

## ESTUDO DAS FORMAS MOLECULARES DA BUTIRILCOLINESTERASE EM CÃES (*Canis familiaris*)

*STUDY OF MOLECULAR FORMS OF BUTYRYLCHOLINESTERASE IN DOGS (*Canis familiaris*)*

Ana Carolina Pitt<sup>1</sup>  
Liya Regina Mikami<sup>2</sup>  
Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza<sup>3</sup>  
Lupe Furtado Alle<sup>4</sup>

Recebido em 16 de dezembro de 2015

Aceito em 29 de março de 2016

### RESUMO

A butirilcolinesterase e a acetilcolinesterase, BChE e AChE, são enzimas do grupo das colinesterases que realizam hidrólise de diversos ésteres de colina. A BChE é uma enzima multifuncional distribuída por diversas partes do corpo e que apresenta isoformas, sendo associada a outras substâncias, como à albumina e, no caso da banda C<sub>5</sub>, a uma substância não identificada. Muitos estudos sugerem sua ligação com diversas doenças do metabolismo, do sistema cardiovascular e nervoso, sendo a maioria deles em humanos. O presente trabalho visou observar a presença da BChE em cães, para verificar sua atividade, isoformas e presença do fenótipo C<sub>5</sub><sup>+</sup>. Para determinação das isoformas e da presença do fenótipo C<sub>5</sub><sup>+</sup> foram utilizados géis de poliacrilamida com dois gradientes de concentração (5 e 7%) e ágar ácido, respectivamente, e a leitura da atividade enzimática foi feita em duplicata em espectrofotômetro em comprimento de onda de 410 nm. O fenótipo C<sub>5</sub><sup>+</sup> foi encontrado em 99 (97,05%) de um total de 102 amostras, e a média das atividades enzimáticas foi de 2,27 KU/L. Visto que a presença da banda C<sub>5</sub><sup>+</sup> em humanos é de até 10% em euro-descendentes, conclui-se que em cães a prevalência é muito maior, atingindo quase 100%. Já a atividade enzimática encontra-se com uma variação menor do que a encontrada em seres humanos, que é de 4,62 KU/L. As formas moleculares foram comparadas entre os cães, não sendo observada diferença significativa entre as bandas.

**DESCRITORES:** butirilcolinesterase, atividade enzimática, fenótipo C<sub>5</sub><sup>+</sup>, cães.

### ABSTRACT

The butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase, BChE and AChE, respectively, are enzymes of the cholinesterase group that perform hydrolysis of various choline esters. BChE is a multifunctional enzyme distributed in various parts of the body and has several polymorphisms, being associated with other substances, such as albumin, and, in the case of C<sub>5</sub> band, one unidentified substance. Many studies suggest a connection with several metabolic diseases, cardiovascular and nervous systems, most of the studies being in humans. This study aims to observe the presence of BChE in dogs, to verify their activity, isoforms and the presence of the C<sub>5</sub><sup>+</sup> phenotype. For the determination of the isoforms and the C<sub>5</sub><sup>+</sup> phenotype were used polycrylamide gel with 2 gradients of concentration 5 and 7% and acid agar, respectively, and the reading of enzyme activity was performed in duplicate in a spectrophotometer in wave length of 410 nm. The C<sub>5</sub><sup>+</sup> phenotype was found in 99 (97, 05%) of 102 samples and the average of the enzymatic activity was 2, 27 KU/L. Considering that the presence of C<sub>5</sub><sup>+</sup> in humans is up to 10% in Euro descendants, it can be concluded that in dogs the prevalence is much higher, reaching almost 100%. On the other hand the enzymatic activity, has with a smaller variation found in humans that is ± 4.62 KU / L. The molecular forms were compared between the groups of dogs and no significant difference was seen between the bands.

**KEYWORDS:** butyrylcholinesterase, enzyme activity, phenotype C<sub>5</sub><sup>+</sup>, dogs.

<sup>1</sup> Acadêmica do sétimo período do curso de Biomedicina do Centro Universitário do Brasil – UNIBRASIL.

<sup>2</sup> Doutora em Genética. Professora da Escola de Saúde do Centro Universitário Autônomo do Brasil – UNIBRASIL. E-mail: [liyamikami@gmail.com](mailto:liyamikami@gmail.com)

<sup>3</sup> Doutor em Genética. Professor da Universidade Federal do Paraná. E-mail: [Ricardo.lehtonen@gmail.com](mailto:Ricardo.lehtonen@gmail.com)

<sup>4</sup> Doutora em Genética. Professora da Universidade Federal do Paraná. E-mail: [lupealle@gmail.com](mailto:lupealle@gmail.com).

## INTRODUÇÃO

As colinesterases, acetilcolinesterase (AChE), e butirilcolinesterase (BChE), são enzimas responsáveis por catalisar a hidrólise de ésteres de colina, sendo a AChE eritrocitária e a BChE presente no soro, e são nomeadas com base em seu substrato e inibidores<sup>1,2,3,4</sup>. Ambas as colinesterases são inibidas por substâncias como acetil, carbamil ou fosfato, que se instalam no sítio catalítico da enzima bloqueando sua função de hidrólise. Essas enzimas são consideradas marcadores de exposição a pesticidas e organofosforados, visto que estes inibem a sua atividade no sangue<sup>4,5</sup>.

A butirilcolinesterase, antigamente denominada de pseudocolinesterase, é sintetizada em diversos órgãos e tecidos, dentre eles pulmão, coração, cérebro, tecido adiposo e, principalmente, o fígado. A BChE é responsável por hidrolisar a butirilcolina, acetilcolina, cocaína, heroína, ácido acetilsalicílico, dentre outros<sup>6,7</sup>. Essa enzima não possui uma função específica determinada, porém, alguns estudos indicam que esteja relacionada ao metabolismo de lipídios, síndromes metabólicas, IMC (Índice de Massa Corporal), obesidade, doenças como o Alzheimer e diabetes *mellitus* e na substituição da acetilcolinesterase quando há falta ou diminuição da mesma<sup>1, 6, 8, 9, 10, 11,12</sup>.

A BChE é codificada pelo gene *BCHE*, que está localizado no braço longo do cromossomo 3 (3q26.1-q26.2), no loco *CHE1*, antigamente denominado E1. No plasma humano, a enzima apresenta diversas isoformas, sendo representadas por monômeros (C<sub>1</sub>), associados à albumina (C<sub>1</sub>-alb), dímeros (C<sub>2</sub>), tetrâmeros (C<sub>4</sub>) e trímeros (C<sub>3</sub>), sendo que a C<sub>4</sub> é a mais abundante e as demais são encontradas em proporções menores e detectadas através de gel de poliacrilamida. Uma quinta forma molecular é encontrada, estando relacionada ao loco *CHE2* (antiga E<sub>2</sub>) presente no cromossomo 2, e sugere a ligação da BChE a uma substância não identificada, conhecida como C<sub>5</sub><sup>9,10,13,14,15,16,17</sup>.

De acordo com Masson *et al*<sup>15</sup> a presença da banda C<sub>5</sub> é vista com maior frequência (cerca de 10%) em populações euro-descendentes, sendo menos frequente em outras etnias. A presença da banda determina o fenótipo C<sub>5</sub><sup>+</sup> e a sua ausência C<sub>5</sub><sup>-</sup>. Observa-se aumento de 25% da atividade da butirilcolinesterase quando esta banda está presente<sup>18</sup>.

Os cães descendem da família dos canídeos (*Canidae*), de que lobos, raposas e chacais também fazem parte. São animais que evoluíram de mamíferos da era pré-histórica cerca de 50 milhões de anos atrás e acredita-se que seu ancestral mais recente seja os *Canis lupus*, o lobo. Supõe-se que sejam os primeiros animais a serem domesticados, criando laços de afetividade e lealdade com seus donos, através de uma comunicação social e comportamental

e dividindo o mesmo ambiente, sendo popularmente considerado como “o melhor amigo do homem”. Sua proximidade com o ser humano o fez objeto de estudos, sendo que Andics *et al.*<sup>20</sup> cita a vocalização como uma semelhança entre as espécies<sup>19, 20, 21, 22</sup>.

Devido ao fato de a maioria dos estudos com a BChE serem realizados em amostras humanas, este projeto buscou verificar a presença dessa enzima em cães, visto que o estudo em animais não possui muitos registros, e assim analisar se existe semelhança com humanos e contribuir para o entendimento da enzima.

## **METODOLOGIA**

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob parecer nº 783.

### **1.1. Coleta de Amostras**

Foi coletado no Hospital Veterinário de Curitiba sangue de diferentes raças de cães em tubos com EDTA que foram submetidos à centrifugação para separação do plasma.

### **1.2. Atividade Enzimática**

A atividade enzimática foi mensurada em um espectrofotômetro, onde foram determinadas as absorbâncias das amostras. Os protocolos utilizados foram os descritos por Evans e Wroe<sup>23</sup> e Naik, Liu e Saxena<sup>4</sup>. Esse método é baseado na hidrólise da butirilticolina pela BChE, produzindo butirato e tiocolina, a qual reage com o DTNB (ácido 5,5'-bisditio-2-nitrobenzóico), gerando 2-nitro-5-mercaptobenzoato de coloração amarela. Foram diluídos 5µL de plasma em 500µL de água destilada em um microtubo 1,5mL. Aplicou-se nos poços de uma placa 220µL de tampão DTNB e 25µL da amostra diluída. Após montagem da placa, foi adicionado 5µL de butirilticolina e aferiu-se a atividade em duplicata, realizando ao final uma média das mesmas, no comprimento de onda 410 nm por cerca de 1 minuto. Após o equipamento realizar as quatro leituras calcula-se a  $\Delta$ /minuto (variação média de absorbância por minuto). Para a obtenção da atividade (KU/L),  $\Delta$ /minuto é multiplicado pelo fator 96,3.

Foi utilizado um grupo humano para realização da comparação entre as atividades enzimáticas de humanos e cães, sendo o grupo humano retirado do estudo de Mikami<sup>18</sup>, onde as amostras bem como suas atividades enzimáticas, foram escolhidas aleatoriamente e submetidas ao teste Mann-Whitney (Wilcoxon Rank-Sum Test).

### 1.3. Fenotipagem do loco CHE2 (C5<sup>+</sup>)

Foi feita a identificação da banda C<sub>5</sub> nas amostras de plasma através da eletroforese em gel de ágar ácido, conforme protocolo descrito em Alcântara *et al.*<sup>25</sup>.

A solução de Bacto Agar foi preparada com 5 ml de tampão citrato, com pH de 6,2, 45 mL de água e 0,5 gramas de Ágar, ajustando o pH para cerca de 6,4. A solução foi aquecida até dissolução total do ágar, tornando-a translúcida, sem nunca atingir fervura. Depois de aquecida, a solução foi vertida sobre uma placa de vidro previamente montada, esperou-se sua total polimerização e deixou-se em repouso por cerca de 12h a 4°C. Após esse período, 2μL de cada amostra (plasma) foram aplicados ao gel com ajuda de uma placa de cobre, com locais estabelecidos com auxílio de um desenho em uma folha de papel. A placa foi submetida à eletroforese com tampão citrato de pH 6,7 durante quatro horas. A corrida eletroforética foi realizada com voltagem de 135 V e 35mA.

Após a corrida, despejou-se sobre a placa uma solução reveladora. Essa solução foi preparada com 150mg de Fast Red TR, 2,7mL de α-naftil acetato e 60mL de tampão fosfato pH 7,1. A placa foi incubada por cerca de 30 minutos à 37°C e, após a revelação das bandas, transferiu-se o gel para papel filtro, prensando-se entre duas placas e levando-se novamente à estufa para sua total secagem. A ferramenta *VassarStats: Website for Statistical Computation* foi escolhida para a análise estatística, que através do teste foi possível observar a presença da banda (frequência), considerando-se significativos valores de *p* menores que 5%.

### 1.4. Determinação das formas moleculares da BChE

O protocolo utilizado foi baseado em Boberg *et al.*<sup>17</sup> As formas moleculares da BChE foram observadas através de gel de poli(acrilamida) com dois gradientes de densidades diferentes, sendo o de 5% o gel de alinhamento e o de 7% o gel de separação. Montaram-se as placas de vidro previamente. O primeiro gel foi o de 7%, onde a solução foi feita com 7mL de acrilamida, 23mL de TBE 1x, 25μL de TEMED e 250μL de PA 10% (persulfato de amônio). Despejou-se a solução entre as placas e acrescentou-se butanol para alinhamento do gel. Deixou-se polimerizar por cerca de 30 minutos e então retirou-se o butanol com água destilada. O segundo gel foi feito com 3,5mL de acrilamida, 16,5mL de TBE 1x, 25μL de TEMED e 250μL de PA. Despejou-se essa solução até completar a placa e em seguida inseriu-se o pente delicadamente. Após polimerização (30 minutos), retirou-se o pente cuidadosamente e lavou-se os poços com água destilada. Após lavagem, adicionou-se água destilada nos poços para impedir o ressecamento, fechou-se com parafilme e deixou-se durante 12h a 4°C.

Após repouso, separou-se micro tubos de 1,5 mL onde foi feita uma diluição de 9,8µL de tampão azul de bromofenol com 7µL de plasma e agitou-se para posterior aplicação no gel. Aplicou-se 16µL nos poços. Inseriu-se a placa do gel na cuba com TBE na parte de cima e de baixo, retirando qualquer tipo de bolha, ligando os eletrodos e configurando a corrida para 100V, 20mA, durante oito horas, a 4°C.

Após a corrida eletroforética, é realizada a coloração do gel com uma solução de 150mg de Fast Red RT, 2,1mL de  $\alpha$ -naftil acetato e 60mL de tampão fosfato pH 7,1, ficando cerca de 30 minutos na estufa à 35°C. Após a coloração, o gel é colocado entre duas folhas de transparência e digitalizado.

A análise dos géis de poliacrilamida foi realizada através do programa *KODAKID Image Analysis Software* e a diferença significativa entre a prevalência das bandas entre os grupos de cães pelo programa *BioEstat 5.0*. A análise foi feita pelo teste estatístico de Kruskal-Wallis, que fez uma comparação entre a intensidade relativa das bandas entre os portes (pequeno, médio e grande) e os SRD e somente com os portes.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram utilizadas amostras de cães das raças pinscher, poodle, dachshund, doberman, rottweiler, shih tzu, pastor belga, vizsla, pequinês, weimaraner, chow chow, pastor alemão, pit bull, lhasa apsu, labrador, schnauzer, yorkshire, bichon frise, golder retriever, basset, border collie, mastim napolitano, maltês, beagle, shapei, cocker, Rottweiler e SRD (sem raça definida). Do total de 102 amostras, 42 cães eram machos e 60 fêmeas. Pode-se observar a partir dos resultados obtidos algumas diferenças entre a BChE humana e a de cães, não ocorrendo nenhum critério de seletividade na escolha dos cães, incluindo gênero e idade, sendo observado desde os que possuíam patologias ou até mesmo ausência de alguma. Tecles *et al*<sup>25</sup> citam que existe semelhança entre a BChE de cães e humanos, fazendo desses animais um bom modelo para estudar a enzima.

A atividade enzimática foi medida e observou-se diferença significativa ( $p$  menor que 5%) entre as espécies, visto que em cães a atividade enzimática tem como média 2,27 KU/L e em humanos é de 4,62 KU/L, segundo Mikami<sup>18</sup>.

O quadro 1 mostra a distribuição das raças de cães e quanto cada uma delas contribuiu com a amostragem total, sendo possível observar que os SRD, poodles e pinschers foram as de maior prevalência, totalizando aproximadamente 44% da quantidade total analisada, e algumas apenas contribuíram com uma amostra.

**QUADRO 1.** Descrição dos animais analisados, número amostral e valores da atividade enzimática encontrados.

<b>RAÇAS</b>	<b>Nº DE ANIMAIS</b>	<b>ATIVIDADE ENZIMÁTICA (KU/L)</b>
WEIMARANER	1	1,86
PASTOR ALEMÃO	1	4,05
SCHNAUZER	1	3,14
BICHON FRISÉ	1	4,52
VIZSLA	1	2,13
PASTOR BELGA	1	1,68
DOBERMAN	1	1,73
BASSET	1	1,71
KUVASZ	1	1,63
POINTER	1	0,67
BORDER COLLIE	1	3,11
MASTIM NAPOLITANO	1	1,50
BEAGLE	1	2,92
SHARPEI	2	1,18
BOXER	2	1,72
YORKSHIRE	2	2,23
GOLDEN RETRIEVER	2	3,30
MALTÊS	2	1,74
PEQUINÊS	2	2,10
ROTTWEILER	2	1,38
COCKER	2	1,22
CHOW CHOW	3	2,53
BULL TERRIER	3	4,52
LABRADOR	3	2,38
LHASA APSU	4	3,05
SHIT TZU	4	2,30
PIT BULL	5	2,14
DACHSHUND	6	2,06
PINSCHER	9	2,17
POODLE	11	1,69
SRD	25	2,47
<b>TOTAL</b>	<b>102</b>	<b>2,28</b>

Os cães apresentaram atividade enzimática da BChE variando de 0,1 a 7,1 KU/L, com uma média de 2,27 KU/L, sendo que o cão com maior atividade enzimática (7,1 KU/L) não portava nenhuma patologia aparente.

O quadro 2 é uma representação da separação das amostras conforme o porte, sendo eles: pequeno, médio e grande e SRD. O quadro também mostra a quantidade de amostra referente a cada grupo e as respectivas atividades enzimáticas.

**QUADRO 2.** Identificação dos portes e a média da atividade enzimática de cada grupo

<b>PORTES</b>	<b>MÉDIA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA</b>
Pequeno (43 amostras)	2,18 KU/L
Médio (19 amostras)	2,43 KU/L
Grande (15 amostras)	2,07 KU/L
SRD (25 amostras)	2,43 KU/L

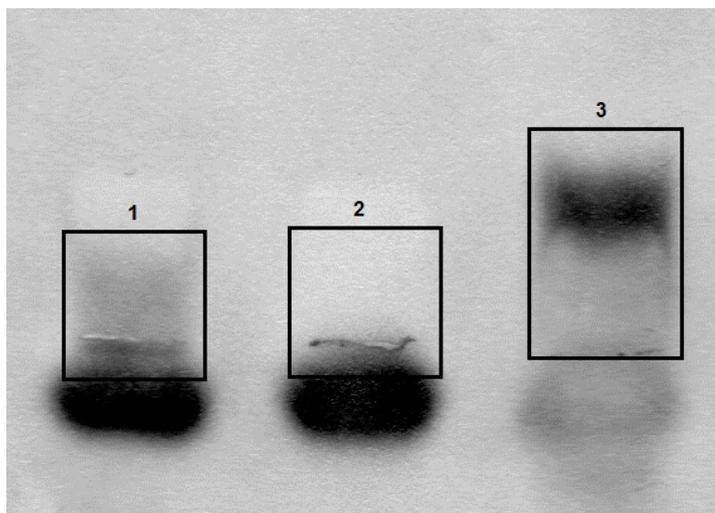
Cerca de 10% dos cães apresentaram algum tipo de neoplasia com a média de sua atividade enzimática sendo de 1,67 KU/L. Os cães que apresentaram algum tipo de doença renal tiveram como média enzimática 1,34 KU/L, e os que apresentaram algum problema hepático tiveram média 1,99 KU/L. Os cães que apresentaram alguma doença comum canina como cinomose, parvovirose, leptospirose, erliquiose, piometra e presença de algum tipo de parasita tiveram como média de atividade enzimática 2,94 KU/L. Alguns cães (3) apresentaram diabetes, sendo que a média enzimática foi de 2,27 KU/L, ficando igual a média encontrada no estudo.

Segundo Saccaro <sup>26</sup>, alguns fatores aumentam a atividade da BChE em humanos, dentre eles: diabetes, obesidade, aumento da pressão arterial, doenças renais e artrite, bem como outros fatores que diminuem como: pancreatite, úlceras intestinais, alguns tumores, infarto e infecções. Os cães que apresentaram algum tipo de câncer possuíam a média da atividade enzimática baixa quando se comparada à média normal como esperado, diferente dos cães que apresentaram algum tipo de doença renal que apresentaram atividade baixa, que não era esperado, visto que doenças renais aumentam a atividade da enzima. Cães que apresentaram algum problema hepático (lugar onde ocorre a síntese da BChE) tiveram a atividade enzimática diminuída (média 1,99 KU/L), como era esperado. Os cães que apresentaram alguma doença canina comum tiveram sua atividade aumentada e os que possuíam diabetes ficaram na média, contrariando estudos que indicavam que infecções diminuem e diabetes aumentam a atividade da enzima. Devido a este fato, acredita-se que ocorra outra diferença entre a BChE humana e canina, porém, mais estudos devem ser feitos para se confirmar tal hipótese, visto que a amostragem não era consideravelmente grande e

não se tem muitas informações sobre os cães, se estavam em tratamento das doenças ou em qual estado chegaram ao Hospital Veterinário.

Na figura 1 é possível observar uma comparação entre controles humanos e uma amostra de cão.

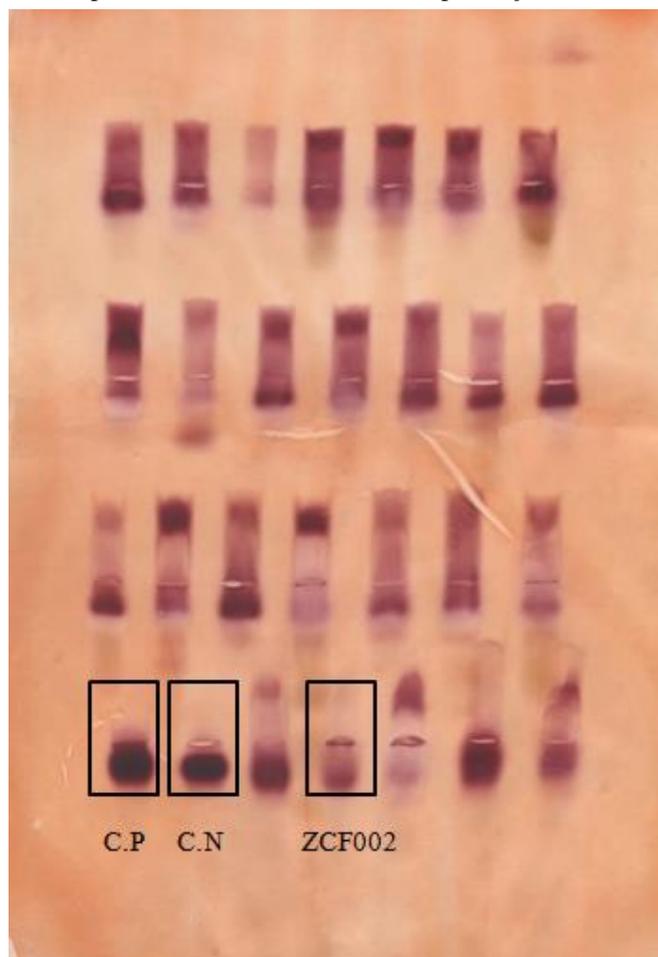
**FIGURA 1.** Interpretação e diferenciação de amostras positivas da negativa. Um rastro a partir da amostra (em preto) é observado em 1, indicando uma amostra positiva para o fenótipo  $c_5^+$ , enquanto em 2 não é possível observar esse rastro. Em cães observou-se uma extensão maior deste rastro, diferenciando muito do 1, porém, ambos indicam positivo para a banda  $c_5$ . Em 3 é possível observar a amostra de cão que indica positividade para  $c_5$ .



A figura 2 mostra um gel de agar ácido, onde pode ser observado que a grande maioria das amostras dos cães (97%) apresenta a banda  $C_5$ . A amostra ZCF002 mostra um exemplo de fenótipo  $C_5^-$ , visto que não é possível observar o rastro da banda como nas demais amostras. Outras três amostras não apresentaram a presença da banda  $C_5$ : ZCF40, ZCF056 e ZCF092, sendo que todas apresentaram atividade enzimática abaixo da média.

Em relação ao fenótipo  $C_5$  foi observada a maior diferença entre humanos e cães, visto que 97 % das amostras analisadas se mostraram positivas em relação à presença da banda  $C_5$ , incomum de ser observada em humanos, visto que apenas 10% da população euro-descendente apresenta este fenótipo. Não se pode observar diferença de atividade enzimática quando comparou-se cães que possuíam a banda  $C_5^+$  e os que não possuíam, pois a atividade dos cães com ausência variou aproximadamente entre 2,00 – 4,00 KU/L, não os diferenciando dos demais, que possuem essa média.

**FIGURA 2.** Gel de ágar ácido corado com fast red rt para determinação da presença da banda  $c_5$ . C.n. representa o controle negativo, c.p. controle positivo e zcf002 a amostra sem presença da banda  $c_5$ .



Em relação às formas moleculares da BChE, foi possível observar que 100% das amostras apresentaram o tetrâmero ( $C_4$ ), sendo que esta forma é a mais abundante no soro. Sugere-se que ela não se apresenta de forma pura no gel de poliacrilamida, sendo uma mistura de várias outras substâncias, inclusive a banda  $C_5$ , como sugere Furtado<sup>27</sup>, podendo então levantar a hipótese de por que a maioria dos cães possui fenótipo  $C_5^+$  bem como a possibilidade de apresentarem a substância não identificada que se liga a BChE em maior abundância do que os humanos. Acredita-se também que as demais formas moleculares são formadas a partir da degradação do tetrâmero (que se apresenta como um arranjo de dímeros), formando como produto a  $C_1$ ,  $C_2$  e  $C_3$ , como cita Furtado<sup>27</sup>. A amostra ZCF013 não foi inserida no gel para estudo das isoformas por motivos externos e nem todas as amostras apresentaram todas as formas moleculares, sendo as mais vistas o tetrâmero e o dímero.

Por meio da análise estatística no programa *BioEstat 5.0*, foi possível observar que não houve diferença significativa na comparação das formas moleculares entre 4 grupos de animais, que foram divididos em: pequeno, médio, grande porte e SRD. Como não havia

informações sobre o tamanho dos cães SRD, não foi possível determinar se o grupo apresentava um porte homogêneo. Dessa forma, há possibilidade de as bandas não terem sido analisadas de forma fidedigna em relação ao porte. Porém, como era uma parte significativa do estudo, não foram descartados da análise estatística.

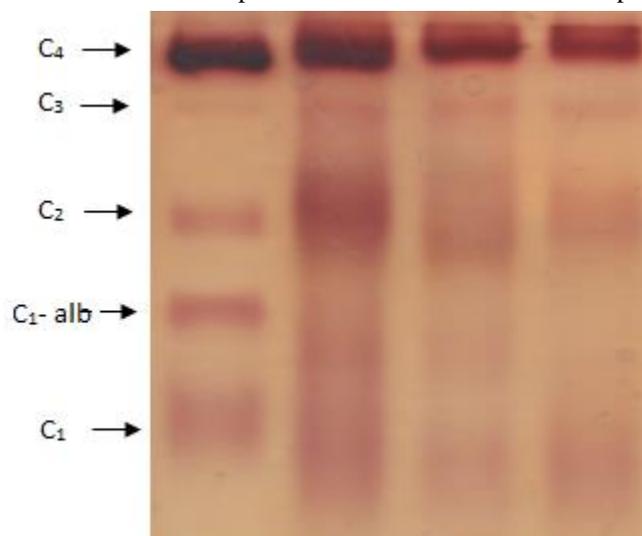
No quadro 3 é possível observar a divisão das formas moleculares em cada grupo definido bem como a média da intensidade relativa das suas formas moleculares.

**QUADRO 3.** Identificação dos grupos, suas formas moleculares e médias da intensidade relativa de cada uma, considerando apenas os indivíduos positivos. Foram utilizados 101 indivíduos na comparação da banda c<sub>4</sub>, 49 para a banda c<sub>3</sub>, 99 para a banda c<sub>2</sub>, 62 para a banda c<sub>1</sub>-alb e 59 para a banda c<sub>1</sub>.

<b>FORMAS MOLECULARES DA BChE</b>	<b>Pequeno Porte (Média das bandas)</b>	<b>Médio Porte (Média das bandas)</b>	<b>Grande Porte (Média das bandas)</b>	<b>SRD (Média das bandas)</b>
C4	0.52	0.47	0.51	0.54
C3	0.09	0.11	0.05	0.07
C2	0.31	0.38	0.34	0.28
C1-ALB	0.11	0.09	0.10	0.07
C1	0.13	0.09	0.13	0.18

Não foi possível observar diferença significativa entre as bandas C<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>1</sub>-alb e C<sub>1</sub> quando comparadas entre os portes (pequeno, médio e grande), porém foi possível observar um *p* menor que 5% quando comparados os portes médio e grande em relação à banda C<sub>4</sub>. Na figura 3 é possível comparar uma amostra humana (controle) e 3 amostras de cães em um gel de poliacrilamida.

**FIGURA 3.** Primeira coluna da esquerda representa o controle humano para determinação das formas moleculares da BChE. As demais colunas são representantes dos cães utilizados na pesquisa.



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi verificado que existem diferenças entre humanos e cães em relação à atividade enzimática e a presença da banda C<sub>5</sub>. Em relação às formas moleculares não foi possível analisar possíveis diferenças ou semelhanças entre cães e humanos devido à falta de uma amostra populacional humana para controle. Verificou-se que o tetrâmero é a forma predominante em cães, como ocorre em humanos. Em relação às doenças, foi possível observar que nem todos os cães obtiveram o efeito semelhante ao observado em humano em relação à atividade enzimática, levantando-se a hipótese de que essa enzima pode não ser afetada da mesma forma por essas doenças, como é em humanos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALLEBRANDT, K.V. **Butirilcolinesterase humana e intoxicação por agrotóxicos**. Curitiba, 1999. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas). Universidade Federal do Paraná.
2. SIQUEIRA, M.E.P.B. *et al.* **Determinação de níveis normais de colinesterase plasmática e eritrocitária**. São Paulo. Revista de Saúde Pública, 12:340-4, 1978.
3. LI, B. *et al.* **Abundant tissue butyrylcholinesterase and its possible function in the acetylcholinesterase knockout mouse**. Journal of Neurochemistry, v. 75, n. 3, p. 1320-1331, 2000.
4. NAIK, R. S.; LIU, W.; SAXENA, A. **Development and validation of a simple assay for the determination of cholinesterase activity in whole blood of laboratory animals**. Journal of Applied Toxicology, v. 33, n. 4, p. 290-300, 2013.
5. MADDISON, J.E. **Farmacologia clínica de pequenos animais**. 2ªed. Ed. Elsevier, 2011.
6. STEFANELLO, F.M. **Efeito da homocisteína sobre as atividades da butirilcolinesterase e da Na<sup>2</sup>, K<sup>+</sup> -ATPase em sangue de ratos**. Porto Alegre, 2003. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
7. GONÇALVES, J.F. **Avaliação de respostas bioquímicas, comportamentais, hematológicas e de bioacumulação em ratos expostos ao cádmio e tratados com n-**

- acetilcisteína**. Porto Alegre, 2012. Tese (Doutorado em Bioquímica). Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
8. DANTAS, V.G.L. **Estudo de associação de variações dos genes BCHE (Butirilcolinesterase) e GHRL (Grelina) com obesidade**. Curitiba, 2008. Dissertação (Mestrado em Genética) - Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná.
  9. BOBERG, D.R. **Formas moleculares da butirilcolinesterase e obesidade**. Curitiba, 2008. Dissertação (Mestrado em Genética). Universidade Federal do Paraná.
  10. CWIERTNIA, M. M.; ALCÂNTARA, V. M.; RÉA, R. R.; FARIA, A. C. R. A.; PICHETH, G.; SCARTEZINI, M.; GRAEF, L. E.; WELTER, M. **Butyrylcholinesterase and diabetes mellitus in the CHE2 C5- and CHE2 C5+ phenotypes**. Arq. Brás. Endocrinol. Metab., São Paulo, v. 54, n. 1, 2010.
  11. SILVA, I. M. W. *et al.* **Effects of physical exercise on butyrylcholinesterase in obese adolescents**. Genetics and Molecular Biology, v. 35, n. 4, p. 741-742, 2012.
  12. FORLENZA, O.V. **Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer**. Rev. Psiqu. Clín. v.32 (3); p. 137-148, 2005
  13. LIMA, J.K. **Relação entre formas moleculares da butirilcolinesterase e variáveis metabólicas**. Curitiba, 2012. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas). Universidade Federal do Paraná.
  14. SILVA, I.M.W. **Atividade relativa das formas moleculares da butirilcolinesterase em adolescentes obesos**. Curitiba, 2011. Monografia ( Bacharel em Ciências Biológicas). Universidade Federal do Paraná.
  15. MASSON, P.; CHATONNET, A.; LOCKRIDGE, O. **Evidence for a single butyrylcholinesterase gene in individuals carrying the C<sub>5</sub> plasma cholinesterase variant (CHE2)**. Febs Letters, v. 262, n. 1, p. 115-118, 1990.
  16. ALCÂNTARA, V. M.; OLIVEIRA, L. C.; RÉA, R. R.; SUPPLY, 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.

17. BOBERG, D. R. *et al.* **Molecular forms of butyrylcholinesterase and obesity.** Genetics and Molecular Biology, v. 33, n. 3, p. 452-454, 2010.
18. MIKAMI, L. R. **Variabilidade dos exons 2 e 4 do gene BCHE e sua relação com a atividade da butirilcolinesterase.** Curitiba, 2005. 198 f. Tese (Doutorado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
19. OSTRANDER, E.A.; WAYNE, R.K. **The canine genome.** Genome Res. 2005;15:1706–16
20. ANDICS, A.; GÁCSI, M. *et al.* **Voice-sensitive regions in the dog and human brain are revealed by comparative fMRI.** Current Biology 24, 574-578, 2014.
21. JENSEN, P. **The behavioural biology of dogs.** Oxfordshire: CABI Publishing, 2007.
22. KINGSLEY, R. **Cães - Guia Prático.** São Paulo: Nobel, 1998.
23. EVANS, R. T.; WROE, J. **Is serum cholinesterase activity a predictor of succinyl choline sensitivity? An assessment of four methods.** Clinical Chemistry, v. 24, n. 10, p. 1762-1766, 1978.
24. ALCÂNTARA, V. M. *et al.* **Association of the CHE2 locus with body mass index and butyrylcholinesterase activity.** Hum. Biol. v. 73, p. 587-595, 2001.
25. TECLES, F.; PANIZO, C. G.; SUBIELA, S. M.; CERÓN, J. J. **Effects of different variables on whole blood cholinesterase analysis in dogs.** Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, Davis, v.14, p.132-139, 2002.
26. SACCARO, R.O. **Atividade de colinesterase sérica em cães antes e durante o uso de coleira impregnada com agente anticolinesterásico.** Porto Alegre, 2007. Monografia (Especialista em Análises Clínicas Veterinárias). Faculdade de Veterinária.
27. FURTADO, L. **Estudos com a butirilcolinesterase humana.** Curitiba, 1997. Monografia ( Bacharel em Ciências Biológicas). Universidade Federal do Paraná.

## APÊNDICES

**Apêndice 1:** No quadro 1 é possível observar a distribuição das formas moleculares da butirilcolinesterase, com a soma das intensidades relativas de cada banda.

<b>Código</b>	<b>Tetrâmero (C<sub>4</sub>)</b>	<b>Trímero (C<sub>3</sub>)</b>	<b>Dímero (C<sub>2</sub>)</b>	<b>Monômero ligado à albumina (C<sub>1</sub>- alb)</b>	<b>Monômero (C<sub>1</sub>)</b>	<b>Soma da Intensidade Relativa</b>
ZCF001	0,4137	0,3752	0,2004	0,0107	-	1
ZCF002	0,8196	-	0,3446	0,0048	-	1,169
ZCF003	0,8196	-	0,3815	-	0,0065	1,2076
ZCF004	0,4387	-	0,5466	0,0146	-	0,9999
ZCF005	0,3502	0,1748	0,3904	-	0,0846	1
ZCF006	0,6811	-	0,0777	-	0,3365	1,0953
ZCF007	0,5118		0,1189	0,3792	-	1,0099
ZCF008	0,8278	-	0,3088	-	-	1,1366
ZCF009	0,4119	0,0086	0,2189	-	0,3605	0,9999
ZCF010	0,333	0,3363	0,2755	0,0552	-	1
ZCF011	0,4205	0,2376	0,3338	0,008	-	0,9999
ZCF012	0,7344	-	0,1452	0,1612	-	1,0408
ZCF014	0,5851	0,0038	0,4111	-	-	1
ZCF015	0,4912	0,0187	0,2734	0,0801	0,1365	0,9999
ZCF016	0,5268	0,223	0,2851	0,1651	-	1,2
ZCF017	0,3172	-	0,3598	0,1696	-	0,8466
ZCF018	0,5217		0,3598	-	0,1185	1
ZCF019	0,4129	-	0,2695	0,0012	0,3163	0,9999
ZCF020	0,3493	0,076	0,4003	0,0662	0,1082	1
ZCF021	0,7554	0,0643	0,3421	-	-	1,1618
ZCF022	0,4384	0,0658	0,2617	-	0,2341	1
ZCF023	0,4577	0,1038	0,4255	0,0848	-	1,0718
ZCF024	0,777	0,0122	0,2451	-	-	1,0343
ZCF025	0,8543	-	0,228	-	-	1,0823
ZCF026	0,1709	-	0,3175	0,1784	0,3332	1
ZCF027	0,5424	-	0,4576	-	-	1
ZCF028	0,552	-	0,448	-	-	1
ZCF029	0,5288	-	0,4712	-	-	1
ZCF030	0,3641	-	0,457	0,1033	0,0756	1
ZCF031	0,6097	-	0,3429	0,0473	-	0,9999
ZCF032	0,4508	0,1867	0,3625	-	-	1
ZCF033	0,4039	0,082	0,2531	0,9991	0,1619	1,9
ZCF034	0,4308	0,0493	0,3382	0,0763	0,1054	1
ZCF035	0,6287	0,0728	0,229	0,0694	-	0,9999
ZCF036	0,433	0,0688	0,2708	0,0829	0,1446	1,0001
ZCF037	0,402	0,0349	0,5494	0,0197	-	1,006
ZCF038	0,3821	-	0,0882	0,385	0,1447	1
ZCF039	0,6326	0,1299	0,2375	-	-	1

ZCF040	0,1147	-	0,8853	-	-	1
ZCF041	0,5432	-	0,3805	0,0278	0,0485	1
ZCF042	0,6421	-	0,3451	-	0,0209	1,0081
ZCF043	0,5059	-	0,3941	-	0,1	1
ZCF044	0,6921	-	0,3034	-	0,0045	1
ZCF045	0,822	-	0,1268	-	0,0412	0,99
ZCF046	1	-	-	-	-	1
ZCF047	0,7891	-	0,2919	-	-	1,081
ZCF048	0,4327	0,0734	0,252	0,1285	0,1133	0,9999
ZCF049	0,8489	0,0185	0,1091	0,0026	0,021	1,0001
ZCF050	0,8059	0,0928	0,0894	0,0088	0,0031	1
ZCF051	0,8454	0,0626	0,0427	0,0215	0,0276	0,9998
ZCF052	0,5523	0,1174	0,2974	-	0,1015	1,0686
ZCF053	0,4207	0,0639	0,2347	0,13	0,1507	1
ZCF054	0,5144	0,1148	0,1791	0,0527	0,139	1
ZCF055	0,6521	0,0616	0,2236	0,002	0,0606	0,9999
ZCF056	0,3388	0,1458	0,4382	0,0132	0,064	1
ZCF057	0,8593	0,006	0,1322	-	0,0025	1
ZCF058	0,9056	0,0461	0,0431	0,0036	0,0016	1
ZCF059	0,9264	0,0904	0,0062	0,0055	-	1,0285
ZCF060	0,6547	0,1432	0,1726	0,0246	0,0049	1
ZCF061	0,355	-	0,4018	0,1279	0,1153	1
ZCF062	0,4018	-	0,3042	0,0971	0,1969	1
ZCF063	0,3582	0,0933	0,2547	0,095	0,1988	1
ZCF064	0,4938	0,0803	0,2731	0,1528	-	1
ZCF065	0,3409	-	0,6239	0,1024	-	1,0672
ZCF066	0,3617	0,1257	0,2926	0,0884	0,1316	1
ZCF067	0,3181	0,0956	0,3214	0,1543	0,1105	0,9999
ZCF068	0,5242	-	0,2742	0,0717	0,1298	0,9999
ZCF069	0,4805	0,1901	0,2164	0,1129	-	0,9999
ZCF070	0,3716	-	0,3777	0,0714	0,1793	1
ZCF071	0,6326	0,1146	0,1616	-	0,0961	1,0049
ZCF072	0,4578	-	0,4373	0,1048	-	0,9999
ZCF073	0,4461	-	0,3491	0,1268	0,078	1
ZCF074	0,5643	0,0683	0,2949	-	0,0725	1
ZCF075	0,4062	0,0874	0,2799	0,1236	0,1029	1
ZCF076	0,512	0,1301	0,2342	0,1237	-	1
ZCF077	0,624	0,1391	0,2369	-	-	1
ZCF078	0,6051	-	0,261	0,1339	-	1
ZCF079	0,5951	-	0,3484	0,0565	-	1
ZCF080	0,6041	-	0,362	0,0039	-	0,97
ZCF081	0,6901	-	0,2603	-	0,0496	1
ZCF082	1	-	-	-	-	1
ZCF083	0,5471	-	0,4413	0,0116	-	1
ZCF084	0,435	-	0,375	0,0266	0,1634	1
ZCF085	0,9057	-	0,795	0,0019	0,013	1,7156
ZCF086	0,3222	-	0,2857	-	0,3921	1

ZCF087	0,832	-	0,1037	-	0,0643	1
ZCF088	1,0072	-	0,0665	-	-	1,0737
ZCF089	0,5135	-	0,3839	0,053	0,0495	0,9999
ZCF090	0,7232	-	0,3031	-	-	1,0263
ZCF091	0,7531	-	0,2491	-	-	1,0022
ZCF092	0,1242	-	0,8758	-	-	1
ZCF093	0,9353	-	0,0821	-	-	1,0174
ZCF094	0,3046	0,0468	0,34	0,1581	0,1506	1,0001
ZCF095	0,6422	0,0487	0,1883	0,0585	0,0623	1
ZCF096	0,5173	-	0,2662	0,111	0,1055	1
ZCF097	0,4951	-	0,3112	0,0935	0,1001	0,9999
ZCF098	0,2731	0,1103	0,2278	0,1229	0,2659	1
ZCF099	0,3964	0,0606	0,2736	0,0903	0,1792	1,0001
ZCF100	0,4725	0,0757	0,2049	0,1298	0,1171	1
ZCF101	0,2316	0,108	0,6604	-	-	1
ZCF102	0,3639	-	0,6361	-	-	1

**Apêndice 2.** Distribuição das amostras sobre os seguintes parâmetros: raça às quais os cães pertencem, gênero e idade, além das médias de suas absorbâncias resultando em sua atividade enzimática.

<b>Código</b>	<b>Espécie</b>	<b>Raça</b>	<b>Gênero</b>	<b>Idade</b>	<b>Atividade Enzimática (KU/L)</b>
ZCF001	Canis familiaris	Sharpei	M	6 anos	2,23
ZCF002	Canis familiaris	SRD	F	5 meses	4,08
ZCF003	Canis familiaris	SRD	M	16 anos	2,71
ZCF004	Canis familiaris	SRD	M	15 anos	1,25
ZCF005	Canis familiaris	Poodle	M	12 anos	1,07
ZCF006	Canis familiaris	Weinamara	F	7 anos	1,86
ZCF007	Canis familiaris	Chow chow	M	12 anos	1,40
ZCF008	Canis familiaris	Pastor alemão	F	10 anos	4,05
ZCF009	Canis familiaris	SRD	M	5 anos	1,92
ZCF010	Canis familiaris	Poodle	F	16 anos	1,96
ZCF011	Canis familiaris	SRD	F	9 meses	2,27
ZCF012	Canis familiaris	Lhasa apsu	F	9 anos	1,64
ZCF013	Canis familiaris	SRD	F	17 anos	1,74
ZCF014	Canis familiaris	Pit bull	M	8 anos	0,98
ZCF015	Canis familiaris	SRD	F	8 anos	2,81
ZCF016	Canis familiaris	SRD	F	6 meses	2,16
ZCF017	Canis familiaris	Chow chow	M	7 anos	3,25
ZCF018	Canis familiaris	Pinscher	F	13 anos	1,91
ZCF019	Canis familiaris	Labrador	F	10 anos	3,13
ZCF020	Canis familiaris	Bull terrier	F	5 anos	4,73
ZCF021	Canis familiaris	Lhasa apsu	M	1 ano	4,73
ZCF022	Canis familiaris	SRD	M	±2 anos	2,37
ZCF023	Canis familiaris	Dachshund	F	1 ano	1,59
ZCF024	Canis familiaris	Poodle	F	5 anos	3,20
ZCF025	Canis familiaris	Schnauzer	M	8 anos	3,14
ZCF026	Canis familiaris	SRD	F	12 anos	2,20
ZCF027	Canis familiaris	SRD	M	12 anos	2,73
ZCF028	Canis familiaris	Shih tzu	F	8 anos	3,37
ZCF029	Canis familiaris	SRD	F	13 anos	1,96
ZCF030	Canis familiaris	SRD	F	3 anos	2,97

ZCF031	Canis familiaris	Shih tzu	F	11 meses	1,83
ZCF032	Canis familiaris	Boxer	M	2 meses	2,04
ZCF033	Canis familiaris	Poodle	F	adulta	1,28
ZCF034	Canis familiaris	Dachshund	M	12 anos	2,73
ZCF035	Canis familiaris	Labrador	M		2,61
ZCF036	Canis familiaris	Shih tzu	F	5 anos	2,40
ZCF037	Canis familiaris	Pit bull	F	14 anos	2,97
ZCF038	Canis familiaris	Yorkshire	F	11 anos	2,13
ZCF039	Canis familiaris	Bichon fris�e	M	11 anos	4,52
ZCF040	Canis familiaris	Pit bull	F	12 anos	2,11
ZCF041	Canis familiaris	Poodle	M	15 anos	0,25
ZCF042	Canis familiaris	Labrador	F	9 anos	1,14
ZCF043	Canis familiaris	Golden retriever	F	11 anos	4,64
ZCF044	Canis familiaris	Golden retriever	F	7 anos	1,96
ZCF045	Canis familiaris	Lhasa apsu	F	8 meses	2,94
ZCF046	Canis familiaris	Basset	F	3 anos	1,71
ZCF047	Canis familiaris	SRD	F	11 anos	1,48
ZCF048	Canis familiaris	Pequin�es	F	2 anos	1,74
ZCF049	Canis familiaris	Pinscher	F	11 anos	1,47
ZCF050	Canis familiaris	Boxer	F	2 anos	1,40
ZCF051	Canis familiaris	Poodle	F	14 anos	1,94
ZCF052	Canis familiaris	Poodle	F	7 anos	1,04
ZCF053	Canis familiaris	Pinscher	F	8 anos	2,61
ZCF054	Canis familiaris	SRD	F	7 anos	0,66
ZCF055	Canis familiaris	Dachshund	F	13 anos	2,37
ZCF056	Canis familiaris	Doberman	M	2 anos	1,73
ZCF057	Canis familiaris	Rottweiler	M	6 anos	2,61
ZCF058	Canis familiaris	Shih tzu	F	21 meses	1,61
ZCF059	Canis familiaris	Pastor belga	F	9 meses	1,68
ZCF060	Canis familiaris	Pinscher	M	6 anos	1,88
ZCF061	Canis familiaris	SRD	F	7-8 anos	1,96
ZCF062	Canis familiaris	Dachshund	F	8 meses	2,51
ZCF063	Canis familiaris	Poodle	M	13 anos	2,51
ZCF064	Canis familiaris	Pinscher	F	3 anos	2,92

ZCF065	Canis familiaris	Pinscher	F	13 anos	1,66
ZCF066	Canis familiaris	Poodle	F	17 anos	1,54
ZCF067	Canis familiaris	Dachshund	M	10 anos	2,21
ZCF068	Canis familiaris	Vizsla	F	2 meses	2,13
ZCF069	Canis familiaris	Pequinês	F	5 anos	2,46
ZCF070	Canis familiaris	SRD	M	7 anos	2,33
ZCF071	Canis familiaris	Kuvasz	M	9 anos	1,63
ZCF072	Canis familiaris	Chow chow	M	14 anos	2,96
ZCF073	Canis familiaris	Labrador	F	8 meses	2,64
ZCF074	Canis familiaris	Bull terrier	F	2 anos	7,09
ZCF075	Canis familiaris	SRD	M	10 anos	3,94
ZCF076	Canis familiaris	Pit bull	F	4 anos	2,80
ZCF077	Canis familiaris	SRD	M	7 meses	1,70
ZCF078	Canis familiaris	Pinscher	M	13 anos	2,20
ZCF079	Canis familiaris	Pinscher	M	6 anos	2,16
ZCF080	Canis familiaris	Lhasa apsu	F	12 anos	2,87
ZCF081	Canis familiaris	SRD	F	10 anos	5,90
ZCF082	Canis familiaris	SRD	M	15 anos	1,87
ZCF083	Canis familiaris	Border collie	F	6 meses	3,11
ZCF084	Canis familiaris	SRD	M	2 meses	3,50
ZCF085	Canis familiaris	Bull terrier	M	8 anos	1,73
ZCF086	Canis familiaris	SRD	M	15 anos	0,88
ZCF087	Canis familiaris	Pointer	M	7 anos	0,67
ZCF088	Canis familiaris	Poodle	F	10 anos	2,04
ZCF089	Canis familiaris	SRD	F	2 anos	2,37
ZCF090	Canis familiaris	Yorkshire	M	6 anos	2,33
ZCF091	Canis familiaris	SRD	F	4 meses	2,10
ZCF092	Canis familiaris	Dachshund	F	10 anos	0,97
ZCF093	Canis familiaris	Mastim napolitano	M	13 anos	1,50
ZCF094	Canis familiaris	Maltês	M	5 anos	2,17
ZCF095	Canis familiaris	Sharpei	M	6 meses	0,13
ZCF096	Canis familiaris	Beagle	F	8 meses	2,92
ZCF097	Canis familiaris	Cocker	M	12 anos	2,21
ZCF098	Canis familiaris	Pit bull	F	13 anos	1,85

ZCF099	Canis familiaris	Poodle	F	12 anos	1,77
ZCF100	Canis familiaris	Maltês	F	6 anos	1,32
ZCF101	Canis familiaris	Cocker	M	10 anos	0,23
ZCF102	Canis familiaris	Rottweiler	M	8 anos	0,16