativa à terapia convencional com antagonistas de receptores. Contudo, como a eficiência da BChE é baixa, é necessária grande quantidade dessa enzima para desintoxicar um paciente humano (SUN et al., 2001; 2002).

Estudos têm mostrado a existência de relação entre as colinesterases e diferenciação celular. LAYER e SPORNS (1987), estudando cérebro e retina de galinha, observaram que, durante o início do desenvolvimento embrionário, a atividade da AChE aumenta quando a atividade da BChE já diminuiu. Os autores também

observaram que a atividade da BChE estava diretamente e a atividade da AChE estava inversamente correlacionada com a proliferação celular, sugerindo que as colinesterases estejam envolvidas na regulação dessa transição entre proliferação e diferenciação celular.

## 2.2 BUTIRILCOLINESTERASE

De acordo com a Comissão de Enzimas da União Internacional de Bioquímica, a butirilcolinesterase é classificada como acilcolina-acilhidrolase (EC 3.1.1.8). A sigla “EC” é a abreviação de *Enzyme Commission*. O primeiro número desse código é referente à classe da enzima, no caso da BChE, classe hidrolase, pois catalisa reações de hidrólise. O segundo número designa a subclasse e a ação da enzima sobre ligações ésteres. O terceiro número indica a sub-subclasse, que enquadra a BChE na categoria hidrolase de éster carboxílico. O último número representa a série dentro da sub-subclasse (IUBMB, acessado em 16/07/2005).

A BChE é sintetizada pelas células hepáticas e amplamente distribuída no organismo, sendo encontrada no plasma, músculo liso, pâncreas, adipócitos, pele, massa branca do cérebro e coração (WESCOE et al., 1947). Foi demonstrado que, em murinos, ela também é sintetizada nas células do tecido adiposo (ORES KOVIC e KUNEC-VAJIC, 1992). A função fisiológica desta enzima, bem como seu substrato natural, não estão claramente estabelecidos. No entanto, a BChE já foi associada ao metabolismo de lípidos, lipoproteínas, à homeostase do peso, índice de massa corporal (IMC) e obesidade.

### 2.2.1 FORMAS MOLECULARES DA BChE

No plasma, os produtos do gene *BCHE* existem em variadas formas moleculares e as principais, designadas em ordem decrescente de mobilidade eletroforética são: C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> e C<sub>5</sub> (HARRIS et al., 1962; 1963), respectivamente, monômero, monômero ligado à albumina, dímero, tetrâmero e o tetrâmero ligado à uma substância ainda desconhecida.

A forma  $C_1$  da BChE humana é constituída por 574 aminoácidos e nove cadeias de carboidratos ligadas a nove asparaginas (LOCKRIDGE et al., 1987b).

A composição de  $C_2$ , elucidada por MASSON (1989), é formada pela associação covalente de um monômero da BChE à albumina. Apesar da forma molecular da  $C_2$  ter sido elucidada, seu significado biológico ainda permanece desconhecido.

A forma  $C_3$  é um dímero, com peso molecular de aproximadamente 180 kDa (LOCKRIDGE et al., 1987b).

A forma  $C_4$ , a mais abundante no plasma, tem peso molecular de 340 kDa e é formada por quatro subunidades idênticas, arranjadas na forma de dois dímeros. Cada dímero é formado por dois monômeros unidos por uma ponte dissulfeto, cuja função é dar estabilidade à molécula (LOCKRIDGE et al., 1979; LOCKRIDGE e LA DU, 1982). No entanto, a ligação entre os dímeros, que se unem para formar o tetrâmero ( $C_4$ ), é mantida por ligações não covalentes.

A forma  $C_5$  é constituída pelo tetrâmero ligado à uma substância ainda desconhecida de aproximadamente 60 kDa. Também foi descrita uma banda que pode ter mobilidade eletroforetica semelhante à banda  $C_5$ , em certo pH (SOUZA et al., 1993), chamada de banda  $C_{4/5}$ .

ALCÂNTARA et al. (1999) e ALCÂNTARA (2000) encontraram 12 bandas eletroforéticas em gel de poliacrilamida, sugerindo que a BChE possa estar ligada a diversas outras substâncias.

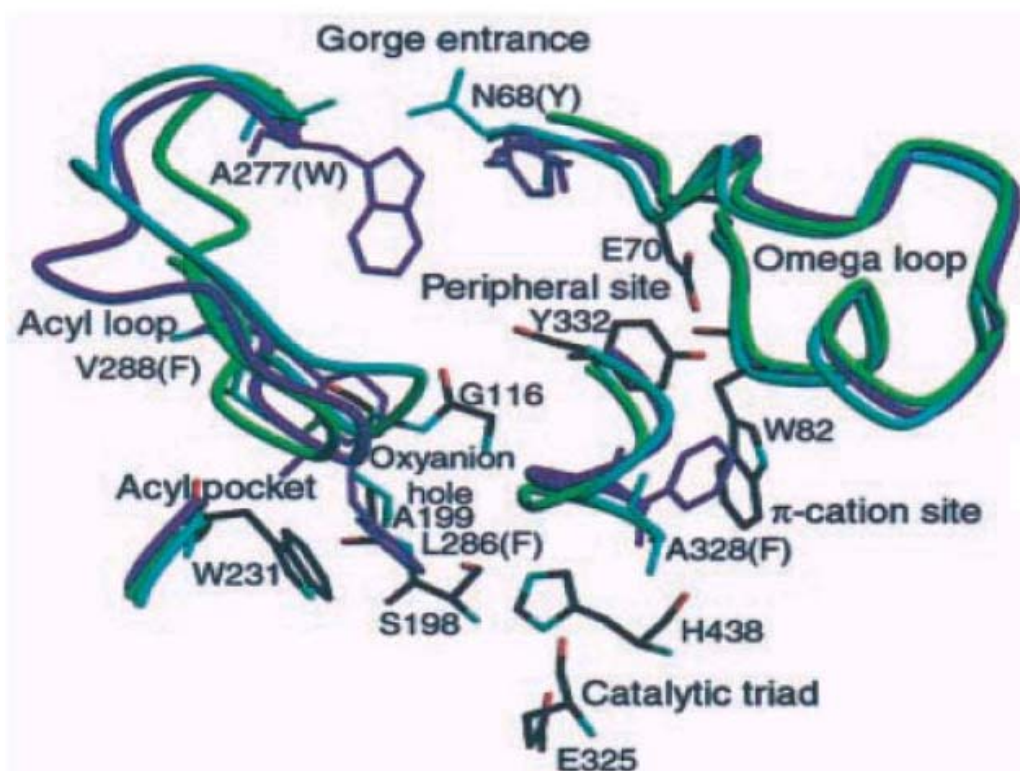
Uma outra nomenclatura proposta por MASSOULIÉ e BON (1982) representa as formas globulares (G) e assimétricas (A) da enzima e o número de subunidades. As formas globulares podem ser solúveis ou ligadas à membrana celular por uma proteína transmembrânica, denominada PRIMA “proline-rich membrane anchor” (PERRIER et al., 2002). A nomenclatura das formas globulares é representada por G1, G2 G3 e G4, respectivamente monômero, dímero, trímero de mobilidade intermediária entre G2 e G4 e o tetrâmero. O complexo formado pelo monômero da BChE mais albumina é representado por G1-ALB. As formas assimétricas (alongadas), representadas pela letra A, são formadas por um a três tetrâmeros (A4, A8, A12) covalentemente associados a uma cauda de colágeno (Col-Q) que os ancora na matriz extra-celular da junção neuro-muscular (KREJCI et al., 1997).

### 2.2.2. ESTRUTURA DA BChE HUMANA

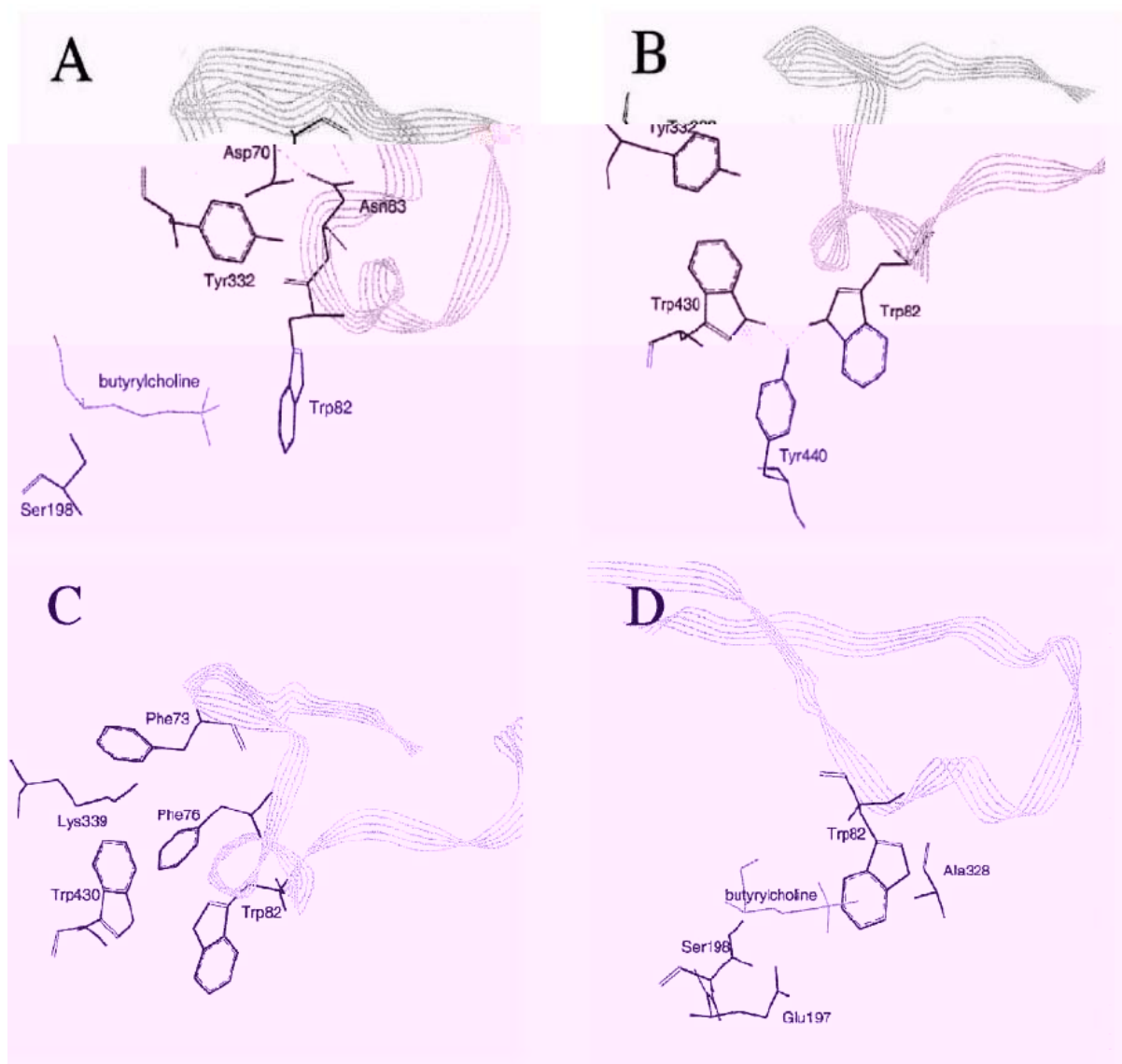
Um modelo tridimensional da BChE humana foi construído por MILLARD e BROOMFIELD (1992) derivado por análise computacional a partir da estrutura cristalográfica da AChE de *Torpedo californica* (TcAChE), que apresenta 53,8% de identidade com a BChE humana (LOCKRIDGE et al., 1987a). A estrutura terciária da BChE é muito similar à AChE, mas a entrada do sulco que leva à triade catalítica (Glu 325, His 438 e Ser 198) do sítio ativo apresenta diferenças. Todos os nove oligossacarídeos conhecidos da BChE ocorrem fora do sulco de entrada do sítio ativo e a maioria está localizada em uma face do monômero.

A estrutura cristalográfica da BChE humana foi determinada por NICOLET et al. (2003) e, de forma geral, ela é bastante similar à estrutura da TcAChE (figura 1). Porém, os resíduos aromáticos encontrados na entrada do sítio ativo da TcAChE foram substituídos, na BChE, por resíduos hidrofóbicos e aqueles no bolso de ligação do grupamento acil (resíduos Phe288 e Phe290) foram substituídos por Leu286 e Val288, respectivamente. Essas mudanças tornam possível a ligação de uma gama maior de substratos na BChE em relação à AChE.

O sítio aniônico periférico da BChE humana está envolvido no mecanismo de ativação de substratos (figura 2). Dois locais de ligação de substrato, Asp70 no sítio aniônico periférico e Trp82 no sítio ativo, são conectados por uma alça ômega ( $\Omega$ ). A ativação do substrato da BChE envolve a participação de diferentes domínios na entrada do sítio ativo da enzima, incluindo o sítio aniônico periférico (Asp70 e Tyr332), o sub-sítio de ligação do sítio ativo (Trp82 e Ala328), o resíduo estabilizador Glu197 e o resíduo Asn83 da alça  $\Omega$  (MASSON et al., 2001).



**Figura 1.** Representação da superposição da BChE (azul claro), TcAChE (azul escuro) e AChE de *Drosophila melanogaster* (verde) na região da entrada do sítio ativo (Fonte: NICOLET et al., 2003).



**Figura 2.** Alça  $\Omega$  da BChE e aminoácidos que interagem com ela. (A) O sítio aniônico periférico da BChE é definido pelos resíduos Asp70 e Tyr332. Ao entrar no canal do sítio ativo, a butiriltocolina liga-se ao sítio aniônico periférico e subsequentemente ao Trp82. A fita é a alça  $\Omega$  formada pelos aminoácidos 65 a 92. Asn83 é ligado por ponte de hidrogênio à Asp70. O sítio ativo é a Ser198 no fundo do túnel. A distância entre o sítio aniônico periférico e o sítio ativo é de cerca de 10 Å. (B) Trp430 interage com Trp82, Tyr332 e Tyr440. (C) Lys339 interage com Phe73 e Phe76 na alça  $\Omega$ . (D) Os resíduos Trp82, Glu197 e Ala328 estão envolvidos na ligação com o substrato (Fonte: MASSON et al., 2001).



### 2.3 GENE *BCHE*

ARPAGAUS et al. (1990) obtiveram evidências sobre a existência de um único gene que codifica a BChE humana, bem como a estrutura deste gene. O gene *BCHE* (3q26.1-q26.2), localizado no braço longo do cromossomo três, tem 64.559 pb até o sítio CA de poliadenilação e é formado por quatro exons com 2.444 pares de bases (Figura 3). Destes, apenas 1.722, o que corresponde a 574 aminoácidos, determinam a estrutura da enzima madura (NCBI, NT\_005612, acessado em 16/07/2005).

O exon 1, com 149 pares de bases, contém as seqüências não traduzidas, e dois sítios potenciais de início de tradução nos códons -69 e -47. O exon 2, com 1.525 pb, contém 83% da seqüência que codifica a proteína madura, incluindo a extremidade N-terminal, o sítio ativo e um possível sítio de início de tradução, no códon -28. O exon 3 contém 167 nucleotídeos, que fazem parte da seqüência que codifica a proteína madura. O exon 4, com 603 pares de base, possui as seqüências que codificam a extremidade C-terminal da proteína e a região 3' não traduzida com dois sinais de poliadenilação. Os três introns também foram identificados, totalizando 62.115 pb. O intron 1 tem 6.272 pb, o intron 2 tem 43.205 pb e o intron 3 tem 12.638 pb (NCBI, NT\_005612, acessado em 16/07/2005).



**Figura 3.** Representação do gene *BCHE* com os quatro exons e seus respectivos pares de bases. A região hachurada corresponde à seqüência que codifica a proteína madura e a região não hachurada do exon 2 corresponde ao peptídeo líder.

O mRNA da BChE possui cerca de 40% de bases G+C, proporção semelhante àquela encontrada para essas bases, no genoma humano total. Porém, quando comparado com o índice de nucleotídeos G+C de genes que codificam proteínas colinérgicas, tais como os receptores muscarínicos e nicotínicos de acetilcolina, em mamíferos e aves, o gene *BCHE* tem um menor conteúdo desses nucleotídeos em relação aos genes dessas outras proteínas (CHATONNET e LOCKRIDGE, 1989). O mRNA da BChE é mais abundante na maioria dos tecidos que o da AChE, exceto no cérebro e músculo onde o mRNA da AChE é mais abundante (LEGAY et al., 1993).

A região promotora e o sítio de início de transcrição do gene *BCHE* foram elucidados por JBILO et al. (1994). Eles analisaram a região regulatória a montante da região codificadora e encontraram um único sítio de início de transcrição, localizado 157 pares de bases a montante da Met<sup>-28</sup>, que corresponde ao sítio de início de tradução. Os autores também identificaram potenciais elementos regulatórios do sítio promotor, incluindo um sítio de ligação para o fator de transcrição (AP1) e múltiplos sítios para Oct-1 (proteína ligadora de octâmero), PEA-3 (elementos que contêm seqüências similares ao sítio de ligação da classe Ets de oncoproteínas) e sítios de ligação de topoisomerase. As seqüências que estão ao redor do sítio de início de transcrição do gene *BCHE* mostraram homologia com elementos iniciadores encontrados em genes sem TATA *Box*, que são regulados durante o desenvolvimento. Como o gene *BCHE* humano não apresenta uma seqüência consenso TATA *box* e, sabendo que na ausência do TATA *box*, a transcrição tem início em um elemento localizado no sítio de início da transcrição chamado iniciador, os autores sugeriram que, no gene *BCHE*, a ativação do elemento de iniciação pode ocorrer através de um fator AP1, pois o plasmídeo pCB58wI, que não continha o sítio AP1, não apresentou atividade de promotor (JBILO et al., 1994).

Existem dois sítios poli A funcionais, sendo provável que um deles determine a forma anfifílica, ainda não encontrada na BChE, mas produzida na AChE por processamento alternativo (JBILO et al., 1994). A região 5' não traduzida apresenta uma estrutura em grampo que vai do nucleotídeo +17 até +39, com 9 bases pareadas e 3 bases não pareadas no topo da estrutura. Estudos em eucariotos mostram que esse tipo de estrutura pode modular a tradução (KOZAK, 1991).

ARPAGAUS et al. (1991) mostraram que há uma grande identidade entre o gene da BChE humana e o de vários outros mamíferos (macaco, vaca, carneiro, porco, cão, coelho e camundongo). A maior identidade da seqüência de aminoácidos foi entre a BChE humana e a de macaco *Rhesus* (100%) e a menor entre a BChE humana e a de camundongos (91,5%). As seqüências em torno do sítio ativo e do sítio aniônico estavam conservadas em todos os animais estudados.

## 2.4 VARIABILIDADE GENÉTICA

A variação genética da BChE é condicionada por alelos de dois locos: *BCHE* e *CHE2*.

### 2.4.1 Loco *CHE2*

HARRIS et al. (1962; 1963), usando eletroforese bidimensional em papel e gel de amido, verificaram a presença de algumas das formas moleculares da BChE. Além das bandas  $C_1$ ,  $C_2$ ,  $C_3$  e  $C_4$ , foi observada uma banda extra, denominada  $C_5$ , em 14 dos 300 indivíduos analisados, representando 4,6% da amostra. A banda  $C_5$  é determinada, tanto pelo loco *BCHE*, como pelo loco *CHE2* (2q33-35; EIBERG et al., 1989). O loco *CHE2* apresenta dois alelos *CHE2*\* $C_5^+$  e *CHE2*\* $C_5^-$  responsáveis, respectivamente, pela presença e ausência da banda  $C_5$ .

HARRIS (1970) relata que os indivíduos *CHE2*\* $C_5^+$  têm atividade média da BChE cerca de 25% superior a dos *CHE2*\* $C_5^-$ . SUGIMORI (1986) mostrou que nos indivíduos *CHE2*\* $C_5^+$  há menor duração da ação da succinilcolina do que nos indivíduos *CHE2*\* $C_5^-$ , que seriam mais sensíveis a esta droga. CHAUTARD-FREIRE-MAIA et al. (1991) encontraram o fenótipo *CHE2*\* $C_5^+$  em amostra da população de Curitiba, com freqüência de 10,3%.

A natureza molecular da banda  $C_5$  não foi completamente elucidada. SCOTT e POWERS (1974) sugerem que a banda  $C_5$  seria um híbrido, formado da associação entre BChE e uma substância desconhecida codificada pelo loco *CHE2*.

A associação do tetrâmero da butirilcolinesterase a uma proteína foi proposta por MASSON (1991), para explicar a formação da banda  $C_5$ . Como a massa molecular

dessa banda (400kDa) é 60kDa maior que a massa molecular de G4 (340kDa), esta diferença pode ser atribuída a essa proteína. Apesar dos resultados obtidos por MASSON (1991) não permitirem identificar a substância codificada pelo loco *CHE2*, várias hipóteses (albumina, imunoglobulina, híbrido de AChE/BChE, colágeno, fibronectina e fosfolípídeo) puderam ser descartadas.

#### **2.4.2 Loco *BCHE***

O uso de succinilcolina, durante a década de 50, como relaxante muscular pré-operatório, possibilitou a descoberta da primeira variante do gene *BCHE*, denominada de atípica. Alguns pacientes, quando submetidos a esse relaxante muscular, apresentavam paralisia muscular e apnéia respiratória prolongada. Essa resposta exagerada deve-se à presença de uma enzima não-usual, que apresenta uma menor eficiência, quando comparada à usual, na hidrólise da succinilcolina em doses fisiológicas.

KALOW e STARON (1957), através de inibição enzimática, puderam identificar alguns alelos do gene *BCHE* e, posteriormente, o seqüenciamento de DNA (ARPAGAUS et al., 1990) vem permitindo a identificação de muitas outras variantes do gene *BCHE*. As mutações do gene *BCHE* já identificadas são apresentadas na tabela 1.

Os diversos alelos já identificados indicam a grande heterogeneidade molecular do gene *BCHE*. A variante atípica, resultante de mutação de GAT para GGT que leva à substituição do ácido aspártico para glicina no aminoácido 70 (Asp70→Gly; *D70G*), tem menor afinidade por ésteres de colina, pois o resíduo Asp70 está em um local onde ocorre a ligação de substrato no sítio aniônico periférico da BChE (MCGUIRE et al., 1989).

Diversas variantes podem apresentar o fenótipo silencioso, por terem atividade enzimática inferior a 10% em relação à enzima usual. Existem, também, polimorfismos descritos fora da região codificadora da enzima madura, como as variantes no sítio -116 no exon 1, que leva à alteração de TGC para TAC, sendo que a frequência da variante -116A observada pelos autores que descreveram a mutação foi igual a 8% (BARTELS et al., 1990). A variante do sítio 1914 também está localizada

fora da região codificadora, 189 bases depois do códon *stop* no exon 4 (BARTELS et al., 1990).

Outras variantes podem estar presentes no plasma em concentrações mais baixas que a usual. A mutação que gera a variante K (*1615A*) leva a uma substituição de Alanina por Treonina (GCA→ACA) e ocorre no nucleotídeo 1615 (BARTELS et al., 1992b), tendo sido associada a 33% menos moléculas circulantes do que a BChE usual (RUBINSTEIN et al., 1978). ALTAMIRANO et al. (2000), entretanto, verificaram que a enzima 1615A não possui atividade da BChE diferente da enzima usual, em relação à afinidade e taxa de catálise do substrato, taxa de secreção da célula e formação dos tetrâmeros.

Nove mutações novas e raras, presentes no exon 2, foram descritas em nosso laboratório: 223G→C (*G75R*); 270A→C (*E90D*); 297T→G (*I99M*); 486T→C (*A162A*); (SOUZA et al., 2005b); 35A→G (*K12R*); 45G→C (*G15G*); 880G→A (*V294M*); 997G→C (*G333C*); 1408C→T (*R470W*); (Mikami, 2004).

**Tabela 1** - Lista de variantes já descritas do gene *BCHE*, incluindo a alteração de nucleotídeo e o nome do alelo.

Alteração de nucleotídeo	Nome <sup>a</sup>	Referência
<b>Exon 1</b>		
-116; G→A		BARTELS et al., 1990
<b>Exon 2</b>		
9-11; CATCAT→CAT	<i>I4del</i>	MAEKAWA et al., 1997
16; ATT→TT	<i>I6fs</i>	BARTELS et al., 1992b; PRIMO-PARMO et al., 1996
35; AAA→AGA	<i>K12R</i>	MIKAMI, 2004
45; GGG→GGC	<i>G15G</i>	MIKAMI, 2004
71; ACG→ATG	<i>T24M</i>	MAEKAWA et al., 1997
82; TTT→ATT	<i>F28I</i>	YEN et al., 2003
98; TAT→TGT	<i>Y33C</i>	PRIMO-PARMO et al., 1996
109; CCT→TCT	<i>P37S</i>	PRIMO-PARMO et al., 1996
208; GAT→CAT	<i>D70H</i>	BOECK et al., 2002
209; GAT→GGT	<i>D70G (A)</i>	MCGUIRE et al., 1989

continua

Alteração de nucleotídeo	Nome <sup>a</sup>	Referência
223; GGC→CGC	<i>G75R</i>	SOUZA et al., 2005b
270; GAA→GAC	<i>E90D</i>	SOUZA et al., 2005b
286; AAT→TAT	<i>N96Y</i>	YEN et al., 2003
297; ATT→ATG	<i>I99M</i>	SOUZA et al., 2005B
298; CCA→TCA	<i>P100S</i>	MAEKAWA et al.; TAKAGI et al.; LU et al., 1997
318; AAT→AAAT	<i>N106fs</i>	YEN et al., 2003; ON-KEI CHAN et al., 2005
344; GGT→GAT	<i>G115D</i>	PRIMO-PARMO et al., 1997
351; GGT→GGAG	<i>G117fs</i>	NOGUEIRA et al., 1990
355; CAA→TAA	<i>Q119X</i>	SUDO et al., 1996
375; TTA→TTT	<i>L125F</i>	PRIMO-PARMO et al., 1996
383; TAT→TGT	<i>Y128C</i>	HIDAKA et al., 1997 <sup>a</sup>
424; GTG→ATG	<i>V142M (H)</i>	JENSEN et al., 1992
486; GCT→GCC	<i>A162A</i>	SOUZA et al., 2005b
510; GAT→GAG	<i>D170E</i>	PRIMO-PARMO et al., 1996
514; CAG→TAG	<i>Q172X</i>	GÄTKE et al., 2001
551; GCC→GTC	<i>A184V (SC)</i>	GREENBERG et al., 1995
592; AGT→GGT	<i>S198G</i>	PRIMO-PARMO et al., 1996
596; GCA→GTA	<i>A199V</i>	SAKAMOTO et al., 1998
601; GCA→ACA	<i>A201T</i>	PRIMO-PARMO et al., 1996
607; TCA→CCA	<i>S203P</i>	HIDAKA et al., 2001
728; ACG→ATG	<i>T243M (F-1)</i>	NOGUEIRA et al., 1992
748; ACT→CCT	<i>T250P</i>	MAEKAWA et al., 1995
765; GAG→GAC	<i>E255D</i>	PRIMO-PARMO et al., 1996
800; AAA→AGA	<i>K267R</i>	MAEKAWA et al., 1997
811; GAA→TAA	<i>E271X</i>	PRIMO-PARMO et al., 1996
880; GTG→ATG	<i>V294M</i>	MIKAMI, 2004
943; ACC→AACC	<i>T315fs</i>	HIDAKA et al., 1992
943; ACC→TCC	<i>T315S</i>	LIU et al., 2002
988; TTA→ATA	<i>L330I</i>	SUDO et al., 1997
997; GGT→TGT	<i>G333C</i>	MIKAMI, 2004
1062 - 1076	<i>K355insALU</i>	MURATANI et al., 1991; MAEKAWA et al., 2004
1093; GGA→CGA	<i>G365R</i>	HIDAKA et al., 1992; HADA et al., 1992
1156; CGT→TGT	<i>R386C</i>	YEN et al., 2003
1169; GGT→GTT	<i>G390V (F-2)</i>	NOGUEIRA et al., 1992
1200; TGC→TGA	<i>C400X</i>	HIDAKA et al., 1997b
1253; TTC→TCC	<i>F418S</i>	MAEKAWA et al., 1995
1270; CGA→TGA	<i>R424X</i>	YEN et al., 2003
1273; TCC→CCC	<i>S425P</i>	GNATT et al., 1990
1294; GAA→TAA	<i>E432X</i>	LEVANO et al., 2005
1303; GGA→AGA	<i>G435R</i>	DEY et al., 1997
1336; TTT→GTT	<i>F446V</i>	DEY et al., 1998
1351; GAA→TAA	<i>E451X</i>	DEY et al., 1998
1378; GAG→AAG	<i>E460K</i>	YEN et al., 2003

continua

Alteração de nucleotídeo	Nome <sup>a</sup>	Referência
1393; AGA→TGA	<i>R465X</i>	MAEKAWA et al., 1995
1408; CGG→TGG	<i>R470W</i>	MIKAMI, 2004
1411; TGG→CGG	<i>W471R</i>	PRIMO-PARMO et al., 1996
1420; TTT→CTT	<i>F474RL</i>	ON-KEI CHAN et al., 2005
<b>Intron 2</b>		
IVS2-8T→G		PRIMO-PARMO et al., 1996
<b>Exon 3</b>		
1490; GAA→GTA	<i>E497V (J)</i>	BARTELS et al., 1992 <sup>a</sup>
1500; TAT→TAA	<i>Y500X</i>	BARTELS et al., 1992b; PRIMO-PARMO et al., 1996
1543; CGT→TGT	<i>R515C</i>	MAEKAWA et al., 1995
1553; CAA→CTA	<i>Q518L</i>	PRIMO-PARMO et al., 1996
<b>Exon 4</b>		
1615; GCA→ACA	<i>A539T (K)</i>	BARTELS et al., 1992b
1914 A→G		BARTELS et al., 1990

<sup>a</sup>: nome comum entre parênteses

Fonte: SOUZA et al. (2005b), com atualizações.

## 2.5. RELAÇÕES DA BChE COM LÍPIDES E LIPOPROTEÍNAS

O desequilíbrio positivo entre a ingestão de alimentos e o gasto de energia leva à estocagem desse excesso em forma de biomoléculas, que serão disponibilizadas ao organismo de acordo com a necessidade fisiológica. A fonte primária de estocagem de energia química são as gorduras neutras, também chamadas de triglicérides, que são lípidos formados por uma molécula de glicerol ligada a três ácidos graxos. Os triglicérides, por serem hidrofóbicos e possuírem uma alta densidade calórica, possibilitam um armazenamento eficiente, sem afetar o equilíbrio osmótico do organismo (ROSENBAUM et al., 1997).

Devido a sua natureza hidrofóbica, os lípidos são transportados no organismo no interior de estruturas hidrofílicas chamadas lipoproteínas, compostas por um núcleo hidrofóbico que contém triglicérides e ésteres de colesterol circundado por uma camada hidrofílica de fosfolípidos, colesterol livre e apoproteína.

As lipoproteínas são classificadas de acordo com sua densidade, composição lipídica e protéica. Quanto à densidade, as lipoproteínas são classificadas como: quilomicrons, que correspondem à lipoproteína menos densa; lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL); lipoproteína de densidade intermediária (IDL); lipoproteína de densidade baixa (LDL); lipoproteína de densidade alta (HDL) e

lipoproteína de densidade muito alta (VHDL). Quanto à composição lipídica, os quilomicrons e as VLDL transportam principalmente triglicérides, de origem exógena (proveniente da alimentação) e endógena, respectivamente; as LDL transportam principalmente ésteres de colesterol que, quando em excesso, podem se depositar nas membranas do endotélio; a HDL é responsável pelo transporte do colesterol endógeno ao fígado e as VHDL são complexos de ácidos graxos livres e albumina ou fosfolípidos e albumina. Quanto à composição protéica, as lipoproteínas são divididas em seis classes de apoproteínas (A-F), algumas preferencialmente encontradas em determinado tipo de lipoproteína, como a A-I encontrada nas HDL e a B100 nas LDL.

LAWRENCE e MELNICK (1961) sugeriram a formação de um complexo entre a LDL e a BChE que seria mantido por ligação física, uma vez que é desfeito por métodos físicos. Os autores encontraram traços de atividade da BChE nessa lipoproteína e observaram que, após o tratamento do soro com ultrassom, ocorria um aumento nessa atividade, indicando que o complexo LDL/BChE seria desfeito por oscilação sônica.

CUCUIANU et al. (1968) examinaram amostras quanto ao nível de colesterol, triglicérides e atividade da BChE. As amostras foram separadas em quatro grupos, um grupo controle com nível de lípidos e peso normal, um grupo de obesos com nível de lípidos normal, um grupo controle hiperlipêmico com peso normal e um grupo de obesos hiperlipêmicos. Os autores observaram um significativo aumento na atividade da BChE nos grupos não-controle. Ao analisarem grupos com um mesmo nível de lípidos, notaram que ocorria um aumento na atividade da BChE em indivíduos obesos.

KUTTY et al. (1973) observaram, em coelhos tratados com endotoxina de *Escherichia coli*, que causa hiperlipidemia, um aumento na atividade da BChE, bem como na concentração de VLDL após 24 horas de tratamento. Verificaram que, entre 48 e 72 horas após o tratamento, houve uma redução da VLDL e da BChE e um simultâneo aumento de LDL e HDL. Os autores propuseram que a LDL seria formada pela ligação de uma pré-LDL à BChE.

Ao analisarem a atividade da BChE em um paciente intoxicado pelo organofosforado paration (o, o - dietil o (p - nitrofenil) fosforotioato), KUTTY et al. (1975) verificaram uma redução na atividade dessa enzima, bem como na



concentração da LDL. Os níveis da enzima e da lipoproteína voltaram ao normal com a recuperação clínica do paciente. Ao tratarem cobaias com o organofosforado iodeto de fosfolina, os autores obtiveram os mesmos resultados, quanto à atividade enzimática e o nível de LDL, sugerindo que a baixa concentração da lipoproteína seria devida ao decréscimo da atividade da BChE.

KUTTY et al. (1977) verificaram, em precipitados de lipoproteína beta (LDL), que a atividade da BChE era proporcional à concentração da LDL observada no soro. Observaram, também, que camundongos tratados com um inibidor da BChE (neostigmina) apresentavam significativo decréscimo na síntese de lipoproteína beta no soro e um aumento na síntese de lipoproteína alfa (HDL).

Cobaias com diabetes induzida foram submetidas a um inibidor não tóxico da BChE (ISO-OMPA) e apresentaram uma redução nos níveis de triglicérides no soro e fígado, bem como de VLDL no soro, sugerindo que a BChE possui um papel no metabolismo das lipoproteínas de densidade muito baixa (KUTTY e PAYNE, 1994).

Amostras de pacientes com hiperlipidemia tipo II-b, detectada pelo aumento de LDL e VLDL, apresentaram um aumento na atividade da BChE quando comparado com o grupo controle, sugerindo uma possível associação entre o metabolismo anormal de lípidos e atividade da BChE (KÁLMÁN et al., 2004).

## **2.6 BCHE E VARIÁVEIS ASSOCIADAS AO PESO E IMC**

Um dos métodos sugeridos pela Organização Mundial de Saúde, utilizado como classificatório para categorias de peso corporal, é o Índice de Massa Corporal (IMC), calculado como a razão entre o peso em quilogramas e o quadrado da altura em metros. Os valores de IMC e as respectivas categorias de peso podem ser observados na tabela 2. Embora o IMC permita uma avaliação prática das categorias de peso corporal, os valores desse índice podem não corresponder ao mesmo grau de gordura em populações diferentes. Estudos da Organização Mundial de Saúde mostraram que as categorias de peso acima do normal ocorriam para valores mais baixos de IMC em populações de origem asiática (WHO - WESTERN PACIFIC REGION, 2000). A altura

também afeta os valores de IMC fornecendo índices distorcidos para indivíduos muito altos ou muito baixos.

A herdabilidade do peso (PLOMIN et al., 1997 apud TRACEY et al., 2001) e do IMC (MAES et al., 1997) foi estimada em pares de gêmeos. Os autores observaram que os fatores genéticos explicam cerca de 50 a 90% da variância do IMC em gêmeos, sendo geralmente mais alta que a herdabilidade obtida em estudos com outros consangüíneos (20% – 80%) e em casos de adoção (20% – 60%). Além disso, estudos com gêmeos e em casos de adoção levaram à conclusão de que a maior parte da variância do peso é devida a fatores genéticos (PLOMIN et al., 1997 apud TRACEY et al., 2001).

**Tabela 2** - Valores do índice de massa corporal (IMC) e suas respectivas categorias de peso.

Fonte: WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1995.

amostra da população de Curitiba, uma média de peso significativamente inferior em indivíduos CHE2 C5+, quando comparados a seus controles CHE2 C5-. Resultados semelhantes foram observados por ALCÂNTARA et al. (2001), que encontraram média de IMC mais baixa em indivíduos de fenótipo CHE2 C5+, em relação a seus controles CHE2 C5-. Além disso, FURTADO (2005) encontrou frequência significativamente menor do fenótipo CHE2 C5+ em obesos do que em seus controles com IMC normal. CHAUTARD-FREIRE-MAIA et al. (1990) observaram a existência de correlação positiva entre a atividade da BChE e peso em indivíduos do fenótipo CHE2 C5-. ALCÂNTARA et al. (2002) observaram que a atividade da BChE estava positivamente correlacionada com idade, IMC, hipertensão e diabetes mellitus do tipo 2, assim como com os níveis de triglicérides, colesterol total, LDL e apolipoproteínas.

SOUZA et al. (2005a) analisaram a possível influência da variabilidade do exon 4 do gene *BCHE* sobre o IMC em doadores de sangue de Curitiba. Foi encontrada variância de IMC significativamente maior no grupo *1615GA* (N = 222) em relação ao grupo controle *1615GG* (N = 222). Usando a amostra populacional de 923 doadores de sangue, na qual constam esses 444 indivíduos, esses autores classificaram-na em dois grupos quanto ao IMC – extremo (IMC  $\geq 30$  e IMC  $< 20$ ) e não extremo – e mostraram que os genótipos não estavam distribuídos igualmente nesses dois grupos principalmente pela frequência do genótipo *1615GA* (38,3%) ser significativamente maior no grupo extremo, em relação ao não extremo (27,5%).

## **2.7 BChE E VARIÁVEIS ASSOCIADAS A OBESIDADE**

A obesidade tem sido definida como excesso de acúmulo de gordura nas células do tecido adiposo, como resultado de um desequilíbrio entre ingestão alimentar e gasto de energia (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1995 e 1997). Ela atinge proporções epidêmicas globais, com mais de um bilhão de adultos com sobrepeso, sendo aproximadamente 300 milhões clinicamente obesos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003).

Segundo a Pesquisa de Orçamentos Familiares, realizada em 2002 e 2003 pelo IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), estima-se que cerca de 40% dos indivíduos adultos do país apresentem excesso de peso, ou seja, IMC igual ou maior

do que 25, não havendo diferença significativa entre homens e mulheres. A obesidade, caracterizada por IMC igual ou superior a 30, afeta 8,9% dos homens adultos e 13,1% das mulheres adultas do país. Indivíduos obesos ou com sobrepeso têm maior risco de apresentarem doenças crônicas, incluindo diabetes mellitus tipo 2, doenças cardiovasculares, hipertensão, doença arterial coronariana, osteoartrose (uma das causas principais de invalidez em adultos) e certas formas de câncer, como de mama, de cólon, de rim e de vesícula (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003).

A obesidade é uma doença complexa, de caráter multifatorial. Os genes de predisposição a esta doença interagem entre si e com o ambiente de diferentes formas, levando a um fenótipo de obesidade. Os mecanismos fisiológicos, que regulam a ingestão alimentar e o gasto de energia, buscam manter o volume de massa adiposa relativamente estável. Entretanto, esses mecanismos parecem agir mais eficientemente no sentido positivo, fazendo com que o volume de massa adiposa seja facilmente excedido. Deste modo, os mecanismos que previnem a perda de peso seriam mais eficientes, do que aqueles que previnem o ganho excessivo de peso. Essas considerações podem ser relacionadas à teoria proposta por NEEL (1962), denominada de genótipo frugal (*thrifty genotype*), segundo a qual, os alelos que promoviam maior estocagem de energia foram selecionados favoravelmente, uma vez que contribuía para aumentar a sobrevivência dos indivíduos em tempos de escassez de alimentos.

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

FURTADO (2005) investigou em amostra de obesos (IMC  $\geq$  30) e controles de peso normal ( $20 \leq$  IMC  $<$  25) a presença do polimorfismo G→A na posição nt -116 no exon 1 do gene *BCHE*. Este estudo foi o primeiro relato da presença desse polimorfismo, originalmente identificado por BARTELS et al. (1990), na população

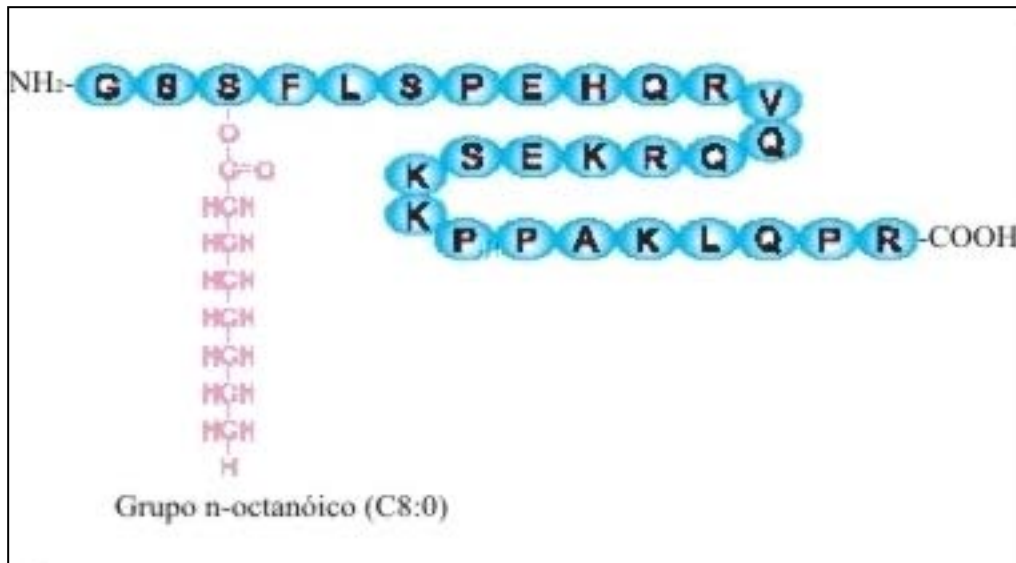
brasileira. A autora não verificou diferenças significativas entre as amostras de obesos e controles quanto às frequências do alelo *-116A*.

Neste mesmo trabalho, FURTADO (2005) determinou a atividade da BChE em obesos classificados de acordo com o genótipo relativo aos alelos *-116A* e *-116G* do exon 1, e constatou que a mutação *-116A* está associada a uma diminuição da atividade da BChE. A autora também realizou análises levando em conta as mutações *-116A* e *1615A*, visto que estão em desequilíbrio de ligação (BARTELS et al., 1990). Foi observado que a atividade da BChE era menor somente nos indivíduos portadores da mutação *-116A*, pois não foi verificada diminuição da atividade enzimática nos indivíduos portadores apenas da mutação *1615A*.

## **2.8. BChE E GRELINA DESACILADA**

A grelina (*ghre* da raiz Proto-Indo-Européia; *grow*, que significa crescer), é um hormônio peptídico produzido principalmente por células da submucosa do estômago, formado por 28 aminoácidos e um ácido n-octanóico na Ser3 (Figura 4). É um ligante endógeno do receptor secretagogo do hormônio do crescimento (GHS-R), isto é, que estimula a secreção do hormônio de crescimento (KOJIMA et al., 2001).

Duas formas principais de grelina circulante foram evidenciadas por HOSODA et al. (2000). Grelina, que contém o ácido n-octanóico na Ser3, o que permite sua ligação ao receptor GHS-R e a consequente secreção de hormônio de crescimento, e a des-n-octanoil-grelina que é incapaz de se ligar ao receptor GHS-R e realizar sua função endócrina. DE VRIESE et al. (2004) realizaram experimentos que permitiram inferir que a BChE purificada é capaz de hidrolisar a grelina, retirando o ácido n-octanóico e inativando-a.



**Figura 4.** Representação esquemática da estrutura da grelina humana, mostrando os 28 aminoácidos e o ácido n-octanóico na Ser3 (Fonte: KOJIMA et al., 2005).

O gene que codifica a grelina humana contém cinco éxons. (TANAKA et al., 2001). O primeiro e mais curto contém apenas 20 pb, e codifica parte da região 5' não traduzida (5' UTR). Os éxons 2 e 3 codificam o peptídeo de 28 aminoácidos.

Ao analisarem o gene da grelina (*GHRL*; 3p26-p25), UKKOLA et al. (2001) encontraram associação entre uma mutação que leva à mudança do aminoácido 51 (Arg51Gln) e obesidade em mulheres. KORBONITS et al. (2002) observaram em crianças altas e obesas, que uma mutação no códon do aminoácido 72 (Leu72Met), um dos dez SNPs encontrados, apresentava uma significativa associação com um IMC maior.

TSCHÖP et al. (2000) investigaram o efeito da administração periférica e diária de grelina em camundongos e ratos, e observaram ganho de peso devido à redução do uso de gorduras pelo organismo. Os autores também analisaram o efeito de injeções intracerebroventriculares desse hormônio e observaram que a concentração de grelina no soro desses camundongos aumentava durante o jejum e diminuía após a alimentação, propondo que além da regulação da secreção do hormônio de

crescimento, a grelina sinaliza ao hipotálamo que um aumento na eficiência metabólica é necessária.

TSCHÖP et al. (2001) investigaram, em amostras de indivíduos em jejum, um possível envolvimento da grelina na patogênese da obesidade humana. Os autores observaram que os níveis desse hormônio eram inversamente proporcionais ao IMC e mais baixos em indivíduos obesos que em indivíduos de peso normal, propondo que a diminuição dos níveis plasmáticos da grelina, observada em obesos, seria uma adaptação fisiológica ao balanço energético positivo associado à obesidade.

A relação entre BChE e grelina desacetilada podem explicar o fato do fenótipo CHE2 C5+ apresentar médias de peso e IMC inferiores ao do fenótipo CHE2 C5-, pois apresenta, em média, cerca de 25% mais atividade da BChE do que este último.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar, em amostra selecionada ao acaso quanto ao índice de massa corporal (IMC), a possível influência das mutações *-116A* do exon 1 e *1615A* do exon 4 do gene *BCHE* sobre o peso, a altura e o IMC.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Genotipar o sítio *-116* no exon 1 do gene *BCHE*, em 484 amostras de doadores de sangue de Curitiba, previamente genotipadas para a mutação *1615A* em trabalho anterior (SOUZA et al., 2005a).
2. Analisar a influência da variação presente no sítio *-116* do gene *BCHE* na variância do IMC.
3. Examinar a atividade da BChE em amostras de plasma, tipadas para os exons 1 e 4 do gene *BChE*, e relacioná-la aos diferentes genótipos e às variáveis antropométricas (peso, altura e IMC).



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 NOMENCLATURA

O presente trabalho utilizou a nomenclatura proposta por DUNNEN e ANTONARAKIS (2000 e 2001) para mutações originadas de substituições de um único nucleotídeo. Os genótipos foram representados em itálico da seguinte forma: o número do nucleotídeo onde ocorre a mutação é seguido dos símbolos que representam os nucleotídeos que o indivíduo apresenta nessa posição, por exemplo *-116GA*. Quando o genótipo considerava 2 sítios diferentes, o símbolo “;” foi utilizado entre esses sítios, por exemplo *-116GA; 1615GA*.

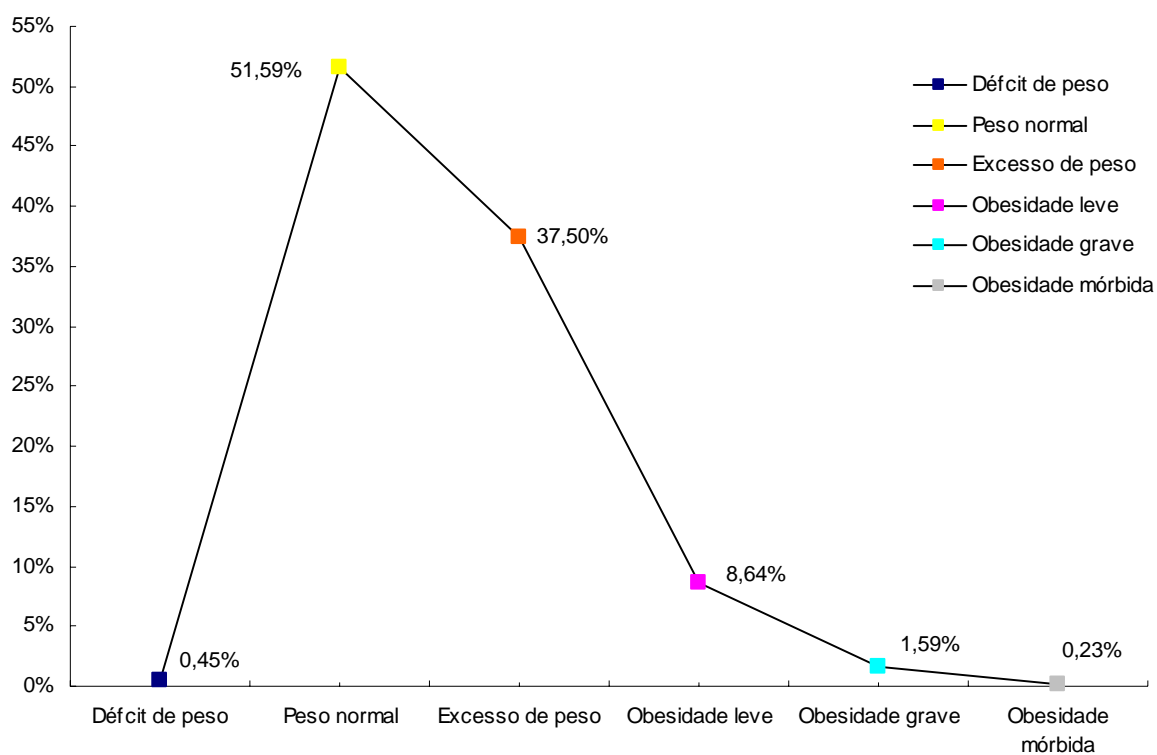
### 4.2 AMOSTRA

SOUZA et al. (2005a) genotiparam 944 doadores de sangue do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (HEMEPAR) para o nucleotídeo 1615, do exon 4 do gene *BCHE*. Desses doadores de sangue, selecionados ao acaso quanto ao IMC, esses autores excluíram aqueles com falta de informação para as variáveis de interesse (sexo, idade, peso, altura e etnia) e escolheram 222 *1615GA* e 23 *1615AA*, pareados por sexo, idade, etnia e período de coleta da amostra com 245 controles *1615GG*. No presente trabalho, foram utilizadas 484 dessas 490 amostras de DNA que estavam estocadas em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ , sendo 220 heterozigotos *1615GA* e seus 220 controles homozigotos *1615GG*; 22 homozigotos *1615AA* e seus 22 controles homozigotos *1615GG*, pareados por sexo, etnia e período de coleta da amostra.

A amostra total inclui homens (83,5%) e mulheres (16,5%), sendo 96% euro-brasileiros e 4% afro-brasileiros. As proporções de categorias de peso nessa amostra podem ser observadas na figura 5.

Para as análises de atividade enzimática da butirilcolinesterase foram utilizados os plasmas de 204 amostras das 484 genotipadas para o sítio -116 do exon 1. As amostras foram selecionadas pela proximidade da data de coleta com a da amostra controle, permitindo-se até quatro meses de diferença.

Em vista do pequeno número de indivíduos com o genótipo *1615AA* (N=22), esse genótipo só foi utilizado para se conhecer suas proporções em relação às variações do sítio -116 e também para se conhecer seus parâmetros quanto à distribuição de atividade da BChE.



**Figura 5.** Percentagem de indivíduos, por categoria de IMC de acordo com a OMS, na amostra de 440 doadores de sangue.

## 4.3 METODOLOGIA

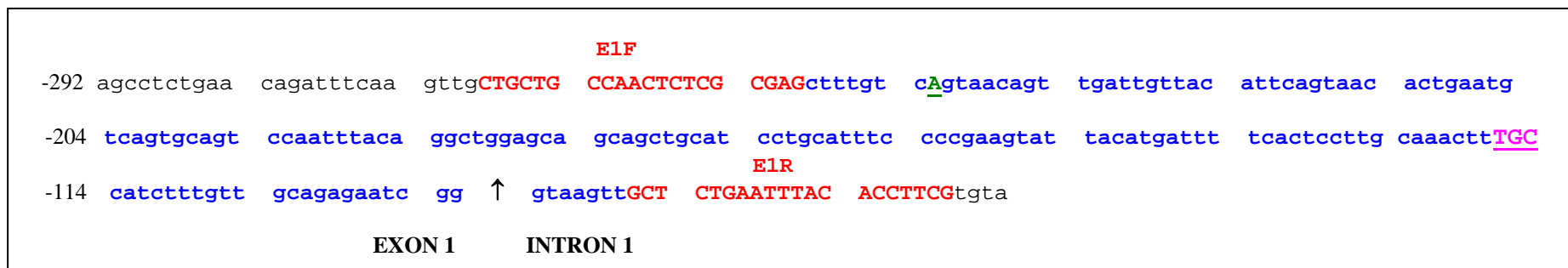
### 4.3.1 Aspectos Gerais

As análises realizadas nesse estudo utilizaram amostras de sangue periférico coletadas com EDTA. A extração do DNA foi realizada conforme metodologia de LAHIRI E NURNBERGER (1991).

### 4.3.2 PCR-SSCA do Exon 1

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

O par de iniciadores utilizado para o exon 1 (FURTADO, 2005) é E1F (5'CTG CTG CCA ACT CTC GCG AG 3') e E1R (3'CGA AGG TGT AAA TTC AGA GC 5'). A figura 6 é uma representação esquemática, indicando a posição do par de iniciadores utilizados. Foi utilizada uma amostra de 1 µL (100 ng) de DNA genômico purificado, misturada a 9 µL de Supermix (Invitrogen) e a 10 pmoles de cada iniciador. Os ciclos foram programados do seguinte modo para o MJ Research PTC-100: 1) 80°C /min.; 2) 94°C /min.; 3) 48°C /min.; 4) 72°C /min.; 5) repetir por 35 vezes do passo 2 ao 4; 6) 72°C /10 min. Após a amplificação, 5 µL do produto foram misturados a 6 µL de corante SSCA (4,75 mL de formamida, 0,0125 g de xilenocianol, 0,0125 g de azul de bromofenol, 125 µL de EDTA - 0,4 M -, 16,7 µL de NaOH 3 M e 108,3 µL de água bidestilada) e depois mantidos a 94°C por 5 minutos. Após a desnaturação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida nas seguintes condições: concentração da solução estoque de poliacrilamida: 50%, concentração de acrilamida mais bisacrilamida: 10%, volume final da solução: 30ml e tampão do gel: TBE 1X.



**Figura 6.** Representação do final da região regulatória do gene *BCHE*, exon 1 e início do intron 1. A numeração utilizada para os nucleotídeos (coluna da esquerda) está de acordo com aquela proposta por ARPAGAUS et al. (1990). A região de hibridação dos iniciadores utilizados nesse estudo, bem como o fragmento que é amplificado, estão representados em vermelho e azul, respectivamente. Em verde está indicado o sitio de início da transcrição (início do exon 1). Em lilás está representado o códon onde ocorre a variante *-116A*, determinada pela alteração de TGC para TAC. A seta indica o final do exon 1 e o início do intron 1.

A solução estoque de poliacrilamida (50%) utilizada contém 49 g de acrilamida, 1 g de bisacrilamida, 5 mL de glicerol (100%) e água bidestilada em quantidade suficiente para completar 100 mL. O gel foi preparado com TBE 1x (diluído a partir de TBE 5x: 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 também é TBE 1x.

Cada corrida eletroforética foi realizada em duas etapas. A primeira etapa corresponde a pré-corrída, onde durante uma hora o gel, ainda sem amostras, é submetido a uma corrente elétrica de 250V. Na segunda fase as amostras são aplicadas ao gel que é então mantido por 22 horas a 100V.

A revelação do gel (BUDOWLE et al., 1991) é realizada em etapas, durante as quais o gel deve ser mantido em agitação. Após a eletroforese, o gel deve ser colocado em um recipiente não metálico e imerso em solução aquosa de ácido nítrico (1 %) durante três minutos. Após duas lavagens com água destilada, o gel é imerso em solução aquosa de nitrato de prata (0,2%) e aquecido por 20 segundos no micro-ondas. Depois de duas novas lavagens com água destilada, o gel é imerso em 60 mL de solução reveladora (170 mL de solução aquosa de carbonato de sódio 2,96 % e 92 µL de formaldeído) até que o líquido escureça. Depois da retirada do líquido escurecido, deve ser acrescentado o restante da solução reveladora e o gel mantido imerso até que as bandas de DNA apareçam no gel.

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 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 aquosa de metanol (30 %) e glicerol (5 %) e colocado sobre papel celofane, previamente embebido na mesma solução. O gel, depois de completamente seco, pode ser guardado, por tempo indeterminado, sem que ocorra perda de coloração.

### 4.3.3 Medida de Atividade Enzimática

Foi utilizada a técnica de DIETZ et al (1972), modificada por EVANS e WROE (1978) para a determinação da atividade da BChE. O material utilizado foi o plasma que estava estocado por 10 a 11 anos. Antes de iniciar a técnica, esse material foi centrifugado com o uso do botão *spin*, por quatro segundos, sendo coletado apenas o sobrenadante.

O princípio dessa técnica é a hidrólise da propioniltiocolina pela butirilcolinesterase, produzindo ácido propiônico e tiocolina, a qual reage com o DTNB (ácido 5,5' ditiobis-2-nitrobenzóico), gerando um produto 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 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> anidro (PM = 141,96) em 1000 mL de água destilada. A solução “b” contém 13,61 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> anidro (PM = 136,09) em 1000 mL de água destilada.

O DTNB (0,423 mM) é dissolvido em tampão fosfato na proporção de 167g por 1000 mL. O substrato (propioniltiocolina 100 mM) é preparado com 303 mg de iodeto de propioniltiocolina (PM = 303,2) em 10 mL de água destilada.

Os tubos contendo 2,2 mL de tampão-DTNB, e 250 µL do plasma diluído (5 mL de água destilada para 50 µL de plasma) foram mantidos por vinte minutos no banho-maria a 25°C antes da leitura em espectrofotômetro. Após os vinte minutos, foram adicionados 50 µL de substrato e iniciada a leitura. A primeira leitura, chamada A0, foi efetuada imediatamente após a colocação dos reagentes na cubeta termostaticada do espectrofotômetro. As leituras A1, A2 e A3 foram efetuadas com um, dois e três minutos a partir da leitura A0. Após as quatro leituras, foi calculado o Δ/minuto (variação média de absorbância por minuto). Para a obtenção da atividade (KU/L), Δ/minuto é multiplicado pelo fator 73,53 e por 1.000.

#### 4.3.4 Análise Estatística

Os cálculos estatísticos foram realizados utilizando-se o programa Statistica para Windows (STATSOFT, Inc., 1996). Através desse programa de computador foram calculados os valores de  $\chi^2$  para as comparações das distribuições de sexo e etnia, bem como as médias de idade e suas comparações por teste t. Além disso, para as variáveis antropométricas (peso, altura e IMC), foram calculadas as médias e variâncias, que foram comparadas entre os grupos genotípicos por testes t e F, respectivamente. Os cálculos de correlação entre a atividade da BChE e peso e entre atividade da BChE e IMC também foram realizados através do programa Statistica. O coeficiente de variação (CV) da distribuição de cada variável antropométrica foi calculado pela fórmula:  $CV = \text{desvio padrão}/\text{média}$ . O programa ANOVA foi utilizado para comparações das médias de atividade da BChE entre diferentes genótipos. Esse programa testa diferenças entre médias comparando a variância devida à variação entre os grupos com a variância devida à variação dentro dos grupos.

Os histogramas de distribuição das variáveis antropométricas foram construídos utilizando-se a ferramenta “Gráficos” do programa Microsoft Excel.

O programa CLUMP (SHAM e CURTIS, 1995) foi utilizado para comparar frequências, quando o número de classes era maior que dois. Esse programa dá resultado igual ao do  $\chi^2$ , sendo que não há necessidade de utilizar a correção de Yates, quando o esperado é menor que 5. Nesse programa, o nível de significância é primeiramente obtido dos dados reais e, em seguida, um grande número de tabelas, 1000, no caso do presente estudo, com os mesmos totais marginais dos dados reais são geradas por simulação de Monte Carlo na base da hipótese nula de que casos e controles possuem a mesma distribuição de frequência. O valor da estatística dado por cada tabela é calculado e uma estimativa empírica do valor de  $p$  é a proporção de tabelas simuladas com uma estatística maior ou igual à obtida com os dados reais. A significância das análises realizadas se dá quando o valor de  $p$  é  $\leq 0,05$ .

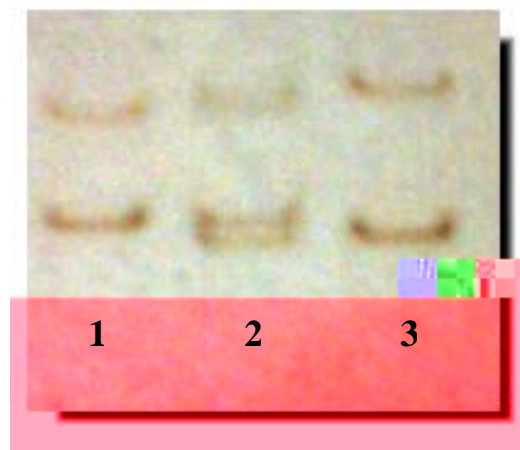
## 5 RESULTADOS

### 5.1 DISTRIBUIÇÕES GENOTÍPICAS

#### 5.1.1. EXON 1 DO GENE *BCHE*

Toda a amostra foi genotipada, mediante PCR-SSCA, para o sítio -116 do exon 1 do gene *BCHE* quanto às variantes -116G e -116A. Foram utilizadas amostras seqüenciadas, do trabalho de FURTADO (2005), como amostras controle para identificação dos genótipos -116GG, -116GA e -116AA nas placas de gel de poliacrilamida.

Foram observados 375 homozigotos -116GG, 108 heterozigotos -116GA e um homozigoto -116AA. A figura 7 mostra a reprodução de uma placa de gel de poliacrilamida, submetida à eletroforese, permitindo a identificação dos genótipos do fragmento amplificado.



**Figura 7.** Reprodução de uma placa de gel de poliacrilamida submetida à eletroforese, contendo os fragmentos do exon 1, amplificados pelos iniciadores E1F e E1R. A amostra 1 é -116AA, a amostra 2 -116GA e a amostra 3 -116GG.



### 5.1.2 EXONS 1 E 4 DO GENE *BCHE*

As frequências dos indivíduos classificados de acordo com os genótipos da posição nt -116, nas classes genóticas *1615GA*, *1615GG* e *1615AA* do exon 4, anteriormente tipadas (SOUZA et al., 2005a), podem ser observadas na tabela 3.

**Tabela 3.** Número e frequência (%  $\pm$  EP) dos indivíduos *-116GG*, *-116GA* e *-116AA* do exon 1, nas amostras genotipadas quanto ao exon 4 como *1615GA* e *1615AA* e seus respectivos controles *1615GG*.

Exon 4	Exon 1						Total
	<i>-116GG</i>		<i>-116GA</i>		<i>-116AA</i>		
	N	% $\pm$ EP	N	% $\pm$ EP	N	% $\pm$ EP	
<i>1615GA</i>	129	58,6 $\pm$ 3,3	91	41,4 $\pm$ 3,3	0	0	220
Controle <i>1615GG</i> <sup>1</sup>	218	99,1 $\pm$ 0,6	02	0,9 $\pm$ 0,6	0	0	220
Total	347	78,9 $\pm$ 1,9	93	21,1 $\pm$ 1,9	0	0	440
<i>1615AA</i>	6	27,3 $\pm$ 9,5	15	68,2 $\pm$ 9,9	1	4,5 $\pm$ 4,4	22
Controle <i>1615GG</i> <sup>1</sup>	22	100,0 $\pm$ 0	0	0	0	0	22
Total	28	63,6 $\pm$ 7,2	15	34,1 $\pm$ 7,1	1	2,3 $\pm$ 2,2	44

1: Controles pareados por sexo, idade, etnia e período de coleta da amostra.

A tabela 4 apresenta o número e a frequência de homens e mulheres e as comparações das distribuições de sexo entre os grupos genóticos que serão comparados em relação às variáveis antropométricas. As distribuições quanto à etnia são mostradas na tabela 5, junto com as comparações dessas distribuições entre os grupos genóticos de interesse. Os valores de t (p), para comparações entre médias de idade de indivíduos classificados quanto aos genótipos de interesse, são apresentados na tabela 6. Nenhum dos resultados dos testes estatísticos, apresentados nas tabelas 4, 5 e 6, mostrou diferença estatisticamente significativa entre os genótipos comparados.

**Tabela 4.** Comparações das distribuições de sexo entre os grupos genotípicos que serão comparados em relação às variáveis antropométricas.

Genótipos	Sexo				Total	$\chi^2$ (p)
	Masculino		Feminino			
Exon 1; Exon 4	N	% $\pm$ EP	N	% $\pm$ EP		
<i>-116GG; 1615GA</i>	111	86,0 $\pm$ 3,0	18	14,0 $\pm$ 3,0	129	1,32 (0,25)
<i>-116GA; 1615GA</i>	73	80,2 $\pm$ 4,2	18	19,8 $\pm$ 4,2	91	
<i>-116GA; 1615GA</i>	73	80,2 $\pm$ 4,2	18	19,8 $\pm$ 4,2	91	0,63 (0,42)
<i>-116GG; 1615GG</i>	183	83,9 $\pm$ 2,5	35	16,1 $\pm$ 2,5	218	
<i>-116GG; 1615GA</i>	111	86,0 $\pm$ 3,0	18	14,0 $\pm$ 3,0	129	0,28 (0,60)
<i>-116GG; 1615GG</i>	183	84,0 $\pm$ 2,5	35	16,0 $\pm$ 2,5	218	

**Tabela 5.** Comparações das distribuições de etnia entre os grupos genotípicos que serão comparados em relação às variáveis antropométricas.

Genótipos	Etnia				Total <sup>1</sup>	$\chi^2$ (p)
	Euro-brasileiros		Afro-brasileiros			
Exon 1; Exon 4	N	% $\pm$ EP	N	% $\pm$ EP		
<i>-116GG; 1615GA</i>	119	93,7 $\pm$ 2,2	8	6,3 $\pm$ 2,2	127	1,99 (0,16)
<i>-116GA; 1615GA</i>	88	97,8 $\pm$ 1,5	2	2,2 $\pm$ 1,5	90	
<i>-116GA; 1615GA</i>	88	97,8 $\pm$ 1,5	2	2,2 $\pm$ 1,5	90	0,67 (0,41)
<i>-116GG; 1615GG</i>	209	95,9 $\pm$ 1,3	9	4,1 $\pm$ 1,3	218	
<i>-116GG; 1615GA</i>	119	93,7 $\pm$ 2,2	8	6,3 $\pm$ 2,2	127	0,81 (0,36)
<i>-116GG; 1615GG</i>	209	95,9 $\pm$ 1,3	9	4,1 $\pm$ 1,3	218	

<sup>1</sup>Foram excluídas 3 amostras, pois não possuíam informação sobre etnia.

**Tabela 6.** Comparações das médias de idade entre grupos genotípicos que serão comparados em relação às variáveis antropométricas.

Genótipos	Idade		
	N	Média ± EP	t (p)
Exon 1; Exon 4			
<i>-116GG; 1615GA</i>	129	31,7 ± 0,9	0,27 (0,78)
<i>-116GA; 1615GA</i>	91	31,3 ± 1,2	
<i>-116GA; 1615GA</i>	91	31,3 ± 1,2	0,10 (0,92)
<i>-116GG; 1615GG</i>	218	31,4 ± 0,7	
<i>-116GG; 1615GA</i>	129	31,7 ± 0,9	0,23 (0,82)
<i>-116GG; 1615GG</i>	218	31,4 ± 0,7	

## 5.2. VARIANTES DOS SÍTIOS -116 E 1615 DO GENE *BCHE* E PESO

As médias, variâncias, amplitudes de variação e coeficientes de variação de peso foram estimadas em genótipos determinados quanto aos exons 1 e 4 do gene *BCHE* e podem ser observados na tabela 7. Nas análises subseqüentes foram consideradas apenas três classes genótípicas, uma vez que a classe *-116GA; 1615GG* ficou representada por apenas dois indivíduos.

As três classes genótípicas foram comparadas entre elas, quanto à média e à variância de peso. Foi observado que não houve diferença significativa com relação à média, porém, a variância foi significativamente maior na classe genotípica *-116GA; 1615GA*, quando comparada com as classes *-116GG; 1615GG* e *-116GG; 1615GA*, conforme apresentado no rodapé da tabela 7. As distribuições de peso nos três genótipos considerados podem ser observadas na figura 8.

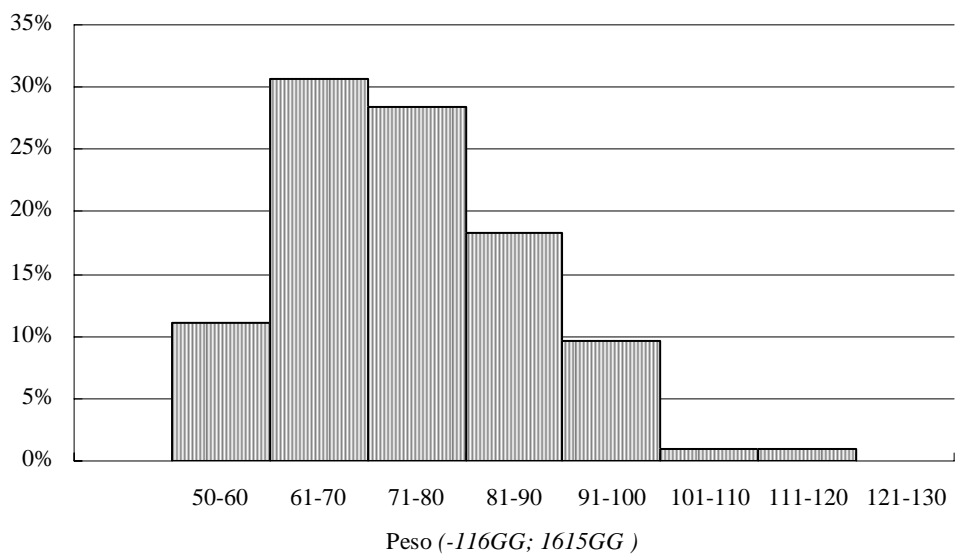
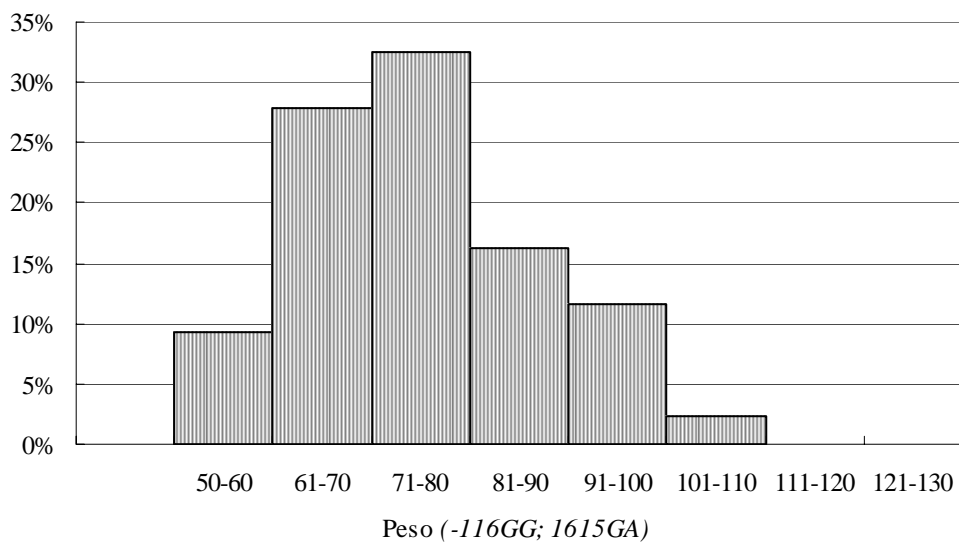
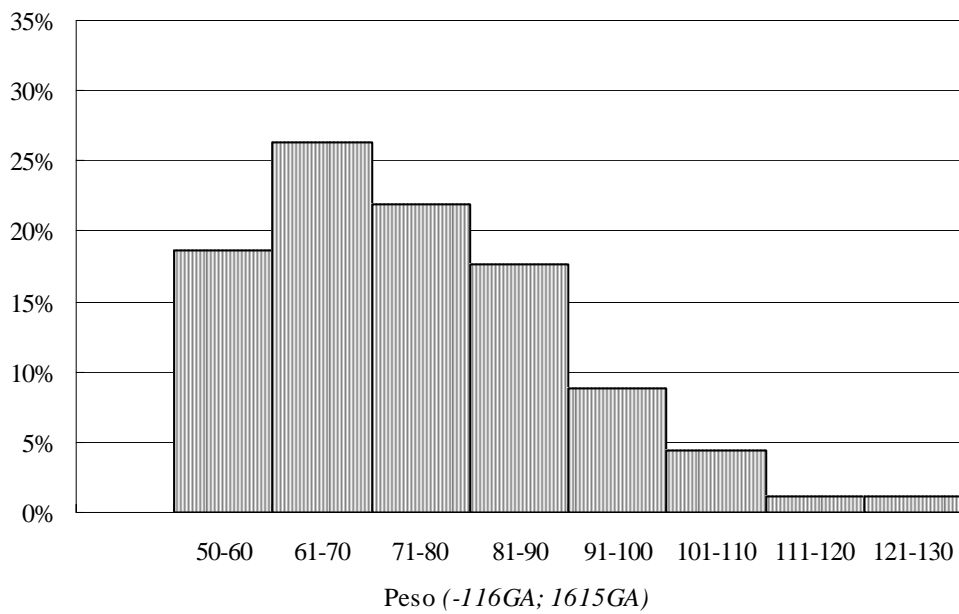
**Tabela 7.** Médias, variâncias, amplitudes e coeficientes de variação de peso, bem como valores de t e F, em amostras classificadas de acordo com os genótipos relativos às variantes dos nucleotídeos -116 do exon 1 e 1615 do exon 4.

Genótipos	Peso				
	N	Média ± EP	S <sup>2</sup>	AV	CV %
A) <i>-116GG; 1615GG</i>	218	74,7 ± 0,8	148,8	51 - 120	16,0
B) <i>-116GG; 1615GA</i>	129	75,2 ± 1,0	136,9	52 - 107	15,5
C) <i>-116GA; 1615GA</i>	91	74,9 ± 1,6	233,0	53 - 130	20,3
D) <i>-116GA; 1615GG</i>	02	84,0 ± 11	242,0	73 - 95	18,5

A x B: t = 0,33 (p = 0,74); F = 1,09 (p = 0,61).

A x C: t = 0,10 (p = 0,92); F = 1,57 (**p = 0,008**).

B x C: t = 0,14 (p = 0,89); F = 1,70 (**p = 0,005**).



**Figura 8.** Distribuição (%) de peso (kg) em 91 amostras *-116GA; 1615GA*, 129 amostras *-116GG; 1615GA* e 218 amostras *-116GG; 1615GG*.

### 5.3. VARIANTES DOS SÍTIOS -116 E 1615 DO GENE *BCHE* E ALTURA

Foram realizados cálculos de média, variância, amplitude de variação e coeficiente de variação de altura em amostras dos genótipos relativos às variantes dos sítios -116 e 1615. Esses resultados podem ser observados na tabela 8. As análises subsequentes consideraram também três classes genotípicas (-116GG; 1615GG, -116GG; 1615GA e -116GA; 1615GA).

As três classes genotípicas foram comparadas quanto à média e à variância de altura, não havendo diferença significativa tanto com relação à média como quanto à variância. Entretanto, houve uma tendência à significância, quando foram comparadas as variâncias de -116GG; 1615GG e -116GG; 1615GA, como mostrado no rodapé da tabela 8. As distribuições de altura, referentes a esses 3 genótipos, podem ser observadas na figura 9.

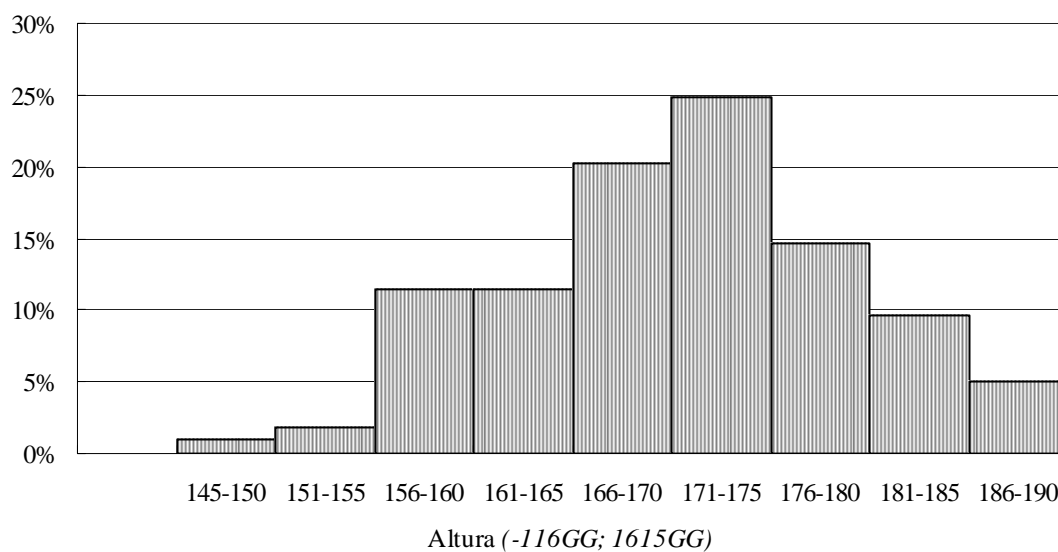
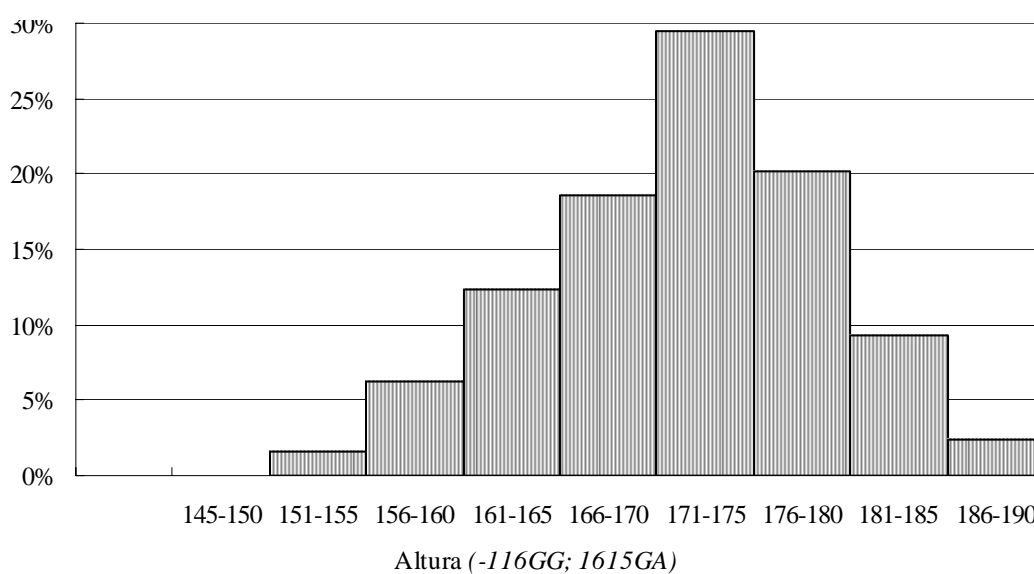
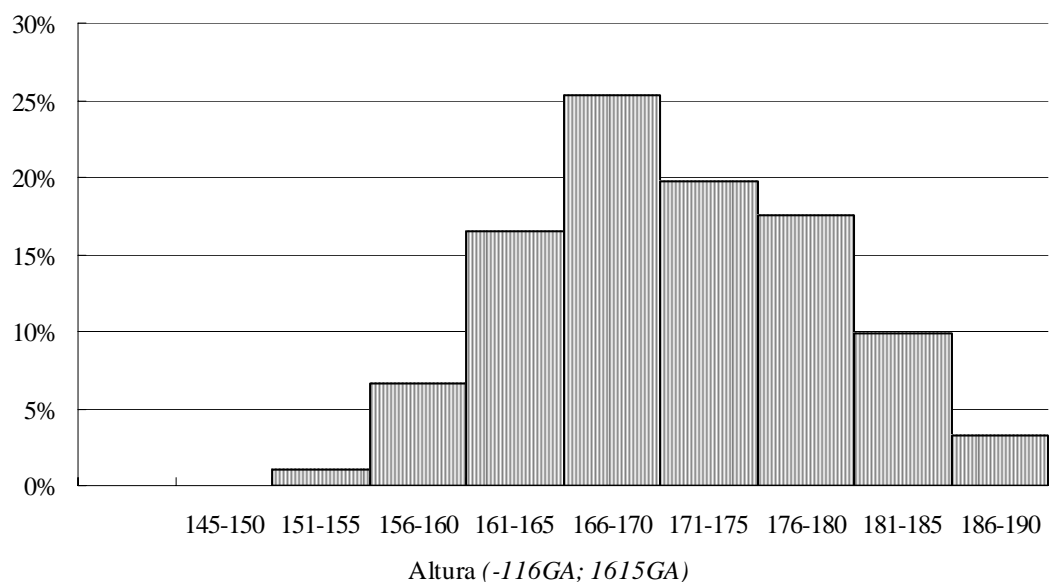
**Tabela 8.** Médias, variâncias, amplitudes e coeficientes de variação de altura em amostras classificadas de acordo com os genótipos relativos às variantes dos nucleotídeos -116 do exon 1 e 1615 do exon 4.

Genótipos	Altura (cm)				
	N	Média ± EP	S <sup>2</sup>	AV	CV %
A) -116GG; 1615GG	218	171,5 ± 0,6	72,4	147 - 190	4,9
B) -116GG; 1615GA	129	172,1 ± 0,6	53,2	184 - 188	4,2
C) -116GA; 1615GA	91	171,8 ± 0,8	61,3	155 - 190	4,6
D) -116GA; 1615GG	02	177,5 ± 1,5	4,5	176 - 179	1,1

A x B: t = 0,69 (p = 0,49); F = 1,36 (p = 0,06)

A x C: t = 0,26 (p = 0,80); F = 1,18 (p = 0,37)

B x C: t = 0,34 (p = 0,73); F = 1,15 (p = 0,45)



**Figura 9.** Distribuição de altura (cm) em 91 amostras -116GA; 1615GA, 129 -116GG; 1615GA e 218 -116GG; 1615GG.



#### 5.4. VARIANTES DOS SÍTIOS -116 E 1615 DO GENE *BCHE* E IMC

As médias, variâncias, amplitudes e coeficientes de variação de IMC foram estimadas em amostras classificadas de acordo com os genótipos variantes dos sítios -116 e 1615. Esses resultados podem ser observados na tabela 9. Nas análises subsequentes também foram consideradas apenas três classes genotípicas (-116GG; 1615GA, -116GA; 1615GA e -116GG; 1615GG). Essas três classes genotípicas foram comparadas quanto à média e à variância de IMC. Foi observado que não houve diferença significativa com relação à média, porém, a variância foi significativamente maior na classe genotípica -116GA; 1615GA, quando comparada com as classes -116GG; 1615GG e -116GG; 1615GA, conforme apresentado no rodapé da tabela 9. As distribuições de IMC dessas três classes podem ser observadas na figura 10.

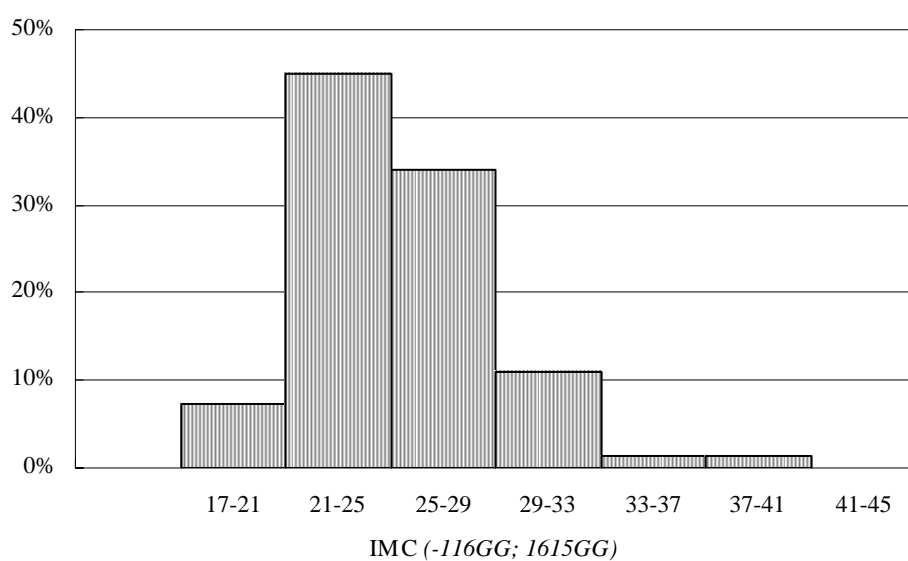
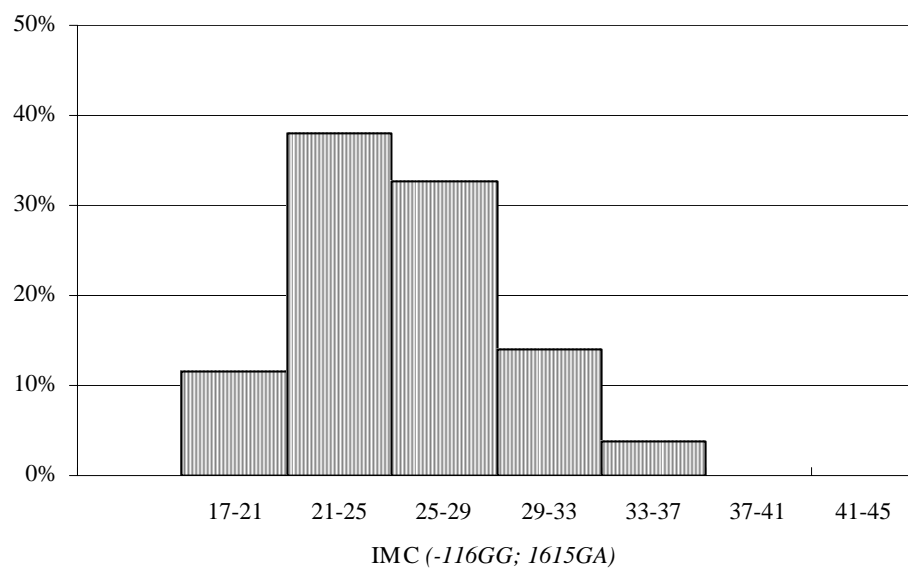
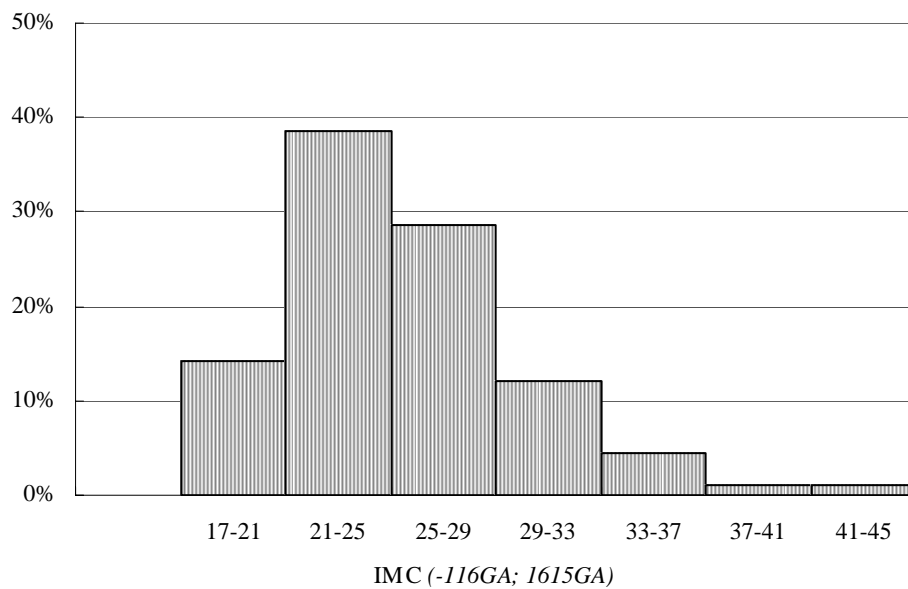
**Tabela 9.** Médias, variâncias, amplitudes e coeficientes de variação de IMC, bem como valores de t e F, em amostras classificadas de acordo com os genótipos relativos às variantes dos nucleotídeos -116 do exon 1 e 1615 do exon 4.

Genótipos	IMC (kg/m <sup>2</sup> )				
	N	Média ± EP	S <sup>2</sup>	AV	CV %
A) -116GG; 1615GG	218	25,37 ± 0,24	12,14	18,8 - 39,0	13,7
B) -116GG; 1615GA	129	25,38 ± 0,32	13,43	17,9 - 35,4	14,4
C) -116GA; 1615GA	91	25,34 ± 0,49	21,75	17,2 - 44,9	18,4
D) -116GA; 1615GG	02	26,60 ± 3,04	18,50	23,5 - 29,6	16,2

A x B: t = 0,03 (p = 0,98); F = 1,10 (p = 0,51).

A x C: t = 0,05 (p = 0,96); F = 1,79 (**p = 0,0006**).

B x C: t = 0,07 (p = 0,94); F = 1,61 (**p = 0,012**).



**Figura 10.** Distribuição de Índice de Massa Corporal em 91 amostras *-116GA; 1615GA*, 129 amostras *-116GG; 1615GA* e em 218 amostras *-116GG; 1615GG*.

## 5.5. ATIVIDADE DA BChE

### 5.5.1. VARIANTES DOS SÍTIOS -116 E 1615 E ATIVIDADE DA BChE

A atividade enzimática da BChE foi examinada nos plasmas de 204 amostras das 484 genotipadas para o sítio -116 do exon 1. Duas amostras com atividade da BChE acima de 10,0 KU/L foram excluídas das análises com a finalidade de normalizar a distribuição. O número de indivíduos selecionados para os genótipos relativos às variantes dos sítios -116 e 1615, os cálculos de média, variância, amplitude de variação e coeficiente de variação de atividade enzimática, podem ser observados na tabela 10.

As análises subseqüentes consideraram três classes genotípicas (*-116GG; 1615GG*, *-116GG; 1615GA* e *-116GA; 1615GA*), uma vez que as demais classes estavam representadas por um número pequeno de indivíduos.

A distribuição de homens e mulheres nas três classes genotípicas: *-116GG; 1615GG* (87% homens), *-116GG; 1615GA* (90% homens) e *-116GA; 1615GA* (87,5% homens) foram comparadas através de teste  $\chi^2$ . Foi realizado teste t para comparações entre médias de idade de indivíduos classificados quanto a esses genótipos de interesse (31,3; 31,3 e 30,2; respectivamente). Nenhum dos resultados dos testes estatísticos mostrou diferença estatisticamente significativa.

As três classes genotípicas foram comparadas entre elas, quanto à média e à variância de atividade enzimática, conforme apresentado no rodapé da tabela 10. Foi observada variância da atividade da BChE significativamente maior nos indivíduos *-116GG; 1615GG* quando comparados com os *-116GG; 1615GA*. A classe genotípica *-116GA; 1615GA* tem média de atividade enzimática significativamente menor que as demais classes (*-116GG; 1615GG* e *-116GG; 1615GA*). As distribuições de atividade enzimática nos três genótipos considerados podem ser observadas na figura 11.

A análise de variância (ANOVA), com a inclusão dos três genótipos, deu o valor total de  $F = 9,97$  ( $p = 0,000079$ ). A tabela 11 mostra os valores de significância para cada uma das comparações, após o uso do teste Tukey.

**Tabela 10.** Médias, variâncias, amplitudes e coeficientes de variação de atividade da butirilcolinesterase, bem como valores de t e F, em amostras classificadas de acordo com os genótipos relativos aos nucleotídeos -116 do exon 1 e 1615 do exon 4.

Genótipos	Atividade enzimática (KU/L)				
	N	Média ± EP	S <sup>2</sup>	AV	CV %
A) <i>-116GG; 1615GG</i>	100	4,22 ± 0,14	2,00	1,07 - 7,76	33,5
B) <i>-116GG; 1615GA</i>	40	4,15 ± 0,14	0,76	2,19 - 5,93	21,0
C) <i>-116GA; 1615GA</i>	40	3,11 ± 0,18	1,35	0,82 - 5,65	37,4
D) <i>-116GG; 1615AA</i>	6	3,02 ± 0,36	0,77	1,87 - 4,40	29,1
E) <i>-116GA; 1615AA</i>	15	3,36 ± 0,23	0,80	0,92 - 4,75	26,6
F) <i>-116AA; 1615AA</i>	1	2,57	-	-	-

A x B: t = 0,36 (p = 0,72); F = 2,64 (p < 0,001).

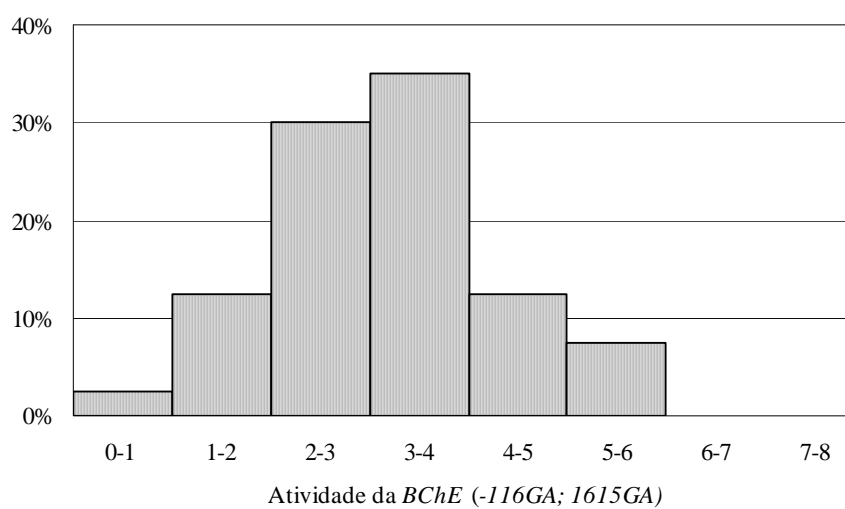
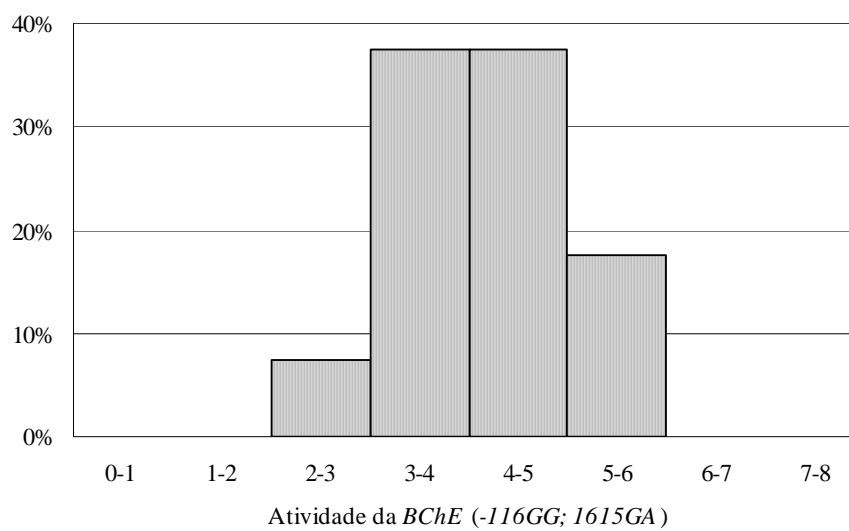
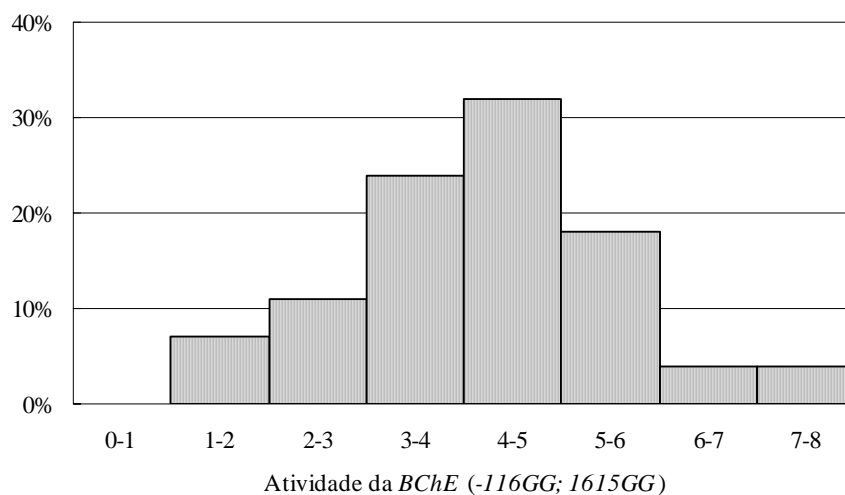
A x C: t = 4,41 (p = 0,00002); F = 1,48 (p = 0,17).

B x C: t = 4,53 (p = 0,00002); F = 1,78 (p = 0,08).

**Tabela 11.** Valores de p obtidos com o uso do teste Tukey, após análise de variância com o programa ANOVA, para as comparações das médias de atividade enzimática nos genótipos relativos aos nucleotídeos -116 do exon 1 e 1615 do exon 4.

Genótipos Comparados	p
<i>-116GG; 1615GG</i> x <i>-116GG; 1615GA</i>	0,6956
<i>-116GG; 1615GG</i> x <i>-116GA; 1615GA</i>	0,00005*
<i>-116GG; 1615GA</i> x <i>-116GA; 1615GA</i>	0,0070*

\*Diferença significativa.

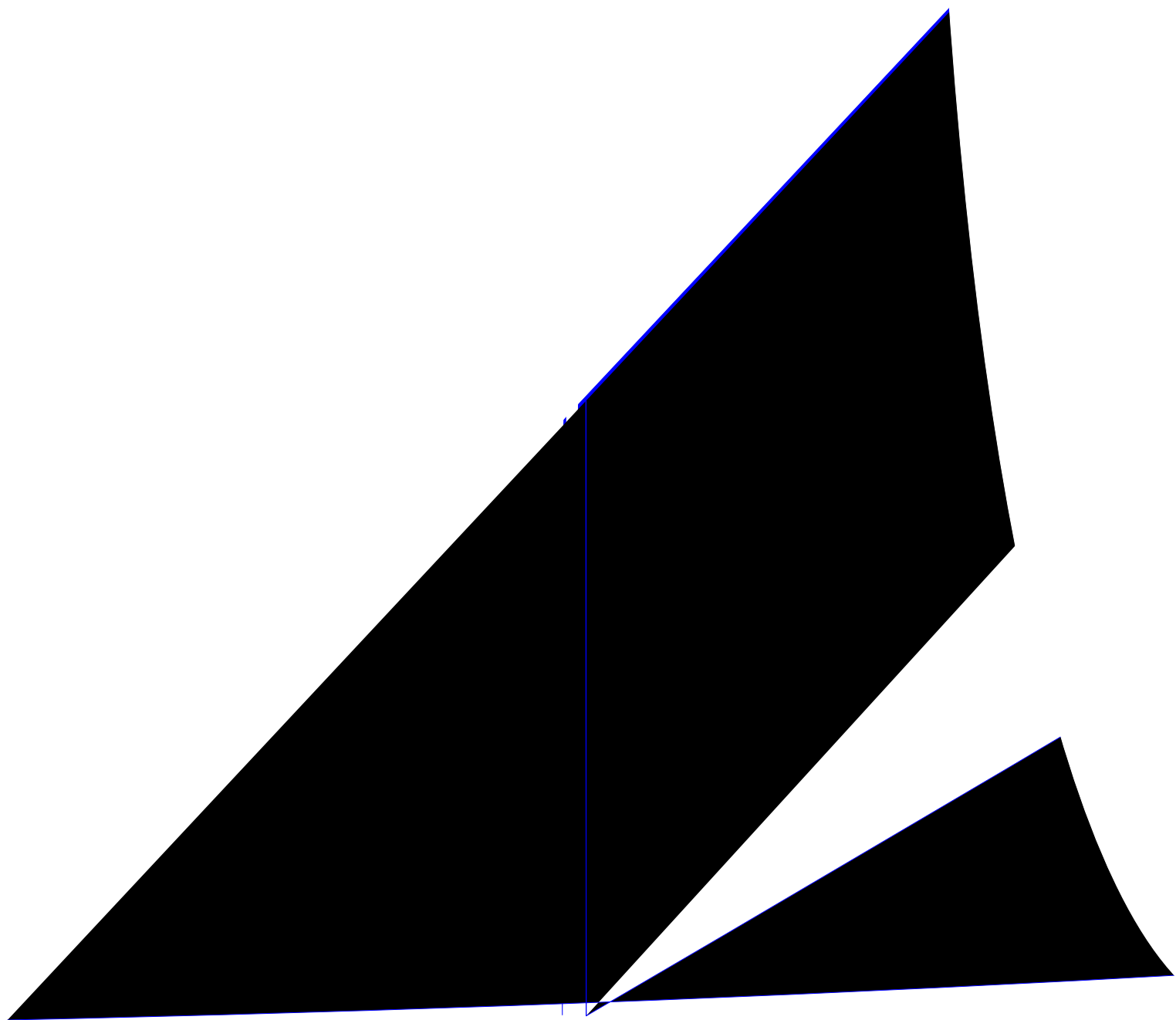


**Figura 11.** Distribuição de atividade enzimática (KU/L) em 100 amostras -116GG; 1615GG, 40 amostras -116GG; 1615GA e em 40 amostras -116GA; 1615GA.

Foram calculados coeficientes de correlação ( $r$ ) entre a atividade da BChE e as variáveis peso e IMC, nas três classes genotípicas. Foram observados coeficientes de correlação significativos entre a atividade e peso ( $r = 0,36$ ;  $p < 0,05$ ) e entre a atividade e IMC ( $r = 0,45$ ;  $p < 0,05$ ) na classe genotípica *-116GG; 1615GA* (Figuras 13 e 14, respectivamente). As demais classes, *-116GG; 1615GG* e *-116GA; 1615GA*, não apresentaram coeficientes de correlação significativos tanto entre atividade e peso quanto entre atividade e IMC ( $r = 0,10$  e  $r = 0,09$ ;  $r = 0,05$  e  $r = 0,21$ , respectivamente)

Tanto a distribuição de peso como a de IMC, das três classes genotípicas foram divididas, com base nos valores das medianas dessas variáveis. Foram realizados testes  $t$  para comparar as médias de atividade enzimática entre os grupos encontrados acima e abaixo da mediana. Observou-se diferença significativa entre as médias de atividade da BChE na classe *116GG;1615GA*, sendo que o grupo acima da mediana, tanto de peso como de IMC, tem maior média de atividade da BChE do que o grupo abaixo do valor da mediana, como pode ser observado nas tabelas 12 e 13, respectivamente.

Cada uma dessas três classes genotípicas foi dividida quanto ao IMC nas categorias de peso normal ( $18,5 \leq \text{IMC} < 25$ ), excesso de peso ( $25 \leq \text{IMC} < 30$ ) e obesidade ( $\text{IMC} \geq 30$ ). As distribuições das categorias de peso entre as classes genotípicas foram comparadas através de teste  $\chi^2$ , que não mostrou diferença significativa, como pode ser observado na tabela 14.



**Tabela 12.** Valores de t (p) para comparação das médias de atividade da BChE nas classes genótípicas *-116GG; 1615GG*, *-116GG; 1615GA* e *-116GA; 1615GA* divididas quanto à mediana de peso.

Genótipos	Peso	Atividade (KU/L) $\pm$ EP		t (p)	
		Abaixo da mediana	Acima da mediana		
Exon 1; Exon 4	N	Mediana	Média $\pm$ EP	Média $\pm$ EP	
<i>-116GG; 1615GG</i>	100	73,5	4,06 $\pm$ 0,19	4,38 $\pm$ 0,21	1,13 (0,26)
<i>-116GG; 1615GA</i>	40	73	3,84 $\pm$ 0,18	4,52 $\pm$ 0,18	2,61 (0,013)*
<i>-116GA; 1615GA</i>	40	72	3,20 $\pm$ 0,21	3,01 $\pm$ 0,31	0,50 (0,62)

\*Diferença estatisticamente significativa



**Tabela 13.** Valores de t (p) para comparação das médias de atividade da BChE nas classes genótípicas *-116GG; 1615GG*, *-116GG; 1615GA* e *-116GA; 1615GA* divididas quanto à mediana de IMC

Genótipos		IMC	Atividade (KU/L) ± EP		t (p)
			Abaixo da mediana	Acima da mediana	
Exon 1; Exon 4	N	Mediana	Média ± EP	Média ± EP	
<i>-116GG; 1615GG</i>	100	24,93	4,01 ± 0,18	4,41 ± 0,21	1,41 (0,16)
<i>-116GG; 1615GA</i>	40	24,61	3,79 ± 0,18	4,50 ± 0,18	2,79 (0,008)*
<i>-116GA; 1615GA</i>	40	23,70	2,98 ± 0,24	3,24 ± 0,28	0,71 (0,48)

\*Diferença estatisticamente significativa

**Tabela 14.** Comparações das distribuições de categorias de peso normal ( $18,5 \leq \text{IMC} < 25$ ), excesso de peso ( $25 \leq \text{IMC} < 30$ ) e obesidade ( $\text{IMC} \geq 30$ ), entre as classes genotípicas.

Genótipos	Categorias de Peso				$\chi^2(p)$
	N	Peso normal	Excesso de peso	Obesidade	
<i>-116GG; 1615GG</i>	100	51	40	9	1,35 (>0,55)
<i>-116GG; 1615GA</i>	40	23	12	5	
<i>-116GG; 1615GG</i>	100	51	40	9	2,01 (>0,35)
<i>-116GA; 1615GA</i>	40	24	11	5	
<i>-116GG; 1615GA</i>	40	23	12	5	0,06 (>0,99)
<i>-116GA; 1615GA</i>	40	24	11	5	

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE AS ANÁLISES DOS EXONS 1 E 4 DO GENE *BCHE*

A grande maioria dos cromossomos com a variante *-116A*, na amostra utilizada neste trabalho, também possui a variante *1615A* (Tabela 3), como era esperado em função do desequilíbrio de ligação entre esses sítios, descrito por BARTELS et al., (1990). FURTADO-ALLE et al. (2006) fizeram o primeiro relato do polimorfismo *-116A* na população brasileira e também observaram desequilíbrio de ligação ( $D' = 91,2\%$ ), sendo que as variantes *-116A* e *1615A* se encontram preferencialmente em *cis*. No presente trabalho não foi possível estimar o desequilíbrio de ligação entre essas variantes, pois as amostras foram selecionadas pela presença de *1615A*, o que acarreta uma super-representação da variante *-116A*, não representando uma amostra aleatória no caso dessas variações. A inferência das frequências de haplótipos em dados de uma geração só pode ser feita a partir de amostras em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Pelo fato de se tratarem de amostras selecionadas por genótipo também não se estimaram as frequências alélicas.

Apesar das correlações positivas entre peso e IMC (nesta amostra:  $r = 0,82$ ;  $p < 1 \times 10^{-30}$ ), bem como entre peso e altura (nesta amostra:  $0,49$ ;  $p = 1,26 \times 10^{-30}$ ), optamos por analisar as três variáveis individualmente para contarmos com mais informação sobre os dados. Além disso, esse estudo teve como objetivo dar continuidade ao estudo de SOUZA et al. (2005), que também examinou essas três variáveis e no qual se detectou associação entre altura e as variações do gene *BCHE* resistentes ao fluoreto de sódio.

As comparações das variáveis antropométricas entre as classes genóticas consideradas (*-116GG; 1615GG* com  $N = 220$ , *-116GG; 1615GA* com  $N = 129$  e *-116GA; 1615GA* com  $N = 91$ ) foram realizadas de forma que fossem comparadas as duas classes de genótipos heterozigotos quanto ao sítio 1615 e, cada uma, com a amostra controle total. Esse tipo de comparação foi escolhido visto que os testes estatísticos quanto às distribuições de sexo e etnia e quanto às médias de idade

(Tabelas 4, 5 e 6, respectivamente) não apresentaram diferença significativa entre esses genótipos. O mesmo tipo de comparação foi utilizado em relação à atividade da BChE, em vista do mesmo princípio. Neste caso, apenas o número de amostras foi menor do que os considerados para as variáveis antropométricas.

Na amostra de 440 doadores de sangue, utilizada nas comparações quanto às variáveis antropométricas, a frequência observada de déficit de peso (0,45%) é significativamente menor ( $\chi^2 = 13,00$  e  $p = 0,0003$ ) que a da população de Curitiba (2,4%; segundo o INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2003). Nossa frequência, relativamente baixa, se deve ao limite mínimo de peso (50 kg) imposto para que uma pessoa possa doar sangue. Consideramos que essa seleção não teria influência nos presentes resultados, uma vez que de acordo com a frequência de 2,4% de déficit de peso seriam esperados apenas cerca de mais 2 casos em *-116GA*; *1615GA*, 3 em *-116GG*; *1615GA* e 4 em *-116GG*; *1615GG*.

## 6.2 PESO, IMC e BUTIRILCOLINESTERASE

A maioria das doenças comuns e características normais são o resultado da soma de pequenos efeitos de vários genes e interações entre eles e com fatores ambientais. Por não apresentarem um padrão de herança simples, a detecção dos genes envolvidos em sua etiologia é mais complexa. Entretanto, mesmo a detecção de parte deles é de importância para se conhecer melhor a etiologia genética da característica e, muitas vezes, também colabora para se entender mais a respeito das funções dos genes implicados.

O IMC e o peso têm padrão de herança multifatorial. Assim, o fenótipo de um indivíduo será o resultado da interação entre genes de predisposição, fatores ambientais como alimentação e comportamentais como a prática de atividade física, por exemplo.

Os estudos de associação são instrumentos úteis na identificação de componentes hereditários de características multifatoriais. Esses estudos referem-se à busca de relações estatísticas entre variações genéticas polimórficas e um determinado fenótipo e podem levar à identificação de genes que contribuem para esse fenótipo. Verificar associação de variações do gene *BCHE* com variáveis antropométricas, como

peso, altura e IMC, por exemplo, não só contribui para melhor conhecimento da etiologia genética dessas variáveis, como também auxilia na compreensão da função da BChE.

Uma série de estudos mostrou associação positiva da atividade da BChE com peso e IMC. Dados de nosso laboratório mostraram correlação positiva entre a atividade da BChE e peso em indivíduos do fenótipo CHE2 C5- e não encontraram correlação, quando o fenótipo era CHE2 C5+ (CHAUTARD-FREIRE-MAIA et al., 1990). ALCÂNTARA et al. (2002) observaram que a atividade da BChE estava positivamente correlacionada com idade, sexo (mais alta no sexo masculino), IMC, hipertensão e diabetes mellitus do tipo 2, assim como com os níveis de triglicérides, colesterol total, LDL e apolipoproteínas. ALCÂNTARA et al. (2003) também encontraram atividade média da BChE significativamente maior em obesos CHE2 C5- do que em seus controles de peso normal e de mesmo fenótipo. Comparações similares, com indivíduos do fenótipo CHE2 C5+, não mostraram diferença significativa. Esses mesmos autores observaram uma frequência significativamente maior de pacientes que perderam peso no grupo de fenótipo CHE2 C5+ do que no grupo CHE2 C5-, sugerindo que o alelo *CHE2*\*C5+ poderia predispor a uma maior tendência para perder peso.

Foi evidenciada relação entre peso e fenótipos determinados pela interação dos genes *BCHE* e *CHE2* em amostra da população de Curitiba (CHAUTARD-FREIRE-MAIA et al., 1991): a média e a variância do peso encontravam-se significativamente inferiores em indivíduos CHE2 C5+, quando comparados a seus controles CHE2 C5-. ALCÂNTARA et al. (2001) obtiveram resultados na mesma direção ao encontrarem média de IMC mais baixa em indivíduos de fenótipo CHE2 C5+, em relação ao grupo controle CHE2 C5-.

A possível influência da variabilidade do sítio 1615 do gene *BCHE* sobre o IMC em doadores de sangue de Curitiba foi analisada por SOUZA et al. (2005a). Os autores observaram que a variância do IMC era significativamente maior no grupo *1615GA* em relação ao *1615GG*.

Como se poderia tentar explicar essas relações da BChE com peso? Neste contexto é interessante relatar dados a respeito da grelina. A grelina é um hormônio

peptídico de 28 aminoácidos que apresenta um ácido n-octanóico na terceira serina (ser3), condição essencial para a sua atividade, que é estimular a secreção pituitária do hormônio de crescimento (GH), quando se liga ao receptor secretagogo do GH, conhecido com GHS-R (KOJIMA et al., 2001). A grelina, além de estimular a secreção do hormônio do crescimento, já foi associada a hiperfagia, diminuição da utilização da gordura estocada e aumento de peso (TSCHÖP et al., 2000). Esses mesmos autores em um trabalho posterior (TSCHÖP et al., 2001) investigaram o efeito da grelina na patogênese da obesidade humana e constataram que os níveis plasmáticos de grelina eram mais baixos em obesos que nos seus controles de peso normal. Os autores propuseram que a diminuição dos níveis plasmáticos de grelina observada em obesos é uma adaptação fisiológica para o equilíbrio energético, prevenindo o aumento da gravidade da obesidade.

DE VRIESE et al. (2004), para identificar a enzima que desacila a grelina (retira o ácido n-octanóico, inativando-a), realizaram testes com inibidores enzimáticos e observaram que a desacilação foi parcialmente inibida por salicilato de eserina e fluoreto de sódio, dois inibidores da butirilcolinesterase. Os autores perceberam que a BChE purificada era capaz de degradar a grelina, havendo uma relação positiva entre a atividade da butirilcolinesterase e a desacilação da grelina no soro humano. Esses experimentos permitiram inferir que a BChE é capaz de hidrolisar a grelina no soro, retirando o ácido n-octanóico e, assim inativando-a. Apesar da BChE ser a esterase predominante no soro, os autores concluíram que ela não é a única responsável pela desacilação da grelina.

Como a atividade da BChE também é determinada geneticamente, como no caso das variações do gene *CHE2*, pois os indivíduos *CHE2*C5+ têm atividade média da BChE cerca de 25% superior a dos *CHE2* C5- (HARRIS, 1970), é possível que essa tendência genética para atividade mais alta exerça maior poder de inativação da grelina. Assim, dados de CHAUTARD-FREIRE-MAIA et al. (1991) e ALCÂNTARA et al. (2001) sobre, respectivamente, médias de peso e de IMC significativamente inferiores em indivíduos *CHE2* C5+, quando comparados a seus controles *CHE2* C5-, poderiam ser explicados como devidos a uma diminuição dos níveis séricos de grelina acilada, fato que levaria à tendência para menor peso.

No caso da variação do sítio -116 do exon 1 do gene *BCHE*, o que poderíamos esperar quanto às distribuições de peso e de IMC? Sobre esse assunto é importante citar dados de FURTADO-ALLE et al. (2006), que analisaram a atividade da BChE e a variabilidade desse sítio em amostras de homens obesos, de IMC normal e de atividade baixa da BChE. Esses autores observaram que a variação *-116A* estava associada a uma diminuição da atividade da BChE. A frequência de *-116A* foi significativamente maior na amostra de atividade baixa quando comparada com amostras de obesos e de IMC normal. Quando as amostras de obesos e de IMC normal foram divididas em quartis de atividade e analisadas quanto à frequência do alelo *-116A*, foi observado que essa frequência estava significativamente mais alta no quartil de atividade baixa, tanto em obesos quanto em indivíduos com IMC normal, do que no resto da distribuição. Em vista do exposto, no início deste estudo, foram formuladas duas hipóteses:

- a) A variação *-116A*, por estar associada à atividade baixa da BChE, poderia estar associada ao aumento do peso e do IMC.
- b) A variação *-116A*, por estar associada à atividade baixa da BChE, poderia levar à perda da influência dessa enzima na homeostase do peso e do IMC.

### **6.3 VARIANTES DOS SÍTIOS -116 E 1615 DO GENE *BCHE* - PESO E IMC**

A variância de peso do genótipo *-116GA; 1615GA* foi significativamente maior (Tabelas 7; Figura 8) que as variâncias dos genótipos *-116GG; 1615GG* e *-116GG; 1615GA*. Também foi observada variância significativamente maior do IMC na classe genotípica *-116GA; 1615GA* (Tabelas 9; Figura 10), quando comparada com as classes *-116GG; 1615GA* e *-116GG; 1615GG*. Como as variâncias de peso e de IMC não diferiram entre as classes *-116GG; 1615GA* e *-116GG; 1615GG*, conclui-se que a presença da variante *-116A* parece ser necessária tanto para o aumento da variância do peso, como do IMC. Porém, como todos os portadores do alelo *-116A* considerados nas comparações também são heterozigotos para *1615A*, não há como descartar o efeito conjunto dessas mutações. Assim, considerando-se esses resultados, conclui-se que essa presença conjunta é a responsável pelo resultado obtido por SOUZA et al.

(2005a), uma vez que a presença de apenas *1615A* não leva ao aumento da variância do IMC (Tabela 9; Figura 10).

FURTADO (2005) obteve resultado semelhante ao analisar a variância de IMC em amostras de obesos ( $IMC \geq 30$ ). A autora observou que a variância da classe *-116GA; 1615GA* era significativamente maior que a variância da classe *-116GG; 1615GA* ( $F = 3,18$ ;  $p = 0,03$ ), sendo esse resultado concordante com o do presente trabalho, reforçando a idéia de que presença do alelo *-116A* é necessária para o aumento da variância de IMC. A autora realizou as mesmas análises em amostras controles ( $20 \leq IMC < 25$ ), porém, não foi verificada diferença entre as variâncias de IMC nessas amostras, possivelmente devido à faixa estreita de IMC desse grupo selecionado.

Uma outra hipótese que poderia ser levantada, seria a de que uma outra suposta variante em outro gene, em desequilíbrio de ligação com a variante *-116A* e a montante desta, fosse a real responsável pelo aumento dessa variância observada para peso e IMC. Entretanto, consideramos mais provável a hipótese de que seja *-116A; 1615A* o haplótipo de importância neste caso. Essa consideração se baseia em dados de outros trabalhos, que evidenciaram associação positiva entre a atividade da BChE com peso e com IMC, bem como as relações diferenciais dos fenótipos do loco *CHE2* com relação às médias de peso e de IMC.

As comparações entre as médias de atividade da BChE em 3 das classes genóticas mostraram que a presença da variante *-116A* está associada a uma diminuição na média da atividade da butirilcolinesterase (Tabelas 10 e 11). Foi observado que a classe genótica *-116GA; 1615GA* tinha em média atividade enzimática significativamente menor que as demais classes (*-116GG; 1615GG* e *-116GG; 1615GA*). Devido ao fato de que todos os portadores do alelo *-116A* considerados nas comparações também são heterozigotos para *1615A*, poderia se supor que também a variante *1615A* fosse a responsável por essa atividade baixa. Contudo, ALTAMIRANO et al. (2000) verificaram que a enzima *1615A* não possui atividade da BChE diferente da enzima usual, em relação à afinidade e taxa de catálise do substrato, taxa de secreção da célula e formação dos tetrâmeros. Assim, essa mutação não teria efeito na estrutura ou atividade da BChE. Os resultados obtidos no presente trabalho



estão no sentido dos obtidos por FURTADO-ALLE et al. (2006) que observaram frequência de *-116A* significativamente maior em amostra de doadores de sangue com atividade baixa da BChE, quando comparada com amostras de doadores de sangue obesos e de IMC normal. A frequência de *-116A* também foi maior no quartil de atividade baixa, tanto em obesos quanto em indivíduos com IMC normal, do que no resto dessas distribuições. Os autores sugerem que a variante *-116A* está associada a uma diminuição da atividade da BChE, provavelmente devido a eventos de regulação transcricional ou traducional, visto que o sítio da mutação *-116A* está localizado fora da região que codifica o peptídeo maduro, mas em uma região que é transcrita. Assim, essa mutação poderia afetar a transcrição do gene *BCHE* ou alterar o sítio de ligação dos fatores de tradução. Outra possibilidade seria a de que outra variante, em desequilíbrio de ligação com a variante *-116A*, seja a responsável pela diminuição da atividade da BChE. FURTADO-ALLE (2005) e FURTADO-ALLE et al. (2006) sugerem que é a variante *-116A* e não a *1615A* a responsável pela baixa atividade da BChE encontrada em parte dos portadores de *1615A*. O presente trabalho reforça os dados encontrados por esses autores.

O conhecimento de que a variação *-116A* está associada com atividade baixa da BChE nos levou a formular a hipótese de que essa variação pudesse estar relacionada com o aumento do peso e do IMC, em contraposição ao fato de que o fenótipo CHE2 C5+, com atividade da BChE aumentada cerca de 25%, estar relacionado com médias mais baixas de peso e de IMC do que o fenótipo CHE2 C5-. Entretanto, nossos dados são mais favoráveis à hipótese de que a variação *-116A*, por estar associada à atividade baixa da BChE, leva à perda da influência dessa enzima na homeostase do peso e do IMC. Nesse caso, outros fatores genéticos e ambientais se tornariam mais influentes na determinação dessas variáveis. Se a ação da BChE em relação ao peso e ao IMC se faz pela sua propriedade em desacilar a grelina, é provável que quando sua atividade for reduzida essa ação perca sua importância tanto na determinação do peso como do IMC.

Como o fenótipo CHE2 C5+ tem efeito sobre a atividade da BChE, poderia se pensar que uma possível distribuição não homogênea desse fenótipo, entre as classes genóticas *-116GG; 1615GG*, *-116GG;1615GA* e *-116GA;1615GA*, poderia levar a

erros nas análises dos resultados sobre atividade da BChE. Entretanto, como a frequência esperada do fenótipo CHE2 C5+ é de aproximadamente 10%, seu efeito sobre a atividade não teria influência nos presentes resultados.

Quando foram estimados os coeficientes de correlação entre a atividade da BChE e IMC e entre a atividade da BChE e peso na classe genotípica *-116GG; 1615GA* (Figuras 13 e 14, respectivamente), seus valores foram estatisticamente significativos. Esse fenômeno foi reproduzido (Tabelas 15 e 16) quando as amostras foram comparadas quanto à média de atividade entre os grupos acima e abaixo da mediana tanto de peso como de IMC. No genótipo *-116GG; 1615GA*, o grupo acima da mediana, tanto de peso como de IMC, tem maior média de atividade da BChE do que o abaixo da mediana. Esses resultados parecem indicar que esse genótipo responderia ao aumento de peso e de IMC com um aumento de síntese da BChE, o que contribuiria para a homeostase dessas características.

O fato de não existir correlação significativa da atividade da BChE com peso ( $r = 0,05$ ) e com IMC ( $r = 0,21$ ) na classe *-116GA; 1615GA* poderia ser considerado como um reforço à hipótese de que BChE de atividade baixa perde influência na homeostase do peso e do IMC. Porém, é importante salientar que a falta de correlação entre atividade da BChE e IMC pode ser função do pequeno tamanho da amostra. Ao se observar uma tabela de coeficiente de correlação, verifica-se que correlação de 0,21 é significativa, ao nível de 5%, em amostra com 90 casos. Entretanto, mesmo se existir correlação de 0,21, a baixa atividade da enzima nesse genótipo pode não atuar adequadamente no sentido da homeostase do peso e do IMC.

O fato da classe genotípica *-116GG; 1615GG* não ter apresentado correlação significativa da atividade da BChE com peso ( $r = 0,10$ ) e com IMC ( $r = 0,09$ ) foi inesperado, tendo em vista a série de dados publicados a respeito de correlações positivas com essas variáveis. Entretanto, nenhum dos trabalhos anteriores dividiu as amostras por genótipo, como o presente estudo. Assim, a validade desse resultado precisa ser verificada em outros estudos.

Como a amostra de doadores de sangue examinada quanto à atividade da BChE era relativamente pequena, optou-se por dividi-la considerando-se a mediana de peso e IMC e não dividi-la por categorias de peso, pois cada categoria estaria representada

por poucos indivíduos. O teste  $\chi^2$  realizado entre as 3 classes genóticas quanto às categorias de peso normal ( $18,5 \leq \text{IMC} < 25$ ), excesso de peso ( $25 \leq \text{IMC} < 30$ ) e obesidade ( $\text{IMC} \geq 30$ ) não mostrou diferença significativa (Tabela 14), mostrando que os resultados observados quanto às análises das medianas não eram devidos a uma diferença na distribuição dos genótipos entre as categorias de peso.

A associação entre variantes dos genes *BCHE* e *CHE2* e variáveis antropométricas foi observada em trabalhos do nosso laboratório, como por exemplo, CHAUTARD-FREIRE-MAIA et al., (1991); ALCÂNTARA et al, (2001) e SOUZA et al. (2005a). Os resultados do presente trabalho aprofundam o conhecimento obtido por SOUZA et al. (2005a), no sentido de que a presença da variação *-116A* é necessária no genótipo *1615GA* para que a variância do peso e do IMC sejam maiores do que em controles *1615GG*. A variação *-116A*, provavelmente por estar associada à atividade baixa da BChE, leva à perda da influência dessa enzima na homeostase do peso e do IMC, sendo que outros fatores genéticos e ambientais se tornam mais influentes na determinação dessas variáveis e, dependendo do tipo de ação destes fatores, levam a desvios da média tanto no sentido positivo como negativo, aumentando a variância.

## 7. CONCLUSÕES

**7.1.** A presença das variantes *-116A* e *1615A* do gene *BCHE* parece ser necessária tanto para o aumento da variância do peso, como do IMC;

**7.2.** A presença conjunta das variantes *-116A* do exon 1 e *1615A* do exon 4 é a responsável pelo resultado obtido por SOUZA et al. (2005a), uma vez que a presença de apenas *1615A* não leva ao aumento da variância do IMC;

**7.3** É provável que seja *-116A* a variante responsável pelo aumento da variância observada, e não uma outra suposta variante em outro gene, em desequilíbrio de ligação com a variante *-116A*, tendo em vista as associações positivas evidenciadas da atividade da BChE com peso e com IMC, bem como as relações diferenciais dos fenótipos do loco *CHE2* com relação às médias de peso e de IMC;

**7.4.** A classe genotípica *-116GA; 1615GA* tem em média atividade enzimática significativamente menor que as demais classes;

**7.5.** Os resultados do presente trabalho apóiam a hipótese de que a variação *-116A*, por estar associada à atividade baixa da BChE, leva à perda da influência dessa enzima na homeostase do peso e do IMC.

**7.6.** O genótipo *-116GG; 1615GA* parece responder ao aumento de peso e de IMC com um aumento de síntese da BChE, o que contribuiria para a homeostase dessas características.

**7.7.** A falta de correlação da atividade da BChE com peso e com IMC na classe genotípica *-116GG; 1615GG* precisa ser pesquisada em outros estudos.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCÂNTARA, V. M.; CIPRIANI, T.R.; REA, R.; SUP LIC Y, H.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A. Formas moleculares da butirilcolinesterase (BChE) e índice de massa corporal (IMC). *Genet. Mol. Biol.*, v. 22, p. 213, 1999, Suplemento.

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

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

ALCÂNTARA, V.M.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.; SCARTEZINI, M.; CERCI, M.S.; BRAUN-PRADO, K. e PICHETH, G. Butyrylcholinesterase activity and risk factors for coronary artery disease. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.**, v. 62, p. 399-404, 2002.

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

ALLDERDICE, P. W.; GARDNER, H. A. R.; GALUTIRA, D.; LOCKRIDGE, O.; LA DU, B.N. e MCALPINE, P.J. The cloned butyrylcholinesterase (*BCHE*) gene maps to a single chromosome site, 3q26. **Genomics**, v.11, p. 452-454, 1991.

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

- ARPAGAU, M.; KOTT, M.; VATSIS, K. P.; BARTELS, C. F.; LA DU, B. N. e LOCKRIDGE, O. Structure of the gene for human butyrylcholinesterase. Evidence for a single copy. **Biochemistry**, v. 29, p. 124-131, 1990.
- ARPAGAU, M.; CHATONNET, A.; MASSON, P.; NEWTON, M.; VAUCHAN, T.A.; BARTELS, C.F.; NOGUEIRA, C.P.; LA DU, B.N. E LOCKRIDGE, O. Use of the polymerase chain reaction for homology probing of butyrylcholinesterase from several vertebrates. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 6966-6974, 1991.
- AUGUSTINSSON, K.B. Cholinesterase and anticholinesterase agents. In: **Handbook of experimental pharmacology**. Koelle, G.B. (org). Springer-Verlab, Berlim e Nova York, p. 89-128, 1963.
- BALASUBRAMANIAN, A.S. e BHANUMATHY, C.D. Noncholinergic functions of cholinesterases. **FASEB J.**, v. 7, p. 1354-58, 1993.
- BARTELS, C. F.; VAN DER SPEK, A. F. L. e LA DU, B. N. Two polymorphisms in the noncoding regions of the *BCHE* gene. **Nucleic Acids Res.**, v. 18, p. 6171, 1990.
- BARTELS, C. F., JAMES, K. e LA DU, B. N. DNA mutations associated with the human butyrylcholinesterase J-variant. **American Journal of Human Genetics**, v. 50, p 1104-1114, 1992a.
- BARTELS, C. F., JENSEN, F. S., LOCKRIDGE, O., VAN DER SPEK, A. F. L., RUBINSTEIN, H. M., LUBRANO, T. e LA DU, B. N. DNA mutation associated with the human butyrylcholinesterase K-variant and its linkage to the atypical variant mutation and other polymorphic sites. **American Journal of Human Genetics**, v. 50, p.1086-1103, 1992b.
- BOECK, A. T.; FRY, D. L.; SASTRE, A. e LOCKRIDGE, O. Naturally occurring mutation, Asp70His, in human butyrylcholinesterase. **Ann. Clin. Biochem.**, v. 39, p. 154–156, 2002.

- BUDOWLE, B.; CHAKRABORTY, R; GUIUSTI, A. M.; EISENBERG, A. J. e ALLEN, R. C. Analysis of the VNTR locus DIS80 by the PCR followed by right-resolution PAGE. **Am. J. Hum. Genet.**, Berlin, v.48, p.137-144, 1991.
- CHATTONET, A. e LOCKRIDGE, O. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. **Biochem. J.**, v. 260, p. 625-634, 1989.
- CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A.; STUEBER-ODEBRECHT, N.; JUNGE, C. e cols. Phenotypes of the *CHE2* locus of serum cholinesterase and adult weight in a sample from Blumenau, Santa Catarina, Brazil. **Rev. Brasil. Genet.**, v. 13, p. 371-376, 1990.
- CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A.; PRIMO-PARMO, S. L.; PICHETH, G.; LOURENÇO, M. A. C. e VIEIRA, M. M. The C<sub>5</sub> isozyme of serum cholinesterase and adult weight. **Hum. Hered.**, v. 41, p. 330-339, 1991.
- CUCUIANU, M.; POPESCU, T. A. e HARAGUS, S. T. Pseudocholinesterase in obese and hyperlipemic subjects. **Clin. Chim. Acta**, v. 22, p. 151-155, 1968.
- DE VRIESE, C.; GREGOIRE, F.; LEMA-KISOKA, R.; WAELBROECK, M.; ROBBERECHT, P. e DELPORTE, C. Ghrelin degradation by serum and tissue homogenates: identification of the cleavage sites. **Endocrinology**, v. 145, p. 4997-5005, 2004.
- DEY, D. C.; KANNO, T.; SUDO, K. e MAEKAWA, M. Genetic analysis of 6 patients with no detectable butyrylcholinesterase activity—three novel silent genes and heterogeneities of mutations in *BCHE* gene in Japan. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 61, p. 2307, 1997.
- DEY, D. C.; MAEKAWA, M.; SUDO, K. e KANNO, T. Butyrylcholinesterase genes in individuals with abnormal inhibition numbers and with trace activity: one common mutation and two novel silent genes. **Ann. Clin. Biochem.** (Part 2), v. 35, p. 302–310, 1998.
- 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.

- DUNNEN D. J. T. e ANTONARAKIS S. E. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. **Hum. Mutat.**, v. 15, p. 7-12, 2000.
- DUNNEN D. J. T. e ANTONARAKIS S. E. Nomenclature for the description of human sequence variations. **Hum. Genet.**, v. 109, p. 121-124, 2001.
- EIBERG, H.; NIELSEN, L.S.; KLAUSEN, J.; DAHLÉN, M.; KRISTENSEN, M.; BISGGARD, M.L.; MOLLER, N. e 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.
- EVANS, R.T. e 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.
- FURTADO, L. **Variabilidade Genética da Butirilcolinesterase e Obesidade**. Curitiba, 2005. Tese de Doutorado. Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná.
- FURTADO-ALLE, L.; NUNES, K.; MIKAMI, LR, SOUZA, RLR, CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A. Associação entre variante *-116A* do exon 1 do gene *BCHE* e atividade da butirilcolinesterase. **Resumos do 52º Congresso Brasileiro de Genética, 2006**.
- GÄTKE, M. R.; OSTERGAARD, D.; BUNDGAARD, J. R.; VARIN, F. e VIBY-MOGENSEN, J. Response to mivacurium in a patient compound heterozygous for novel and a known silent mutation in the butyrylcholinesterase gene: genotyping by sequencing. **Anesthesiology**, v. 95, p. 600–606, 2001.
- GAUGHAN, G.; PARK, H.; PRIDDLE, J.; CRAIG, S. Refinement of localization of human butyrylcholinesterase to chromosome 3q26.1-q26.2 using a PCR-derived probe. **Genomics**, v 11, p. 455-458, 1991.



GNATT, A.; PRODY, C. A.; ZAMIR, R.; LIEMAN-HURWITZ, J.; ZAKUT, H. e 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.

GREENBERG, C. P.; PRIMO-PARMO, S. L.; PANTUCK, E. J. e 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.

HADA, T.; MURATANI, K.; OHUE, T.; IMANISHI, H.; MORIWAKI, Y.; ITOH, M.; AMURO, Y. e 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. 357-362, 1992.

HARRIS, H. **The principles of human biochemical genetics**. North Holland Publishing Company, Amsterdam, p. 161, 1970.

HARRIS, H.; HOPKINSON, D. A e ROBSON, E. B. Two-dimensional electrophoresis of pseudocholinesterase components in human serum. **Nature**, v.196, p. 1296-1298, 1962.

HARRIS, H.; ROBSON, E. B.; GLEN-BOTT, A. M. e THORNTON, J. A. Evidence for non-allelism between genes affecting human serum cholinesterase. **Nature**, v. 200, p. 1185-1187, 1963.

HIDAKA, K.; IUCHI, I.; YAMASAKI, T.; OHHARA, M.; SHODA, T.; PRIMO-PARMO, S. L. e 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. 535-540, 1992.

HIDAKA, K.; IUCHI, I.; TOMITA, M.; WATANABE, Y.; MINATOGAWA, Y.; IWASAKI, K.; GOTOH, K. e SHIMIZU, C. Genetic analysis of a Japanese patient with butyrylcholinesterase deficiency. **Ann. Hum. Genet.**, v. 61, p. 491-496, 1997a.

- HIDAKA, K., IUCHI, I., YAMASAKI, T., UEDA, N. e HUKANO, K. Nonsense mutation in exon 2 of the butyrylcholinesterase gene: a case of familial cholinesterasemia. **Clinica Chimica Acta**, v. 261, p. 27-34, 1997b.
- HIDAKA, K.; WATANABE, Y.; TOMITA, M.; UEDA, N.; HIGASHI, M.; MINATOGAWA, Y. e IUCHI, I. Gene analysis of genomic DNA from stored serum by polymerase chain reaction: identification of three missense mutations in patients with cholinesterasemia and ABO genotyping. **Clin. Chim. Acta**, v. 303, p. 61–67, 2001.
- HOFFMAN, R.S.; MORASCO, R. e GOLDFRANK, L.R. Administration of purified human plasma cholinesterase protects against cocaine toxicity in mice. **J. Toxicol. Clin. Toxicol.**, v. 34, p. 259–266, 1996.
- HOSODA, H.; KOJIMA, M.; MATSUO, H. e KANGAWA, K. Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 279, p. 909-913, 2000.
- INABA, T., STEWART, D. J. e KALOW, W. Metabolism of cocaine in man. **Clin Pharmacol. Ther.**, v.23, p. 547–552, 1978.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Pesquisa de Orçamentos Familiares-2002-2003**, 2003.
- INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY (IUBMB). Disponível em: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme>. Acessado em 16/07/2005.
- JBILO, O.; TOUTANT, J. P.; VATSIS, K. P.; CHATONNET, A. e LOCKRIDGE, O. Promoter and transcription start site of human and rabbit butyrylcholinesterase genes. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 20829-20837, 1994.
- JENSEN, F. S.; BARTELS, C. F. e LA DU, B. N. Structural basis of the butyrylcholinesterase H-variant segregating in two Danish families. **Pharmacogenetics**, v. 2, p. 234-240, 1992.

- KÁLMÁN, J.; JUHÁSZ, A.; RAKONCZAY, Z.; ÁBRAHÁM, G.; ZANAA, M.; BODAD, K.; FARKAS, T.; PENKEF, B. e JANKA, Z. Increased serum butyrylcholinesterase activity in type IIb hyperlipidaemic patients. **Life Sci.**, v. 75, p. 1195–1204, 2004.
- KALOW, W. e STARON, N. On distribution and inheritance of atypical forms of human cholinesterase as indicated by dibucaine numbers. **Canad. J. Biochem. Physiol.**, v. 35, p. 1305-1320, 1957.
- KOJIMA, M.; HOSODA, H.; MATSUO, H. e KANGAWA, K. Ghrelin: Discovery of the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. **Trends Endocrinol. Metab.**, v. 12, p. 118-122, 2001.
- KOJIMA, M.; KANGAWA, K. Ghrelin: structure and function. **Physio. Rev.**, v. 85, p. 495-522, 2005.
- KORBONITS, M.; GUEORGUIEV, M.; O'GRADY, E.; LECOEUR, C.; SWAN, D. C.; MEIN, C. A.; WEILL, J.; GROSSMAN, A. B. e FROGUEL, P. A variation in the ghrelin gene increases weight and decreases insulin secretion in tall, obese children. **J. Clin. Endocr. Metab.**, v. 87, p. 4005-4008, 2002.
- KOZAK, M. Structural features in eukaryotic mRNA that modulate the initiation of translation. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 19867-19870, 1991.
- KREJCI, E., THOMINE, S., BOSCHETTI, N., LEGAY, C., SKETELJ, J. e MASSOULIÉ, J. The mammalian gene of acetylcholinesterase-associated collagen. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 22840-22847, 1997.
- KUTTY, K. M.; ROWDEN, G. e COX, A. R. Interrelationship between serum beta-lipoprotein and cholinesterase. **Canad. J. Biochem.**, v. 51, p. 883-887, 1973.
- KUTTY, K. M.; JACOB, J. C.; HUTTON, C. J.; DAVIS, P. J. e PETERSON, S. C. Serum beta-lipoproteins: studies in a patient and in guinea pigs after the ingestion of organophosphorus compounds. **Clin. Biochem.**, v. 8, p. 379-383, 1975.

KUTTY, K. M.; REDHEENDRAN, R. e MURPHY, D. Serum cholinesterase: function in lipoprotein metabolism. **Experientia**, v. 33, p. 420-421, 1977.

KUTTY, K. M. e PAYNE, R. H. Serum pseudocholinesterase and very-low-density lipoprotein metabolism. **J. Clin. Lab. Anal.**, v. 8, p.247-250, 1994.

LAWRENCE, S. H. e MELNICK, P. J. Enzymatic activity related to human serum beta-

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

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

LOCKRIDGE, O.; ADKINS, S. e LA DU, B.N. Location of disulfid bonds within the sequence of human serum cholinesterase. **J. Biol. Chem.**, v. 262 (27), p. 12945-12952, 1987b.

LU, W. D., HADA, T., FUKUI, K., IMANISHI, H., MATSUOKA, N., IWASAKI, A. e HIGASHINO, K. Familial hypocholinesterasemia found in a family and a new confirmed mutation. **Internal Medicine**, v. 36, p. 9-13, 1997.

MAEKAWA, M.; SUDO, K.; KANNO, T.; K, 2 8 4

- MASSON, P. **Molecular heterogeneity of human plasma cholinesterase. In Massoulié J. et al. Cholinesterases: structure, function, mechanisms, genetics and cell biology.** eds. Washington DC: American Chemical Society, p. 42-45, 1991.
- MASSON, P.; XIE, W.; FROMENT, M.T e LOCKRIDGE, O. Effects of mutations of active site residues and amino acids interacting with the 6 loop on substrate activation of butyrylcholinesterase. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1544, p. 166-176, 2001.
- MASSOULIÉ, J. e BON, S. The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates. **Annual Review of Neurosciences**, v. 5, p. 57-106, 1982.
- MCGUIRE, M. C.; NOGUEIRA, C. P.; BARTELS, C. F.; LIGHTSTONE, H.; HAJRA, A.; VAN DER SPEK, A. F. L.; LOCKRIDGE, O. e LA DU, B. N. Identification of the structural mutation responsible for the dibucaine-resistant (atypical) variant form of human serum cholinesterase. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 86, p. 953-957, 1989.
- MIKAMI, L. R., SOUZA, R. L. R., CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A. e LOCKRIDGE, O. New genetic variants of human butyrylcholinesterase in the Brazilian population. **VIII International Meeting on Cholinesterases, Abstract**, v. 60, p. 23, 2004.
- MILLARD, C.B. e BROOMFIELD, C.A. A computer model of glycosylated human butyrylcholinesterase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 189, p. 1280-1286, 1992.
- MURATANI, K.; HADA, T.; YAMAMOTO, Y.; KANEKO, T.; SHIGETO, Y.; OHUE, T.; FURUYAMA, J. e HIGASHINO, K. Inactivation of the cholinesterase gene by Alu insertion: possible mechanism for human gene transposition. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 88, p. 11315-11319, 1991.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> . Acessado em 16/07/2005.

- NEEL, J. V. Diabetes mellitus: a “thrifty” genotype rendered detrimental by “progress”? **Am. J. Hum. Genet.**, v. 14, p. 353-362, 1962.
- NICOLET, Y.; LOCKRIDGE, O.; MASSON, P. e FONTECILLA-CAMPS, J.C. Crystal structure of butyrylcholinesterase and of its complexes with substrats and products. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 41141-41147, 2003.
- NOGUEIRA, C. P.; MCGUIRE, M. C.; GRAESER, C.; BARTELS, C. F.; ARPAGAU, M.; VAN DER SPEK, A. F. L.; LIGHTSTONE, H.; LOCKRIDGE, O. e 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. 934-942, 1990.
- NOGUEIRA, C. P.; BARTELS, C. F. e 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. 821-828, 1992.
- ON-KEI CHAN, A., LAM, C. W., TONG, S. F., MAN TUNG, C., YUNG, K., CHAN, Y. W., AU, K. M., YUEN, Y. P., HUNG, C. T., NG, K. P. e SHEK, C. C. Novel mutations in the *BCHE* gene in patients with no butyrylcholinesterase activity. **Clinica Chimica Acta**, v. 351, p. 155-159, 2005.
- ORESKOVIC, K. e KUNEC-VAJIC, E. Pseudocholinesterase in alloxan-diabetic rats. **Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol**, v. 78, p. 117-120, 1992.
- PERRIER, A. L., MASSOULIÉ J. e KREJCI E. PRIMA: The membrane anchor of acetylcholinesterase in the brain. **Neuron**, v. 33, p. 275-285, 2002.
- PLOMIN, R., DE FRIES, J. C., MCCLEARN, G. E., e RUTTER, M. Behavioral Genetic. **Freeman & Co.** v.3, 1997.
- PRIMO-PARMO, S. L.; BARTELS, C. F.; WIERSEMA, B.; VAN DER SPEK, A. F. L.; INNIS, J. W. e 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.

- PRIMO-PARMO, S. L.; LIGHTSTONE, H. e LA DU B. N. Characterization of an unstable variant (BChE115D) of human butyrylcholinesterase. **Pharmacogenetics**, v. 7, p. 27-34, 1997.
- ROSENBAUM, M.; LEIBEL, R.L.; HIRSCH J. Obesity. **New England Journal of Medicine**, v. 337, p. 396-407, 1997.
- RUBINSTEIN, H. M.; DIETZ, A. A. e LUBRANO, T. E1<sup>K</sup>, another quantitative variant at cholinesterase locus1. **J. Med. Genet.**, v. 15, p. 27-29, 1978.
- SAKAMOTO, N.; HIDAKA, K.; FUJISAWA, T.; MAEDA, M. e 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. 159-166, 1998.
- SCOTT, E. M. e POWERS, R. F. Properties of the C5 variant form of human serum cholinesterase. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 26, p. 189-194, 1974.
- SHAM, P. C. e CURTIS D. Monte Carlo tests for associations between disease and alleles at highly polymorphic loci. **Ann. Hum. Genet.**, v. 59, p. 97-105, 1995.
- SOREQ, H.; ZAMIR, R.; ZEVIN-SONKIN, D.; ZAKUT, H. Human cholinesterase genes localized by hybridization to chromosomes 3 and 16. **Hum. Genet.**, v.77, p. 325-328, 1987.
- SOUZA, R.L.R.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.; SILVA, A.C.D. e KAISS, J. Nova banda da butirilcolinesterase humana detectada em fenótipos CHE2 C5-. **Rev. Brasil. Genet.**, v. 16, 103, 1993. Suplemento.
- SOUZA, R. L. R.; FADEL-PICHETH, C.; ALLEBRANDT, K. V.; FURTADO, L. e CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A. Possible influence of *BCHE* locus of butyrylcholinesterase on stature and body mass index. **Am. J. Phys. Ant.**, v. 326, p. 329-334, 2005a.



- SOUZA, R. L. R.; MIKAMI, L. R.; MAEGAWA, R. O. B. e CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A. Four new mutations in the *BCHE* gene of butyrylcholinesterase in a Brazilian blood donor sample. **Mol. Genet. Metab.**, v. 84, p. 349-353, 2005b.
- STEWART, D.J.; INABA, T.; TANG, B.K.; e KALOW, W. Hydrolysis of cocaine in human plasma by cholinesterase. **Life Sci.**, v. 20, p. 1557–1564, 1977.
- STUEBER-ODEBRECHT, N.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.; PRIMO-PARMO, S.L. e CARRENHO, J.M.X. Studies on the *CHE1* locus of serum cholinesterase and surnames in a sample from Southern Brazil. **Rev. Brasil. Genet.**, v. 8, p. 535-543, 1985
- SUDO, K.; MAEKAWA, M.; AKIZUKI, S.; MAGARA, T. e KANNO, T. Three different point mutations in the butyrylcholinesterase gene of three Japanese subjects with a silent phenotype. **Clin. Biochem.**, v. 29, p. 165-169, 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. 372-375, 1997.
- SUGIMORI, T. Shortened action of succinylcholine in individuals with cholinesterase C5 isoenzyme. **Canad. Anaesth. Soc. J.**, v. 33, p. 321-327, 1986.
- SUN, H.; YAZAL, J.E.; LOCKRIDGE, O.; SCHOPFER, L.M.; BRIMIJOIN, S. e PANG, Y-P. Predicted Michaelis-Menten complexes of cocaine-butyrylcholinesterase. Engineering effective butyrylcholinesterase mutants for cocaine detoxication. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 9330-9336, 2001.
- SUN, H.; PANG, Y-P.; LOCKRIDGE, O. e BRIMIJOIN, S. Re-engineering butyrylcholinesterase as a cocaine hydrolase. **Mol. Pharmacol.**, v. 62, p. 220-224, 2002.

- TANAKA, M.; HAYSHIDA, Y.; IGUCHI, T.; AKAN, N.; NAKAI, N.; NAKASHIMA, K.  
Organization of the mouse ghrelin gene and promoter: occurrence of a short noncoding first exon. **Endocrinology**, v. 124, p. 3697-3700, 2001.
- TAKAGI, H., NARAHARA, A., TAKAYAMA, H., SHIMODA, R., NAGAMINE, T. e MORI, M.  
A new point mutation in cholinesterase: relationship between multiple mutation sites and enzyme activity. **International Hepatology Communications**, v. 6, p. 288-293, 1997.
- TRACEY, D. W., CYNTHIA, M., BULIK, A., C., HEATH, N., G., M., e LINDON, J., E. The influence of genetic and environmental factors in estimations of current body size, desired body size, and body dissatisfaction **Twin Research**. V., 4, p. 260- 265, 2001.
- TSCHÖP, M.; WEYER, C.; TATARANNI, A. P.; DEVANARAYAN, V.; RAVUSSIN, E. e HEIMAN, M. L. Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. **Diabetes**, v. 50, p. 707-709, 2000.
- TSCHÖP, M.; SMILEY, D. L. e HELMAN, M. L. Ghrelin induces adiposity in rodents. **Nature**, v. 407, p. 908-913, 2001.
- UKKOLA, O.; RAVUSSIN, E.; JACOBSON, P.; SNYDER, E. E.; CHAGNON, M.; SJOSTROM, L. e BOUCHARD, C. Mutations in the preproghrelin/ghrelin gene associated with obesity in humans. **J. Clin. Endocr. Metab.**, v. 86, p. 3996-3999, 2001.
- XIE, W.; ALTAMIRANO, C.V.; BARTELS, C.F.; SPEIRS, R.J.; CASHMAN, R.J. e LOCKRIDGE, O. An improved cocaine hydrolase: the A328Y mutant of human butyrylcholinesterase is 4-fold more efficient. **Mol. Pharmacol.**, v. 55, p. 83-91, 1999.
- WESCOE, W. C.; HUNT, C. H.; RIKER, W. F. e LITT, I. C. Regeneration rates of serum cholinesterase in normal individuals and in patients with liver damage. **Am. J. Physiol.**, v. 149, p. 549-551, 1947.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Physical status: the use and interpretation of anthropometry.** World Health Organization Technical Reports, 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Obesity: preventing and managing the global epidemic.** World Health Organization Technical Reports, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WESTERN PACIFIC REGION. **The Asia-Pacific perspective: redefining obesity and its treatment.** Published by Health Communications Australia on behalf of the Steering Committee, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Diet, Nutrition and the prevention of chronic diseases. WHO.** Technical Reports Series n. 916. World Health Organization Expert Committee, Geneva, 2003.

YEN, T.; NIGHTINGALE, B. N.; BURNS, J. C.; SULLIVAN, D. R. e STEWART, P. M. Butyrylcholinesterase (*BCHE*) genotyping for post-succinylcholine apnea in an Australian population. **Clin. Chem.**, v. 49, p. 1297-1308, 2003.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)