

Alejandro Boëchat Fernandes

Associação entre o gene da butirilcolinesterase e
diabete melito tipo 1

Curitiba
2010

Alejandro Boëchat Fernandes

Associação entre o gene da butirilcolinesterase e diabete melito tipo 1

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Genética da
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Ricardo Lehtonen Rodrigues de
Souza

Co-Orientadora: Lupe Furtado Alle

Curitiba
2010

Agradecimentos

À Prof^a Dra. Eleidi Alice Chautard-Freire Maia, uma verdadeira dama, elegante. Animada a cada descoberta, curiosidade sempre a flor da pele, minuciosa em cada detalhe. Sempre será admirada por mim e por muitos.

A todos os professores que passaram os ensinamentos através de cada aula, vários assuntos complexos e outros menos, mas alimentando de modos diferentes o fascínio pela nossa área, que ainda esta nos primórdios de sua existência e promete tantas maravilhas a serem descobertas: A Genética.

Principalmente ao Prof. Dr. Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza, primeiro de tudo um grande amigo e o meu orientador de longa data, que sempre entusiasmado e motivado pelo que faz me orientou desde o começo da iniciação científica passando pelo Mestrado.

À presença sempre querida da professora Lupe Furtado Alle que ensinou muito e me viu crescer desde a época de iniciação científica.

Ao Programa da Pós-Graduação em Genética da UFPR e aos demais Laboratórios do Setor de Ciências Biológicas que colaboraram emprestando equipamentos e oferecendo soluções quando necessário.

Aos colegas de Laboratório de Polimorfismo e Ligação: que quando reunidos, é sempre uma festa a parte.

Aos colegas de mestrado Gustavo Góes da Costa, Rodrigo Kaviski, Lisandra Santos Ferreira, Douglas Herrera Montenegro, Shenia Pedro Bom da Silva, e aos doutorandos Marcos Euzébio Maciel, Márcio Marques de Moraes, Renata Rodrigues Gomes, que serão sempre grandes amigos.

Ao meu pai José Manoel Fernandes que foi e sempre será o melhor amigo e mentor. E a minha belíssima mãe Márcia Helena Boëchat Alves Fernandes que esteve lá pra me alegrar com a sua astral radiante.

Ao Silvio Marques Zanata por disponibilizar o uso do seu laboratório.

Ao Ambulatório do HC, à Dra. Rosângela Roginski Rea e a toda equipe de funcionários pela realização do estágio e aprendizado de como se faz uma coleta de sangue periférico.

Ao Bruno Graça, Mozart Moraes, Alexandre Perin, Luiz Arthur, André Dquesch, Daniel Philippe, Mario Penteado, e a todos os meus amigos do peito, irmãos adquiridos, que desde que cheguei em Curitiba me receberam com braços abertos.

A Deus que possibilitou a existência de tudo, e que nós, meros mortais, tentamos desvendar a Sua obra prima.

“Desconfie do destino e acredite em você. Gaste mais horas realizando que sonhando, fazendo que planejando, vivendo que esperando... Porque, embora quem quase morre esteja vivo, quem quase vive, já morreu...”

Luiz Fernando Veríssimo

Sumário

| | |
|---|----|
| Lista de Figuras e Tabelas | 6 |
| 1. Introdução | 11 |
| 2. Revisão Bibliográfica..... | 13 |
| 2.1. Butirilcolinesterase | 13 |
| 2.1.1 Função Biológica..... | 13 |
| 2.1.2 Formas Moleculares da BChE..... | 15 |
| 2.1.3 Variabilidade Genética | 17 |
| 2.2. Diabete Melito do Tipo 1 | 19 |
| 2.2.1. Classificação de Diabetes | 20 |
| 2.2.2. Associação Genética do DM1 | 22 |
| 2.3. Butirilcolinesterase e Diabete Melito..... | 25 |
| 3. Objetivos | 28 |
| Capítulo 1 | 29 |
| Resumo | 29 |
| Introdução | 30 |
| Materiais e métodos | 31 |
| Amostras..... | 31 |
| Métodos | 31 |
| Extração de DNA | 31 |
| Genotipagem | 31 |
| Análise dos dados..... | 32 |
| Resultados..... | 33 |
| Frequências genotípicas e alélicas..... | 33 |
| Frequências haplotípicas | 38 |
| Desequilíbrio de ligação | 40 |
| Idade de aparecimento do DM1..... | 42 |
| Análises complementares | 43 |
| Discussão | 43 |
| Frequências genotípicas e alélicas..... | 43 |
| Frequências haplotípicas | 47 |
| Desequilíbrio de ligação | 47 |
| Idade de aparecimento do DM1..... | 48 |
| Análises complementares | 48 |
| Conclusões finais..... | 49 |
| Referências | 49 |
| 4. Discussão Geral..... | 51 |
| Referências | 52 |
| Apêndice I..... | 65 |
| Material e Métodos | 65 |
| Material..... | 65 |
| Métodos | 66 |
| Extração de DNA | 66 |
| Medição de concentração das amostras..... | 68 |
| PCR | 68 |
| Genotipagem das mutações K e -116..... | 68 |
| Genotipagem dos SNPs próximos ao gene <i>BCHE</i> | 68 |
| Análise dos dados | 73 |
| Frequências alélicas e genotípicas..... | 73 |
| Equilíbrio de Hardy-Weinberg, desequilíbrio de ligação e inferência haplotípica | 74 |
| Apêndice II..... | 77 |

Lista de Figuras e Tabelas

| | |
|---|----|
| Fig. 1. Localização dos SNPs estudados em relação ao gene <i>BCHE</i> . | 32 |
| Tabela 1. Freqüências genotípicas e alélicas dos SNPs rs1803274, rs1126680, rs7624915, rs4387996, rs4440084 e rs2863381 nas amostras de diabéticos (DM1) e controles (CTL) novos e antigos. | 33 |
| Tabela 2. Freqüências genotípicas e alélicas dos SNPs rs1803274, rs1126680, rs7624915, rs4387996, rs4440084 e rs2863381 nas amostras de diabéticos novas e antigas agrupadas e controles novas e antigas agrupadas. | 34 |
| Tabela 3. Teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg para os seis SNPs nas quatro amostras. | 35 |
| Tabela 4. Teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg para os seis SNPs nas duas amostras, com os diabéticos novos e antigos e controles novos e antigos agrupados. | 36 |
| Tabela 5. Comparação das freqüências genotípicas e alélicas dos seis SNPs estudados, através de teste de qui-quadrado entre a amostras nova de diabéticos e seus controles, bem como a comparação através do teste de <i>Odds Ratio</i> . | 37 |
| Tabela 6. Comparação das freqüências genotípicas e alélicas dos quatro SNPs estudados, através de teste de qui-quadrado entre a amostras antiga de diabéticos e seus controles, bem como a comparação através do teste de <i>Odds Ratio</i> . | 37 |
| Tabela 7. Comparação das freqüências genotípicas e alélicas dos seis SNPs estudados, através de teste de qui-quadrado entre diabéticos com amostras novas e antigas agrupadas e seus controles agrupados, bem como a comparação através do teste de <i>Odds Ratio</i> . | 37 |
| Tabela 8. Haplótipos com freqüência maior que 5% na amostra dos Diabéticos Novos. | 38 |
| Tabela 9. Haplótipos com freqüência maior do que 5% na amostra dos Controles Novos sem o SNP rs1803274 (*). | 38 |
| Tabela 10. Haplótipos com freqüência maior do que 5% na amostra dos Diabéticos Antigos sem o SNP rs7624915 (*). | 39 |

| | |
|---|----|
| Tabela 11. Haplótipos com frequência maior do que 5% na amostra dos Controles Antigos. | 39 |
| Tabela 12. Comparação entre haplótipos das amostras novas sem o SNP rs1803274 (*) com frequência para o DM1 \geq 5%. | 40 |
| Tabela 13. Comparação entre Haplótipos das amostras antigas sem o SNP rs7624915 (*) com frequência para o DM1 \geq 5%. | 40 |
| Tabela 14. Tabela de desequilíbrio de ligação entre os seis SNPs estudados na amostra de Diabéticos Novos. | 41 |
| Tabela 15. Tabela de desequilíbrio de Ligação entre cinco dos seis SNPs estudados na amostra de Controles Novos. | 41 |
| Tabela 16. Tabela de desequilíbrio de Ligação entre cinco dos seis SNPs estudados na amostra de Diabéticos Antigos. | 41 |
| Tabela 17. Tabela de desequilíbrio de Ligação entre os seis SNPs estudados na amostra de Controles Antigos. | 41 |
| Tabela 18. Tabela de comparação das frequências alélicas, para os SNPs rs1803274, rs1126680, rs7624915 e rs4387996, entre indivíduos da amostra nova dividindo-a em dois grupos, um abaixo da mediana da idade de aparecimento do DM1 (\leq 15 anos) e outro acima ($>$ 15 anos). | 42 |
| Tabela 19. Tabela de comparação das frequências alélicas, para os SNPs rs1803274, rs1126680, rs7624915 e rs4387996, entre indivíduos diabéticos (amostra nova mais a antiga) dividindo-a em dois grupos, um abaixo da mediana da idade de aparecimento do DM1 (\leq 13 anos) e outro acima ($>$ 13 anos). | 43 |
| Tabela 20. Dados obtidos pelo estudo de Lepienski e cols. (2006) das frequências genotípicas e alélicas para o SNP rs1803274. | 44 |
| Tabela 21. Dados obtidos pelo estudo de Oliveira (2006) das frequências genotípicas e alélicas para o SNP rs1126680. | 44 |
| Tabela 22. Comparações entre as frequências genotípicas e alélicas dos seis SNPs entre DM1 novo e antigo e controles novos e antigos. | 45 |
| Tabela 23. Comparação entre frequências genotípicas e alélicas dos seis SNPs estudados dos controles novos com frequências populacionais obtidas do NCBI. | 46 |

| | |
|--|----|
| Tabela 24. Comparação entre freqüências genotípicas e alélicas de cinco SNPs dos controles novos com freqüências dos controles utilizados por GOMES (2010). | 47 |
| Fig. 2. Localização cromossômica dos genes <i>BCHE</i> e <i>SI</i> ; dos SNPs rs7624915 e rs4387996; em relação ao microssatélite D3S1279. A região centromérica está representada à esquerda e a região telomérica à direita. | 51 |
| Tabela 25. Estatística das amostras novas de diabéticos. | 65 |
| Tabela 26. Estatística das amostras dos controles novos. | 65 |
| Fig. 3. Estratégia de discriminação alélica utilizando sondas marcadas com fluorescência. | 69 |
| Fig. 4. Exemplo da análise de um resultado em homozigose para o alelo FAM do programa RealPlex após o processo de PCR em tempo real. | 70 |
| Fig. 5. Exemplo da análise de um resultado em heterozigose FAM/VIC do programa RealPlex após o processo de PCR em tempo real. | 71 |
| Fig. 6. Exemplo da análise de um resultado em homozigose para o alelo VIC do programa RealPlex após o processo de PCR em tempo real. | 72 |
| Fig 7. Plotagem dos resultados reais de genotipagem com TaqMan. | 73 |
| Tabela 27 Esquema para o cálculo de OR. | 74 |
| Tabela 28. Para facilitar o cálculo: | 76 |
| Tabela 29. Seqüência em ordem crescente de freqüência dos haplótipos na amostra de Diabéticos Novos sem exclusão de nenhum SNP na análise. | 77 |
| Tabela 30. Seqüência em ordem crescente da freqüência dos haplótipos na amostra de Diabéticos Novos sem o SNP rs1803274. | 78 |
| Tabela 31. Seqüência em ordem crescente de freqüência dos haplótipos na amostra de Controles Novos sem exclusão de nenhum SNP na análise. | 78 |
| Tabela 32. Seqüência em ordem crescente de freqüência dos haplótipos na amostra de Controles Novos sem o SNP rs1803274. | 79 |
| Tabela 33. Seqüência em ordem crescente de freqüência dos haplótipos na amostra de Diabéticos Antigos sem exclusão de nenhum | 80 |

SNP na análise.

Tabela 34. Seqüência em ordem crescente de freqüência dos 80
haplótipos na amostra de Diabéticos Antigos sem o SNP rs7624915.

Tabela 35. Seqüência em ordem crescente de freqüência dos 81
haplótipos na amostra de Controles Antigos sem exclusão de nenhum
SNP na análise.

Tabela 36. Seqüência em ordem crescente de freqüência dos 82
haplótipos na amostra de Controles Antigos sem o SNP rs7624915.

Tabela 37. Freqüências genotípicas e alélicas para cada um dos 83
SNPs estudados para quatro populações mundiais (Caucasiano –
Europeu; Asiático – Chines; Asiático – Japonês e África Subsaariana)

Lista de Abreviações

| | |
|---------------|--|
| AChE: | acetilcolinesterase |
| BChE: | butirilcolinesterase |
| <i>BCHE</i> : | gene da butirilcolinesterase |
| DM 1: | diabete melito do tipo 1 |
| DM 2: | diabete melito do tipo 2 |
| DP: | desvio padrão |
| EDTA: | ácido etilenodiaminotetraacético |
| EP: | erro padrão |
| HDL: | lipoproteína de alta densidade |
| IA: | Idade de aparecimento da doença |
| IC: | Intervalo de confiança |
| IMC: | índice de massa corporal |
| LDL: | lipoproteína de baixa densidade |
| OR: | Odds ratio |
| pb: | pares de bases |
| PCR: | reação em cadeia da polimerase |
| SSCA: | Análise Conformacional da Fita Simples |
| VLDL: | lipoproteína de muito baixa densidade |

1. Introdução

A butirilcolinesterase (BChE) é codificada pelo gene *BCHE*, que está localizado no braço longo do cromossomo 3 (3q26.1- q26.2; SOREQ e cols., 1987). Cerca de 65 variantes genéticas deste gene já foram descritas, sendo a maioria rara. O gene *BCHE*, constituído por 64.558 pb, existe como entidade única no genoma, contém 4 éxons, sendo que o éxon 1 é transcrito, mas não é traduzido e o éxon 2 contém 83% da seqüência que codifica a BChE e inclui o sítio serina-ativo e a seqüência líder da enzima (ARPAGAUS e cols., 1990).

A variabilidade do gene *BCHE* começou a ser estudada na década de 50. Desde então diversas variantes foram descobertas, através da utilização de técnicas de inibição enzimática, estudos familiares e por técnicas de análise do DNA. Algumas variantes também foram identificadas devido à atividade ausente ou reduzida em relação à enzima usual. Atualmente muitas variantes têm sido identificadas através de seqüenciamento de DNA (ARPAGAUS e cols., 1990).

O diabetes melito (DM) é uma síndrome de etiologia múltipla, decorrente da falta de insulina e/ou da incapacidade da insulina de exercer adequadamente seus efeitos. A hiperglicemia crônica é freqüentemente acompanhada de dislipidemia, hipertensão arterial, disfunção endotelial e obesidade (SOC. BRAS. DIABETES, 2003).

A baixa atividade da BChE está relacionada a disfunções endoteliais, sendo que a variante *K* (*A539T*; rs1803274), *originalmente*, estava associada a uma redução de 30% da atividade da BChE. Um estudo de nosso laboratório, mostrou que existe um aumento na freqüência do alelo *A539T* no grupo de diabéticos tipo 1 com aparecimento precoce da doença (≤ 12 anos), em relação ao grupo com aparecimento mais tardio (> 12 anos) e o grupo controle (LEPIENSKI e cols., 2006).

Outro estudo de nosso laboratório mostrou que a redução da atividade da BChE se deve a variante *-116A* (rs1126680), e não à mutação *K*. Esse estudo mostrou associação com o aumento da média do índice de massa corporal em obesos. Essa variante ocorre no éxon 1, e apresenta desequilíbrio de ligação com a variante *A539T*, ocorrendo em mais de 90% dos casos em cromossomo que também apresenta a variante *A539T* (FURTADO, 2005).

Este estudo pretende buscar informações que levem à indicação mais precisa do possível envolvimento do gene *BCHE* na susceptibilidade ao diabetes melito ou se existe outro gene de susceptibilidade na região proximal ao gene *BCHE*.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. *Butirilcolinesterase*

No sangue humano existem dois tipos de colinesterases: a acetilcolinesterase (AChE) e a butirilcolinesterase (BChE). A seqüência de aminoácidos da BChE e da AChE tem 53% de identidade, sendo bem conservada no sítio ativo. As duas enzimas apresentam respostas similares a diversos inibidores (SCHUMACHER et al., 1986; LOCKRIDGE et al., 1987) e semelhança estrutural (GEORGE et al., 2001). A análise filogenética da expressão da BChE e da AChE indica que essas duas enzimas surgiram a partir de um precursor comum cuja função era hidrolisar a acetilcolina.

A acetilcolinesterase (EC 3.1.1.7), também chamada de colinesterase verdadeira ou específica, é responsável pela hidrólise da acetilcolina nas sinapses colinérgicas e existe em diferentes formas moleculares. Ocorre na membrana eritrocitária, na placa motora de músculos esqueléticos e em áreas do cérebro onde não há evidência de função colinérgica, sugerindo a existência de funções não colinérgicas. A AChE modula o crescimento neural e a adesão celular em células de neuroblastoma humano *in vitro*. A forma tetramérica da AChE (G4), está associada à adesão celular independente da sua atividade colinérgica, mas dependente do sítio aniônico da enzima (JOHNSON e MOORE, 2000).

2.1.1 Função Biológica

A butirilcolinesterase (BChE; EC 3.1.1.8), também chamada colinesterase do soro, pseudocolinesterase, colinesterase não específica e colinesterase do tipo S, é uma esterase sérica que hidrolisa diversos ésteres de colina, sendo mais eficiente na hidrólise da butirilcolina. A BChE é sintetizada no fígado e é amplamente distribuída no organismo, sendo encontrada na pele, pâncreas, massa branca do cérebro, coração, músculo liso e adipócitos (WESCOE e cols., 1947). Mais recentemente, sua síntese nos adipócitos foi sugerida em ratos (ORESKOVIC e KUNEC-VAJIC, 1992) e em humanos (POPOVIC et al., 1998). Hidrolisa vários

ésteres de colina, desde a acetilcolina até a heptanoilcolina, sendo mais eficiente na hidrólise da butirilcolina. A função da BChE no organismo e o seu substrato natural permanecem desconhecidos. Existem hipóteses que relacionam a BChE à proteção da acetilcolinesterase (WHITTAKER, 1980; WHITTAKER, 1986) e ao metabolismo de lípidos (KUTTY, 1980).

As colinesterases (AChE e BChE) exibem atividades catalíticas adicionais, além da hidrólise de ésteres de colina. A similaridade nas seqüências de diferentes esterases, lipases, tiroglobulina, proteínas de adesão celular e colinesterases sugerem que as colinesterases podem exibir mais de uma atividade biológica e funções biológicas mais amplas (BALASUBRAMANIAN e BHANUMATHY, 1993; WEITNAUER et al., 1998). Apresentam atividade de aril acilamidase amino-sensível (AAA), uma atividade semelhante à amidase e sem função fisiológica conhecida (GEORGE e BALASUBRAMANIAN, 1981; JAYANTHI et al., 1992; JAGANATHAN e BOOPATHY, 2000). BOOPATHY e LAYER (2004) encontraram alta atividade de AAA tanto para AChE como para BChE em cérebro de embriões de galinha durante os primeiros estágios da vida embrionária, sugerindo que a atividade de AAA das colinesterases tem um papel nos primeiros estágios do desenvolvimento do cérebro.

Diversos estudos propõem a existência de relação entre as colinesterases e diferenciação celular (LAYER e SPORNS, 1987; LAPIDOT-LIFSON et al., 1989; PATINKIN et al., 1990; ZAKUT et al., 1990; SOREQ et al., 1991). No tubo neural de galinhas, antes de ocorrer a sinaptogênese, a BChE é distribuída difusamente nas camadas ventriculares, enquanto a AChE é localizada nas células da camada externa. O surgimento das duas colinesterases está correlacionado, especialmente, com as fases finais da proliferação celular em diferentes tecidos do cérebro e da retina do embrião de galinha. A expressão das colinesterases em períodos críticos do início da neurogênese sugere seu envolvimento no processo neurogenético (LAYER, 1990; ROBITZKI et al., 1998). Foi observada uma correlação entre a expressão da BChE e altas taxas proliferativas em neuroblastos do tubo neural, células de retina e outras (LAYER et al., 1992). WILLBOLD e LAYER (1992) consideraram a BChE como um marcador transmitótico devido à alta atividade da BChE tipicamente encontrada em células em estado transitório pouco antes do final da mitose e do início da diferenciação celular. A expressão da AChE e da BChE nos estágios iniciais da embriogênese, antes da formação das sinapses, também sugere

que as colinesterases possuam um papel morfogenético nesse estágio do desenvolvimento neural.

2.1.2 Formas Moleculares da BChE

O monômero da BChE humana é formado por uma cadeia de 574 resíduos de aminoácidos e nove cadeias laterais de oligossacarídeos ligados a nove asparaginas. O peso molecular, que é calculado com base na seqüência de aminoácidos e oligossacarídeos, é de 85.534 kDa e os quatro monômeros, que formam o tetrâmero, são idênticos (LOCKRIDGE et al., 1987).

NICOLET et al. (2003) determinaram a estrutura cristalográfica da BChE humana que é, de modo geral, bastante similar à estrutura da TcAChE. Entretanto, na BChE, os resíduos aromáticos encontrados na entrada do sítio da TcAChE foram substituídos por resíduos hidrofóbicos e no bolso de ligação de grupamento acil foram substituídos os resíduos Phe288 e Phe290 da TcAChE por Leu286 e Val288, respectivamente. Essas mudanças tornam possível a ligação de uma gama maior de substratos na BChE em relação à AChE. A conformação da alça acil também apresenta diferenças entre TcAChE e BChE. O sítio aniônico periférico da BChE humana está envolvido no mecanismo de ativação de substratos. Dois locais de ligação de substrato, Asp70 no sítio aniônico periférico e Trp82 no sítio ativo, são conectados por uma alça ômega (Ω). 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 Ω (Masson et al., 2001).

As evidências da existência de um único gene que codifica a BChE, bem como a estrutura desse gene, foram mostradas por ARPAGAUS et al. (1990). O gene BCHE (3q26.1-q26.2) tem 64.558 kb e possui quatro éxons formados por 2.445 pares de bases. Como a BChE é formada por 574 resíduos de aminoácidos, apenas 1722 pares de bases codificam para a enzima madura, sendo que os 723 pares de bases não codificantes da enzima madura correspondem ao éxon 1, à parte inicial do éxon 2 e à parte final do éxon 4. O éxon 1 (149 pb) contém seqüências não traduzidas e dois sítios potenciais de início de tradução nos códons -69 e -47. O

éxon 2 (1.525 pb) contém 83% da seqüência codificadora da proteína madura, incluindo a extremidade N-terminal, o sítio ativo e um terceiro possível sítio de início de tradução no códon -28. O primeiro códon que codifica para o peptídeo maduro é numerado como +1 e está localizado no éxon 2. O éxon 3 tem 167 nucleotídeos e o éxon 4 (604 pb) codifica a extremidade C-terminal da proteína e a região 3' não traduzida que contém dois sinais de poliadenilação. O íntron 1 tem 6,272 kb, o íntron 2 tem 56,512 kb e o íntron 3 tem 12,638 kb.

A BChE do soro ou plasma, após eletroforese, pode aparecer sob cinco formas moleculares (Harris *et al.*, 1963) que, em ordem de peso molecular, são: C₁ (monômero), C₂ (monômero ligado à albumina sérica através de uma cisteína), C₃ (dímero), C₄ (tetrâmero) e C₅ (tetrâmero ligado a uma substância desconhecida). Esse complexo C₅ é formado pela interação dos produtos dos genes *BCHE* e *CHE2* (Masson, 1989).

A banda C₄ é formada por quatro subunidades unidas por fortes ligações não covalentes, sendo que o conjunto é estabilizado pelas pontes dissulfeto interdímeros (Lockridge *et al.*, 1979). Cada tetrâmero contém quatro sítios ativos.

Após estimativas de massa molecular, identificou-se a banda C₂ como um heterodímero formado pela associação da banda C₁ com uma proteína com 65Kda através de uma ponte dissulfeto. Após eletroforese posterior à imunoabsorção para albumina, se nota que a banda C₂ não aparece, demonstrando que a imunoabsorção para albumina consegue remover a banda C₂. Portanto, o resultado indica que a banda C₂ é um conjugado covalente entre o monômero C₁ e a albumina (Masson, 1989).

A variabilidade do loco *CHE2* afeta uma substância que se liga à *BCHE* (Masson, 1991). Esse polimorfismo é caracterizado de acordo com a presença ou a ausência de uma banda detectada em eletroforese denominada C₅, cujo padrão de herança é autossômico dominante (Harris *et al.*, 1963). As freqüências mais comuns desse alelo em populações caucasóides estão em torno de 5% (ver referência correta).

2.1.3 Variabilidade Genética

A BChE é uma enzima polimórfica e alguns dos fenótipos foram identificados usando-se inibidores diferenciais, que podem inibir em graus diferentes as variantes não usuais. Atualmente, devido ao conhecimento da seqüência e caracterização da estrutura desse gene, já é possível identificar as variantes pela análise do DNA. Em vista disso já foram descritas mais de 65 mutações nesse gene (Souza et al., 2005).

A existência de variabilidade genética da BChE foi, pela primeira vez, constatada em pacientes que sofriam de apnéia e paralisia muscular prolongadas quando submetidos a doses farmacológicas de succinilcolina, um relaxante muscular pré-operatório (KALOW e GENEST, 1957). A enzima variante K da BChE humana foi originalmente descrita como uma variante quantitativa que reduz o número de moléculas circulantes da BChE em 33% (RUBINSTEIN et al., 1978). A enzima K é determinada por uma mutação de ponto de guanina para adenina no nucleotídeo 1615 (G→A), levando a uma substituição de Ala539 por Thr (A539T; BARTELS et al., 1992).

O alelo *A539T* é o mais freqüente dentre as variantes não-usuais da BChE, tendo sido encontrado com freqüência de 12,8% em população norte-americana (BARTELS et al., 1992), 19,6% em população escocesa (GAFFNEY e CAMPBELL, 1994), 16,4% (Shibuta et al., 1994) e 17,5% (IZUMI et al., 1994) em amostras da população japonesa, 18% em população dinamarquesa (JENSEN et al., 1996). No Brasil, Souza et al. (1998), estudando amostras de brancos e miscigenados (branco X negro), obtiveram as freqüências de 18,4% e 17,1%, respectivamente, que não diferem estatisticamente das achadas anteriormente.

De acordo com ALTAMIRANO et al. (2000), a mutação *A539T* não parece ter nenhum efeito na estrutura ou atividade da BChE, pois a enzima K não apresenta diferenças com a BChE usual ou selvagem em relação à afinidade e taxa de catálise de substratos, taxa de secreção da célula ou formação sérica de tetrâmeros. Os autores sugerem que o decréscimo no número de moléculas circulantes da BChE, associado ao fenótipo variante K, pode ser causado por mutações na região regulatória ou promotora do gene *BCHE*.

Kalow e Genest (1957) mostraram que a inibição pela dibucaína distinguia dois tipos de indivíduos, os sensíveis e os não sensíveis à inibição (determinadas respectivamente pelos alelos usual e atípico). Essa variante, denominada variante A,

foi identificada molecularmente por McGuire et al. (1989), sendo que ela é caracterizada por uma mutação de ponto no nucleotídeo 290, o que ocasiona uma modificação de ácido aspártico 70 (GAT) para glicina (GGT) no sítio aniônico.

Uma outra variante, resistente ao fluoreto, BCHE*F foi identificada usando-se o fluoreto de sódio como inibidor diferencial (Harris e Whittaker, 1961). Posteriormente foram identificadas duas formas resistentes ao fluoreto: F-1 (243M), caracterizada por uma mutação de ponto que altera a treonina 243 (ACG) para metionina (ATG) e F-2 (390V), caracterizada por uma mutação de ponto que altera a glicina 390 (GGT) para valina (GTT) (Nogueira et al., 1992).

Outra variante, esta denominada de J, foi identificada por Garry et al. (1976).

Essa variante é caracterizada por uma mutação que altera o ácido glutâmico 497 (GAA) para valina (GTA) (Bartels et al., 1992a). Essa variante, encontrada em ligação absoluta com a variante K (Bartels et al., 1992a), determina uma queda de 66% na enzima circulante e a um decréscimo correspondente na atividade enzimática.

Existem, também, polimorfismos descritos na região não codificadora do gene, como as mutações nt -116 (-116A) no éxon 1, com freqüência de 8,0% e nt 1914 (-1914G) no éxon 4, com freqüência de 26% (BARTELS et al., 1990). Essas duas mutações estão em desequilíbrio de ligação, com acoplamento entre -116A e -1914G. A mutação A539T também está em desequilíbrio de ligação com as mutações -116A e -1914G, exibindo configuração em cis (BARTELS et al., 1990).

Estudos realizados por FURTADO et. al. (2005) indicam que a queda de atividade da BChE, originalmente atribuída à mutação A539T só é verificada em indivíduos portadores da mutação -116A. Como essas mutações estão em desequilíbrio de ligação, a diminuição de atividade enzimática pode ser atribuída à presença de ambas as mutações, ou ainda à mutação no nt 1914.

Em eletroforese bidimensional em papel e gel de amido, além das bandas C₁ a C₄, HARRIS et al. (1962) e HARRIS et al. (1963a) encontraram uma banda que foi denominada C₅. Essa banda foi encontrada em apenas 4,6% da amostra e o gene responsável pela sua determinação foi chamado *CHE2* e apresenta os alelos CHE2*C5+ e CHE2*C5- responsáveis, respectivamente, pela presença e pela ausência da banda C₅. CHAUTARD-FREIRE-MAIA et al. (1991) encontraram, em amostra da população de Curitiba, o fenótipo CHE2C5+ com freqüência de 10,3%. SUGIMORI (1986) demonstrou que os indivíduos CHE2 C5+ são menos sensíveis à

succinilcolina que os indivíduos CHE2 C5⁻. HARRIS (1980) relata que indivíduos com fenótipo CHE2 C5⁺ apresentam atividade média da BChE cerca de 30% superior à de indivíduos CHE2 C5⁻. Foi proposto um padrão de herança autossômico dominante para a presença da banda C5 (HARRIS et al, 1963b).

A banda C₅ é determinada, pelo loco *BCHE* em conjunto com o loco *CHE2*, que condiciona uma substância cuja estrutura permanece desconhecida. HARRIS et al. (1963b) estudaram a segregação mendeliana em duas famílias e verificaram a independência entre os alelos do gene *BCHE* e a banda C₅. A participação do loco *BCHE* na determinação da banda C₅ é verificada pelo uso do inibidor Ro2-0683, que inibe as bandas C₄ e C₅, totalmente em soros de fenótipo usual e parcialmente em soros de fenótipo atípico. Uma associação entre a BChE e uma proteína codificada pelo loco *CHE2* foi proposta por SCOTT e POWERS (1974) como a provável formação da banda C₅.

AKIZUKI et al. (2004) analisaram as regiões codificadoras e não traduzidas do gene *BCHE*, buscando diferenças estruturais nesse gene entre indivíduos com fenótipos CHE2 C5⁺ e CHE2 C5⁻. Esses autores não verificaram associação entre variantes do gene *BCHE* e o fenótipo CHE2 C5⁺, sugerindo que não há relação entre o aumento de atividade da BChE, que é verificado em CHE2 C5⁺, e os variantes do gene *BCHE*. O tratamento do soro desses indivíduos com anti-imunoglobulinas humanas (IgA, IgG e IgM) não teve efeito na atividade da BChE e a sua atividade específica no componente C₅ foi entre 30 e 54% maior que aquela calculada para os demais componentes da enzima. AKIZUKI et al. (2004) sugerem que não há relação entre os variantes do gene *BCHE* e o fenótipo CHE2 C5⁺ e que, embora a atividade específica da BChE seja aumentada no variante C₅, permanece desconhecida a natureza da substância produzida pelo loco *CHE2*, responsável pelo fenótipo CHE2 C5⁺.

2.2. Diabete Melito do Tipo 1

O diabete melito (DM) é uma síndrome de etiologia múltipla, decorrente da falta e/ou da incapacidade da insulina de exercer adequadamente seus efeitos. Caracteriza-se por hiperglicemia crônica, freqüentemente acompanhada de dislipidemia, hipertensão arterial, disfunção endotelial e obesidade.

Complicações microvasculares, comprometendo o sistema nervoso periférico e autônomo são comuns. Seus pacientes são mais propensos a distúrbios termorregulatórios, como hipertermia e hipotermia, e a desidratação (CHISHOLM, D.J, 1998).

Além disso, a neuropatia autonômica diabética (NAD) é uma complicação comum e suas principais manifestações clínicas incluem taquicardia de repouso, hipotensão ortostática, constipação, intolerância ao exercício e disfunção sudorípara. Tais sintomas são resultados de uma disfunção no sistema nervoso autonômico, tanto parassimpático quanto simpático (VINIK, A.I. et. al. 2003).

Uma evidência da influência de fatores ambientais é o aumento global de casos de diabetes, verificado pela incidência de 3% por ano, por fatores alimentícios que influenciam na susceptibilidade para DM1, como por exemplo, a exposição precoce ao leite de vaca e glúten. (DAHL-JORGENSEN, et. al. 1991; SAVILAHTI, et. al. 1993; VAARALA, et. al. 2006)

Os fatores ambientais podem ser agrupados em fatores de susceptibilidade introduzidos no ambiente (infecção viral, dieta, exposição a nitratos), e fatores de proteção removidos do ambiente (hipótese higiênica, deficiência de vitamina D). (MERRIMAN et. al 2009)

A velocidade de progressão deste processo pode ser variável, evoluindo com a perda da capacidade de secreção insulínica em alguns meses ou até em vários anos. Além da destruição da massa de células β , pode haver comprometimento da função secretora das células remanescentes, de maneira transitória ou permanente (SCREENAN, et. al. 1998; MARCHETTI, et. al. 2000).

2.2.1. Classificação de Diabetes

Em longo prazo, o DM provoca alterações que levam à disfunção, dano ou falência de vários órgãos, incluindo nefropatia, com possível evolução para insuficiência renal, retinopatia, artropatia de Charcot e disfunções autonômicas, inclusive disfunção sexual. A classificação atualmente recomendada utiliza os estágios clínicos do DM, desde a normalidade, passando por tolerância à glicose diminuída e/ou glicemia em jejum alterada, até o DM propriamente dito. A nova classificação, baseada na etiologia do DM, elimina os termos diabete melito-insulino

dependente (IDDM) e não-insulinodependente (NDDM) e sugere os seguintes critérios:

- O DM do tipo 1 (DM1) resulta primariamente da destruição das células beta das ilhotas pancreáticas, produtoras de insulina, e tem tendência à cetoacidose. Inclui casos decorrentes de doença auto-imune e casos de causa desconhecida. Corresponde a 5 a 10 % do total de casos de diabetes. A forma de progressão rápida é comumente observada em crianças e adolescentes, mas pode ocorrer em adultos. A forma de progressão lenta ocorre geralmente em adultos e é denominada de diabetes latente auto-imune do adulto (Lada);
- O DM do tipo 2 (DM2) é caracterizado por graus variáveis de resistência à insulina e deficiência relativa de secreção de insulina. A maioria dos pacientes tem excesso de peso e a cetoacidose ocorre apenas em situações especiais. Geralmente manifesta-se após os 40 anos, mas pode desenvolver-se mais cedo, embora raramente em adolescentes e crianças. Entre 85 e 90% dos casos de diabetes são DM2 e a sua incidência tem aumentado também entre os jovens, devido ao aumento de incidência da obesidade.

Uma das principais limitações dos estudos que avaliam a secreção de insulina em pacientes com DM1 é a impossibilidade de mensurar a massa de células β *in vivo*. Embora modelos animais venham sendo utilizados para elucidar questões acerca deste tema, nem sempre é possível extrapolar as informações obtidas para o DM1 humano. Dessa forma, métodos indiretos para avaliação da massa de células β e da função pancreática em humanos vêm sendo desenvolvidos e aprimorados. Não obstante a possibilidade de comprometimento funcional das células β preservadas, a capacidade de secreção de insulina mostrou ter correlação aproximada com a massa de células β utilizada no transplante de ilhotas nos pacientes com DM1 (TSAI, et. al. 2006).

A avaliação da função das células β pode ser feita por diferentes métodos. O uso da dosagem da insulina no sangue periférico, com esta finalidade, tem limitações importantes: 40% a 60% sofrem efeito da primeira passagem pelo fígado, o seu *clearance* periférico varia de acordo com as condições metabólicas e não é possível diferenciar a insulina endógena da exógena ou da pró-insulina (PALMER, et. al. 2004). O método mais adequado, aceito e clinicamente validado para a mensuração da função das células β sob condições ideais é a dosagem do peptídeo C (PC) (VERDRAME, et. al. 2004). Esta molécula é cossecretada na circulação

portal em quantidade equimolar à da insulina, e não sofre metabolização hepática. Sua dosagem possui alta reprodutibilidade e variabilidade relativamente baixa (TSAI, et. al. 2006; PALMER, et. al. 2004; VERDRAME, et. al. 2004), podendo ser basal ou sob estímulo, com glicose, refeição-padrão ou secretagogos de insulina, como o glucagon (PALMER, et. al. 2004; VERDRAME, et. al. 2004). Os testes com estímulo apresentam boa correlação entre si e parecem ser superiores à avaliação basal (VERDRAME, et. al. 2004). O teste com glucagon representa estímulo suprafisiológico, mas podem ter algumas vantagens sobre os demais, como maior rapidez, menor influência da glicotoxicidade, simples realização técnica e boa reprodutibilidade. Além disso, é teste seguro, que apresenta efeitos colaterais leves e transitórios (TSAI, et. al. 2006; PALMER, et. al. 2004; VERDRAME, et. al. 2004).

Estudos recentes têm demonstrado função residual das células β (por meio da dosagem de PC) em uma proporção significativa de indivíduos com DM1, tanto ao diagnóstico quanto após vários anos da doença (TSAI, et. al. 2006). A preservação desta capacidade de secreção seria atrativa para evitar a necessidade de insulino-terapia ou até curar o DM. Entretanto, mesmo sem atingir este objetivo, a manutenção de alguma função residual poderia ter vantagens importantes, como melhor controle metabólico, menor frequência de hipoglicemia e menor risco de complicações microvasculares (TSAI, et. al. 2006; PALMER, et. al. 2004; VERDRAME, et. al. 2004; STEFFES, et. al. 2003; SHERRY, et. al. 2005; TDCCTRG, et. al. 1998).

DM1 clínico representa o último estágio de *insulinitis*, e já foi estimado que no tempo de diagnose, somente 10 a 20% das células β estão em funcionamento. (KNIP et. al. 2008)

2.2.2. Associação Genética do DM1

A incidência do diabetes melito do tipo 1 (DM1) é entre 1 e 4 entre 10.000 indivíduos antes da idade dos 30. É um problema médico de proporção social sendo a terceira desordem infantil mais comum, associado à diminuição da qualidade de vida e à morte prematura. (LEVY-MARCHAL, et.al 2001, KARVONEN, et. al. 2000)

São evidentes os fatores genéticos desempenharem um importante papel na determinação do DM1, já que há forte agrupamento de afetados em uma mesma família, com a taxa de recorrência entre irmãos de 6%, e a taxa de concordância

entre gêmeos monozigóticos de 30% - 50%. (TODD, et. al. 1990; KYVIK, et. al. 1995; HYTTINEN, et. al. 2003; ANAYA, et. al. 2006). Uma evidencia mais direta é visto pela forte associação entre várias variantes genéticas e DM1. O primeiro locus genético que predispõe à desordem foi detectado em 1974 por Nerup et. al. Seguido de Cudworth e Woodrow, que detectaram uma associação com o sistema do HLA. (NERUP, et. al. 1974; CUDWORTH, et. al. 1975) . Desde então, 30 anos de estudos genéticos contribuíram para significativamente avançar os conhecimentos dos fatores genéticos para a susceptibilidade para o DM1, fazendo com que essa desordem seja aquela mais bem estudada entre as doenças complexas. (ALIZADEH et. al. 2008)

Muitos genes candidatos foram estudados para o DM1 nas ultimas décadas, mas somente alguns poucos comprovadamente estão associados à desordem. Muitas das associações significativas iniciais falharam para serem confirmadas em estudos independentes, algumas outras foram confirmadas inconsistentemente, e somente três se mostraram consistentemente associadas por vários diferentes trabalhos e são agora conhecidos como fatores de risco para o DM1. Esses três locos para o DM1 são os VNTRs perto do gene da Insulina (INS), antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico (CTLA4) e a proteína não receptora-tipo22 tirosina fosfatase pirocina (PTPN22). (ALIZADEH et. al. 2008)

O DM1 apresenta associação com genes do sistema HLA, que são responsáveis por cerca de 10% (KNIP et. al. 2008) do risco genético para desenvolvimento de DM1, especialmente os genes de classe II, da região D: *DRB* (*DRB1*0401*, *DRB1*0402*, *DRB1*0205*, *DRB1*0301* e *DRB1*1501*), *DQA* e *DQB*. Devido ao desequilíbrio de ligação entre muitos alelos, ao nível populacional é provável que existam haplótipos de risco na região D do sistema HLA (FLOREZ, 2003).

Isso implica que fatores adicionais são necessários para ativar e motivar a destruição das células β em indivíduos geneticamente predispostos. (KNIP et. al., 2008)

Diversos estudos identificam cerca de 20 locos, distribuídos em vários cromossomos (1, 2, 3, 5, 6, 10, 11, 14, 15, 16 e 18), que mostraram ligação com o DM1 (FLOREZ, 2003; PUGLIESE, 1997; CONCANNON, 1998; MEIN, 1998; LAINE, 2004; NOSIKOV, 2004).

Enquanto que os eventos moleculares que levam para a condição clínica do DM1 ainda não foram totalmente elucidados, evidências imunológicas e genéticas indicam que uma regulação aberrante do sistema imune é a chave. (MERRIMAN et al 2009)

Rastreamentos genômicos e estudos com genes candidatos mostraram evidências de quinze locos de susceptibilidade ao DM1 (IDDM1-IDDM15), sendo que um desses locos (IDDM9) foi localizado no cromossomo 3 (3q21-q25). MEIN et al. (1998), utilizando os microssatélites D3S1576 e D3S1279 encontraram um lod score de 1,1. CONCANNON et al. (1998) excluíram ligação de DM1 com D3S1576. NOSIKOV (2004) testou ligação de DM1 com os microssatélites D3S1769 e D3S4015, em amostra de russos e encontrou resultados sugestivos de ligação genética com ambos os marcadores. LAINE et al. (2004) também obtiveram resultados comparáveis aos de NOSIKOV (2004).

Em trabalhos anteriores da equipe de pesquisa (LEPIENSKI et al., 2006; OLIVEIRA, 2006), foram encontradas associações entre a idade de aparecimento do DM1 e variações no gene *BCHE* (3q26.1-q26.2) da butirilcolinesterase humana. LEPIENSKI et al. (2006) mostraram que os portadores da variação K (nucleotídeo 1615) apresentam risco aumentado de apresentar DM1 com idade ≤ 12 anos. Ao estudar as variações do nucleotídeo -116 do éxon 1 desse gene, em conjunto com as variações do nucleotídeo 1615 (éxon 4), OLIVEIRA (2006) mostrou que a presença conjunta de -116A e da mutação K aumenta ainda mais o risco do aparecimento precoce do DM1. Essa autora sugere que essa associação estaria apontando para outro gene do cromossomo 3, provavelmente a montante do gene *BCHE*, e que seria o gene responsável pelo aparecimento precoce de DM1.

Com base nos dados desses autores e nos resultados das pesquisas de nosso laboratório, é provável que as associações que encontramos, com SNPs do gene *BCHE* e DM1 de aparecimento precoce, sejam devidas ao gene do loco *IDDM9*. É possível que o resultado de ligação genética discordante, obtido por CONCANNON et al. (1998), seja devido à heterogeneidade de amostras, no que concerne a idade de aparecimento da doença. É provável que o loco *IDDM9* predisponha apenas para o aparecimento precoce do DM1 e não ao próprio DM1. Assim, dependendo do tipo de famílias analisadas, o resultado de ligação genética poderá ser no sentido de ligação ou não.

A possível associação entre DM1 e variantes do gene *BCHE* não pôde ser descartada no trabalho de OLIVEIRA (2006), devido ao tamanho reduzido da amostra, à redução da atividade da BchE associada à mutação -116A e à presença de outros fatores que poderiam estar influenciando na atividade da BchE, como o fenótipo CHE2 C5+ e a obesidade (KUTTY, 1980; ALCÂNTARA e cols., 2003, FURTADO, 2005), ambos associados a um aumento na atividade enzimática.

2.3. Butirilcolinesterase e Diabete Melito

A BChE é uma enzima polimórfica cuja função no organismo ainda não está elucidada. Suas variantes são na maioria silenciosas e possuem atividade inferior a 10% em relação à enzima usual (PRIMO-PARMO e cols., 1996).

A variante -116A foi descoberta por BARTELS e cols (1990) e apresenta-se em desequilíbrio de ligação com a variante *K* (RUBINSTEIN e cols, 1978). Parece ser a variante -116A a responsável pela redução de cerca 30% na atividade da BChE, em relação à enzima usual (FURTADO, 2005), redução antes atribuída à influência da mutação *K*. Entretanto, não há informação sobre a -116A isoladamente, somente do seu efeito associado a A539T.

O primeiro relato de aumento na atividade da BChE em diabéticos foi feito por ANTOPOL e cols. (1937). Vários estudos mais recentes têm mostrado alguma relação da atividade da butirilcolinesterase com o metabolismo alterado de lipoproteínas em pacientes diabéticos e também em modelos animais.

PAVKOVIC e cols. (1993) relataram que tanto pacientes com tolerância prejudicada à glicose, como com diabete melito do tipo 2, possuem atividade da BChE levemente maior do que aqueles que apresentam somente hiperlipemia. ABBOT e cols. (1993) investigaram a relação entre atividade total da BChE no soro e a hipertrigliceridemia em pacientes com diabete melito tipos 1 e 2, e também com resistência à insulina e obtiveram dados, de pacientes em jejum, que os levaram a concluir que, tanto no diabete melito tipo 1 quanto no tipo 2, essa atividade está correlacionada com o log das concentrações dos triglicérides no soro.

ABBOT e cols. (1993) encontraram valores elevados de atividade da BChE em pacientes diabéticos com hipertrigliceridemia. Os níveis de BChE e triglicérides mostraram-se positivamente correlacionados em crianças diabéticas e obesas

(RANDELL e cols., 1996). A atividade da BChE correlaciona-se positivamente com os níveis de insulina e do peptídeo-C, no soro de indivíduos portadores de diabetes melito do tipo 2 (NISTOR e cols., 1998).

Ratos hiperglicêmicos mostraram níveis elevados de BChE no plasma e no fígado e apresentaram metabolismo alterado de VLDL (KUTTY e cols., 1980). Diabetes induzida por estreptozotocina, em ratos, resultou em aumento nos níveis de BChE, triglicerídeos, VLDL e glicerol. O controle deste estado com insulina provocou a normalização destes níveis (ANNAPURNA e cols., 1991).

HASHIM e cols. (2001) estudaram uma amostra de pacientes diabéticos do tipo 2 e encontraram uma associação positiva entre este distúrbio e o alelo *A539T* da BChE. A freqüência desse alelo foi de 22,8% em 276 desses pacientes, contra 15,8% em um grupo controle de 348 não diabéticos ($p = 0,00017$). As freqüências genóticas também diferiram significativamente entre os dois grupos. O aumento no risco de desenvolver diabetes do tipo 2, associado à presença de *A539T*, foi estimado em 44%. Esses mesmos pacientes foram divididos em dois grupos, segundo a necessidade ou não de tratamento com insulina, 6 anos após o ingresso na pesquisa. O objetivo foi investigar uma possível associação entre o alelo *A539T* e uma disfunção das células beta pancreáticas. Para tanto, compararam a distribuição das freqüências alélicas e genóticas nestes grupos e não encontraram nenhuma diferença estatisticamente significativa. Dessa forma, os autores sugerem que a associação encontrada entre o alelo *A539T* e o diabetes melito tipo 2 seria, mais provavelmente, devida a um desequilíbrio de ligação desta mutação com genes de susceptibilidade, já identificados na região 3q27-ter, cerca de 25cM distante do gene *BCHE*.

LEPIENSKI (2004) encontrou freqüência mais elevada (30,3%) do alelo *A539T* no grupo de diabéticos do tipo 1 com aparecimento precoce da doença (<12 anos), em relação ao grupo com aparecimento mais tardio (8,8%) e também em relação ao grupo controle de doadores de sangue (17,8%). Ressalte-se que, nos diabéticos do tipo 1, cuja idade de aparecimento da doença é inferior 12 anos, a freqüência de pacientes com a mutação *A539T* em homo e heterozigose (53,06%) ultrapassa a freqüência de pacientes com o genótipo usual. Em nenhuma das populações já descritas, tal predominância foi verificada. No grupo cuja idade de aparecimento da doença foi de 12 anos ou mais, essa freqüência é de 25,49%. Apesar de ser um número pequeno, salienta-se que todos os *A539T/A539T*, da

amostra estudada por LEPIENSKI (2004) tiveram o aparecimento da doença antes dos 12 anos.

Os resultados da análise de regressão múltipla escalonada confirmam a associação da variante *A539T* com a idade mais precoce de aparecimento do diabetes melito do tipo 1. LEPIENSKI (2004) observou também que a frequência da variante *A539T* nos diabéticos tipo 2 (17,12%) não difere estatisticamente das encontradas nos doadores de sangue (17,53%) e na amostra pareada por origem étnica (13,70%). As comparações entre as distribuições de frequências genotípicas também não apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Dessa forma, não foi constatada a esperada associação entre a frequência da mutação *A539T* da BChE e o diabetes melito do tipo 2, de modo que os presentes dados não corroboram os encontrados por HASHIM e cols. (2001).

FURTADO (2005) estudando a variante *-116A* mostrou sua associação com o aumento da média do IMC em obesos. Essa variante ocorre no éxon 1, e apresenta desequilíbrio de ligação com a variante *A539T* (éxon 4), sendo observada em mais de 90% dos casos em cromossomo que também apresenta a variante *A539T*. (BARTELS e cols., 1990). O grupo de doadores de sangue de Curitiba estudado por FURTADO (2005), mostrou frequência de 8,6% para o alelo *-116A*. Na mesma amostra, a frequência do alelo *A539T* foi de cerca de 17%, sendo que 50% dos cromossomos que o portam também apresentam a variante *-116A*. Em vista disso, é importante saber se a associação encontrada nos diabéticos do tipo 1, já estudados por LEPIENSKI (2006), entre a idade precoce de aparecimento da doença e a variante *A539T* trata-se mesmo de associação com essa variante ou se é devida à presença da variante *-116A*. Devido ao desequilíbrio de ligação entre esses alelos e à maior frequência de *A539T*, o efeito isolado da mutação *-116A*, não pode ser verificado adequadamente. É possível verificar o efeito da mutação *A539T* isoladamente, mas não o efeito da *-116A*.

3. Objetivos

3.1. Verificar associação genética de dois grupos de DM1 (abaixo e acima da mediana da idade de aparecimento do DM1) com as variantes *-116A*, *A539T* do gene *BCHE* em nova amostra de pacientes com DM1.

3.2. Verificar associação genética de dois grupos de DM1 (abaixo e acima da mediana da idade de aparecimento do DM1) com SNPs do cromossomo 3, localizados em torno do gene *BCHE* (3q26.1-q26.2) em amostra utilizada em trabalhos anteriores do nosso laboratório e em nova amostra de pacientes com DM1.

3.3. Realizar análise de associação genética do conjunto dos dados do presente trabalho e daqueles de variações do gene *BCHE*, já registrados em nosso laboratório.

3.4. Buscar informações que levem à indicação mais precisa do gene de susceptibilidade ao DM1, presente no loco IDDM9 (3q21-q25).

Capítulo 1

Associação entre o gene da butirilcolinesterase e diabetes melito tipo 1

Resumo

A butirilcolinesterase (BChE) é codificada pelo gene *BCHE* que apresenta dezenas de alelos, sendo alguns polimórficos. O diabetes melito (DM) é uma síndrome de etiologia múltipla, decorrente da falta de insulina e/ou da incapacidade desta exercer adequadamente seus efeitos levando a vários distúrbios metabólicos. O objetivo deste estudo foi buscar informações que levem à indicação mais precisa do possível envolvimento do gene *BCHE* na susceptibilidade ao diabetes melito ou se existe outro gene de susceptibilidade na região proximal ao gene *BCHE*. Foram utilizadas duas amostras de pacientes com DM1, uma já coletada em estudo anterior (N=71) e outra coletada para o presente estudo (N=103), com suas respectivas amostras controle. Ambas as amostras de DM1 foram coletadas no Hospital de Clínicas, Curitiba, PR. As amostras controle são de doadores de sangue de Curitiba, coletadas no HEMEPAR. A nova amostra de pacientes com DM1 foi genotipada para as mutações K (rs1803274), -116 (rs1126680), já genotipadas para a amostra antiga e controles, e os 4 SNPs (para as duas amostras e respectivos controles) em torno do gene *BCHE* (rs2863381 e rs4440084 a montante do gene e rs7624915 e rs4387996 a jusante do gene) utilizando a técnica de genotipagem por PCR em tempo real. Fazendo a análise conjunta das duas amostras, foram encontradas diferenças significativas, entre DM1 e seus controles, na frequência genotípica (rs1803274 e rs7624915) e na frequência alélica (rs7624915 e rs4387996). Em estudo anterior de nosso laboratório, com a amostra antiga, foi encontrada diferença na frequência da mutação K e -116 quando a amostra de DM1 foi separada pela mediana da idade de aparecimento de DM1. Com as amostras agrupadas, esse resultado não se repetiu, no entanto, foi encontrada diferença para o SNP rs7624915. Esse SNP é o mesmo que apresentou diferenças alélica e genotípicas entre DM1 e seus controles. Como esse SNP, assim como o outro que apresentou diferença na frequência alélica ficam a jusante do gene *BCHE*, pode ser que a associação encontrada seja com outro gene próximo ao gene.

Introdução

A butirilcolinesterase (BChE) é codificada pelo gene *BCHE*, que está localizado no braço longo do cromossomo 3 (3q26.1- q26.2; SOREQ e cols., 1987). Cerca de 65 variantes genéticas deste gene já foram descritas, sendo a maioria rara. O gene *BCHE*, constituído por 64.558 pb, existe como entidade única no genoma, contém 4 éxons, sendo que o éxon 1 é transcrito, mas não é traduzido e o éxon 2 contém 83% da seqüência que codifica a BChE e inclui o sítio serina-ativo e a seqüência líder da enzima (ARPAGAUS e cols., 1990; SOUZA e cols., 2005).

A variabilidade do gene *BCHE* começou a ser estudada na década de 50. Desde então diversas variantes foram descobertas, através da utilização de técnicas de inibição enzimática, estudos familiares e, mais recentemente, por técnicas de análise do DNA. Algumas variantes também foram identificadas devido à atividade ausente ou reduzida em relação à enzima usual. Atualmente muitas variantes têm sido identificadas através de seqüenciamento de DNA (ARPAGAUS e cols., 1990; SOUZA e cols., 2005; MIKAMI e cols., 2008).

O diabetes melito (DM) é uma síndrome de etiologia múltipla, decorrente da falta de insulina e/ou da incapacidade da insulina de exercer adequadamente seus efeitos. A hiperglicemia crônica é freqüentemente acompanhada de dislipidemia, hipertensão arterial, disfunção endotelial e obesidade (SOC. BRAS. DIABETES, 2003).

A baixa atividade da BChE está relacionada a disfunções endoteliais. Um estudo mostrou que existe um aumento na freqüência do alelo *A539T* no grupo de diabéticos tipo 1 com aparecimento precoce da doença (≤ 12 anos), em relação ao grupo com aparecimento mais tardio (> 12 anos) e o grupo controle (LEPIENSKI e cols., 2006).

Outra variante da BChE, *-116A*, mostrou associação com o aumento da média do índice de massa corporal em obesos. Essa variante ocorre no éxon 1, e apresenta desequilíbrio de ligação com a variante *A539T*, ocorrendo em mais de 90% dos casos em cromossomo que também apresenta a variante *A539T* (FURTADO, 2005).

Este estudo analisa as mutações *A539T*, *-116A* e mais quatro SNPs em torno do gene *BCHE* em uma amostra de pacientes com DM1, pretendendo buscar informações que levem à indicação mais precisa do possível envolvimento do gene

BCHE na susceptibilidade ao diabetes melito ou se existe outro gene de susceptibilidade na região proximal ao gene *BCHE*.

Materiais e métodos

Amostras

Foram utilizadas duas amostras de pacientes com DM1 e duas amostras controles. Uma das amostras de pacientes com DM1, constituída de 71 pacientes, coletada em estudo anterior e genotipada com os seus devidos controles para as mutações K e -116 (OLIVEIRA, 2006, LEPIENSKI e cols., 2006). A segunda amostra foi coletada no presente estudo, sendo constituída de 103 pacientes do Hospital de Clínicas, com DM1, sendo 40,2% do sexo feminino, a idade média de aparecimento do DM1 foi de 17,6 anos, o nível médio de colesterol foi de 179,8 mg/dL e as médias de peso e altura foram, respectivamente, de 64,76kg e 163,3cm. Foi utilizada como amostra controle doadores de sangue de Curitiba, cujo material já foi coletado e estocado em nosso laboratório.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas.

Métodos

Extração de DNA

O DNA da nova amostra de pacientes com DM1 foi extraído através do método de salting out (LAHIRI e NURNBERGER, 1991),

As concentrações das amostras estoque foram medidas usando-se o aparelho Nanodrop da Thermo Scientific. Foi feita uma alíquota de uso com concentração de 20ng/μl

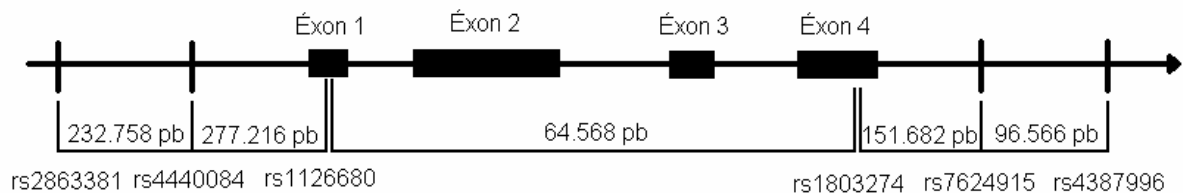
Genotipagem

A nova amostra de pacientes com DM1 foi genotipada para as mutações K, -116 e os 4 SNPs em torno do gene *BCHE* (rs2863381 e rs4440084 a montante do gene e rs7624915 e rs4387996 a jusante do gene) (figura 1) utilizando a técnica de genotipagem por PCR em tempo real.

Para genotipagem desses SNPs foi utilizado o kit TaqMan SNP genotyping assays da Applied Biosystems. Esse kit consiste de 2 iniciadores não marcados e duas sondas (uma para cada alelo) marcadas com fluorescência VIC imitando coloração vermelha e FAM como a coloração verde.

As reações foram feitas em um aparelho Eppendorf Mastercycler ep realplex2, usando os seguintes parâmetros: 1) 50°C por 2 minutos; 2) 95°C por 10 minutos; 3) 95°C por 15 segundos; 4) 62°C por 1 minuto; os passos 3 e 4 foram repetidos por 50 ciclos. As análises foram feitas com o software Eppendorf realplex v. 1.5.

Fig. 1. Localização dos SNPs estudados em relação ao gene *BCHE*.



Análise dos dados

As frequências alélicas e genotípicas foram obtidas através da contagem direta do número de cromossomos e de indivíduos, respectivamente.

O programa CLUMP (SHAM e CURTIS, 1995) foi usado para comparar as frequências alélicas e genotípicas obtidas no presente trabalho com as de outros autores.

O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi verificado pelo programa Arlequin 2000 (SCHNEIDER et al., 2000) de acordo com o teste de GUO e THOMPSON (1992).

Os coeficientes de desequilíbrio de ligação também foram estimados pelo programa Arlequin 2000 (SCHNEIDER et al., 2000) através do teste "likelihood ratio" (SLATKIN e EXCOFFIER, 1996).

A inferência da fase haplotípica foi obtida a partir dos dados das frequências genotípicas observadas, baseada no método de máxima verossimilhança do programa Arlequin 2000 (SCHNEIDER et al., 2000).

Foram calculados os valores de OR (*odds ratio*), de acordo com o método de Woolf (1955) e para os valores significativos foi calculado o risco relativo.

Os cálculos de correlações foram calculadas pelo programa STATISTICA for Windows (STATSOFT, 2000; <http://www.statsoft.com>)

Resultados

Genotipagem por Taqman

A genotipagem com taqman apresentou uma taxa média de falha de 14,91%, isso inclui falta de amplificação ou resultados indeterminados.

Foi feito um teste cego com 30 amostras com genótipo conhecido, 10 de cada genótipo, sendo que o resultado apresentou uma concordância de 100% nas 29 amostras que amplificaram.

Freqüências genotípicas e alélicas

As amostras de diabéticos e seus controles foram genotipadas para as mutações K (rs1803274) e -116 (rs1126680) e para os SNPs rs7624915, rs4387996, rs4440084 e rs2863381 foram genotipados além das amostras de diabéticos e controles do presente estudo, as amostras de diabéticos e controles de estudo anterior de nosso laboratório (Lepienski e cols. 2006, Oliveira, 2006). As freqüências alélicas e genotípicas da amostra nova e antiga separadas podem ser vistas na tabela 1. Foi feito um teste de homogeneidade, para cada SNP, entre a amostra nova e antiga, o qual não foi significativo, o que possibilitou agrupá-las, como pode ser visto na tabela 2.

Tabela 1. Freqüências genotípicas e alélicas dos SNPs rs1803274, rs1126680, rs7624915, rs4387996, rs4440084 e rs2863381 nas amostras de diabéticos (DM1) e controles (CTL) novos e antigos.

| rs1803274 | N | Freqüências Genotípicas | | | Freqüências Alélicas | |
|-----------|-----|-------------------------|--------|--------|----------------------|--------------|
| | | GG (%) | GA (%) | AA (%) | G (%) | A(%) |
| DM1 novos | 97 | 64,94 | 30,93 | 04,12 | 80,41 ± 2,85 | 19,59 ± 2,85 |
| CTL novos | 102 | 58,82 | 41,18 | 00,00 | 79,41 ± 2,83 | 20,59 ± 2,83 |

| rs1126680 | N | Frequências Genotípicas | | | Frequências Alélicas | |
|-----------|-----|-------------------------|--------|--------|----------------------|------------|
| | | GG (%) | GA (%) | AA (%) | G(%) | A(%) |
| DM1 novos | 99 | 86,87 | 12,12 | 01 | 92,02±1,81 | 07,07±1,81 |
| CTL novos | 102 | 82,35 | 17,65 | 00,00 | 91,18±1,98 | 08,82±1,98 |

| rs7624915 | N | Frequências Genotípicas | | | Frequências Alélicas | |
|-------------|-----|-------------------------|--------|--------|----------------------|------------|
| | | AA (%) | AC (%) | CC (%) | A (%) | C(%) |
| DM1 novos | 98 | 27,55 | 47,96 | 24,49 | 51,53±3,57 | 48,47±3,57 |
| CTL novos | 102 | 11,76 | 58,86 | 31,37 | 40,20±3,43 | 59,80±3,43 |
| DM1 antigos | 71 | 14,08 | 64,79 | 21,13 | 46,48±4,18 | 53,52±4,18 |
| CTL antigos | 69 | 14,49 | 55,07 | 30,43 | 42,03±4,2 | 57,97±4,2 |

| rs4387996 | N | Frequências Genotípicas | | | Frequências Alélicas | |
|-------------|-----|-------------------------|--------|--------|----------------------|------------|
| | | AA (%) | AG (%) | GG (%) | A(%) | G(%) |
| DM1 novos | 98 | 10,20 | 56,12 | 33,67 | 38,26±3,47 | 61,74±3,47 |
| CTL novos | 101 | 04,95 | 41,58 | 53,47 | 25,74±3,08 | 74,26±3,08 |
| DM1 antigos | 70 | 12,86 | 40 | 47,14 | 32,86±3,97 | 67,14±3,97 |
| CTL antigos | 69 | 08,69 | 43,48 | 47,83 | 30,43±3,92 | 69,57±3,92 |

| rs4440084 | N | Frequências Genotípicas | | | Frequências Alélicas | |
|-------------|-----|-------------------------|--------|--------|----------------------|------------|
| | | CC (%) | CG (%) | GG (%) | C (%) | G (%) |
| DM1 novos | 98 | 19,39 | 46,94 | 33,67 | 42,86±3,53 | 57,14±3,53 |
| CTL novos | 101 | 13,86 | 47,52 | 38,61 | 37,62±3,41 | 62,38±3,41 |
| DM1 antigos | 71 | 11,27 | 49,29 | 39,44 | 35,92±4,03 | 64,08±4,03 |
| CTL antigos | 68 | 10,29 | 51,47 | 38,23 | 36,03±4,12 | 63,97±4,12 |

| rs2863381 | N | Frequências Genotípicas | | | Frequências Alélicas | |
|-------------|-----|-------------------------|--------|--------|----------------------|------------|
| | | CC (%) | CT (%) | TT (%) | C (%) | T (%) |
| DM1 novos | 97 | 08,25 | 31,96 | 59,79 | 24,23±3,08 | 75,77±3,08 |
| CTL novos | 102 | 06,86 | 35,29 | 57,84 | 24,51±3,01 | 75,49±3,01 |
| DM1 antigos | 68 | 10,29 | 30,88 | 58,82 | 25,73±3,72 | 74,27±3,72 |
| CTL antigos | 69 | 08,69 | 37,68 | 53,62 | 27,54±3,8 | 72,46±3,8 |

Tabela 2. Frequências genotípicas e alélicas dos SNPs rs1803274, rs1126680, rs7624915, rs4387996, rs4440084 e rs2863381 nas amostras de diabéticos novas e antigas agrupadas e controles novas e antigas agrupadas.

| rs1803274 | N | Frequências Genotípicas | | | Frequências Alélicas | |
|------------|-----|-------------------------|--------|--------|----------------------|------------|
| | | GG (%) | GA (%) | AA (%) | G (%) | A(%) |
| Diabéticos | 161 | 65,84 | 29,81 | 4,35 | 80,74±2,20 | 19,26±2,20 |
| Controles | 144 | 59,72 | 40,28 | 0,00 | 79,86±2,36 | 20,14±2,36 |

| rs1126680 | N | Frequências Genotípicas | | | Frequências Alélicas | |
|------------|-----|-------------------------|--------|--------|----------------------|------------|
| | | GG (%) | GA (%) | AA (%) | G(%) | A(%) |
| Diabéticos | 165 | 84,24 | 14,55 | 1,21 | 91,52±1,53 | 8,48±1,53 |
| Controles | 164 | 79,88 | 20,12 | 0,00 | 89,94±1,66 | 10,06±1,66 |

| rs7624915 | N | Frequências Genotípicas | | | Frequências Alélicas | |
|------------|-----|-------------------------|--------|--------|----------------------|------------|
| | | AA (%) | AC (%) | CC (%) | A (%) | C (%) |
| Diabéticos | 163 | 22,09 | 53,99 | 23,93 | 49,08±2,77 | 50,92±2,77 |
| Controles | 164 | 12,80 | 56,71 | 30,49 | 41,16±2,72 | 58,84±2,72 |

| rs4387996 | N | Frequências Genotípicas | | | Frequências Alélicas | |
|------------|-----|-------------------------|--------|--------|----------------------|------------|
| | | AA (%) | AG (%) | GG (%) | A (%) | G (%) |
| Diabéticos | 163 | 11,04 | 49,69 | 39,26 | 35,89±2,66 | 64,11±2,66 |
| Controles | 163 | 6,75 | 43,56 | 49,69 | 28,53±2,50 | 71,47±2,50 |

| rs4440084 | N | Frequências Genotípicas | | | Frequências Alélicas | |
|------------|-----|-------------------------|--------|--------|----------------------|------------|
| | | CC (%) | CG (%) | GG (%) | C (%) | G (%) |
| Diabéticos | 163 | 16,56 | 46,63 | 36,81 | 39,88±2,72 | 60,12±2,72 |
| Controles | 163 | 12,88 | 48,47 | 38,65 | 37,12±2,68 | 62,88±2,68 |

| rs2863381 | N | Frequências Genotípicas | | | Frequências Alélicas | |
|------------|-----|-------------------------|--------|--------|----------------------|------------|
| | | CC (%) | CT (%) | TT (%) | C (%) | T (%) |
| Diabéticos | 159 | 8,81 | 32,08 | 59,12 | 24,84±2,24 | 75,16±2,24 |
| Controles | 164 | 7,32 | 53,37 | 57,32 | 25,00±2,39 | 75,00±2,39 |

Foi testado o equilíbrio de Hardy-Weinberg em todas as amostras (tabela 3). Com exceção do SNP rs1803274 nos controles novos e do SNP rs7624915 nos diabéticos antigos, os demais estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Foi testado o equilíbrio de Hardy-Weinberg para as amostras novas e antigas agrupadas, tanto para os diabéticos quanto para os seus controles (tabela 4). Somente os controles para os SNPs rs1803274 e rs7624915 não estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 3. Teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg para os seis SNPs nas quatro amostras.

| SNPs | rs1803274 | rs1126680 | rs7624915 | rs4387996 | rs4440084 | rs2863381 |
|------------|--------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | $\chi^2_{(1)} (p)$ | $\chi^2_{(1)} (p)$ | $\chi^2_{(1)} (p)$ | $\chi^2_{(1)} (p)$ | $\chi^2_{(1)} (p)$ | $\chi^2_{(1)} (p)$ |
| Diabéticos | 0,032199 | 0,63229 | 0,15614 | 2,1718 | 0,17013 | 1,62744 |
| Novos | (p>0,75) | (p>0,25) | (p>0,90) | (p>0,1) | (p>0,75) | (p>0,1) |
| Controles | 6,8551 | 0,95596 | 3,4055 | 0,7767 | 0,015865 | 0,21801 |
| Novos | (p<0,01) | (p>0,25) | (p>0,05) | (p>0,25) | (p>0,9) | (p>0,75) |
| Diabéticos | | | 6,4855 | 0,61103 | 0,3568 | 2,5094 |
| Antigos | | | (p<0,025) | (p>0,25) | (p>0,5) | (p>0,1) |
| Controles | | | 1,1692 | 0,049513 | 0,9242 | 0,21471 |
| Antigos | | | (p>0,25) | (p>0,75) | (p>0,25) | (p>0,5) |

Tabela 4. Teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg para os seis SNPs nas duas amostras, com os diabéticos novos e antigos e controles novos e antigos agrupados.

| SNPs | rs1803274 | rs1126680 | rs7624915 | rs4387996 | rs4440084 | rs2863381 |
|------------|----------------------------|--------------------|---------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | $\chi^2_{(1)} (p)$ | $\chi^2_{(1)} (p)$ | $\chi^2_{(1)} (p)$ | $\chi^2_{(1)} (p)$ | $\chi^2_{(1)} (p)$ | $\chi^2_{(1)} (p)$ |
| Diabéticos | 0,273 (p>0,50) | 0,6596 (p>0,25) | 1,0464 (p>0,25) | 1,0397 (p>0,25) | 0,1244 (p>0,50) | 3,1635 (p>0,05) |
| Controles | 9,1564 (p<0,005) | 2,0525 (p>0,10) | 4,7816 (p<0,05) | 0,7572 (p>0,25) | 0,2386 (p>0,50) | 0,5312 (p>0,25) |

Foram comparadas as freqüências alélicas e genotípicas entre pacientes e controles através de teste de qui-quadrado utilizando o programa CLUMP (tabela 5 e 6), tanto na amostra nova, quanto na antiga. Foram comparadas também as freqüências alélicas e genotípicas para os pacientes novos e antigos agrupados e seus controles (tabela 7). Na amostra nova, os SNPs rs7624915 e rs4387996 apresentaram diferenças significativas nas freqüências genotípicas e alélicas e o SNP rs1803274, somente para freqüência genotípica. Na amostra antiga não houve nenhuma diferença significativa. Ao agrupar as amostras novas e antigas os SNPs rs1803274 e rs7624915 continuam apresentando uma diferença significativa nas freqüências genotípicas enquanto que para o SNP rs4387996, embora não apresente diferença significativa, é próxima dos 5%. Da mesma forma que nas amostras novas, as amostras agrupadas, apresentaram diferença significativa para os SNPs rs7624915 e rs4387996 nas freqüências alélicas. Para os SNPs rs7624915 e rs4387996 foram calculados os riscos relativos, tanto para alelos como para genótipos. Para o SNP rs7624915, a presença do alelo A atribui risco relativo de 1,27 (IC 1,02 – 1,57) e a presença do genótipo AA atribui um risco relativo de 2,32 (IC 1,25 – 4,31). Para o SNP rs4387996 a presença do alelo A atribui um risco relativo de 1,47 (IC 1,10 – 1,97) e a presença do genótipo AA + AG atribui um risco relativo de 1,41 (IC 1,10 – 1,81).

Tabela 5. Comparação das freqüências genóticas e alélicas dos seis SNPs estudados, através de teste de qui-quadrado entre a amostras nova de diabéticos e seus controles, bem como a comparação através do teste de *Odds Ratio*.

| SNP | $\chi^2_{(1)} (p)$ | | <i>Odds Ratio</i> (IC 95%*) |
|-----------|--------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| | Genótipos | Alelos | Alelos |
| rs1803274 | 4,29 (p<0,05) | 0,062 (p>0,10) | 1,01 (0,65 – 1,74) |
| rs1126680 | 1,21 (p>0,25) | 0,42 (p>0,10) | 1,27 (0,61 – 2,63) |
| rs7624915 | 7,93 (p<0,005) | 5,17 (p<0,025) | 1,58 (1,06 – 2,35) |
| rs4387996 | 7,92 (p<0,005) | 7,18 (p<0,01) | 1,79 (1,17 – 2,74) |
| rs4440084 | 1,1 (p>0,25) | 1,13 (p>0,25) | 1,24 (0,83 – 1,86) |
| rs2863381 | 0,25 (p>0,5) | 0,004 (p=0,95) | 0,98 (0,62 – 1,56) |

* IC = intervalo de confiança; Valores significativos em negrito

Tabela 6. Comparação das freqüências genóticas e alélicas dos quatro SNPs estudados, através de teste de qui-quadrado entre a amostras antiga de diabéticos e seus controles, bem como a comparação através do teste de *Odds Ratio*.

| SNP | $\chi^2_{(1)} (p)$ | | <i>Odds Ratio</i> (IC 95%*) |
|-----------|--------------------|------------------|-----------------------------|
| | Genótipos | Alelos | Alelos |
| rs7624915 | 1,59 (p>0,10) | 0,56 (p>0,25) | 1,20 (IC: 0,75 – 1,92) |
| rs4387996 | 0,63 (p>0,25) | 0,19 (p>0,50) | 1,12 (IC: 0,67 – 1,85) |
| rs4440084 | 0,07 (p>0,75) | 0,0004 (p=0,995) | 1,00 (IC: 0,61 – 1,62) |
| rs2863381 | 0,7 (p>0,25) | 0,11 (p>0,50) | 0,91 (IC: 0,53 – 1,56) |

* IC = intervalo de confiança; Valores significativos em negrito

Tabela 7. Comparação das freqüências genóticas e alélicas dos seis SNPs estudados, através de teste de qui-quadrado entre diabéticos com amostras novas e antigas agrupadas e seus controles agrupados, bem como a comparação através do teste de *Odds Ratio*.

| SNP | $\chi^2_{(1)} (p)$ | | <i>Odds Ratio</i> (IC 95%*) |
|-----------|--------------------------|-------------------------|-----------------------------|
| | Genótipos | Alelos | Alelos |
| rs1803274 | 6,41 (p<0,025) | 0,08 (p>0,75) | 1,06 (0,71 – 1,58) |
| rs1126680 | 2,00 (p>0,10) | 0,49 (p>0,25) | 1,21 (0,71 – 2,05) |
| rs7624915 | 4,89 (p<0,05) | 4,14 (p<0,05) | 1,38 (1,01 – 1,88) |
| rs4387996 | 3,59 (p>0,05) | 4,05 (p<0,05) | 1,40 (1,01 – 1,95) |
| rs4440084 | 0,88 (p>0,25) | 0,52 (p>0,25) | 1,12 (0,82 – 1,54) |
| rs2863381 | 0,39 (p>0,50) | 0,002 (p>0,95) | 0,99 (0,69 – 1,42) |

Freqüências haplotípicas

Com auxílio do programa Arlequin foram construídos os haplótipos usando 6 SNPs (Apêndice II). No entanto, na amostra de controles novos o SNP rs1803274 e o SNP rs7624915 na amostra de diabéticos antigos não estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg e por isso foram retirados para a construção dos haplótipos nesses grupos. Nas tabelas 8, 9, 10 e 11 estão os haplótipos com freqüência maior que 5% nas diferentes amostras.

Tabela 8. Haplótipos com freqüência maior que 5% na amostra dos Diabéticos Novos.

| N | Freqüência (%) | Haplótipos |
|----|----------------|-------------|
| 41 | 22,04 | G G C G G T |
| 27 | 14,52 | G G A A C T |
| 16 | 08,60 | G G A G C C |
| 14 | 07,53 | A G C G G T |
| 13 | 06,99 | G G A G G T |

A configuração do haplótipo é a seqüência de SNPs: rs1803274, rs1126680, rs7624915, rs4387996, rs4440084 e rs2863381.

Tabela 9. Haplótipos com freqüência maior do que 5% na amostra dos Controles Novos sem o SNP rs1803274 (*).

| N | Freqüência (%) | Haplótipos |
|----|----------------|-------------|
| 58 | 29 | * G C G G T |
| 26 | 13 | * G A G C T |
| 23 | 11,5 | * G A A G T |
| 14 | 07 | * G C G C T |
| 14 | 07 | * G C G G C |
| 11 | 05,5 | * G C G C C |
| 11 | 05,5 | * G A G C C |
| 11 | 05,5 | * G A A C C |
| 10 | 05 | * A C A G T |

A configuração do haplótipo é a seqüência de SNPs: rs1126680, rs7624915, rs4387996, rs4440084 e rs2863381.

Tabela 10. Haplótipos com frequência maior do que 5% na amostra dos Diabéticos Antigos sem o SNP rs7624915 (*).

| N | Frequência (%) | Haplótipos |
|----|----------------|-------------|
| 32 | 23,53 | G G * G G T |
| 22 | 16,18 | G G * G C T |
| 19 | 13,97 | G G * A G T |
| 16 | 11,76 | G G * G C C |
| 10 | 07,35 | G G * G G C |
| 8 | 05,88 | A G * G G T |
| 8 | 05,88 | A A * A G T |

A configuração do haplótipo é a seqüência de SNPs: rs1803274, rs1126680, rs4387996, rs4440084 e rs2863381.

Tabela 11. Haplótipos com frequência maior do que 5% na amostra dos Controles Antigos.

| N | Frequência (%) | Haplótipos |
|----|----------------|-------------|
| 16 | 17,39 | G G A A G T |
| 13 | 14,13 | G G C G G T |
| 9 | 09,78 | G G A G G T |
| 9 | 09,78 | G G C G C C |
| 8 | 08,70 | G G C G C T |
| 6 | 06,52 | A A C G G T |

A configuração do haplótipo é a seqüência de SNPs: rs1803274, rs1126680, rs7624915, rs4387996, rs4440084 e rs2863381.

Foram extraídas da tabela de haplótipos de Diabéticos Novos sem considerar o SNP rs1803274 aqueles haplótipos com frequência maior que 5%, as frequências foram comparadas com os mesmos haplótipos na amostra dos Controles Novos também sem considerar o SNP rs1803274, como pode ser visto na tabela 12. Foi averiguado com ajuda do programa CLUMP que um dos haplótipos está significativamente mais presente em uma das amostras. Foi feito a mesma comparação com as amostras antigas, na qual neste caso foi retirado o SNP rs7624915 da análise, como pode ser visto na tabela 13. Foi constatado um haplótipo com significância entre as duas amostras.

Tabela 12. Comparação entre haplótipos das amostras novas sem o SNP rs1803274 (*) com frequência para o DM1 \geq 5%.

| Haplótipos | DM1 (%) | CTRL (%) | $\chi^2_{(1)}$ (p) |
|-------------|---------|----------|--------------------------|
| * G C G G T | 27,96 | 29,00 | 0,051 (> 0,75) |
| * G A A C T | 15,05 | 1,00 | 26,55 (< 0,01) |
| * G A G G T | 8,06 | 4,50 | 2,10 (> 0,10) |
| * G A G C C | 8,06 | 5,50 | 1,01 (> 0,25) |
| * G A A G T | 5,91 | 11,50 | 3,74 (> 0,05) |

A configuração do haplótipo é a seqüência de SNPs: rs1126680, rs7624915, rs4387996, rs4440084 e rs2863381.

Tabela 13. Comparação entre Haplótipos das amostras antigas sem o SNP rs7624915 (*) com frequência para o DM1 \geq 5%.

| Haplótipos | DM1 (%) | CTRL (%) | $\chi^2_{(1)}$ (p) |
|-------------|---------|----------|--------------------------|
| G G * G G T | 23,53 | 22,82 | 0,02 (> 0,75) |
| G G * G C T | 16,18 | 9,78 | 1,91 (> 0,10) |
| G G * A G T | 13,97 | 21,74 | 2,34 (> 0,10) |
| G G * G C C | 11,76 | 11,96 | 0,002 (= 0,99) |
| G G * G G C | 07,35 | 3,26 | 1,71 (> 0,10) |
| A G * G G T | 05,88 | 4,35 | 0,26 (> 0,50) |
| A A * A G T | 05,88 | 0,00 | 5,61 (< 0,025) |

A configuração do haplótipo é a seqüência rs1803274, rs1126680, rs4387996, rs4440084 e rs2863381.

Desequilíbrio de ligação

Outra análise feita com o programa Arlequin foi o cálculo do desequilíbrio de ligação entre os SNPs. Com os dados colhidos pelo programa foram feitas as tabelas 14, 15, 16 e 17. Cada tabela referente a cada uma das amostras, sendo elas em seqüência: Diabéticos Novos, Controles Novos, Diabéticos Antigos e Controles Antigos. Devido à falta de equilíbrio de Hardy-Weinberg nas amostras do Controle Novo para o SNP rs1803274 e no Diabéticos Antigos para o SNP rs7624915, elas foram retiradas da análise.

Tabela 14. Tabela de desequilíbrio de ligação entre os seis SNPs estudados na amostra de Diabéticos Novos.

| SNP | rs1803274 | rs1126680 | rs7624915 | rs4387996 | rs4440084 | rs2863381 |
|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| rs1803274 | * | + | + | | | |
| rs1126680 | | * | | | + | |
| rs7624915 | | | * | + | + | |
| rs4387996 | | | | * | + | |
| rs4440084 | | | | | * | + |
| rs2863381 | | | | | | * |

Tabela 15. Tabela de desequilíbrio de Ligação entre cinco dos seis SNPs estudados na amostra de Controles Novos. O SNP rs1803274 (*) foi retirado da análise devido à não equilíbrio de Hardy-Weinberg na amostra.

| SNP | rs1803274 | rs1126680 | rs7624915 | rs4387996 | rs4440084 | rs2863381 |
|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| rs1803274 | * | * | * | * | * | * |
| rs1126680 | * | * | + | + | | |
| rs7624915 | * | | * | + | + | |
| rs4387996 | * | | | * | | |
| rs4440084 | * | | | | * | + |
| rs2863381 | * | | | | | * |

Tabela 16. Tabela de desequilíbrio de Ligação entre cinco dos seis SNPs estudados na amostra de Diabéticos Antigos. O SNP rs7624915 (*) foi retirado da análise devido à não equilíbrio de Hardy-Weinberg na amostra.

| SNP | rs1803274 | rs1126680 | rs7624915 | rs4387996 | rs4440084 | rs2863381 |
|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| rs1803274 | * | + | * | | | |
| rs1126680 | | * | * | | | |
| rs7624915 | * | * | * | * | * | * |
| rs4387996 | | | * | * | | |
| rs4440084 | | | * | | * | + |
| rs2863381 | | | * | | | * |

Tabela 17. Tabela de desequilíbrio de Ligação entre os seis SNPs estudados na amostra de Controles Antigos.

| SNP | rs1803274 | rs1126680 | rs7624915 | rs4387996 | rs4440084 | rs2863381 |
|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| rs1803274 | * | + | | | | |
| rs1126680 | | * | | | | |
| rs7624915 | | | * | | | |
| rs4387996 | | | | * | | |
| rs4440084 | | | | | * | |
| rs2863381 | | | | | | * |

Idade de aparecimento do DM1

A mediana da idade de aparecimento do DM1 foi de 15 anos, na amostra nova. Separando essa amostra pela mediana da idade de aparecimento (≤ 15 e >15), foram calculadas as freqüências alélicas nos dois grupos e feita comparação por qui-quadrado para os SNPs rs1803274, rs1126680, rs7624915 e rs4387996 e para nenhum dos casos a diferença foi significativa (tabela 18). Após o teste de homogeneidade não demonstrar significância entre as amostras novas e antigas, elas foram agrupadas, a nova mediana da idade de aparecimento do DM1 do grupo todo foi de 13 anos. Com a nova análise da freqüência alélica foi encontrada uma diferença significativa para o SNP rs7624915, na qual o alelo A aparece mais no grupo inferior à mediana da idade de aparecimento do DM1.

Tabela 18. Tabela de comparação das freqüências alélicas, para os SNPs rs1803274, rs1126680, rs7624915 e rs4387996, entre indivíduos da amostra nova dividindo-a em dois grupos, um abaixo da mediana da idade de aparecimento do DM1 (≤ 15 anos) e outro acima (>15 anos).

| SNP | alelo | Freqüência alélica (%) | | $\chi^2_{(1)}$; p |
|-----------|-------|------------------------|-------|--------------------|
| | | ≤ 15 | >15 | |
| rs1803274 | G | 85,11 | 76,04 | 2,49; $>0,10$ |
| | A | 14,89 | 23,96 | |
| rs1126680 | G | 94,00 | 91,67 | 0,40; $> 0,50$ |
| | A | 6,00 | 8,33 | |
| rs7624915 | A | 57,00 | 46,81 | 2,02; $>0,10$ |
| | C | 43,00 | 53,19 | |
| rs4387996 | A | 41,84 | 35,42 | 0,84; $>0,30$ |
| | G | 58,16 | 64,58 | |

Tabela 19. Tabela de comparação das freqüências alélicas, para os SNPs rs1803274, rs1126680, rs7624915 e rs4387996, entre indivíduos diabéticos (amostra nova mais a antiga) dividindo-a em dois grupos, um abaixo da mediana da idade de aparecimento do DM1 (≤ 13 anos) e outro acima (>13 anos).

| SNP | alelo | Freqüência alélica (%) | | $\chi^2_{(1)}$; p |
|-----------|-------|------------------------|-------|------------------------------------|
| | | ≤ 13 | >13 | |
| rs1803274 | G | 78,40 | 82,91 | 1,04; $>0,25$ |
| | A | 21,60 | 17,09 | |
| rs1126680 | G | 88,55 | 94,44 | 3,64; $> 0,05$ |
| | A | 11,45 | 5,56 | |
| rs7624915 | A | 54,82 | 43,67 | 4,03; $<0,05$ |
| | C | 45,18 | 56,33 | |
| rs4387996 | A | 37,35 | 34,81 | 0,23; $>0,50$ |
| | G | 62,65 | 65,19 | |

Análises complementares

Comparando-se a atividade média da BChE entre os diabéticos e controles novos, verificou-se que a atividade em DM1 ($4,27 \pm 1,24$) é significativamente maior ($t=3,64$; $p < 0,0004$) que nos controles ($3,61 \pm 1,28$).

Fazendo uma análise de correlação, verificou-se que há uma correlação positiva entre a atividade da BChE e a idade de aparecimento de DM1 (0,29). Também foi encontrada uma correlação positiva (0,39) entre o rs1126680 e a freqüência cardíaca em repouso e uma correlação negativa (- 0,23) entre o loco *CHE2* e a freqüência cardíaca em repouso.

Discussão

Freqüências genotípicas e alélicas

Os SNPs rs1803274 e o rs7624915 não estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg na amostra de controles novos e DM1 antigos, respectivamente. Os dados foram revisados para descartar problemas técnicos, portanto, deve ser um problema de amostragem, lembrando também que, principalmente no caso de DM1, não se trata de uma amostra populacional. Quando as amostras foram agrupadas (tabela

4), o SNP rs1803274 continuou fora do equilíbrio de Hardy-Weinberg nos controles, no entanto, o SNP rs7624915 ficou fora do equilíbrio na amostra controle, diferente de quando as amostras foram analisadas em separado (tabela 3).

Comparando as frequências alélicas e genotípicas entre diabéticos e controles (amostra nova; tabela 5), vemos que para o SNP rs1803274 houve uma diferença significativa apenas para a frequência genotípica, já no caso dos SNPs rs7624915 e rs4387996, tanto as frequências genotípicas e alélicas mostraram diferenças significativas. Para a amostra antiga (tabela 6) não houve nenhuma diferença significativa para nenhuma das frequências. Embora esse resultado mostre uma diferença entre essas duas amostras de DM1, o teste de homogeneidade não mostrou diferenças significativas, possibilitando agrupar as amostras. A análise conjunta (tabela 7) obteve quase os mesmos resultados, a única diferença foi a não significância na comparação genotípica do SNP rs4387996, mas que ficou próximo da significância.

Também comparamos diretamente as frequências genotípicas e alélicas entre as amostras novas e antigas para todos os SNPs (tabela 22). No caso dos SNPs rs1803274 e rs1126680, usamos os dados obtidos por estudos anteriores (tabela 20 e 21)

Tabela 20. Dados obtidos pelo estudo de Lepiensi e cols. (2006) das frequências genotípicas e alélicas para o SNP rs1803274.

| rs1803274 | N | Frequências Genotípicas | | | Frequências Alélicas | |
|--------------------|----|-------------------------|--------|--------|----------------------|-------------|
| | | GG (%) | GA (%) | AA (%) | G (%) | A(%) |
| Diabéticos antigos | 71 | 66,20 | 29,58 | 04,22 | 80,99± 3,29 | 19,01± 3,29 |
| Controles antigos | 47 | 61,70 | 38,30 | 00,00 | 80,85± 4,06 | 19,15± 4,06 |

Tabela 21. Dados obtidos pelo estudo de Oliveira (2006) das frequências genotípicas e alélicas para o SNP rs1126680.

| rs1126680 | N | Frequências Genotípicas | | | Frequências Alélicas | |
|--------------------|----|-------------------------|--------|--------|----------------------|------------|
| | | GG (%) | GA (%) | AA (%) | G(%) | A(%) |
| Diabéticos antigos | 71 | 78,87 | 19,72 | 01,4 | 88,73±2,65 | 11,27±2,65 |
| Controles antigos | 69 | 78,26 | 21,74 | 00,00 | 89,13±2,65 | 10,87±2,65 |

Tabela 22. Comparações entre as freqüências genótípicas e alélicas dos seis SNPs entre DM1 novo e antigo e controles novos e antigos.

| | Genótipos $\chi^2_{(1)}$; p | Alelos $\chi^2_{(1)}$; p |
|--|---------------------------------|------------------------------|
| DM1 novo x DM1 antigo | | |
| rs1803274 | 0,04; > 0,75 | 0,02; > 0,75 |
| rs1126680 | 1,92; > 0,10 | 1,81; > 0,10 |
| rs7624915 | 4,71; < 0,05 | 0,84; > 0,25 |
| rs4387996 | 4,25; < 0,05 | 1,04; > 0,25 |
| rs4440084 | 2,02; > 0,10 | 1,65; > 0,10 |
| rs2863381 | 0,20; > 0,50 | 0,10; > 0,75 |
| Controles novos x controles antigos | | |
| rs1803274 | 0,11; > 0,50 | 0,08; > 0,75 |
| rs1126680 | 0,44; > 0,50 | 0,40; > 0,50 |
| rs7624915 | 0,27; > 0,50 | 0,11; > 0,50 |
| rs4387996 | 0,95; > 0,25 | 0,90; > 0,25 |
| rs4440084 | 0,48; > 0,25 | 0,004; = 0,95 |
| rs2863381 | 0,30; > 0,50 | 0,39; > 0,50 |

Na comparação entre os controles novos e antigos não houve nenhuma diferença significativa, tanto para genótipos, quanto para alelos, mostrando uma homogeneidade entre essas duas amostras, já na comparação entre os DM1 novos e antigos houve diferença significativa somente para os genótipos dos SNPs rs7624915 e rs4387996, que são justamente os SNPs que apresentaram diferença significativa entre DM1 e controles da amostra nova.

Também foi feita uma comparação entre freqüências genótípicas e alélicas dos seis SNPs estudados dos controles novos com freqüências populacionais obtidas do NCBI (Apêndice II; tabela 23).

Tabela 23. Comparação entre freqüências genotípicas e alélicas dos seis SNPs estudados dos controles novos com freqüências populacionais obtidas do NCBI.

| | | Genótipos $\chi^2_{(1)}$; p | Alelos $\chi^2_{(1)}$; p |
|--|-----------------|---------------------------------|------------------------------|
| Controles novos x freqüências populacionais | | | |
| rs1803274 | CEU (Euro) | 1,69; > 0,10 | 0,38; > 0,50 |
| | HCB (China) | 2,26; > 0,10 | 0,0034; > 0,99 |
| | JPT (Japones) | 7,03; < 0,005 | 0,000934; > 0,99 |
| | YRI (Africa SS) | 0,84; > 0,25 | 0,65; > 0,25 |
| rs1126680 | CEU (Euro) | 2,77; > 0,05 | 1,00; > 0,75 |
| | Global | 2,26; > 0,10 | 2,06; > 0,10 |
| rs7624915 | CEU (Euro) | 3,27; > 0,05 | 1,74; > 0,10 |
| | HCB (China) | 3,70; > 0,05 | 2,56; > 0,10 |
| | JPT (Japones) | 9,53; < 0,005 | 0,053; > 0,75 |
| | YRI (Africa SS) | 66,27; < 0,001 | 59,16; < 0,001 |
| rs4387996 | CEU (Euro) | 1,15; > 0,25 | 0,19; > 0,50 |
| | HCB (China) | 15,80; < 0,001 | 16,06; < 0,001 |
| | JPT (Japones) | 5,98; < 0,025 | 7,63; < 0,01 |
| | YRI (Africa SS) | 6,49; < 0,025 | 7,19; < 0,01 |
| rs4440084 | CEU (Euro) | 6,00; < 0,025 | 6,15; < 0,025 |
| | HCB (China) | 3,38; > 0,05 | 4,00; < 0,05 |
| | JPT (Japones) | 2,64; > 0,10 | 3,94; < 0,05 |
| | YRI (Africa SS) | 57,13; < 0,001 | 70,98; < 0,001 |
| rs2863381 | CEU (Euro) | 7,76; < 0,01 | 12,93; < 0,001 |
| | HCB (China) | 20,70; < 0,001 | 31,27; < 0,001 |
| | JPT (Japones) | 11,90; < 0,001 | 16,45; < 0,001 |
| | YRI (Africa SS) | 30,64; < 0,001 | 30,68; < 0,001 |

Fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>

CEU = Residentes de Utah (EUA) com descendência européia do norte e oeste.

HCB = Chineses da Etnia Han

JPT = Japoneses da cidade de Tokyo

YRI = Nigerianos da etnia Yoruba coletados na cidade de Ibadan

Como vemos na tabela 23, o SNP rs2863381 teve diferenças significativas nas freqüências genotípicas e alélicas na comparação com todas as populações. As freqüências alélicas do SNP rs4440084 também foram diferentes de todas as 4 populações. Já para o SNP rs4387996, não houve diferenças significativas apenas para a população de origem européia.

Também foram comparadas as freqüências genotípicas e alélicas de cinco SNPs dos controles novos com freqüências dos controles utilizados por GOMES (2010), que utilizou a mesma metodologia de genotipagem, bem como os mesmos reagentes e equipamentos, sendo que esses controles eram, assim como os nossos controles, da região metropolitana de Curitiba, PR. Apenas a freqüência alélica do

SNP rs1803274 e as freqüências alélicas e genotípicas do SNP rs4387996 foram significativamente diferentes (tabela 24).

Tabela 24. Comparação entre freqüências genotípicas e alélicas de cinco SNPs dos controles novos com freqüências dos controles utilizados por GOMES (2010).

| SNPs | Genótipos | Alelos |
|-----------|-------------------------|--------------------------|
| | $\chi^2_{(1)}; p$ | $\chi^2_{(1)}; p$ |
| rs1803274 | 3,72; > 0,05 | 12,43; < 0,001 |
| rs1126680 | 1,64; > 0,10 | 0,37; > 0,50 |
| rs4387996 | 6,09; < 0,025 | 8,39; < 0,005 |
| rs4440084 | 0,78; > 0,75 | 0,33; > 0,50 |
| rs2863381 | 4,88; < 0,05 | 3,17; > 0,05 |

Freqüências haplotípicas

Comparando os haplótipos mais freqüentes entre pacientes e controles, vemos que, tanto na amostra nova como na antiga, apenas um haplótipo difere significativamente nos dois grupos (tabela 12 e 13), no entanto, não é o mesmo haplótipo que difere nas duas amostras. Apesar de na amostra nova não termos a informação do SNP rs1803274 e na amostra antiga não temos a informação do SNP rs 7624915, podemos ver o haplótipo que difere na amostra nova não está presente entre os mais freqüentes da amostra antiga, assim como o que difere da amostra antiga não está presente nos mais freqüentes da amostra nova.

No caso da amostra nova (tabela 12), o haplótipo que mostrou diferença significativa (GAACT) apareceu em 15% dos DM1 e apenas 1% nos controles. O primeiro nucleotídeo deste haplótipo se refere ao SNP rs (dentro do gene *BCHE*) e não muda nesses haplótipos mais freqüentes, reforçando a idéia que a associação está relacionada aos SNPs em torno do gene.

Desequilíbrio de ligação

Nas amostras novas, em comum, há desequilíbrio de ligação entre o SNP rs7624915 com o rs4387996 e o rs4440084. As três primeiras amostras apresentam desequilíbrio de ligação entre os SNPs rs4440084 e rs2863381. Devido à retirada do SNP rs1803274 da análise na segunda amostra, esta amostra foi a única a não demonstrar desequilíbrio de ligação entre os SNPs rs1803274 e rs1126680, que é

um desequilíbrio já relatado anteriormente. A variante *G-116A* (rs1126680) ocorre no éxon 1, e apresenta desequilíbrio de ligação com a variante *A539T* (rs1803274), ocorrendo em mais de 90% dos casos em cromossomo que também apresenta a variante *A539T* (FURTADO, 2005).

Idade de aparecimento do DM1

A mediana da idade de aparecimento do DM1 na amostra nova foi de 15 anos e separando a amostra em dois grupos, divididos por essa mediana, não houve nenhuma diferença significativa entre as freqüências dos SNPs estudados nos dois grupos (tabela 18), diferindo do resultado obtido em estudos anteriores (Lepiensi e cols., 2006, Oliveira, 2006) com amostra antiga, na qual a mediana da idade de aparecimento do DM1 foi de 12 anos e a freqüência dos SNPs rs 18003274 (*A539T*) e rs1126680 (*-116G>A*) foi maior nos diabéticos do que nos controles. Quando as amostras foram agrupadas (tabela 19), a mediana da idade de aparecimento do DM1 foi de 13 anos e refazendo a análise foi constatada uma significância para o SNP rs7624915, onde o alelo A está mais freqüente no grupo com idade de aparecimento de DM1 ≤ 13 anos. Houve uma diferença próxima da significância para o SNP rs1126680.

Análises complementares

Foi encontrada uma atividade média da BChE maior em DM1 que nos controles, sendo que esse dado já foi relatado anteriormente (ANTOPOL e cols., 1937). Também encontrada correlação positiva entre a atividade média da BChE e a idade de aparecimento de DM1. Além disso também foi obtida uma correlação entre freqüência cardíaca em repouso com o SNP rs1126680 (positiva) e com loco CHE2 (negativa). Essa duas correlações estão no mesmo sentido uma vez que o alelo A do SNP rs1126680 diminui a atividade da BChE e o fenótipo CHE2 C5+ aumenta a atividade da BChE, indicando que o diminuição da atividade da BChE está correlacionado com o aumenta da freqüência cardíaca em repouso, embora não tenha tido uma correlação significativa diretamente com a atividade da BChE.

Conclusões finais

Considerando que não encontramos uma associação entre os SNPs estudados com a idade de aparecimento do DM1 com as amostras em separado mas uma associação (rs7624915) com as amostras agrupadas, além de constatar uma associação de DM1 com dois dos SPNs estudados (rs7624915 e rs4387996), sendo que ambos estão localizados a jusante do gene *BCHE* e com um dos haplótipos. Investigando outros genes que estão a jusante do gene *BCHE*, verificamos a existência do gene *SI* (sucrase-isomaltase), que tem como função metabolizar dissacarídeos no intestino (SANDERI e cols., 2005) e a inibição dessa enzima tem um efeito protetor a diabete (OLSEN e cols, 1977). Portanto, é possível que o gene *BCHE* não esteja diretamente relacionado ao DM1, e sim um gene próximo a jusante, sendo o gene *SI* um bom candidato para ser averiguado.

Referências

ARPAGAUS, 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.

FURTADO, L. Variabilidade genética da butirilcolinesterase e obesidade. Curitiba, 2005. 192 f. Tese (Doutorado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

LAHIRI, D.K.; NURNBERGER Jr, J.I. A rapid nonenzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Research*, Oxon. v. 19, p. 5444, 1991.

LEPIENSKI, L.M.; SOUZA,R.L.R.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.; ALCÂNTARA, V.M.; RÉA, R. Variant K of butyrylcholinesterase and risk of early-onset type 1 diabetes mellitus in Euro-Brazilians. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, doi: 10.1111/j.1463-1326.2005.00559.x, 2006.

OLIVEIRA, L.C. Investigação de associação das variantes do nucleotídeo -116 do gene BCHE da butirilcolinesterase em diabetes mellito 1.. Curitiba, 2006. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

OLSEN, W. A.; KORSMO, H. The Intestinal Brush Border Membrane in Diabetes Studies of Sucrase-isomaltase Metabolism in rats with Streptozotocin diabetes. J Clin Invest. V. 60(1): 181–188, 1977.

SANDERI, P.; ALFALAH, M.; KEISER, M.; KORPONAY-SZABO, I.; KOVACS, J. B.; LEEBI, T.; NAIM, H.Y. Novel Mutations in the Human Sucrase-Isomaltase Gene (*SI*) That Cause Congenital Carbohydrate Malabsorption. Human Mutation. Mutation in Brief #863 Online, 2005.

SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D. e EXCOFFIER, L. Arlequin ver. 2.000: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland, 2000.

SHAM, P. C., AND CURTIS, D. Monte Carlo tests for associations between disease and alleles at highly polymorphic loci. Annals Hum Genetics, v. 59, p.97-105, 1995.

SLATKIN, M.; EXCOFFIER L. Testing for linkage disequilibrium in genotypic data using the Expectation-Maximization algorithm. Heredity. v. 4, p.377-383, 1996.

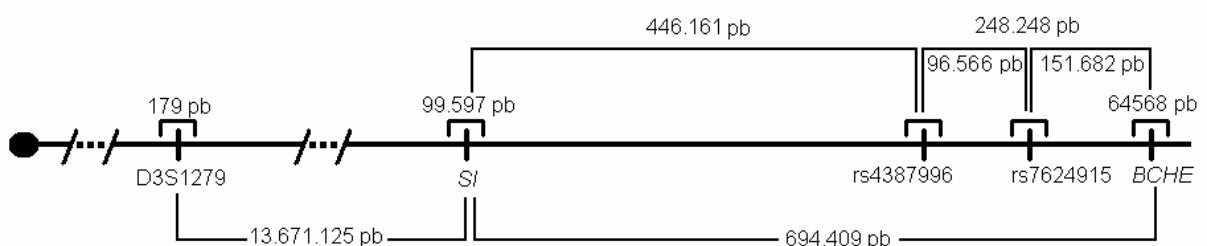
SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diagnóstico e Classificação do Diabetes Mellito e Tratamento do Diabetes Mellito do Tipo 2. Disponível em: <<http://www.diabetes.org.br/> 2003.

SOREQ, H.; ZAMIR, R.; ZEVIN-SONKIN, D.;ZAKUT, H. Human cholinesterase genes localized by hibridization to chromosome 3 and 16. Hum. Genet., v. 77, p. 325 - 328, 1987.WOOLF B. On estimating the relationbetween blood group and disease. Ann. Hum.Genet. v.19, p. 251-253, 1955.

4. Discussão Geral

O trabalho inicial que deu origem ao presente estudo, mostrou associação entre a mutação K (rs1803274) da *BCHE* e DM2 (HASHIM e cols.; 2001). Lepienski e cols. (2006) estudou uma amostra de DM1 e DM2 e encontrou apenas uma diferença de frequência da mutação K nos grupos de idade precoce e tardia de aparecimento do DM1 e Oliveira (2006) mostrou que essa associação da idade de aparecimento de DM1 estava correlacionada com a mutação -116 (rs1126680). No entanto, no presente estudo não foi encontrada esta associação, embora fosse encontrada uma associação com outro SNP estudado (rs7624915) com a idade de aparecimento do DM1, além disso, foi constatada uma associação de DM1 com dois dos SNPs estudados (rs7624915 e rs4387996), sendo que ambos estão localizados a jusante do gene *BCHE* (figura 2) e com um dos haplótipos formado por cinco dos SNPs estudados. O microssatélite D3S1279 (MEIN et al.; 1998) indicou que essa região do braço longo do cromossomo 3 está associada com diabetes. Esse microssatélite está localizado a cerca de 13Mb a jusante do gene *BCHE*. Próximo ao gene *BCHE* (~700Kb; figura 2) verificamos a existência do gene *SI* (sucrase-isomaltase), que tem como função metabolizar dissacarídeos no intestino (SANDERI e cols., 2005) e a inibição dessa enzima tem um efeito protetor a diabetes (OLSEN e cols., 1977). Portanto, é possível que o gene *BCHE* não esteja diretamente relacionado ao DM1, e sim um gene próximo a jusante, sendo o gene *SI* um bom candidato para ser averiguado.

Fig. 2. Localização cromossômica dos genes *BCHE* e *SI*; dos SNPs rs7624915 e rs4387996; em relação ao microssatélite D3S1279. A região centromérica está representada à esquerda e a região telomérica à direita.



Referências

ABBOTT, C.A.; MACKNESS, M.I.; KUMAR, S.; OLUKOGA, O.A.; GORDON, C.; ARROL, S. Relationship between serum butyrylcholinesterase activity, hypertriglyceridemia in insulin sensitivity in diabetes. *Clin. Sci.*, v. 85, p. 77-81, 1993.

AKIZUKI, S.; OHNISHI, A.; KOTANI, K. E SUDO, K. Genetic and immunological analyses of patients with increased serum butyrylcholinesterase activity and its c5 variant form. *Clin. Chem. lab. med.*, v. 42, p. 991-996, 2004.

ALCÂNTARA, V. M., OLIVEIRA, L. C., RÉA, R. R., SUPLICY, H. L. AND CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A. Butyrylcholinesterase and obesity in individuals with the CHE2 C5+ and CHE2 C5- phenotypes. *International Journal of Obesity*, v.27, p.1557-1564, 2003.

ALIZADEH, B.Z., KOELEMAN, B.P.C, Genetic polymorphisms in susceptibility to Type 1 Diabetes. *Clinica Chimica Acta* v.387, p.9-17, 2008.

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.

ANAYA, J.M., CASTIBLANCO, J., TOBON, G.J., et al. Familial clustering of autoimmune diseases in patients with type 1 diabetes mellitus. *JAutoimmun.* v.26, p.208–14, 2006.

ANNAPURNA, V.; SENCIALI, I.; DAVIS, A.J.; KUTTY, K.M. Relationship between pseudocholinesterase in experimentally induced diabetes in rats. *Diabetologia*, v. 34, p. 320-324, 1991.

ANTOPOL, W.; TUCHMAN, L.; SCHIFRIN, A. Cholinesterase activity of human sera with special reference to hyperthyroidism. *Proc. Soc. Exp.Biol. Med.*, v. 36, p. 4650, 1937.

ARPAGAUS, 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.

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.; 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. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 50, p. 1086-103, 1992.

BOOPATHY, R. e LAYER, P.G. Aryl acylamidase activity on acetylcholinesterase is high during early chicken brain development. *Protein J.*, v. 23, p. 325-333, 2004.

CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.; PRIMO-PARMO, S.L.; PICHETH, G.; LOURENÇO, M.A.C.; VIEIRA, M.M. The C5 isozyme of serum cholinesterase and adult weight. *Hum. Hered.*, v. 41, p. 330-339, 1991.

CHISHOLM, D.J. Medical Problems in sport – Diabetes Mellitus. In: Sherry E, Wilson SF, editors. *Oxford handbook of sports medicine*. 1st ed. Oxford (NY): Oxford University Press, 1998.

CLARK, A.; CULL, C.A. Butyrylcholinesterase K variant on chromosome 3 q is associated with Type II diabetes in white Caucasian subjects. *Diabetologia*, v. 44, p. 2227-2230, 2001.

CONCANNON, P.; GOGOLIN-EWENS, K.J.; HINDS, D.A.; WAPELSHORST, B.; MORRISON V.A.; STIRLING, B.; MITRA, M.; FARMER, J.; WILLIAMS, S.R.; COX, N.J.; BELL, G.I.; RISCH, N.; SPIELMAN, R.S. A second-generation screen of the

human genome for susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature Genetics*, v. 19, p. 292-296, 1998.

CUDWORTH, A.G., WOODROW, J.C. HL-A system and diabetes mellitus. *Diabetes*. v.24 p.345–9, 1975.

DAHL-JORGENSEN, K., JONER, G., HANSSSEN, K.F. Relationship between cows' milk consumption and incidence of IDDM in childhood. *Diabetes Care*.v.14, p.1081–3, 1991.

DANTAS, V.G.L. Estudo de associação de variações dos genes *BCHE* (Butirilcolinesterase) e *GHRL* (Grelina) com obesidade. Curitiba, 2008. Dissertação (Mestre em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

FADEL-PICHETH, C. Variabilidade do loco *BCHE* da butirilcolinesterase e peso do adulto em amostra de Curitiba. Curitiba, 1991. Tese de Mestrado. Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná.

FLOREZ, J.C.; HIRSCHHORN, J.; ALTSCHULER, D. The inherited basis of diabetes mellitus: implications for the genetic analysis of complex traits. *Annu. Rev. Genomics Hum Genet.*, v. 4, p. 257-291, 2003.

FURTADO, L. Variabilidade genética da butirilcolinesterase e obesidade. Curitiba, 2005. 192 f. Tese (Doutorado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

GAFFNEY, D. e CAMPBELL, R.A. A PCR method to determine the Kallow allele frequency and its significance in the normal population. *J. Med. Genet.*, v. 31, p. 248-50, 1994.

GEORGE, S.T. e BALASUBRAMANIAN, A. The aryl acylamidase and their relationship to cholinesterase in human serum, erythrocyte and liver. *Eur. J. Biochem.*, v. 121, p. 177-186, 1981.

GEORGE, K.M.; MONTGOMERY, M.A.; SANDOVAL, L.E. e THOMPSON, C.M. Examination of cross-antigenicity of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase using anti-acetylcholinesterase antibodies. *Toxicol. Lett.*, v. 126, p. 99-105, 2001.

GORLIN, R.J.; OLD, T.; ANDERSON, V.E. Hypohidrotic ectodermal dysplasia in females. A critical analysis and argument for genetic heterogeneity. *Zeitschrift fuer. Kinderheilkunde, Berlin*, v. 108, p. 1-11, 1970.

HARRIS, H.; ROBSON, E.B.; HOPKINSON, D.A. e WHITTAKER, M. Genetical studies on a new variant of serum pseudo-cholinesterase detected by electrophoresis. *Ann. Hum. Genet.*, v. 26, p. 359-82, 1963a.

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. 1185-87, 1963b.

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

HASHIM, Y.; SHEPHERD, D.; WILTSHIRE, S.; HOLMAN, R.R.; LEVY, J.C.;

HYTTINEN, V., KAPRIO, J., KINNUNEN, L., KOSKENVUO, M., TUOMILEHTO, J. Genetic liability of type 1 diabetes and the onset age among 22,650 young Finnish twin pairs: a nationwide follow-up study. *Diabetes*. v.52, p.1052–5, 2003.

IZUMI, M.; MAEKAWA, M. e KANNO, T. Butyrylcholinesterase K-variant in Japan: Frequency of allele and associated enzyme activity in serum. *Clin. Chem.*, v. 40, p. 1606-7, 1994.

JAGANATHAN, L. e BOOPATHY, R. A direct method to visualize the aryl acylamidase activity on cholinesterases in polyacrylamide gels. *BMC Biochemistry*, v. 1, p. 3, 2000.

JAYANTHI, L. D.; BALASUBRAMANIAN, N.; e BALASUBRAMANIAN, A.S. Cholinesterases exhibiting aryl acylamidase activity in human amniotic fluid. *Clin. Chim. Acta*, v. 205, p. 157-166, 1992.

JENSEN, F.S.; NIELSEN, L.R. e SCHWARTZ, M. Detection of plasma cholinesterase K-variant by PCR using an amplification created restriction site. *Hum. Hered.*, v. 46, p. 26-31, 1996.

JOHNSON, G. e MOORE, S.W. Cholinesterases modulate cell adhesion in human neuroblastoma cells in vitro. *Int. J. Dev. Neurosci.*, v. 18, p. 781–790, 2000.

KALOW, W. e GENEST, K. A method for the detection of atypical forms of human serum cholinesterase. Determination of dibucaine numbers. *Canad. J. Biochem. Physiol.*, v. 35, p. 339-346, 1957.

KARVONEN, M., VIIK-KAJANDER, M., MOLTCHANOVA, E., LIBMAN, I., LaPORTE, R., TUOMILEHTO, J. Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide. Diabetes Mondiale (DiaMond) Project Group. *Diabetes Care*. v.23, p.1516–26, 2000.

KNIP, M.; SILJANDER, H. Autoimmune mechanisms in type 1 diabetes. *Autoimmunity Reviews* v.7, p.550–557, 2008.

KUTTY, K.M. Biological function of cholinesterase. *Clin. Biochem.*, v. 13, p. 239-43, 1980.

KYVIK, K.O., GREEN A., BECK-NIELSEN, H. Concordance rates of insulin dependent diabetes mellitus: a population based study of young Danish twins. *Bmj*. v.311, p.913–7, 1995.

LAHIRI, D.K.; NURNBERGER Jr, J.I. A rapid nonenzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Research*, Oxon, v. 19, p. 5444, 1991.

LAINE, A.P.; NEJENTESEV, S.; VEIJOLA R. A linkage study of 12 IDDM susceptibility loci in the Finnish population. *Diabetes Metab Res Ver*, v. 20, p. 144-149, 2004.

LAPIDOT-LIFSON, Y.; PRODY, C.A.; GINZBERG, D.; MEYTES, D.; ZAKUT, H. e SOREQ, H. Co-amplification of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase genes in blood cells: correlation with various leukemias and abnormal megakaryocytopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 86, p. 4715-4717, 1989.

LAYER, P.G. e SPORNS, O. Spatiotemporal relationship of embryonic cholinesterases with cell proliferation in chicken brain and eye. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 84, p. 284-288, 1987.

LAYER, P.G. Cholinesterases preceding major tracts in vertebrate neurogenesis. *Bioessays*, v. 12, n. 9, p. 415-420, 1990.

LAYER, P.G.; WEILCER, T.; e WILLBOLD, E. Chicken retinospheroids as developmental and pharmacological in vitro models: acetylcholinesterase is regulated by its own and by butyrylcholinesterase activity. *Cell Tissue Res.*, v. 268, p. 409-418, 1992.

LEVY-MARCHAL, C., PATTERSON, C.C., GREEN, A. Geographical variation of presentation at diagnosis of type I diabetes in children: the EURODIAB study. *European and Diabetes. Diabetologia*. v.44, p.75–80, 2001.

LOCKRIDGE, O.; ECKERSON, H.W.; LA DU, B.N. Interchain disulfide bonds and subunit organization in human serum cholinesterase. *J. Biol. Chem.*, Bethesda, v. 254, p. 8324-30, 1979.

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, 1987.

LEPIENSKI, LM. Variante K da Butirilcolinesterase e Diabetes Mellitus. Curitiba 2004. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

LEPIENSKI, L.M.; SOUZA, R.L.R.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.; ALCÂNTARA, V.M.; RÉA, R. Variant K of butyrylcholinesterase and risk of early-onset type 1 diabetes mellitus in Euro-Brazilians. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, doi: 10.1111/j.1463-1326.2005.00559.x, 2006.

MARCHETTI, P., DOTTA, F., ZHONG, L., LUPI, R., DEL GGUERRA, S., SANTANGELO, C., et al. The function of pancreatic islets isolated from type 1 diabetic patient. *Diabetes Care*. v.23, p.701-3, 2000.

MASSON, P. A naturally occurring molecular form of human plasma cholinesterase is an albumin conjugate. *Biochim. Biophys. Acta.*, Amsterdam, v. 988, p. 258-66, 1989.

MASSON, P. Molecular heterogeneity of human plasma cholinesterase. In: MASSOULIÉ, J. et al. *Cholinesterases: Structure, Function, Mechanisms, Genetics and Cell Biology*. Washington: American Chemical Society, 1991. p. 42-45.

MEIN, C.A.; ESPOSITO, L.; DUNN M.G.; JOHNSON, G.C.L.; TIMMS, A.E.; GOY, J.V.; SMITH, A.N.; SEBAG-MONTEFIORE, L.; MERRIMAN, M.E.; WILSON, A.J.; PRITCHARD, L.E.; CUCCA, F.; BARNETT, A.H.; BAIN, S.C.; TODD, J.A. A search for type 1 diabetes susceptibility genes in families from the United Kingdom. *Nature Genetics*, v. 19, p. 297-300, 1998.

MERRIMAN, T. R. Type 1 diabetes, the A1 milk hypothesis and vitamin D deficiency. *Diabetes research and clinical practice* v.83, p.149 – 156, 2009.

MIKAMI, L.R. Variabilidade dos exons 2 e 4 do gene BCHE e sua relação com atividade da butirilcolinesterase. Curitiba, 2005. 180f. Tese (Doutorado em Genética)- Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

NEI M.; GOJOBORIT, T. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol. Biol. Evol.*, v.3, p.418-426, 1986.

NERUP, J., PLATZ, P., ANDERSON, O.O., et al. HL-A antigens and diabetes mellitus. *Lancet*. v.2 p.864–6, 1974. (NERUP, et. al. 1974)

NICOLET, Y.; LOCKRIDGE, O.; MASSON, P. e FONTECILLA-CAMPS, J.C. Crystal structure of butyrylcholinesterase and of its complexes with substrates and products. *J. Biol. Chem.*, v. 278, p. 41141-41147, 2003.

NISTOR, T.; CUCUIANU, M.; HANCU, N.; ORBAI, P. Serum cholinesterase activity correlated with serum insulin and C-peptide levels. *Fiziologia*, v. 8, p. 2-5, 1998.

NOSIKOV, V.V. Genomics of type 1 diabetes mellitus and its late complications. *Molecular Biology*, v. 38, p. 128-139, 2004.

OLIVEIRA, L.C. Investigação de associação das variantes do nucleotídeo -116 do gene BCHE da butirilcolinesterase em diabete mellito 1.. Curitiba, 2006. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

OLSEN, W. A.; KORSMO, H. The Intestinal Brush Border Membrane in Diabetes Studies of Sucrase-isomaltase Metabolism in rats with Streptozotocin diabetes. *J Clin Invest*. V. 60(1): 181–188, 1977.

ORESKOVIC, K. e KUNEC-VAJIC, E. Pseudocholinesterase in alloxan-diabetic rats. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, V. 78, P. 117-120, 1992.

PALMER, J.P., FLEMING, G.A., GREENBAUM, C.J., HEROLD, K.C., JANSÁ, L.D., KOLB, H., et al. C-peptide is the appropriate outcome measure for type1 diabetes clinical trials to preserve beta cell function – ADA Workshop Report. *Diabetes*. v.53, p.250-64, 2004.

PARMO-FOLLONI, F. Estudos sobre a mutação IVS3-14T>C do gene BCHE. Curitiba, 2005. 25f. Monografia (Bacharel em Biologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

PATINKIN, D.; SEIDMAN, S.; ECKSTEIN, F.; BENSELER, F.; ZAKUT, H. e SOREQ, H. Manipulations of cholinesterase gene expression modulates murine megakaryocytopoiesis in vitro. *Mol. Cell. Biol.*, v. 10, p. 6046-6050, 1990.

PAVKOVIC E.; SIMON, V.; REINER, E.; SUCIC, M.; LIPOVAC, V. Serum Paraoxonase and cholinesterase activities in individuals with lipid and glucose Metabolism disorders. *Chem. Biol. Interact*, v.87, p. 179-182, 1993.

POPOVIC, L.; ORESKOVIC, K.; ZUPANCIC, B.; PETRUNIC, M. e KUNEC-VAJIC, E. The relation between plasma lipid levels and pseudocholinesterase activity in hypothyroidism. *Metab. Res.*, v. 3, p. 137-140, 1998.

PRIMO-PARMO, S.L.; BARTELS, C.F.; WIERSEMA, B.; VAN DER SPEK, A.F.L.; INNIS, J.W.; LA DU, B.N. Characterisation of 12 silent alleles of the human butyrylcholinesterase (*BCHE*) gene. *Am. J. Genet.*, v. 58, p. 52-64, 1996.

RANDELL, E.W.; VARGHESE, A.; KUTTY, K.M. Plasma cholinesterase levels are related to triglyceride levels in diabetic and obese children. *Clin. Chem.*, v. 42, p. S299, 1996.

ROBINSON, A.R.; ROBSON, M.; HARRISON, A.P.; ZUELZER, W.W. A new technique for differentiation of hemoglobin. *J. Lab. Clin. Med.*, v. 50, p. 745-52, 1957.

ROBITZKI, A.; MACK, A.; HOPPE, U.; CHATONNET, A. e LAYER, P.G. Butyrylcholinesterase antisense transfection increases apoptosis in differentiating retinal reagggregates of the chick embryo. *J. Neurochem.*, v. 71, p. 413-420, 1998.

RUBINSTEIN, H.M.; DIETZ, A.A. e LUBRANO, T. E1K, another quantitative variant at cholinesterase locus1. *J. Med. Genet.*, v. 15, p. 27-29, 1978.

SANDERI, P.; ALFALAH, M.; KEISER, M.; KORPONAY-SZABO, I.; KOVACS, J. B.; LEEBI, T.; NAIM, H.Y. Novel Mutations in the Human Sucrase-Isomaltase Gene (*SI*) That Cause Congenital Carbohydrate Malabsorption. *Human Mutation. Mutation in Brief #863 Online*, 2005.

SAVILAHTI, E., SAUKKONEN, T.T., VIRTALA, E.T., TUOMILEHTO, J., AKERBLOM, H.K. Increased levels of cow's milk and beta-lactoglobulin antibodies in young children with newly diagnosed IDDM. The Childhood Diabetes in Finland Study Group. *Diabetes Care*. v.16, p.984–9, 1993.

SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D. e EXCOFFIER, L. Arlequin ver. 2.000: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland, 2000.

SCHUMACHER, M.; CAMP, S.; MAULET, V.; NEWTON, M.; MACPHEE-QUIGLEY, K.; TAYLOR, S.S.; FRIEDMANN, T., e TAYLOR, P. Primary structure of Torpedo Californica acetylcholinesterase deduced from its cDNA sequence. *Nature (London)*, v. 319, p. 407-409, 1986.

SCREENAN, S., PICK, A.J., LEVISETTIM, BALDWIN, A.C., PUGH, W., POLONSKY, K.S. Increased beta-cell proliferation and reduced mass before diabetes onset in the nonobese diabetic mouse. *Diabetes*. v.48, p.989-96, 1998.

SHERRY, N.A., TSAI, E.B., PALMER, J.P., HEROLD, K.C. Natural history of beta cell function in type 1 diabetes. *Diabetes*. v.54:Suppl 2:S32-9, 2005.

SLATKIN, M.; EXCOFFIER L. Testing for linkage disequilibrium in genotypic data using the Expectation-Maximization algorithm. *Heredity*. v. 4, p.377-383, 1996

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diagnóstico e Classificação do Diabetes Mellito e Tratamento do Diabetes Mellito do Tipo 2. Disponível em: <<http://www.diabetes.org.br/> 2003.

SOREQ, H.; ZAKUT, H. Human cholinesterases and anticholinesterases. New York, Academic Press,. 1993.

SOREQ, H.; ZAMIR, R.; ZEVIN-SONKIN, D.; ZAKUT, H. Human cholinesterase genes localized by hibridization to chromosome 3 and 16. Hum. Genet., v. 77, p. 325 - 328, 1987.

SOUZA, R.L.R. Estudos sobre nova banda da butirilcolinesterase humana (C4/5) verificada em eletroforese. Curitiba, 1995. Dissertação (Mestrado em Genética) -. Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná.

SOUZA, R.L.R.; CASTRO, R.M.V.; PEREIRA, L.; FREUND, A.A.; CULPI, L.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Frequencies of the butyrylcholinesterase K mutation in the Brazilian population of European and African origin. Hum. Biol., v. 70, p. 965-970, 1998.

SOUZA, R.L.R. Variação fenotípica e genotípica da butirilcolinesterase humana e sua relação com altura e índice de massa corporal. Curitiba, 2001. 146f. Tese (Doutorado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

SOUZA, R. L. R. ;MIKAMI, L. R.; MAEGAWA R. O. B. ; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A. Four new mutations in the *BCHE* gene of human butyrylcholinesterase in a Brazilian blood donor sample. Mol. Genet. Metab., New York, v.84, p. 349-353, 2005

STEFFES, M.W., SIBLEY, S., JACKSON, M., THOMAS, W. b-cell Function and the development of diabetes-related complications in diabetes control and complication trial. Diabetes Care. v.26, p.832-6, 2003.

The Diabetes Control and Complications Trial Research Group: the effect of intensive therapy on residual beta-cell function in patients with type 1 diabetes in the diabetes control and complications trial. Ann Intern Med. v.128, p.517-53, 1998.

TSAI, E.B., SHERRY, N.A., PALMER, J.P., HEROLD, K.C., for the DPT-1 Study Group. The Rise and Fall of Insulin Secretion in type 1 diabetes mellitus. *Diabetologia*. v.49, p.261-70, 2006.

TODD, J.A. Genetic control of autoimmunity in type 1 diabetes. *Immunol Today*. v.11, p.122-9, 1990.

TODD, J.A., WALKER, N.M., COOPER, J.D., SMYTH, D.J., DOWNES, K., V. Plagnol, et al., Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes, *Nat. Genet*. v.39, p.857-864, 2007.

VAARALA, O. Is it dietary insulin? *Ann N Y Acad Sci*. v.1079, p.350-9, 2006.

VAN ROS, G.; VERVOORT, T. Frequencies of the "atypical" and C5 variants of serum cholinesterase in Zairians and Belgians. Detection of the C5 variant by agar gel electrophoresis with an acid buffer. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.*, v. 53, p. 633-44, 1973.

VENDRAME, F., ZAPPATERRENO, A., DOTTA, F. Markers of beta cell function in type 1 diabetes mellitus. *Minerva Med*. v.95, p.1-6, 2004.

VINIK, A.I., MASER, R.E., MITCHELL, B.D., FREEMAN, R. Diabetic autonomic neuropathy. *Diabetes Care*. 26 (5), p.1553-79, 2003.

WEITNAUER, E.; ROBITZKI A. e LAYER, P.G. Aryl acylamidase activity exhibited by butyrylcholinesterase is higher in chick than in horse, but much lower than in fetal calf serum. *Neurosci. Lett.*, v. 254, p.153-156, 1998.

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. 549-51, 1947.

WHITTAKER, M. Plasma cholinesterase variants and the anaesthetist. *Anaesthesia*, v. 35, p. 174-97, 1980.

WHITTAKER, M. Cholinesterase. Karger, Basel, New York., p. 1-126, 1986.

WHITTAKER, M. e BRITTEN, J.J. Eh1, a new allele at cholinesterase locus 1. Hum. Hered., v. 37, p. 54-58, 1987.

WILLBOLD, E. e LAYER, P.G. A hidden retinal regenerative capacity from the chick diary margin is reactivated in vitro, that is accompanied by down-regulation of butyrylcholinesterase. Eur. J. Neurosci., v. 4, p. 210-220, 1992.

WOOLF B. On estimating the relation between blood group and disease. Ann. Hum. Genet., v. 19, p. 251-253, 1955.

ZAKUT, H.; ERLICH, G.; AYALON, A.; PRODY, C.A.; MALINGER, G.; SELDMAN, S.; GINZBERG, D.; KEHLENBACH, R e SOREQ, H. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase genes coamplify in primary ovarian carcinomas. J. Clin. Invest., v. 86, p. 900-908, 1990.

Apêndice I

Material e Métodos

Material

Serão utilizadas 2 amostras de pacientes com DM1 e uma amostra controle. Uma das amostras de pacientes com DM1, constituída de 71 pacientes já foi coletada e genotipada para as mutações K e -116 (OLIVEIRA, 2006, LEPIENSKI e cols., 2006). A segunda amostra coletada é constituída de 103 pacientes do Hospital de Clínicas, com DM1 (tabela 25). Será utilizada como amostra controle 102 doadores de sangue de Curitiba (38% de mulheres), cujo material já foi coletado e estocado em nosso laboratório.

O projeto como também a coleta da segunda amostra no HC foram aprovados pelo Comitê de Ética do HC.

Tabela 25. Estatística das amostras novas de diabéticos. (n total =102)

| Sexo | Idade de aparecimento (anos) | Raça | Peso (kg) | Altura (cm) | Frequência Cardíaca (bpm) |
|------------------|------------------------------|-------------------|---------------------|--------------------|---------------------------|
| 61M; 41F | \bar{x} =17,6 | 84C 16P 2N | \bar{x} =64,76 kg | \bar{x} =163,3 | \bar{x} =74,43 |
| HDL (mg/dL) | Triglicerídeos (mg/dL) | LDL (mg/dL) | Atividade (n = 90) | Colesterol (mg/dL) | |
| \bar{x} =53,08 | \bar{x} =91,33 | \bar{x} =107,32 | \bar{x} =4,27 | \bar{x} =179,8 | |

Tabela 26. Estatística das amostras dos controles novos. (n total = 101)

| Sexo | Raça (n = 100) | Atividade da Bche | Peso (kg) | Altura (cm) |
|----------|----------------|-------------------|------------------|-------------------|
| 64M; 37F | 94C 6N | \bar{x} =3,64 | \bar{x} =72,60 | \bar{x} =168,97 |

Métodos

Extração de DNA

O DNA da nova amostra de pacientes com DM1 foi extraído através do método de salting out.

A técnica utilizada é a de LAHIRI e NURNBERGER (1991), apresentada a seguir com algumas modificações.

Reagentes:

- Tampão TKM1 - Tris-HCl 10mM, pH 7,6; KCl 10mM; MgCl₂ 10mM e EDTA 2mM.
- Tampão TKM2 - Tris-HCl 10mM, pH 7,6; KCl 10mM; MgCl₂ 10mM; NaCl 0,4M e EDTA 2mM.
- Tampão Tris-HCl-EDTA - Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8,0.
- Tampão TE - 0,5 mL de tampão tris-HCl 1M, pH8,0, 0,5mL de EDTA 0,1M, 8,0 e completar para 50 mL com água bidestilada.

Procedimento:

- 1- Coletar 10 mL de sangue em EDTA. Centrifugar a 2500 rpm por 15 minutos. Retirar o plasma e separar a camada de leucócitos. Quando o material for congelado por algum tempo antes da extração, estocar a camada de leucócitos com alguns mL de hemácias. Colocar os leucócitos com parte das hemácias, em um tubo de centrifugação, completar para 10mL com tampão TKM1.
- 2- Adicionar 125 µL de Nonidet P-40 ou Igepal (Sigma) para lisar as células. Misturar por inversão várias vezes.
- 3- Centrifugar a 2500 rpm por 20 minutos a temperatura ambiente.
- 4- Desprezar o sobrenadante, e completar novamente para 10 mL com TKM1.

Destruir o precipitado com uma pipeta pasteur e passar no vortex. Centrifugar novamente como no item anterior. Quando for sangue congelado repetir esse item mais uma vez.

5- Ressuspender o precipitado em 0,8 mL de tampão TKM2 e transferi-lo para um tubo de microcentrífuga (1,5 mL) com uma micropipeta.

6- Adicionar 100 μ L de SDS a 10%, misturar a suspensão, com uma pipeta, várias vezes e incubar por 2 horas em banho-maria a 55°C, podendo ficar por cerca de 12 horas.

7- Adicionar 0,30 mL de NaCl 6M e misturar bem.

8- Centrifugar a 12000 rpm por 20 minutos, em uma microcentrífuga.

9- Salvar o sobrenadante, que contém o DNA, passando-o para um tubo de ensaio e descartar o precipitado de proteínas.

10- Adicionar ao sobrenadante 2 volumes de etanol 100%, gelado, e inverter o tubo várias vezes até precipitar o DNA.

11- Remover o DNA precipitado para um tubo de microcentrífuga e lavar o DNA com etanol 70%, gelado. Dispensar o etanol e colocar o tubo aberto na estufa a 37°C até evaporar o resto de etanol.

12- Ressuspender o DNA em 200 μ L de tampão TE.

13- Levar ao banho-maria a 55°C por 1 hora, podendo ficar até 3 dias para que ocorra a solubilização, depois deixar na geladeira por mais 3 dias antes de congelar.

Medição de concentração das amostras

As concentrações das amostras estoque foram medidas usando-se do aparelho Nanodrop da Thermo Scientific. Foi usada 2µl para a leitura. Após conhecer os valores de concentrações das amostras estoque, foram feitas alíquotas de uso para o procedimento de genotipagem por TaqMAN com concentração de 20ng/µl.

PCR

Genotipagem das mutações K e -116

A nova amostra de pacientes com DM1 foi genotipada para as mutações K e -116, utilizando a técnica de genotipagem por TaqMan, em aparelho de PCR em tempo real.

Genotipagem dos SNPs próximos ao gene *BCHE*

Foram escolhidos os SNPS rs1803274, rs1126680 (dentro do gene da *BCHE*), rs7624915, rs4387996 (à jusante), rs4440084 e rs2863381 (à montante) entre o gene *BCHE* e o microssatélite D3S1279 (cerca de 13Mb). Esses SNPs já foram utilizados em outros estudos de nosso laboratório. Para genotipagem desses SNPs foi utilizado o kit TaqMan SNP da Applied Biosystems. Esse kit consiste de 2 iniciadores não marcados e duas sondas (uma para cada alelo) marcadas com fluorescência VIC emitindo coloração vermelha e FAM para a coloração verde.

As reações serão feitas em um aparelho de PCR em tempo real.

A emissão dos compostos fluorescentes gera um sinal que aumentará na proporção direta da quantidade de produto da PCR.

As figuras 3 até 7 mostram um esquema da detecção dos alelos por essa técnica.

Fig 3. Estratégia de discriminação alélica utilizando sondas marcadas com fluorescência.

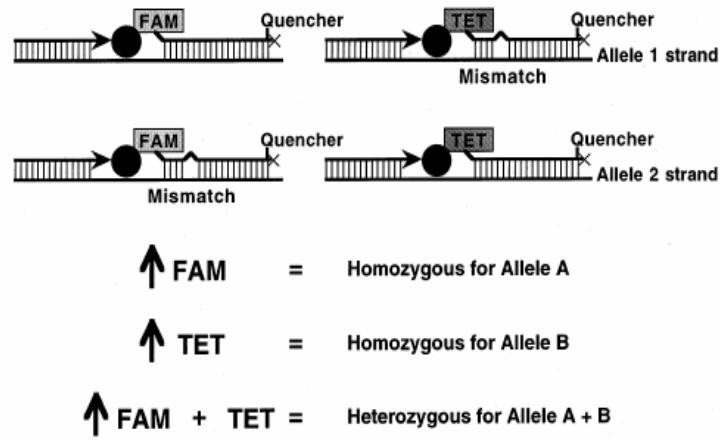


Fig. 3. Estratégia de discriminação alélica utilizando sondas marcadas com fluorescência.

Fig. 4. Exemplo da análise de um resultado em homozigose para o alelo marcado pela fluorescência FAM do programa RealPlex após o processo de PCR em tempo real.

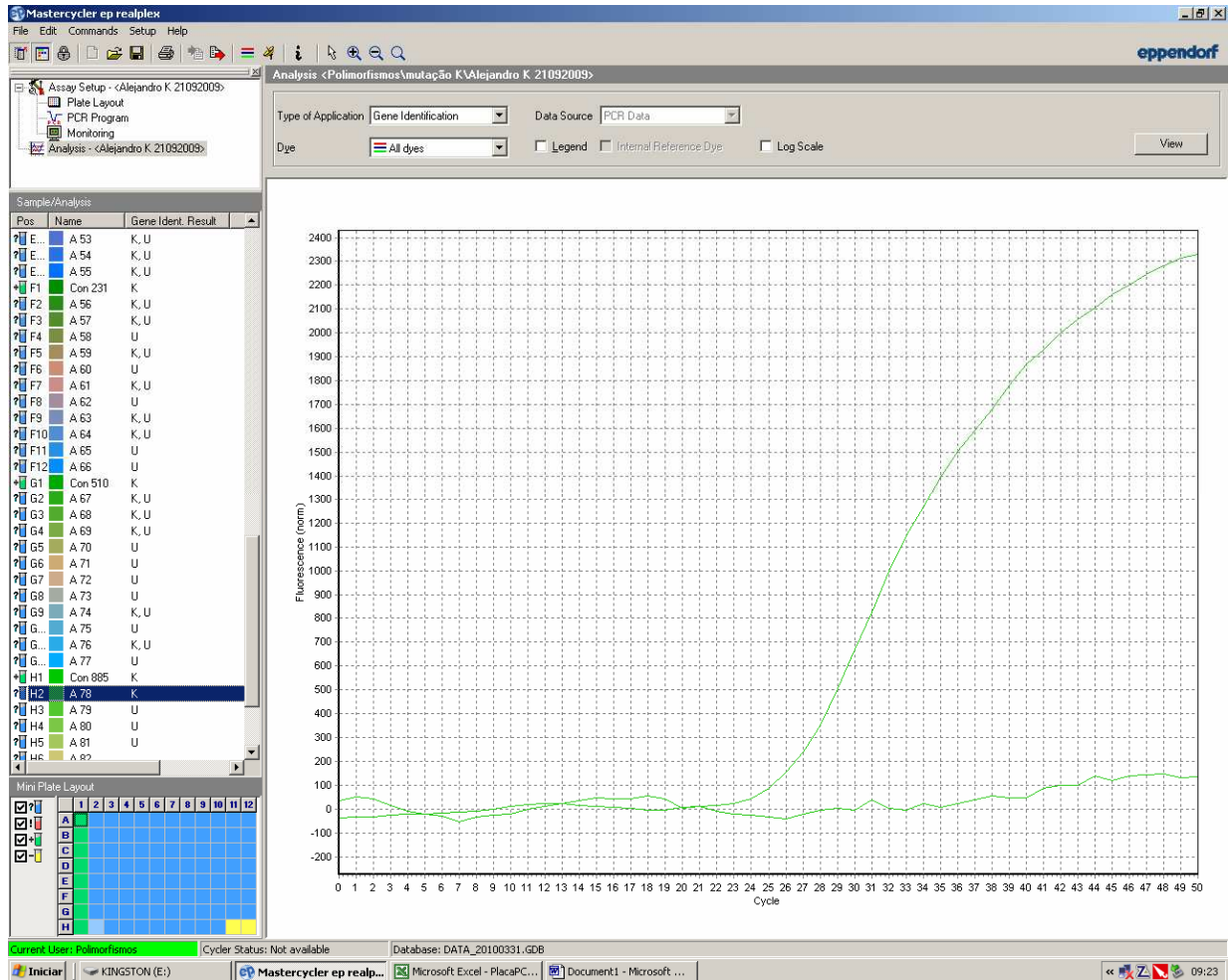


Fig. 5. Exemplo da análise de um resultado em heterozigose FAM/VIC do programa RealPlex após o processo de PCR em tempo real.

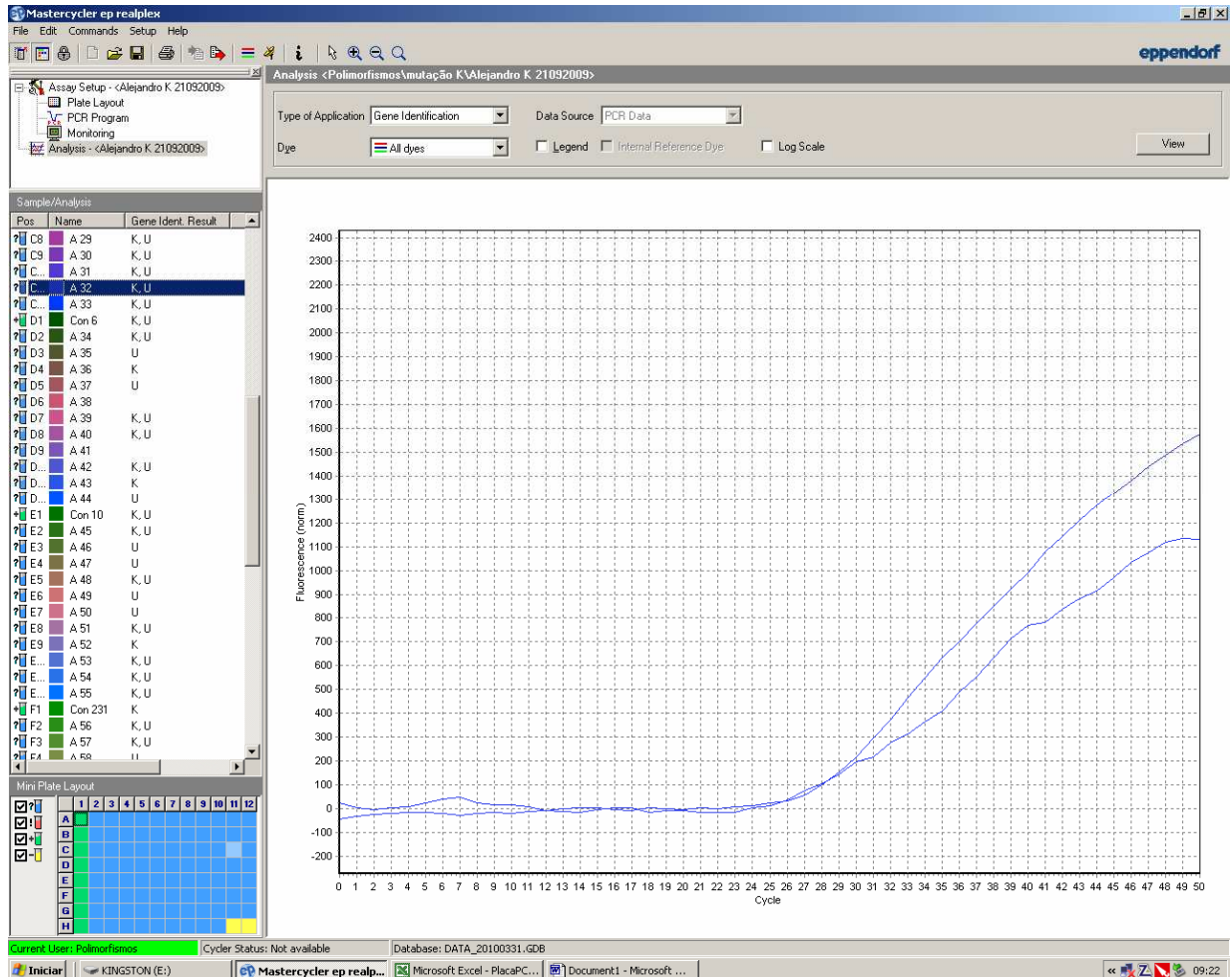


Fig. 6. Exemplo da análise de um resultado em homozigose para o alelo marcado pela fluorescência VIC do programa RealPlex após o processo de PCR em tempo real.

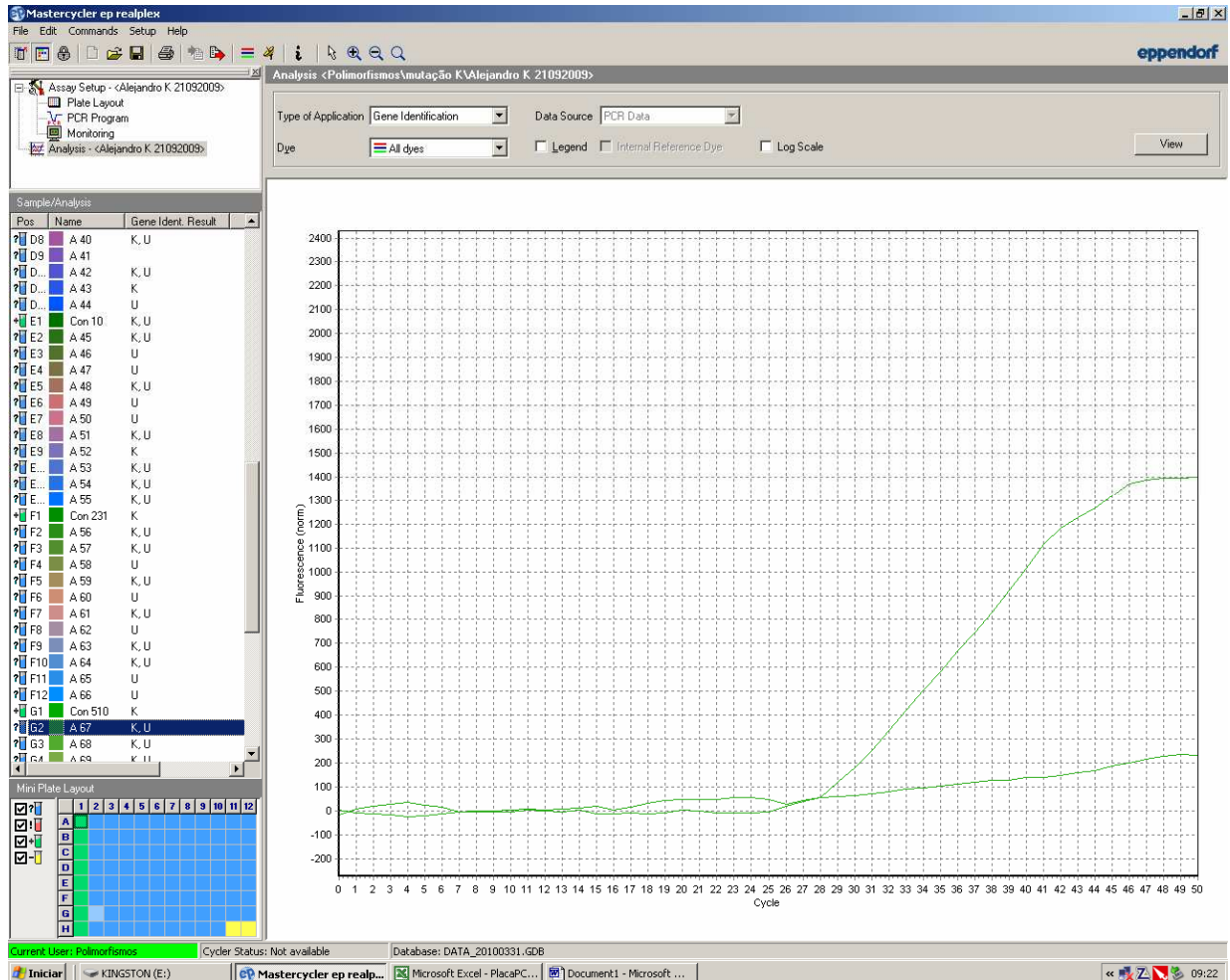
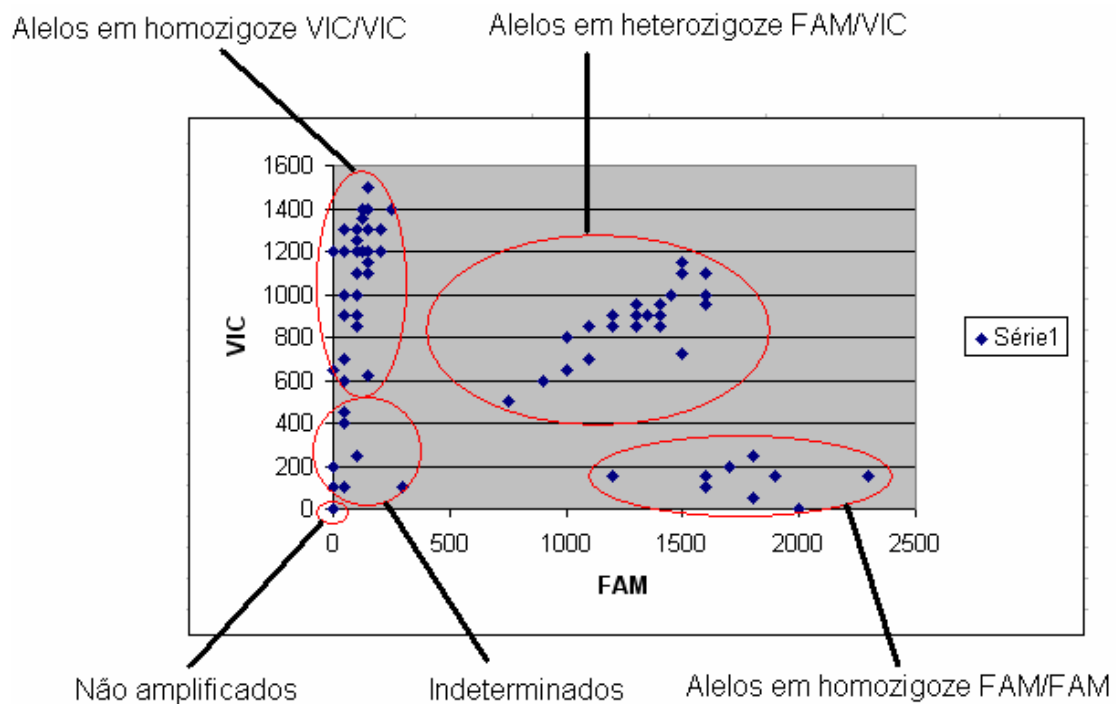


Fig 7. Plotagem dos resultados reais de genotipagem com TaqMan.



Para confecção do gráfico mostrado na figura 5, foram utilizados os valores máximos de fluorescência de cada um dos fluoróforos (ver eixo Y das figuras 2 a 4).

Análise dos dados

Freqüências alélicas e genotípicas

As freqüências alélicas e genotípicas foram obtidas através da contagem direta do número de cromossomos e de indivíduos, respectivamente.

O programa CLUMP (SHAM e CURTIS, 1995) foi usado para comparar as freqüências alélicas e genotípicas obtidas no presente trabalho com as de outros autores. O teste dá resultado igual ao do χ^2 , sendo que não há necessidade de utilizar a correção de Yates, quando o esperado é menor que 5. Neste programa, o nível de significância é primeiramente obtido dos dados reais e, em seguida, um grande número de tabelas (10000, no presente estudo) com os mesmos totais marginais dos dados reais é gerado por simulação de Monte Carlo, com base na hipótese nula de que populações diferentes possuem a mesma distribuição de

freqüência. O valor da estatística de 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 $\leq 0,05$.

Equilíbrio de Hardy-Weinberg, desequilíbrio de ligação e inferência haplotípica

O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi verificado pelo programa Arlequin 2000 (SCHNEIDER et al., 2000) de acordo com o teste de GUO e THOMPSON (1992).

Os coeficientes de desequilíbrio de ligação também foram estimados pelo programa Arlequin 2000 (SCHNEIDER et al., 2000) através do teste "likelihood ratio" (SLATKIN e EXCOFFIER, 1996).

A inferência da fase haplotípica foi obtida a partir dos dados das freqüências genóticas observadas, baseada no método de máxima verossimilhança do programa Arlequin 2000 (SCHNEIDER et al., 2000).

Os cálculos de correlações foram calculadas pelo programa STATISTICA for Windows (STATSOFT, 2000; <http://www.statsoft.com>)

ODDS RATIO

Nos resultados estatisticamente significativos, que indicaram associação, determinou-se o OR (*odds ratio*), de acordo com o método de Woolf (1955), $OR = (A \times D) / (B \times C)$ como mostra a tabela a seguir:

Tabela 27. Esquema para o cálculo de OR.

| Fator | Estudo | Controle | Total |
|----------|--------|----------|-------|
| Presença | A | B | t |
| Ausência | C | D | z |
| Total | x | y | |

x, y, t e z representam a soma de A + C, B + D, A + B e C + D, respectivamente.

E em algumas comparações, como em casos de genótipos conjuntos ou de haplótipos, o grupo de >15 anos de idade de aparecimento da doença foi contrastado com o controle e com o grupo de ≤ 15 anos de idade de aparecimento da

doença. O valor de OR indica quantas vezes a mais (ou a menos) o grupo com o fator tem de apresentar determinada doença, ou, no caso do presente trabalho, de apresentá-la precoce ou tardiamente, quando contrastado com o grupo sem esse fator. O valor de OR correspondente a 1 significa que a probabilidade é a mesma para indivíduos que tem e que não tem o fator. Valores acima de 1 indicam que o fator está associado a uma maior probabilidade de se desenvolver a doença, e valores abaixo de 1 indicam uma menor probabilidade. Dado o valor de OR, pode-se calcular o Erro Padrão (EP) para o log OR e, a partir deste o seu Intervalo de Confiança (I.C.), através da fórmula:

EP (log OR) =

$$\sqrt{\frac{1}{A} + \frac{1}{B} + \frac{1}{C} + \frac{1}{D}}$$

Para se obter o Intervalo de Confiança a 95%, usam-se inicialmente 1,96 erros padrões para qualquer direção em relação à estimativa de log OR. Em seguida, obtém-se o antilog desses dois limites, que é o IC ao nível de 95%.

Risco Relativo

O fato de existir uma diferença de freqüência do dano entre os expostos e os não expostos ao fator de risco indica uma associação de fator, com o dano, sempre que esta diferença não seja facilmente atribuível ao azar (significação estatística).

A força desta associação constitui um critério importante na seleção do fator de risco. Duas medidas desta força são:

- **RR**: risco relativo (risco de um em relação ao outro: mede a potência da associação)
- **RA**: risco atribuível

Risco Relativo (RR): é a relação do quociente entre o risco de ter um dano nos que estão expostos ao (s) fator(s) de risco em estudo, comparado com o risco dos que não estão. Mede o excesso de risco para um dado dano nos indivíduos expostos ao fator de risco, comparado com os que não estão expostos.

Tabela 28. Para facilitar o cálculo:

| Fator | Patologia | | Total |
|-------|-----------|-----|------------|
| | Sim | Não | |
| Sim | a | B | a+b |
| Não | c | D | c+d |
| Total | a+c | b+d | n(a+b+c+d) |

$$RR = \frac{a/a+b}{c/c+d}$$

RR = Incidência do dano nos que tem o fator ($p_1 = a/a+b$)

Incidência do dano entre os que não têm fator ($p_2 = c/c+d$)

Apêndice II

Tabelas completas dos Haplótipos em freqüência crescente nas quatro amostras estudadas e freqüências alélicas e genóticas dos SNPs estudados em outras populações.

Tabela 29. Seqüência em ordem crescente de freqüência dos haplótipos na amostra de Diabéticos Novos

| N | Freqüência (%) | Haplótipos |
|-----|----------------|-------------|
| 41 | 22,04 | G G C G G T |
| 27 | 14,516 | G G A A C T |
| 16 | 08,602 | G G A G C C |
| 14 | 07,53 | A G C G G T |
| 13 | 06,99 | G G A G G T |
| 9 | 04,84 | G G A A G T |
| 8 | 04,30 | G G A G C T |
| 8 | 04,30 | G G A A C C |
| 7 | 03,76 | G G C A G T |
| 7 | 03,76 | G G C G C C |
| 4 | 02,15 | A A A A G T |
| 4 | 02,15 | G G C A C T |
| 4 | 02,15 | A A C G G T |
| 4 | 02,15 | G G A A G C |
| 3 | 01,61 | G G C G C T |
| 3 | 01,61 | A G C A C T |
| 2 | 01,08 | A G A G G T |
| 2 | 01,08 | A A C A G C |
| 2 | 01,08 | G G C G G C |
| 2 | 01,08 | A A C G G C |
| 1 | 00,54 | A G A A C C |
| 1 | 00,54 | A G A A C T |
| 1 | 00,54 | A G C G C T |
| 1 | 00,54 | G G A G G C |
| 1 | 00,54 | A A A A G C |
| 1 | 00,54 | A G C G G C |
| 186 | 1 | |

A configuração do haplótipo é a seqüência de SNPs: rs1803274, rs1126680, rs7624915, rs4387996, rs4440084 e rs2863381.

Tabela 30. Seqüência em ordem crescente da freqüência dos haplótipos na amostra de Diabéticos Novos sem o SNP rs1803274.

| N | Freqüência (%) | Haplótipos |
|-----|----------------|-------------|
| 52 | 27,96 | * G C G G T |
| 28 | 15,05 | * G A A C T |
| 15 | 08,06 | * G A G G T |
| 15 | 08,06 | * G A G C C |
| 11 | 05,9 | * G A A G T |
| 9 | 04,84 | * G A G C T |
| 9 | 04,84 | * G A A C C |
| 8 | 04,30 | * G C A G T |
| 8 | 04,30 | * G C G C C |
| 7 | 03,76 | * G C A C T |
| 5 | 02,69 | * A C G G T |
| 4 | 02,15 | * A C G G C |
| 4 | 02,15 | * G A A G C |
| 3 | 01,61 | * G C G C T |
| 3 | 01,61 | * G C G G C |
| 2 | 01,07 | * A A A G T |
| 1 | 00,54 | * A C A G T |
| 1 | 00,54 | * A A A G C |
| 1 | 00,54 | * G A G G C |
| 186 | 1 | |

A configuração do haplótipo é a seqüência de SNPs: rs1803274, rs1126680, rs7624915, rs4387996, rs4440084 e rs2863381.

Tabela 31. Seqüência em ordem crescente de freqüência dos haplótipos na amostra de Controles Novos.

| N | Freqüência (%) | Haplótipos |
|----|----------------|-------------|
| 53 | 26,50 | G G C G G T |
| 23 | 11,50 | G G A A G T |
| 17 | 08,50 | G G A G C T |
| 14 | 07,00 | G G C G C T |
| 12 | 06,00 | G G C G G C |
| 11 | 05,50 | G G C G C C |
| 10 | 05,00 | A A C A G T |
| 9 | 04,50 | A G A G C T |
| 9 | 04,50 | G G A G C C |

| | | |
|-------|-------|-------------|
| 8 | 04,00 | G G A A C C |
| 6 | 03,00 | G G A G G T |
| 5 | 02,50 | A G C G G T |
| 5 | 02,50 | A A C G G T |
| 4 | 02,00 | G G C A G T |
| 3 | 01,50 | A G A A C C |
| 3 | 01,50 | A G A G G T |
| 2 | 01,00 | A G C G G C |
| 2 | 01,00 | G G A A C T |
| 2 | 01,00 | A G A G C C |
| 2 | 01,00 | A A C A G C |
| <hr/> | | |
| 200 | 1 | |

A configuração do haplótipo é a seqüência de SNPs: rs1803274, rs1126680, rs7624915, rs4387996, rs4440084 e rs2863381.

Tabela 32. Seqüência em ordem crescente de freqüência dos haplótipos na amostra de Controles Novos sem o SNP rs1803274.

| N | Freqüência (%) | Haplótipos |
|-------|----------------|-------------|
| 58 | 29,00 | * G C G G T |
| 26 | 13,00 | * G A G C T |
| 23 | 11,50 | * G A A G T |
| 14 | 07,00 | * G C G C T |
| 14 | 07,00 | * G C G G C |
| 11 | 05,50 | * G C G C C |
| 11 | 05,50 | * G A G C C |
| 11 | 05,50 | * G A A C C |
| 10 | 05,00 | * A C A G T |
| 9 | 04,50 | * G A G G T |
| 5 | 02,50 | * A C G G T |
| 4 | 02,00 | * G C A G T |
| 2 | 01,00 | * G A A C T |
| 2 | 01,00 | * A C A G C |
| <hr/> | | |
| 200 | 1 | |

A configuração do haplótipo é a seqüência de SNPs: rs1803274, rs1126680, rs7624915, rs4387996, rs4440084 e rs2863381.

Tabela 33. Seqüência em ordem crescente de freqüência dos haplótipos na amostra de Diabéticos Antigos.

| N | Freqüência (%) | Haplótipos |
|-----|----------------|-------------|
| 28 | 20,59 | G G C G G T |
| 11 | 08,09 | G G A A C T |
| 10 | 07,35 | G G A G C T |
| 9 | 06,62 | G G A G C C |
| 9 | 06,62 | G G A G G T |
| 8 | 05,88 | G G A A G T |
| 8 | 05,88 | A G C G G T |
| 7 | 05,15 | G G C G C C |
| 7 | 05,15 | G G A G G C |
| 5 | 03,68 | G G A A C C |
| 5 | 03,68 | G G C G C T |
| 5 | 03,68 | G G C A G T |
| 5 | 03,68 | A A C A G T |
| 4 | 02,94 | G G C G G C |
| 4 | 02,94 | A A C G G T |
| 3 | 02,21 | A A A A G T |
| 2 | 01,47 | A A C A C C |
| 2 | 01,47 | A G C A G T |
| 1 | 00,74 | A G A A C T |
| 1 | 00,74 | G A A G C T |
| 1 | 00,74 | G G C A G C |
| 1 | 00,74 | A G A G G T |
| 136 | 1 | |

A configuração do haplótipo é a seqüência de SNPs: rs1803274, rs1126680, rs7624915, rs4387996, rs4440084 e rs2863381.

Tabela 34. Seqüência em ordem crescente de freqüência dos haplótipos na amostra de Diabéticos Antigos sem o SNP rs7624915.

| N | Freqüência (%) | Haplótipos |
|----|----------------|-------------|
| 32 | 23,53 | G G * G G T |
| 22 | 16,18 | G G * G C T |
| 19 | 13,97 | G G * A G T |
| 16 | 11,76 | G G * G C C |
| 10 | 07,35 | G G * G G C |
| 8 | 05,88 | A G * G G T |
| 8 | 05,88 | A A * A G T |
| 6 | 04,41 | G G * A C C |

| | | |
|-------|-------|----------|
| 4 | 02,94 | AA * GGT |
| 3 | 02,21 | GG * ACT |
| 3 | 02,21 | AG * AGT |
| 2 | 01,47 | AA * ACC |
| 1 | 00,74 | AG * ACT |
| 1 | 00,74 | GA * GCT |
| 1 | 00,74 | GG * AGC |
| <hr/> | | |
| 136 | 1 | |

A configuração do haplótipo é a seqüência de SNPs: rs1803274, rs1126680, rs7624915, rs4387996, rs4440084 e rs2863381.

Tabela 35. Seqüência em ordem crescente de freqüência dos haplótipos na amostra de Controles Antigos.

| N | Freqüência (%) | Haplótipos |
|-------|----------------|------------|
| 16 | 17,39 | GGAA GT |
| 13 | 14,13 | GGCG GT |
| 9 | 09,78 | GGAG GT |
| 9 | 09,78 | GGCG CC |
| 8 | 08,70 | GGCG CT |
| 6 | 06,52 | AACG GT |
| 4 | 04,35 | GGAA GC |
| 3 | 03,26 | GGCA CC |
| 3 | 03,26 | GGCA CT |
| 3 | 03,26 | AACG CT |
| 3 | 03,26 | GGCA GT |
| 2 | 02,17 | AGCG GT |
| 2 | 02,17 | AGAG CC |
| 2 | 02,17 | AGCG GC |
| 2 | 02,17 | GGAG CC |
| 1 | 01,09 | GACG CT |
| 1 | 01,09 | AACG CC |
| 1 | 01,09 | GGCG GC |
| 1 | 01,09 | GGAG CT |
| 1 | 01,09 | GGAG GC |
| 1 | 01,09 | AACG GC |
| 1 | 01,09 | AAAG CT |
| <hr/> | | |
| 92 | 1 | |

A configuração do haplótipo é a seqüência de SNPs: rs1803274, rs1126680, rs7624915, rs4387996, rs4440084 e rs2863381.

Tabela 36. Seqüência em ordem crescente de freqüência dos haplótipos na amostra de Controles Antigos sem o SNP rs7624915.

| N | Freqüência (%) | Haplótipos |
|----|----------------|-------------|
| 21 | 22,83 | G G * G G T |
| 20 | 21,74 | G G * A G T |
| 11 | 11,96 | G G * G C C |
| 9 | 09,78 | G G * G C T |
| 5 | 05,43 | G G * A G C |
| 4 | 04,34 | A A * G C T |
| 4 | 04,34 | A A * G G T |
| 4 | 04,34 | A G * G G T |
| 3 | 03,26 | A A * G C C |
| 3 | 03,26 | G G * A C T |
| 3 | 03,26 | G G * G G C |
| 2 | 02,17 | A G * G C C |
| 1 | 01,09 | G A * G C T |
| 1 | 01,09 | G G * A C C |
| 1 | 01,09 | A A * G G C |
| 92 | 1 | |

A configuração do haplótipo é a seqüência de SNPs: rs1803274, rs1126680, rs7624915, rs4387996, rs4440084 e rs2863381.

Tabela 37. Freqüências genotípicas e alélicas para cada um dos SNPs estudados para quatro populações mundiais (CEU = Residentes de Utah (EUA) com descendência europeia do norte e oeste; HCB = Chineses da Etnia Han; JPT = Japoneses da cidade de Tokyo; YRI = Nigerianos da etnia Yoruba coletados na cidade de Ibadan).

| Ss# | População | GG(%) | AG(%) | AA(%) | G(%) | A(%) |
|------------|-----------------------|-------|-------|-------|------|------|
| Ss11585689 | HapMap- CEU (Euro) | 66,7 | 31,7 | 1,7 | 82,5 | 17,5 |
| | HapMap-HCB (China) | 62,2 | 35,6 | 2,2 | 80,0 | 20,0 |
| rs1803274 | HapMap-JPT (Japones) | 65,9 | 27,3 | 6,8 | 79,5 | 20,5 |
| | HapMap-YRI (AfricaSS) | 67,7 | 33,3 | | 83,3 | 16,7 |

| Ss# | População | GG(%) | AG(%) | AA(%) | G(%) | A(%) |
|------------|--------------------|-------|-------|-------|------|------|
| Ss14912951 | HapMap- CEU (Euro) | 90,0 | 8,3 | 1,7 | 94,2 | 5,8 |
| | Global | 95,2 | 4,8 | | 97,6 | 2,4 |
| rs1126680 | | | | | | |

| Ss# | População | AA(%) | AC(%) | CC(%) | A(%) | C(%) |
|------------|-----------------------|-------|-------|-------|------|------|
| Ss11557733 | HapMap- CEU (Euro) | 22,8 | 50,9 | 26,3 | 48,2 | 51,8 |
| | HapMap-HCB (China) | 24,4 | 51,1 | 24,4 | 50,0 | 50,0 |
| rs7624915 | HapMap-JPT (Japones) | 27,3 | 29,5 | 43,2 | 42,0 | 58,0 |
| | HapMap-YRI (AfricaSS) | | 3,3 | 96,7 | 1,7 | 98,3 |

| Ss# | População | AA(%) | AG(%) | GG(%) | A(%) | G(%) |
|------------|-----------------------|-------|-------|-------|------|------|
| Ss68881526 | HapMap- CEU (Euro) | 1,7 | 48,3 | 50,0 | 25,8 | 74,2 |
| | HapMap-HCB (China) | 17,8 | 64,4 | 17,8 | 50,0 | 50,0 |
| rs4387996 | HapMap-JPT (Japones) | 15,6 | 53,3 | 31,1 | 42,2 | 57,8 |
| | HapMap-YRI (AfricaSS) | | 26,7 | 73,3 | 13,3 | 86,7 |

| Ss# | População | CC(%) | CG(%) | GG(%) | C(%) | G(%) |
|------------|-----------------------|-------|-------|-------|------|------|
| Ss14203384 | HapMap- CEU (Euro) | 30,0 | 43,3 | 26,7 | 51,7 | 48,3 |
| | HapMap-HCB (China) | 26,7 | 46,7 | 26,7 | 50,0 | 50,0 |
| rs4440084 | HapMap-JPT (Japones) | 25,0 | 50,0 | 25,0 | 50,0 | 50,0 |
| | HapMap-YRI (AfricaSS) | 73,3 | 25,0 | 1,7 | 85,8 | 14,2 |

| Ss# | População | CC(%) | CT(%) | TT(%) | C(%) | T(%) |
|-----------|-----------------------|-------|-------|-------|------|------|
| Ss4052351 | HapMap- CEU (Euro) | 8,3 | 56,7 | 35,0 | 36,7 | 63,3 |
| | HapMap-HCB (China) | 28,9 | 53,3 | 17,8 | 55,6 | 44,4 |
| rs2863381 | HapMap-JPT (Japones) | 22,7 | 50,0 | 27,3 | 47,7 | 52,3 |
| | HapMap-YRI (AfricaSS) | | 1,7 | 98,3 | 0,8 | 99,2 |