

LUIS MARCOS LEPIENSKI

BUTIRILCOLINESTERASE E DIABETES MELLITUS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Genética da Universidade Federal do Paraná
como requisito para obtenção do título de Mestre.
Orientadora: Prof^a Dr^a Eleidi A. Chautard-Freire-Maia
Co-orientadores: Dr. Ricardo L. R. Souza e
Dr^a Vânia M. de Alcântara

CURITIBA
2004

LUIS MARCOS LEPIENSKI

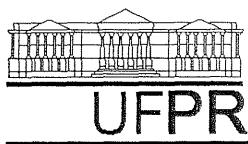
VARIANTE K DA BUTIRILCOLINESTERASE E DIABETES MELLITUS

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

Orientadora: Prof^a, Dr^a, Eleidi A. Chautard-Freire-Maia.

Co-orientadores: Dr. Ricardo L. R. Souza e Dr^a, Vânia M. de Alcântara.

CURITIBA
2004



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

P A R E C E R

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

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

Curitiba, 26 de março de 2004.

Banca Examinadora:



Eleidi A. Freire Maia
Profa. Dra. Eleidi Alice Chautard-Freire-Maia
Orientadora e Presidente

Bonaldi Figueiredo
Prof. Dr. Ronald Cavalcanti Figueiredo
Membro

Maria Luiza Petzl-Erler
Profa. Dra. Maria Luiza Petzl-Erler
Membro

Visto:

Marta Margarete Cestari
Profa. Dra. Marta Margarete Cestari
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Genética

Para meus pais, Leoni e Melício,
minha esposa Fátima e meus filhos
Cássio e Newton.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Eleidi A. Chautard Freire Maia, pela orientação, amizade e seu exemplo de entusiasmo e dedicação à investigação científica.

Ao grupo do Laboratório de Bioquímica Clínica da UFPR, em especial à Prof^a. Vânia M. de Alcântara, pelas orientações e pelo grande apoio.

Ao Prof. Ricardo L. R. Souza, pela amizade e pela colaboração durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os colegas do Laboratório de Polimorfismos e Ligação e aos professores e funcionários do Departamento de Genética pelo incentivo e amizade, e que, de uma forma ou outra, colaboraram na elaboração deste trabalho.

Ao grupo do Hospital de Clínicas, em especial às Dras. Rosângela R. Réa, Rilene Figueiredo, Rosa Maria Vargas e Ana Cristina R. de Almeida.

À Prof^a. Roseli Wassen pela colaboração nos procedimentos de seqüenciamento.

Ao CNPq, CAPES e FUNPAR pelo auxílio financeiro, que permitiu o desenvolvimento desta pesquisa.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	VI
LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE GRÁFICOS.....	X
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS.....	XII
RESUMO.....	XIV
ABSTRACT.....	XVI
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. NOMENCLATURA.....	3
2.2. ESTERASES.....	4
2.3. ESTRUTURA E FORMAS MOLECULARES DA BChE.....	4
2.4. O GENE <i>BCHE</i> : LOCALIZAÇÃO E ESTRUTURA.....	6
2.5. VARIABILIDADE GENÉTICA.....	7
2.6. FUNÇÃO DA BChE.....	12
2.7. DIABETES MELLITUS.....	13
2.8. BChE E DIABETES.....	18
2.9. SÍNDROME METABÓLICA.....	20
2.10. HERANÇA GENÉTICA DO DIABETES MELLITUS.....	21
3. OBJETIVOS.....	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4.1. AMOSTRAS.....	26
4.2. MÉTODOS LABORATORIAIS.....	28
4.2.1. EXTRAÇÃO DO DNA.....	29
4.2.2. GENOTIPAGEM DA VARIANTE K POR PCR-RFLP.....	31
4.2.3. GENOTIPAGEM DA VARIANTE K POR PCR-SSCA.....	35
4.2.4. SEQÜENCIAMENTO DO DNA.....	37
4.2.5. EXAMES REALIZADOS EM OUTROS LABORATÓRIOS.....	37
4.3. MÉTODOS ESTATÍSTICOS.....	38
5. RESULTADOS	40
5.1. METODOLÓGICOS.....	40
5.2. FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS.....	40

5.3. DIABETES MELLITUS, VARIANTE K E ORIGEM ÉTNICA.....	43
5.4. FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DA VARIANTE K EM DIABÉTICOS E DOADORES DE SANGUE DE CURITIBA.....	46
5.5. ATIVIDADE DA BUTIRILCOLINESTERASE.....	51
5.6. VARIANTE K E DEMAIS VARIÁVEIS DESSE ESTUDO.....	53
5.6.1. DIABETES MELLITUS DO TIPO 1.....	53
5.6.2. DIABETES MELLITUS DO TIPO 2.....	63
5.7. VARIANTE K E FATORES DE RISCO PARA SÍNDROME METABÓLICA.....	74
5.7.1. FREQUÊNCIAS E FATORES DE RISCO.....	74
5.7.2. ATIVIDADE DA BChE.....	79
6. DISCUSSÃO	81
6.1. METODOLOGIA.....	81
6.2. FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS.....	84
6.3. VARIANTE K, DIABETES MELLITUS E ORIGEM ÉTNICA.....	86
6.4. ATIVIDADE DA BUTIRILCOLINESTERASE.....	88
6.5. INVESTIGAÇÃO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE A VARIANTE K E DM.....	92
6.5.1. DIABETES MELLITUS DO TIPO 1.....	92
6.5.2. DIABETES MELLITUS DO TIPO 2.....	98
7. CONCLUSÕES	102
7.1. VARIANTE K E DIABETES MELLITUS DO TIPO 1.....	102
7.2. VARIANTE K E DIABETES MELLITUS DO TIPO 2.....	103
REFERÊNCIAS	104
APÊNDICE	114

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 01. Exemplos da nomenclatura proposta por LA DU e cols. (1991)	3
Tabela 02. Lista de variantes já descritas do gene <i>BCHE</i> , incluindo nome, fenótipo, alteração de aminoácido, alteração de DNA, nome do alelo e referências bibliográficas.....	9
Tabela 03. Outros tipos específicos de diabetes.....	16
Tabela 04. Valores de glicose plasmática em mg/dL para diagnóstico do diabetes mellitus e seus estágios pré-clínicos.....	17
Tabela 05. Quadro demonstrativo dos resultados obtidos nas genotipagens quanto à variante K (<i>BCHE*539T</i>), por meio das técnicas de PCR-RFLP, PCR-SSCA e seqüenciamento.....	41
Tabela 06. Freqüências alélicas e genotípicas (%), referentes à variante K da butirilcolinesterase, observadas em pacientes com Diabetes Mellitus do tipo 1.....	42
Tabela 07. Freqüências alélicas e genotípicas (%), referentes à variante K da butirilcolinesterase, observadas em pacientes com Diabetes Mellitus do tipo 2	43
Tabela 08. Comparação das freqüências alélicas e genotípicas (%) em relação à variante K entre diabéticos do tipo 1 e do tipo 2.....	44
Tabela 09. Distribuição dos genótipos e das freqüências alélicas em relação à variante K, em pacientes diabéticos do tipo 1, classificados por origem étnica.....	45
Tabela 10. Distribuição dos genótipos e das freqüências alélicas em relação à variante K, em pacientes diabéticos do tipo 2, classificados por origem étnica.....	47

Tabela 11. Distribuição dos genótipos e das freqüências alélicas em relação à variante K, em pacientes euro-brasileiros, classificados por tipo de diabetes.....	48
Tabela 12. Distribuição dos genótipos e das freqüências alélicas em relação à variante K, em pacientes afro-brasileiros, classificados por tipo de diabetes.....	49
Tabela 13. Comparaçao das freqüências alélicas e genotípicas em relação à variante K, em diabéticos dos tipos 1 e 2 e em doadores de sangue de Curitiba.....	50
Tabela 14. Atividades médias (\pm E.P.) da butirilcolinesterase (KU/L) em diabéticos dos tipos 1 e 2, classificados genotípicamente, em relação à variante K.....	52
Tabela 15. Atividades médias (\pm E.P.) da butirilcolinesterase (KU/L) em diabéticos dos tipos 1 e 2, classificados pela presença ou não da variante K.....	54
Tabela 16. Médias (\pm E.P.) e amplitudes de variação (A.V.) das variáveis bioquímicas, antropométricas, pressões arteriais e idade de aparecimento da doença em diabéticos do tipo 1, classificados pela presença ou não da variante K.....	55
Tabela 17. Idade de aparecimento do diabetes mellitus do tipo 1.....	57
Tabela 18. Distribuição dos genótipos e das freqüências alélicas em relação à variante K, em pacientes diabéticos do tipo 1, classificados pela idade de aparecimento da doença.....	59
Tabela 19. Resultados da regressão múltipla escalonada, na qual a idade de aparecimento do diabetes mellitus do tipo 1 (N = 100) foi a variável dependente.....	61
Tabela 20. Médias (\pm E.P.) e amplitudes de variação (A.V.) das variáveis bioquímicas, antropométricas, pressões arteriais e idade de aparecimento da doença em diabéticos do tipo 2, classificados pela presença ou não da variante K.....	65

Tabela 21. Coeficientes de correlação entre RCQ e variáveis que apresentaram resultados estatisticamente significativos, em diabéticos do tipo 2.....	66
Tabela 22. Resultados da regressão múltipla escalonada, na qual considerou-se a RCQ como a variável dependente, em diabéticos do tipo 2 (N = 138).....	68
Tabela 23. Distribuição das freqüências de pacientes diabéticos do tipo 2, estudados quanto ao número de fatores de risco para Síndrome Metabólica (SM) e quanto aos genótipos relativos à mutação K.....	77
Tabela 24. Comparações entre as atividades médias da butirilcolinesterase observadas no grupo com 0 ou 1 fator de risco para Síndrome Metabólica e no grupo com 2 ou 3 fatores de risco para SM, classificados em relação à presença ou não da mutação K.....	80
Tabela 25. Atividades médias (\pm E.P.) da butirilcolinesterase (KU/L) em diferentes amostras.....	91

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 01. Desenho esquemático do gene <i>BCHE</i>	6
Figura 02. O esquema mostra o princípio da técnica de PCR-PIRA, no qual o segmento amplificado, a partir da seqüência “usual”, apresenta um sítio de identificação e corte da enzima <i>Fnu4HI</i> , gerando dois fragmentos, um de 85 pb e outro de 21 pb.....	32
Figura 03. Padrões de genótipos obtidos por PCR-RFLP, após eletroforese em gel de poliacrilamida: a. UU; b. UK; c. KK	35
Figura 04. Padrões de genótipos obtidos por PCR-SSCA, após eletroforese em gel de poliacrilamida: a. UU; b. KK; c. UK	37
Figura 05. Diagrama compreendendo o intron 3, exon 4 e parte da região a jusante, com indicação dos iniciadores usados nas amplificações e respectivos produtos.....	85

LISTA DE GRÁFICOS

	Página
Gráfico 01. Distribuições de freqüências da idade de aparecimento do diabetes mellitus do tipo 1, classificadas pela presença ou não da variante K.....	58
Gráfico 02. Distribuição dos valores de aspartato-aminotransferase, em diabéticos do tipo 1, classificados pela presença ou não da variante K.....	62
Gráfico 03. Distribuição de freqüências dos valores de aspartato-aminotransferase (em ln), em diabéticos do tipo 1, classificados pela presença ou não da variante K.....	64
Gráfico 4. Distribuições de freqüências dos valores de RCQ, em diabéticos do tipo 2, classificados pela presença ou não da variante K.....	67
Gráfico 5. Distribuição dos valores de peso (Kg), em diabéticos do tipo 2, classificados pela presença ou não da variante K.....	70
Gráfico 6. Distribuição dos valores de IMC, em diabéticos do tipo 2, classificados pela presença ou não da variante K.....	71
Gráfico 7. Distribuição dos valores de aspartato-aminotransferase (ln), em diabéticos do tipo 2, classificados pela presença ou não da variante K.....	72
Gráfico 8. Distribuição dos valores de alanina-aminotransferase (ln), em diabéticos do tipo 2, classificados pela presença ou não da variante K.....	73
Gráfico 9. Distribuições de freqüências de peso (Kg) em diabéticos do tipo 2, classificados pela presença ou não da variante K.....	75

Gráfico 10. Distribuições de freqüências (%) dos valores de IMC, em diabéticos do tipo 2, classificados pela presença ou não da variante K.....	76
Gráfico 11. Distribuições das freqüências dos genótipos em relação à variante K, de acordo com a presença de 0 e 1 ou 2 e 3 fatores de risco para Síndrome Metabólica.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

AAA	Aril acilamidase amino sensitiva
AChE	Acetilcolinesterase
Ala	Alanina
ALT	Alanina-aminotransferase
Arg	Arginina
Asp	Ácido aspártico
AST	Aspartato-aminotransferase
BChE	Butirilcolinesterase
<i>BCHE</i>	Gene da butirilcolinesterase
<i>CHE2</i>	Gene condicionador do complexo C ₅ da butirilcolinesterase
Cys	Cisteína
DM	Diabetes Mellitus
DNA	Ácido desoxiribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
Gln	Glutamina
Glu	Ácido glutâmico
Gly	Glicina
HbA _{1C}	Hemoglobina glicosilada
HDL-C	Lipoproteína de alta densidade
Hemepar	Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná
His	Histidina
<i>HNFlα</i>	Gene do fator nuclear 1α do hepatócito
<i>HNF4α</i>	Gene do fator nuclear 4α do hepatócito
Ile	Isoleucina
IMC	Índice de massa corporal
<i>IPF1</i>	Gene do fator 1 promotor da insulina
KK	Genótipo homozigoto quanto à mutação K
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
Leu	Leucina

Lys	Lisina
Met	Metionina
MODY	“Maturity-onset diabetes of the young”
PAD	Pressão arterial diastólica
PAS	Pressão arterial sistólica
PCR	“Polymerase chain reaction”
Phe	Fenilalanina
PIRA	“Primer introduced restriction analysis”
Pro	Prolina
RCQ	Razão cintura-quadril
RFLP	Polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Ser	Serina
SM	Síndrome Metabólica
SSCA	“Single strand conformational analysis”
TBE	Tampão tris-ácido-bórico-EDTA
TE	Tampão composto de tris-HCl e EDTA
TF	Gene da transferrina
TG	Triglicerídeos
Thr	Treonina
TKM1	Tampão composto de tris-HCl, KCl, MgCl ₂ e EDTA
TKM2	Tampão composto de tris-HCl, KCl, MgCl ₂ , NaCl e EDTA
Trp	Triptofano
TTG	Teste de tolerância à glicose
Tyr	Tirosina
UK	Genótipo heterozigoto quanto à variante K
UU	Genótipo homozigoto quanto ao alelo usual
Val	Valina
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa

RESUMO

A butirilcolinesterase humana (BChE; EC 3.1.1.8), enzima produzida no fígado, presente no plasma e principais sistemas do organismo, ainda não teve sua função biológica esclarecida. É codificada pelo gene *BCHE*, cuja variante K confere redução de cerca de 33% na atividade, em relação à enzima usual. O objetivo deste trabalho foi investigar associação da variante K com o diabetes mellitus dos tipos 1 e 2. A amostra de 249 pacientes (103 do tipo 1 e 146 do tipo 2) foi genotipada quanto à variante K por PCR-RFLP e PCR-SSCA. Analisaram-se variáveis antropométricas, bioquímicas, fenótipos do gene *CHE2*, pressões arteriais, idade de aparecimento da doença, sexo e origem étnica. Uma amostra de 944 doadores de sangue serviu de controle para as comparações das freqüências alélicas e genotípicas. Em DM do tipo 1, os principais resultados foram: 1) As freqüências alélicas e genotípicas ($K = 21,84\% \pm 2,88\%$; 61,17% UU, 33,98% UK e 4,85% KK) não diferem daquelas dos controles; 2) Nos pacientes, o grupo UK+KK mostrou menor idade média de aparecimento da doença ($11,67 \pm 1,00$) do que o grupo usual ($15,25 \pm 0,96$; $p = 0,015$) e menor atividade média da BChE ($4,62 \pm 0,16$ KU/L) do que o usual ($5,42 \pm 0,16$ KU/L; $p < 9 \times 10^{-4}$); 3) A freqüência do alelo K ($30,61\% \pm 4,66\%$) nos diabéticos com idade de aparecimento da doença antes dos 13 anos (mediana) é significativamente mais alta do que naqueles com essa idade maior ou igual a 13 anos ($12,75\% \pm 3,30\%$; $p = 0,002$) e do que nos controles ($17,53 \pm 0,88\%$; $p = 0,0011$). Indivíduos com o alelo K parecem apresentar maior suscetibilidade ao aparecimento do DM do tipo 1 antes dos 13 anos (odds ratio = 2,40; de 1,35 a 4,28, com IC de 95%). Esses dados são reforçados pelos que relacionam atividade baixa da BChE e auto-imunidade. Em DM do tipo 2, os principais resultados foram: 1) As freqüências alélicas e genotípicas ($K = 17,12\% \pm 2,20\%$; 69,18% UU, 27,40% UK e 3,42% KK) não diferem

daquelas dos controles, contrariando resultados de HASHIM e cols. (2001) e estando de acordo com os de JOHANSEN e cols. (2003); 2) Nesses pacientes, o grupo com a variante K mostrou maior média de razão cintura-quadril (RCQ = $0,97 \pm 0,01$) do que o usual ($0,93 \pm 0,01$; $p = 0,023$) e menor atividade média da BChE ($5,68 \pm 0,18$ KU/L) do que o usual ($6,33 \pm 0,15$ KU/L; $p < 0,02$); 3) A RCQ, em média, aumenta com os triglicerídeos, o índice de massa corporal (IMC), em homens e diabéticos com a variante K; 4) A freqüência dessa variante no grupo com Síndrome Metabólica ($22,02\% \pm 3,20\%$) é maior ($p = 0,027$) que naquele sem SM ($11,22\% \pm 3,19\%$), sugerindo que, em DM do tipo 2, a variante K predispõe para maior RCQ e, em consequência, para maior risco de Síndrome Metabólica, já que a RCQ é usada no diagnóstico dessa síndrome.

ABSTRACT

The human butyrylcholinesterase (BChE; EC 3.1.1.8) - enzyme produced in liver and found in plasma and in the main body systems - has not yet had its biological function defined. It is coded by the *BCHE* gene whose K variant leads to approximately 33% reduction in activity in relation to the usual enzyme. The purpose of this work was to investigate associations between the K variant and diabetes mellitus (types 1 and 2). The 249 patient sample (103 type 1 and 146 type 2) was genotyped for the K variant by PCR-RFLP and PCR-SSCA. Many variables were analyzed (anthropometric, biochemical, *CHE2* gene phenotypes, arterial pressures, age of disease appearance, sex and ethnic origin). A sample of 944 blood donors served as control for comparing allele and genotype frequencies. The main results for type 1 DM were: 1) The allele and genotype frequencies ($K = 21.84\% \pm 2.88\%$; 61.17% UU, 33.98% UK and 4.85% KK) did not differ from those of the controls; 2) In these patients, the UK+KK group showed lower mean age of disease onset (11.67 ± 1.00) than the usual group (15.25 ± 0.96 ; $p = 0.015$) and lower mean BChE activity (4.62 ± 0.16 KU/L) than the usual group (5.42 ± 0.16 KU/L; $p < 9 \times 10^{-4}$); 3) The K allele frequency ($30.61\% \pm 4.66\%$) in diabetics with age of disease onset less than 13 years (median value) is significantly higher than in those with this age greater than or equal to 13 years ($12.75\% \pm 3.30\%$; $p = 0.002$) and than in the controls (17.53 ± 0.88 ; $p = 0.0011$). Individuals with the K variant seem to have greater susceptibility to type 1 DM onset previous to 13 years of age (odds ratio = 2.40, from 1.35 to 4.28, with 95% of CI). These data are reinforced by those that relate low BChE activity and auto-immunity. In type 2 DM, the main results were: 1) The allele and genotype frequencies ($K = 17.12\% \pm 2.20\%$; 69.18% UU, 27.40% UK and

3.42% KK) do not differ from those of the controls, disagreeing with results from HASHIM *et al.* (2001) and in accordance with those from JOHANSEN *et al.* (2003); 2) In these patients, the group with the K variant showed greater mean waist-hip ratio (WHR = 0.97 ± 0.01) than the usual group (0.93 ± 0.01 ; $p = 0.023$) and lower mean BChE activity (5.68 ± 0.18 KU/L) than the usual group (6.33 ± 0.15 KU/L; $p < 0.02$); 3) The mean WHR raises with triglycerides, body mass index (BMI), in men and in diabetics with the K variant; 4) The frequency of this variant in the group with the Metabolic Syndrome ($22.02\% \pm 3.20\%$) is higher ($p = 0.027$) than in those without it ($11.22\% \pm 3.19\%$), suggesting that the K variant predisposes to higher WHR in type 2 DM and, consequently, to higher risk of Metabolic Syndrome, since WHR is used for the diagnosis of this syndrome.

1. INTRODUÇÃO

A butirilcolinesterase humana é uma enzima produzida no fígado, presente no plasma e nos principais sistemas do organismo. Juntamente com a acetilcolinesterase, presente nos eritrócitos, forma a classe das colinesterases. Embora seja capaz de hidrolisar diversos ésteres de colina, seu substrato natural e função são desconhecidos.

Estudos bioquímicos mostram que a forma globular tetramérica, de subunidades idênticas, é a mais estável e predominante em amostras de soro, parecendo ser a forma em que essa enzima é secretada. Entretanto, é possível evidenciar em eletroforese até 12 bandas, o que demonstra a existência de diferentes formas moleculares, homólogas e heterólogas.

A BChE (butirilcolinesterase) é codificada por um gene localizado no braço longo do cromossomo 3, que existe como entidade única no genoma. Este gene possui pelo menos 73Kb, e é composto por 4 exons, sendo que o exon 2 contém 83% da seqüência que codifica a proteína e inclui o sítio serino-ativo.

A variabilidade do loco *BCHE* começou a ser investigada na década de 50, a partir da ocorrência de casos de apnéia prolongada em pacientes submetidos à succinilcolina. Mostrou-se que tais pacientes possuíam uma forma variante da enzima, chamada "atípica", incapaz de degradar adequadamente aquele relaxante muscular pré-anestésico, em doses fisiológicas. Desde então, diversas variantes foram sendo descobertas, a partir de técnicas bioquímicas, estudos familiares e, mais recentemente, por técnicas moleculares.

Condições associadas com metabolismo anormal de lípides, como por exemplo: obesidade, hiperlipoproteinemias, hipertensão e diabetes mellitus, mostram atividade

média aumentada da butirilcolinesterase. Esses dados têm mostrado um envolvimento desta enzima no metabolismo de lípides.

Alguns estudos mostraram associação positiva entre uma variante genética da BChE, chamada K, e doença de Alzheimer e um estudo (HASHIM e cols., 2001) mostrou esse tipo de associação com o diabetes do tipo II. Ambas são doenças degenerativas, de causas complexas e relacionadas com a idade. Considerando-se a região codificadora, o alelo que condiciona a variante K é o mais freqüente entre os chamados "não usuais", em vários grupos étnicos estudados. Em Curitiba, sua freqüência é aproximadamente 17%. No presente trabalho, a freqüência desse alelo será determinada em uma amostra de diabéticos, procurando-se investigar se existe associação entre essa variante e o diabetes mellitus.

Este estudo é, também, parte integrante do projeto "Variabilidade da Butirilcolinesterase no Diabetes Mellitus", registrado no sistema Thales sob o número 2000007694, coordenado pela Dra. Vânia M. de Alcântara (Departamento de Patologia Médica) e que tem os seguintes objetivos principais: relacionar as variantes da butirilcolinesterase com o metabolismo geral dos pacientes diabéticos; verificar a variabilidade fenotípica dos locos *BCHE* e *CHE2* nestes pacientes; estudar as variantes ao nível do DNA, comparando suas freqüências com as da população geral de Curitiba.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 NOMENCLATURA

Adotamos a nomenclatura proposta por LA DU e cols. (1991). A butirilcolinesterase é designada por BChE e o gene que a condiciona por *BCHE*. Um asterisco é acrescido ao símbolo do gene para referir-se ao alelo, seguido da posição e do símbolo do aminoácido que substitui a forma usual. Por exemplo, em *BCHE*70G* a variante apresenta uma glicina na posição 70 no lugar de ácido aspártico da forma usual. Uma barra separa alelos e indica cromossomos homólogos. No mesmo trabalho os autores sugerem a utilização, sempre que possível, dos nomes comuns das principais variantes, estabelecidos na literatura.

Alguns exemplos são mostrados na tabela 1.

Tabela 1 – Exemplos da nomenclatura proposta por LA DU e cols. (1991)

Fenótipo	Genótipo	Abreviatura
Usual	<i>BCHE</i>	UU
Atípico	<i>BCHE*70G/BCHE*70G</i>	AA
Atípico	<i>BCHE*70G/BCHE*70G539T</i>	A/AK
Intermediário	<i>BCHE/BCHE*70G</i>	UA

Neste trabalho serão utilizadas as seguintes abreviaturas: KK, UK e UU, respectivamente, para os indivíduos que apresentam a mutação K em homozigose, em heterozigose e para os que não a apresentam.

2.2 ESTERASES

As esterases compreendem uma ampla variedade de enzimas presentes nos vertebrados. De acordo com a União Internacional de Bioquímica, são enzimas capazes de realizar a hidrólise de ligações éster e, em humanos, são divididas em três classes, conforme o substrato sobre o qual preferencialmente atuam. As arilesterases ou esterases aromáticas hidrolisam ésteres aromáticos. As aliesterases apresentam maior afinidade por ésteres alifáticos; e as colinesterases são mais eficientes na hidrólise de ésteres de colina (SOMORIN E SKOREPA, 1978). As colinesterases são inibidas pela fisostigmina na concentração de 10^{-5} M, o que as diferencia das demais esterases (AUGUSTINSSON, 1963). Há dois tipos de colinesterases humanas: a butirilcolinesterase (EC 3.1.1.8.) ou colinesterase do soro, que age sobre diversos ésteres de colina, mas é mais eficiente sobre a butirilcolina, e a acetilcolinesterase (EC 3.1.1.7.), presente principalmente nos eritrócitos e junções neuromusculares, nas quais regula os níveis de acetilcolina.

2.3 ESTRUTURA E FORMAS MOLECULARES DA BChE

HARRIS e cols. (1962) encontraram quatro bandas com atividade da BChE humana em eletroforese de gel de amido, que foram chamadas de C₁ a C₄. Estudos posteriores mostraram que C₁ corresponde ao monômero, C₃ ao dímero e C₄ ao tetrâmero (MUENSCHÉ e cols., 1976). A banda C₂ é resultado da ligação do monômero à albumina (MASSON, 1989). HARRIS e cols. (1962) observaram que alguns indivíduos exibiam uma banda adicional da BChE, quando utilizaram eletroforese bidimensional em papel e em gel de amido. A presença dessa banda adicional, chamada de C₅, caracteriza o fenótipo CHE2 C5⁺ e a sua ausência, o fenótipo CHE2 C5⁻. Essa característica é controlada pelo loco *CHE2*, que apresenta dois alelos: *CHE2*5⁺* e *CHE2*5⁻*. Indivíduos CHE2 C5⁺

representam cerca de 10% da população brasileira (CHAUTARD-FREIRE-MAIA e cols., 1991) e apresentam atividade enzimática da BChE superior à de indivíduos C₂ C₅ (HARRIS, 1980). Admite-se que o loco *CHE2* codifica uma substância que se liga à BChE e forma o complexo C₅ (MASSON, 1991).

A forma predominante e de maior atividade no plasma é o tetrâmero, constituído por um dímero de dímeros de subunidades idênticas. As subunidades de cada dímero estão unidas por uma ligação dissulfeto e os dímeros unem-se através de forças hidrofóbicas não covalentes. Cada monômero se constitui em uma cadeia de 574 resíduos de aminoácidos, com 9 cadeias de carboidratos ligadas a 9 aspáraginas (LOCKRIDGE e cols., 1987). As cadeias de carboidratos parecem não interagir com moléculas do substrato pois estariam distantes da entrada do sítio esterásico (MILLARD e BROOMFIELD, 1992). Modelos teóricos da estrutura tridimensional da BChE, baseados na sua similaridade com a AChE, sugerem que o sítio esterásico estaria localizado no interior da molécula e ligado ao exterior por um túnel, cuja triade catalítica seria formada por serina na posição 198, ácido glutâmico em 325 e histidina em 438 (SHAFFERMAN e cols., 1992). NICOLET e cols. (2003) obtiveram cristalização da BChE e através da análise de difração de raios-X, obtiveram resultados que, basicamente, confirmaram a estrutura proposta nos modelos teóricos.

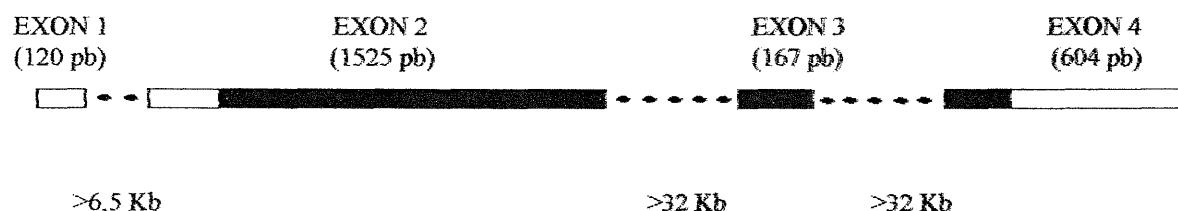
ALCÂNTARA (2000), utilizando gel de poliacrilamida, confirmou o aparecimento de 12 bandas de atividade da BChE em eletroforese, mostradas inicialmente por JUUL (1968), o que sugere a existência de outras formas moleculares heterólogas da butirilcolinesterase, além de C₂ e de C₅.

2.4 O GENE *BCHE* LOCALIZAÇÃO E ESTRUTURA

YANG e cols. (1984) atribuíram a localização do loco da transferrina (*TF*) ao cromossomo 3. A ligação entre os locos *BCHE* e *TF* já havia sido demonstrada por ROBSON e HARRIS (1966). Posteriormente, SOREQ e cols. (1987) utilizando DNAc como sonda para hibridização *in situ* mapearam o loco *BCHE* em 3q21-26 e GAUGHAN e cols. (1991), ao utilizarem uma sonda amplificada por PCR e contendo a região do sítio ativo, obtiveram um sinal único de hibridização e refinaram a localização para 3q26.1-q26.2.

ARPAGAUS e cols. (1990), utilizando DNAc da butirilcolinesterase humana, isolaram clones de uma biblioteca genômica contendo o gene *BCHE* e, através da análise de mapas de restrição, puderam delinear sua estrutura. Esse gene é composto por 4 exons, intercalados por 3 introns. A região que codifica a proteína madura abrange parte do exon 2, todo o exon 3 e parte do exon 4, conforme mostrado na figura 1.

FIGURA 1. Desenho esquemático do gene *BCHE*. A área escura (1722 pb) representa a região que codifica a proteína.



2.5 VARIABILIDADE GENÉTICA

Diversos alelos são responsáveis pela variabilidade da butirilcolinesterase, muitos deles descobertos a partir de pacientes com resposta incomum à succinilcolina. As técnicas clássicas de fenotipagem baseiam-se na quantificação da atividade enzimática sobre substratos como a benzoilcolina e o-alfa-naftil acetato e na resistência diferencial a inibidores como a dibucaina e o fluoreto de sódio.

O aperfeiçoamento das técnicas de análise do DNA permitiu a determinação da base molecular de variantes conhecidas e a descoberta de novas mutações.

KALOW e GENEST (1957) demonstraram, pela primeira vez, a existência de uma enzima qualitativamente diferente da “usual”, denominada “atípica”. McGUIRE e cols. (1989) mostraram que esta diferença deve-se a uma mutação de ponto no nucleotídeo 209, alterando o códon 70 de GAT para GGT. Os mesmos autores sugeriram que a substituição de um ácido aspártico por uma glicina geraria uma modificação no sítio aniónico da enzima, o que explicaria sua afinidade reduzida por ésteres de colina. A freqüência do alelo “atípico”, *BCHE*70G*, foi estimada em cerca de 2% em populações caucasóides (WHITTAKER, 1986).

HARRIS e WHITTAKER (1961) utilizaram o fluoreto de sódio como inibidor diferencial e descreveram uma outra variante, chamada “resistente ao fluoreto”. A freqüência desse alelo foi estimada em 0,49 % em nordestinos (SIMPSON E KALOW, 1965) e 0,51% e 0,61% em amostras da população de Curitiba, por ALCÂNTARA e cols. (1988) e FADEL-PICHETH (1991), respectivamente. Posteriormente, NOGUEIRA e cols. (1992) mostraram que esse fenótipo é heterogêneo, distinguindo dois grupos: “fluoreto 1”, condicionado pelo alelo *BCHE*243M* e “fluoreto 2” condicionado pelo alelo *BCHE*390V*. SOUZA (2001) estudou uma amostra da população de Curitiba

através da análise direta do DNA e encontrou uma freqüência de 0,07% do alelo *BCHE*243M* e de 0,34% do alelo *BCHE*390V*.

A variante K (em homenagem a Werner Kalow) da butirilcolinesterase foi descrita pela primeira vez por RUBINSTEIN e cols. (1978). Estudaram duas famílias nas quais indivíduos heterozigotos para a variante “atípica” apresentavam inibição diminuída pela dibucaína e redução de 33% na atividade enzimática, quando comparada com a enzima usual. Essa redução deve-se ao número menor de moléculas circulantes, por degradação acelerada da enzima ou síntese diminuída. A mutação K causa a substituição de uma alanina por treonina na posição 539. Em cerca de 89% dos casos da mutação “atípica”, ela está em cis com a mutação K (BARTELS e cols., 1992a).

O alelo *BCHE*539T* (mutação K) é o mais freqüente entre os alelos não usuais da região codificadora do loco *BCHE*. As freqüências desse alelo, estimadas por SOUZA e cols. (1998), foram de 18,4% em euro-brasileiros ($N = 190$) e de 17,1% em miscigenados oriundos de europeus e africanos ($N = 82$), em amostras coletadas em Curitiba. Posteriormente, SOUZA (2001), ao ampliar a amostra de euro-brasileiros ($N = 898$), encontrou uma freqüência de 17,8%.

A variante J da BChE, relatada em membros de uma família estudada por GARY e cols. (1976), produz uma redução de aproximadamente dois terços no número de moléculas circulantes da enzima e é causada por uma mutação que substitui o ácido glutâmico, na posição 497, por uma valina (BARTELS e cols., 1992b).

Os fenótipos silenciosos são caracterizados por reduções maiores que 90% na atividade enzimática. São muito raros e mostram grande heterogeneidade genética. Vários alelos determinantes desta condição já foram descritos e são apresentados na tabela 2, juntamente com outras variantes genéticas do loco *BCHE*.

Tabela 2 - Lista de variantes já descritas do gene *BCHE*, incluindo nome, fenótipo, alteração de aminoácido, alteração de DNA, nome do alelo e referências bibliográficas.

NOME	FENÓTIPO	ALTERAÇÃO DE AA	ALTERAÇÃO DE DNA	ALELO	REFERÊNCIA
Usual	Normal	Nenhuma	Nenhuma	<i>BCHE</i>	
Neutra rara	Normal	255Glu->Asp	nt 764 GAG->GA?	<i>BCHE*255D</i>	Primo-Parmo e cols. 1996
RESISTENTES A INIBIDORES					
Atípica	dibucaina	70Asp->Gly	nt 209 <u>GAT</u> -> <u>GGT</u>	<i>BCHE*70G</i>	McGuire e cols. 1989
Fluoreto-1	fluoreto	243Thr->Met	nt 728 <u>ACG</u> -> <u>ATG</u>	<i>BCHE*243M</i>	Nogueira e cols. 1992
Fluoreto-2	fluoreto	390Gly->Val	nt 1169 <u>GGT</u> -> <u>GTT</u>	<i>BCHE*390V</i>	Nogueira e cols. 1992
ATIVIDADE DIMINUÍDA, EM RELAÇÃO À USUAL, FRENTE A DETERMINADO SUBSTRATO					
SC	Succinil-colina	184Ala->Val	nt 551 <u>GCC</u> -> <u>GTC</u>	<i>BCHE*184V</i>	Greenberg e cols. 1995
ATIVIDADE GERAL DIMINUÍDA, EM RELAÇÃO À USUAL					
K (Kalon)	70%	539Ala->Thr	nt 1615 <u>GCA</u> -> <u>ACA</u>	<i>BCHE*539T</i>	Bartels e cols. 1992a
J (James)	30%	497Glu->Val	nt 1490 <u>GAA</u> -> <u>GTA</u>	<i>BCHE*497V</i>	Bartels e cols. 1992b
H (Hamersmith)	10%	142Val->Met	nt 424 <u>GTG</u> -> <u>ATG</u>	<i>BCHE*142M</i>	Jensen e cols. 1992
ATIVIDADE MENOR QUE 10% DA USUAL OU AUSENTE					
Silenciosa	Expressão reduzida	4 Deleção Ile	nt 9-11 <u>CATCAT</u> -> <u>CAT</u>	<i>BCHE*FS4</i>	Maekawa e cols. 1997
Silenciosa	Truncada	Desloc. no códon 6 ¹	nt 16 <u>ATT</u> -> <u>TT</u>	<i>BCHE*FS6</i>	Primo-Parmo e cols. 1996
Silenciosa	Expressão reduzida	24Thr->Met	nt 71 <u>ACG</u> -> <u>ATG</u>	<i>BCHE*24M</i>	Maekawa e cols. 1997
Silenciosa	Enzima inativa ²	33Tyr->Cys	nt 98 <u>TAT</u> -> <u>TGT</u>	<i>BCHE*33C</i>	Primo-Parmo e cols. 1996
Silenciosa	Expressão reduzida	37Pro->Ser	nt 109 <u>CCT</u> -> <u>TCT</u>	<i>BCHE*37S</i>	Primo-Parmo e cols. 1996
Silenciosa	Expressão reduzida	100Pro->Ser	nt 298 <u>CCA</u> -> <u>TCA</u>	<i>BCHE*100S</i>	Maekawa e cols. 1997

continua

NOME	FENÓTIPO	ALTERAÇÃO DE AA	ALTERAÇÃO DE ADN	ALELO	REFERÊNCIA
Silenciosa	Ausente	117Gly-> Códon stop ³ no aa 129	nt 351 <u>GGT</u> -> <u>GGAG</u>	<i>BCHE*FS117</i>	Nogueira e cols. 1990
Silenciosa		119Gln->stop	nt 355 <u>CAA</u> -> <u>TAA</u>	<i>BCHE*119STOP</i>	Sudo e cols. 1996
Silenciosa	Expressão reduzida	125Leu->Phe	nt 375 <u>TTA</u> -> <u>TTT</u>	<i>BCHE*125F</i>	Primo-Parmo e cols.1996
Silenciosa		128Tyr->Cys	nt 383 <u>TAT</u> -> <u>TGT</u>	<i>BCHE*128C</i>	Hidaka e Iuchi, 1995
Silenciosa	Expressão reduzida	170Asp->Glu	nt 510 <u>GAT</u> -> <u>GAG</u>	<i>BCHE*170E</i>	Primo-Parmo e cols.1996
Silenciosa	Ausente	172Gln->STOP	nt 514 <u>CAG</u> -> <u>TAG</u>	<i>BCHE*172STOP</i>	Gärtke e cols. 2001
Silenciosa	Enzima inativa	198Ser->Gly	nt 592 <u>AGT</u> -> <u>GGT</u>	<i>BCHE*198G</i>	Primo-Parmo e cols.1996
Silenciosa	Expressão reduzida	199Ala->Val	nt 596 <u>GCA</u> -> <u>GTA</u>	<i>BCHE*199V</i>	Sakamoto e cols. 1998
Silenciosa	Enzima inativa	201Ala->Thr	nt 601 <u>GCA</u> -> <u>ACA</u>	<i>BCHE*201T</i>	Primo-Parmo e cols.1996
Silenciosa	Expressão reduzida	203Ser->Pro	nt 607 <u>TCA</u> -> <u>CCA</u>	<i>BCHE203P</i>	Hidaka e cols. 2001
Silenciosa		250Thr->Pro	nt 748 <u>ACT</u> -> <u>CCT</u>	<i>BCHE*250P</i>	Maekawa e cols. 1995
Silenciosa	Expressão reduzida	267Lys->Arg	nt 800 <u>AAA</u> -> <u>AGA</u>	<i>BCHE*267R</i>	Maekawa e cols. 1997
Silenciosa	Truncada	271Glu->stop	nt 811 <u>GAA</u> -> <u>TAA</u>	<i>BCHE271STOP</i>	Primo-Parmo e cols.1996
Silenciosa	Sem atividade	315Thr->stop aa 330 ⁴	ACC -> <u>AACC</u>	<i>BCHE*FS315</i>	Hidaka e cols. 1992
Silenciosa		315Cys->stop	nt 944 ACC-> <u>AACC</u>	<i>BCHE*315STOP</i>	Hidaka e Iuchi, 1995
Silenciosa	Reduzida ⁵	330Leu->Ile	nt 988 <u>TAA</u> -> <u>ATA</u>	<i>BCHE*330I</i>	Sudo e cols. 1997
Silenciosa	Sem atividade	355Lys->Alu (stop) ⁶	nt 1062 - 1076	<i>BCHE*355ALU</i>	Muratani e cols. 1991
Silenciosa		365Gly->Arg	nt 1093 <u>GGA</u> -> <u>CGA</u>	<i>BCHE*365R</i>	Hada e cols. 1992
Silenciosa	Ausente	400Cys->stop	nt 1200 <u>TGC</u> -> <u>TGA</u>	<i>BCHE*400STOP</i>	Hidaka e Iuchi, 1995

continua

NOME	FENÓTIPO	ALTERAÇÃO DE AA	ALTERAÇÃO DE ADN	ALELO	REFERÊNCIA
Silenciosa		418Phe->Ser	nt 1253 <u>TTC</u> -> <u>TCC</u>	<i>BCHE*418S</i>	Maekawa e cols. 1995
Silenciosa	Sem atividade	465Arg->stop	nt 1393 <u>AGA</u> -> <u>TGA</u>	<i>BCHE*465STOP</i>	Maekawa e cols. 1995
Silenciosa	Expressão reduzida	471Trp->Arg	nt 1411 <u>TGG</u> -> <u>CGG</u>	<i>BCHE*471R</i>	Primo-Parmo e cols.1996
Silenciosa	Truncada	Process. alterado	nt -8 ⁷ <u>T</u> -> <u>G</u>	<i>BCHE*12E3-8G</i>	Primo-Parmo e cols.1996
Silenciosa	Truncada	500Tyr->stop	nt 1500 <u>TAT</u> -> <u>TAA</u>	<i>BCHE*500STOP</i>	Primo-Parmo e cols.1996
Silenciosa		515Arg->Cys	nt 1543 <u>CGT</u> -> <u>TGT</u>	<i>BCHE*515C</i>	Maekawa e cols. 1995
Silenciosa	Expressão reduzida	518Gln->Leu	nt 1553 <u>CAA</u> -> <u>CTA</u>	<i>BCHE*518L</i>	Primo-Parmo e cols.1996
MUTAÇÃO COM EXPRESSÃO NÃO DESCRITA					
ND	Não descrita	425Ser->Pro	nt 1273 <u>TCC</u> -> <u>CCC</u>	<i>BCHE*425P</i>	Gnatt e cols.1990
MUTAÇÃO SINÔNIMA					
Sinônima	Usual	470Arg->Arg	nt 1410 <u>CGT</u> -> <u>CGG</u>	<i>BCHE</i>	Maekawa e cols.1995
MUTAÇÕES EM REGIÕES NÃO CODIFICADORAS					
Exon 1	Usual ⁸		nt -116 <u>G</u> -> <u>A</u>	<i>BCHE</i>	Bartels e cols. 1992a
Exon 4	Usual ⁹		nt 1914 <u>A</u> -> <u>G</u>	<i>BCHE</i>	Bartels e cols. 1992a

Nota: Exon 1 (nts -212 a -93); Exon 2 (nts -92 a 1433); Exon 3 (nts 1434 a 1600); Exon 4 (nts 1601 a 2.205)

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

2.6 FUNÇÃO DA BChE

Apesar da butirilcolinesterase apresentar uma ampla distribuição em diferentes tecidos humanos, a sua função biológica ainda não está esclarecida.

Desde a verificação de uma correlação positiva entre a atividade da BChE e o teor de gordura subcutânea (BERRY e cols., 1954), vários trabalhos têm indicado algum envolvimento desta enzima com o metabolismo de lípides. A atividade da BChE está aumentada em distúrbios como diabetes (ANTOPOL e cols., 1937), obesidade (CUCUIANU e cols., 1968), hiperlipoproteinemia (CUCUIANU e cols., 1975) e correlacionada com os níveis de triglicerídeos (MAGARIAN e DIETZ, 1987), VLDL e LDL (CHU e cols., 1978). Há evidências de que a BChE formaria, por meio de uma ligação física, um complexo com LDL e participaria na origem da LDL (KUTTY, 1980). Além disso, foi mostrado que indivíduos CHE2 C5+ com banda C₅ forte têm, em média, menor peso que seus controles CHE2 C5- (CHAUTARD-FREIRE-MAIA e cols., 1991), IMC menor que os CHE2 C5- e que os CHE2 C5+ de banda C₅ fraca (ALCÂNTARA e cols., 2001).

LAYER (1983), estudando cérebro de embriões de galinha, observou que tanto a BChE como a AChE são expressas bem antes da sinaptogênese e que existe uma relação espaço-temporal entre essas duas enzimas. Isto levou a propor um papel não sináptico das duas enzimas e que a butirilcolinesterase regularia a expressão da acetilcolinesterase. Levando em conta a íntima associação da BChE com a proliferação celular no tubo neural de embriões de galinha, LAYER (1983) sugeriu uma função para a BChE no crescimento celular. O mesmo autor (LAYER, 1991) mostrou uma ação mitogênica da BChE purificada em células neurais *in vitro*, e que inibidores da BChE afetam a proliferação

celular. SOREQ E ZAKUT (1993) mostraram uma elevada atividade da BChE em sistemas proliferativos como o hematopoético e em tumores.

Além de hidrolisar ésteres de colina, a BChE apresenta atividade de aril acilamidase amino sensitiva (AAA), frente ao substrato o-nitroacetanilato (BALASUBRAMANIAN e BHANUMATHY, 1993). Os mesmos autores especulam a possibilidade da BChE degradar analgésicos endógenos, possivelmente existentes no organismo. Argumentam que o paracetamol e o fenacetin apresentam na sua estrutura a ponte acil-amida, semelhante àquela clivada pela AAA e que pacientes com enxaqueca apresentam excesso de tiramina, uma das substâncias que estimulam a atividade de AAA da BChE.

2.7 DIABETES MELLITUS

As informações a seguir, referentes à definição e à classificação do diabetes mellitus, são baseadas em documento da Organização Mundial de Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1999).

O diabetes mellitus (DM) é uma doença crônica e degenerativa, caracterizada por concentração elevada de glicose no sangue, decorrente da deficiência na produção de insulina pelo pâncreas ou de um contexto metabólico no qual a insulina é incapaz de exercer adequadamente seu papel.

A glicotoxicidade instalada é acompanhada de distúrbios no metabolismo de lípides, carboidratos e proteínas, o que pode comprometer seriamente vários órgãos, principalmente os rins, olhos, nervos e vasos sanguíneos. As doenças cardiovasculares representam a principal causa de mortalidade em pacientes diabéticos, os quais freqüentemente apresentam fatores de risco para essas doenças, como obesidade,

hipertensão e dislipidemias. A hipertrigliceridemia, o nível baixo de HDL e a formação de partículas de LDL pequenas e densas, são as alterações lipídicas mais freqüentes nesses pacientes.

A classificação mais atual é baseada na etiologia da doença e não mais na dependência ou não de insulina por parte do doente. Pacientes com qualquer forma de diabetes podem necessitar de tratamento com insulina em algum estágio da doença.

O DM tipo 1 caracteriza-se pela destruição das células beta do pâncreas. Na maioria das vezes, esse processo de destruição é decorrente de doença auto-imune e pode ser detectado antes mesmo da doença manifestar-se clinicamente. Quando anticorpos anti-GAD (descarboxilase do ácido glutâmico), anticorpos anti-insulina ou anti-células beta das ilhotas de Langerhans estão presentes, a existência desse processo é identificada. Principalmente crianças e adolescentes podem apresentar cetoacidose como primeira manifestação da doença. Alguns indivíduos mostram hiperglicemia leve após jejum, que pode evoluir rapidamente para hiperglicemia severa e/ou cetoacidose, na presença de infecção ou de alguma forma de estresse orgânico. Outros, geralmente adultos, podem apresentar função residual das células beta, suficiente para prevenir cetoacidose por muitos anos.

O DM tipo 2 é a forma mais comum, abrange cerca de 90% dos casos e aparece geralmente na idade adulta. Resulta, em geral, de graus variáveis de resistência à insulina e deficiência relativa de secreção de insulina. Freqüentemente, esta forma de diabetes deixa de ser diagnosticada por muitos anos, pois a hiperglicemia não é severa o suficiente para provocar sintomas evidentes de diabetes. Mesmo assim, neste estágio, há um risco aumentado de desenvolver complicações micro e macrovasculares. Há, provavelmente, diversos mecanismos diferentes que podem resultar nesta forma de diabetes e é provável

que o número de pessoas, nesta categoria, diminua no futuro, quando a identificação de defeitos genéticos e processos patogênicos específicos, permita uma melhor diferenciação e uma classificação mais definitiva. Dessa forma, esses casos migrariam para a categoria “outros tipos específicos”, descrita mais adiante. Embora a etiologia específica do diabetes tipo 2 não seja conhecida, por definição, não ocorre destruição autoimune de células pancreáticas e tais pacientes não apresentam nenhuma das causas da categoria “outros tipos específicos”. A maioria dos pacientes com o diabetes tipo 2 é obesa, o que pode causar ou agravar a resistência à insulina. A cetoacidose não é frequente neste tipo de diabetes. Alguns pacientes podem apresentar, ao mesmo tempo, hiperglicemia e níveis normais ou até elevados de insulina o que caracteriza a resistência à insulina. Por outro lado, alguns indivíduos têm ação normal da insulina, mas secreção marcadamente diminuída.

A categoria “outros tipos específicos” inclui causas menos comuns de diabetes mellitus, mas cujo defeito subjacente ou processo de doença pode ser identificado de uma maneira relativamente específica. A tabela 3 lista estes tipos específicos.

O diabetes gestacional é a intolerância a carboidratos, que resulta em hiperglicemia de severidade variável, reconhecida pela primeira vez durante a gestação. Isto não exclui, entretanto, que a intolerância à glicose anteceda a gravidez e que possa não ter sido reconhecida. A definição de diabetes gestacional independe da utilização ou não de insulina no tratamento, ou se a condição persistirá ou não após a gravidez (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1999).

Os sintomas clássicos do diabetes são a sede e fome excessiva, poliúria e perda de peso, mas variam muito em grau, podendo até estar ausentes em muitos casos.

Tabela 3. Outros tipos específicos de diabetes.

Defeitos funcionais das células beta^a
Cromossomo 20, <i>HNF4α</i> (MODY1)
Cromossomo 7, glucoquinase (MODY2)
Cromossomo 12, <i>HNFIα</i> (MODY3)
Cromossomo 13, <i>IPF-1</i> (MODY4)
Mutação 3243, DNA mitocondrial
Outros
Defeitos genéticos na ação da insulina
Resistência tipo A à insulina
Leprechaunismo
Síndrome de Rabson-Mendenhall
Diabetes Lipoatrófica
Outros
Doenças do pâncreas exócrino
Pancreopatia de cálculo fibroso
Pancreatites
Trauma/ pancreatotomia
Neoplasia
Fibrose cística
Hemocromatose
Outras
Endocrinopatias
Síndrome de Cushing
Acromegalia
Feocromocitoma
Glucagonoma
Hipertireoidismo
Somatostatinoma
Outras
Induzidos por fármacos ou agentes químicos
Infecções
Rubéola congênita
Citomegalovírus
Outras
Formas incomuns de diabetes imuno-mediado
Síndrome da insulina autoimune (anticorpos para insulina)
Receptor de anticorpos anti-insulina
Síndrome "Stiff Man"
Outras
Outras síndromes genéticas

^a MODY: maturity-onset diabetes of the young

As informações a seguir, referentes aos procedimentos diagnósticos, são recomendações da Sociedade Brasileira de Diabetes.

O diagnóstico utiliza os valores de dosagem de glicose no plasma, após jejum de 8 a 12 horas e do TTG (teste de tolerância à glicose) após administração de 75g de glicose por via oral. Os estágios clínicos variam desde a normalidade, passando para a glicemia de jejum alterada e ou tolerância diminuída à glicose, até o DM propriamente dito. Os valores de referência, atualmente utilizados, são mostrados na tabela 4. Os testes devem ser sempre repetidos para a confirmação do diagnóstico.

Tabela 4. Valores de glicose plasmática em mg/dl, para diagnóstico do diabetes mellitus e seus estágios pré-clínicos.

Estágio	Jejum	2h após administração de 75 g de glicose	Casual
Glicemia de jejum alterada	> 110 e < 126	< 140 (se realizada)	
Tolerância diminuída à glicose	< 126 e	≥ 140 e < 200	
DM	≥ 126 ou	> 200 ou	≥ 200 (com sintomas clássicos do DM)

Valor “casual” é a glicemia medida sem observar jejum. Quando este valor é ≥ 200mg/dl, acompanhado dos sintomas clássicos, é indicador de DM.

A realização do teste de sobrecarga de 75 gramas de glicose é indicada quando a glicose plasmática de jejum é ≥ 110mg/dl e < 126 mg/dl ou quando é < 110 mg/dl mas o

paciente apresenta dois ou mais fatores de risco para DM e idade ≥ 45 anos. Os fatores de risco para o diabetes mellitus são os seguintes: idade ≥ 45 anos, história familiar de DM (pais, filhos e irmãos), excesso de peso (IMC $\geq 25\text{Kg/m}^2$), sedentarismo, HDL-C baixo ou triglicerídeos elevados, hipertensão arterial, doença coronariana, DM gestacional prévio, história de abortos de repetição ou mortalidade perinatal ou macrossomia, uso de medicação hiperglicemiante (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2000).

2.8 BChE e DIABETES

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

ABBOT e cols. (1993) encontraram valores elevados de atividade da BChE em pacientes diabéticos com hipertrigliceridemia. Os níveis de BChE e triglicerídeos 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 peptídio-C, no soro de indivíduos portadores de diabetes mellitus do tipo 2 (NISTOR e cols., 1998). O peptídio-C é secretado na circulação juntamente com a insulina em resposta à estimulação das células beta pancreáticas e sua função biológica tem sido relacionada ao estabelecimento da estrutura terciária e quaternária da pró-insulina (RIZK e DUNBAR, 2004).

Ratos hiperídicos mostraram níveis elevados de BChE no plasma e no fígado e apresentaram metabolismo alterado de VLDL (KUTTY e cols., 1981). Diabetes induzida por estreptozotocina (substância antitumoral), em ratos, resultou em aumento nos níveis de BChE, triglicerídeos, VLDL e glicerol. O controle deste estado com insulina provocou a normalização

destes níveis. A administração de um inibidor específico da BChE também reverteu os níveis elevados de TG, VLDL e glicerol (ANNAPURNA e cols., 1991).

Algumas evidências sugerem uma relação fisiológica diferenciada da insulina, nos fenótipos do loco *CHE2* (ALCÂNTARA e cols., 2003). Os autores mostraram que obesos de fenótipo *CHE2 C5+* apresentaram, em média, níveis significativamente maiores de insulina no sangue, quando estavam com maior peso, do que quando apresentavam menor peso. Isto, entretanto, não se verificou em indivíduos com o fenótipo *CHE2 C5-*. Quando foi quantificada a atividade relativa do complexo C_5 , encontrou-se uma correlação negativa entre essa variável e o nível de insulina.

WELTER e cols. (2002) observaram que a intensidade do complexo C_5 entre diabéticos do tipo 1 é significativamente maior que em diabéticos tipo 2.

HASHIM e cols. (2001) estudaram uma amostra de pacientes diabéticos do tipo 2 e encontraram uma associação positiva entre este distúrbio e a variante K da BChE. A freqüência do alelo *BCHE*539T* foi de 22,8% em 276 desses pacientes contra 15,8% em um grupo controle de 348 não diabéticos ($p = 0,00017$). As freqüências genotípicas também diferiram significativamente entre os dois grupos. O aumento no risco de desenvolver diabetes, associado à presença de K, 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 a variante K e uma disfunção das células beta pancreáticas. Para tanto, compararam a distribuição das freqüências alélicas e genotípicas nestes grupos e não encontraram nenhuma diferença estatisticamente significativa. Dessa forma, os autores sugerem que a associação encontrada entre a variante K e o diabetes mellitus 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 loco *BCHE*.

Entretanto, no presente trabalho, considerou-se que um fator de risco para a predisposição a uma doença, não está, necessariamente, associado à sua severidade.

2.9. SÍNDROME METABÓLICA

Freqüentemente pessoas com DM, ou mesmo com tolerância diminuída à glicose, apresentam, concomitantemente, outros fatores de risco para doença cardiovascular. Esta condição, caracterizada por uma agravante combinação de diferentes anormalidades metabólicas, é comum em uma ampla variedade de grupos étnicos e tem sido chamada, mais comumente, de Síndrome Metabólica (SM). Mesmo em indivíduos com tolerância normal à glicose, a SM representa um fator risco para DM do tipo 2 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1999).

A SM tem mostrado um grande avanço na sua incidência, por conta de alterações implementadas por hábitos de vida modernos: sedentarismo, dieta com alto teor de carboidratos refinados, gordura saturada e baixo teor de fibras, que implicam em última análise em ganho progressivo de peso, com especial atenção ao aumento da gordura intra-abdominal ou visceral (GRUNDY, 1999). Em vista disso, a Organização Mundial de Saúde propôs uma definição prática para a síndrome metabólica (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1999), baseada na presença dos seguintes componentes:

- a) Hipertensão: pressão arterial $\geq 140/90$ mmHg.
- b) Dislipidemia: triglicerídeos ≥ 150 mg/dL e ou HDL-C < 35 mg/dL para homens ou < 39 mg/dL para mulheres.
- c) Obesidade: razão cintura-quadril (RCQ) $> 0,85$ para mulheres e $> 0,90$ para homens e ou índice de massa corporal (IMC) ≥ 30 Kg/m².

- d) Microalbuminúria: taxa de excreção de albumina na urina $\geq 20 \mu\text{g}/\text{min}$ ou proporção albumina:creatinina $\geq 30 \text{ mg/g}$.

Individuos com DM do tipo 2, que apresentam dois ou mais desses fatores, são diagnosticados como apresentando Síndrome Metabólica.

2.10. HERANÇA GENÉTICA DO DIABETES MELLITUS

O diabetes mellitus é uma doença complexa que pode ser determinada por uma ampla variedade de fatores genéticos e ambientais. A influência genética, no desencadeamento de anormalidades metabólicas que levam ao estado diabético e suas complicações, varia desde a ação monogênica, característica de algumas formas mais raras, até a poligênica, responsável pelas formas mais comuns.

A identificação de genes que, de alguma forma, influenciam o grau de susceptibilidade à doença, tem utilizado os métodos clássicos de ligação, com informações de famílias, e os estudos de associação em amostras populacionais. Mais recentemente, as técnicas de estudo com marcadores moleculares têm sido utilizadas em amplos rastreamentos do genoma.

a) DM do tipo 1

Os genes do sistema HLA apresentam uma associação bastante forte com DM do tipo 1 e são responsáveis por uma parcela considerável (44%) do risco genético para essa doença. Os genes mais relacionados são os da classe II, região D (*DRB*, *DQA* e *DQB*), especialmente os alelos *DRB1*0401*, *DRB1*0402*, *DRB1*0405* e *DRB1*0301* (aumentam o risco) e *DRB1*1501* (efeito protetor). Como muitos alelos na região HLA apresentam forte desequilíbrio de ligação, como por exemplo, os alelos no loco *DRB* com alelos em *DQB*, é

muito provável que, no nível populacional, existam haplótipos de risco da região D do sistema HLA (revisão em FLOREZ e cols., 2003).

Uma região polimórfica de VNTR, localizada próxima ao sítio de início de transcrição do gene da insulina (11p15), representa um outro fator de risco bem estudado para o DM do tipo 1 e que afeta a expressão desse gene no timo, sugerindo uma importante participação da insulina no processo de tolerância e iniciação do processo de ataque autoimune na destruição das células beta (PUGLIESE e cols., 1997).

Pelo menos 20 locos, distribuídos em vários cromossomos (1, 2, 3, 5, 6, 10, 11, 14, 15, 16 e 18), mostraram ligação com o DM do tipo 1 em estudos de rastreamento do genoma, que utilizaram genes ou segmentos de DNA não codificadores, polimórficos, não necessariamente com alguma relação conhecida com a doença. Muitos desses estudos concordaram com resultados prévios, obtidos por estudos familiares ou de associação, ou os reforçaram. A maior parte dos locos foi nomeada como *IDDM* (insulin-dependent diabetes mellitus) e numerados de 1 a 18 por ordem de descoberta. Muitos desses locos estão fisicamente muito próximos, como por exemplo *IDDM7*, *IDDM12* e *IDDM13*, localizados em 2q31-35, uma região do cromossomo que contém o gene *CTLA4*, cuja relação com o DM do tipo 1 foi confirmada por vários estudos de associação (revisão em FLOREZ e cols., 2003).

b) DM do tipo 2

Uma grande quantidade de genes candidatos, cuja influência como fator de risco ao DM do tipo 2 foi investigada por estudos de associação, apresentou resultados significativos. Entretanto, a grande maioria desses estudos não pôde ser confirmada em trabalhos com outras populações (LOHMUELLER e cols., 2003).

Os polimorfismos que apresentaram as associações mais consistentes foram:

- 1) *PPARG* (peroxisome proliferator-activated receptor γ), localizado no cromossomo 3 (3p25), condiciona um fator de transcrição que desempenha papel central no desenvolvimento de adipócitos, sendo alvo da tiazolidinedione, droga usada no tratamento do DM do tipo 2. O alelo Pro12 confere um acréscimo de risco relativo de cerca de 25%, quando no estado homozigoto. Sua importância cresce na medida em que ficou demonstrado ser um alelo bastante frequente em populações européias e japonesas (DEEB e cols., 1998).
- 2) O gene *ABCC8*, localizado no cromossomo 6, codifica uma proteína que é alvo de uma ampla classe de medicamentos hipoglicemiantes e apresenta polimorfismos importantes no exon 18 (C→T nt 759) e no intron 24 (C→T nt -3).
- 3) O gene *KCNJ11*, adjacente ao *ABCC8* no cromossomo 6, apresenta uma variante (E23K) que confere risco aumentado para DM do tipo 2.

Vários estudos de rastreamento do genoma, com o uso de marcadores genéticos, têm identificado locos importantes, cujo polimorfismo pode conferir algum risco no desenvolvimento do DM do tipo 2. As regiões que apresentaram um LOD escore maior que 3,6, em pelo menos um estudo, e cuja ligação tem sido apoiada por outros trabalhos, são as seguintes: 1q25.3, 2q37.3, 3p24.1, 3q27 - qter, 10q26.13, 12q24.31 e 18p11.22. Pelo menos 17 outras regiões apresentaram resultados sugestivos de ligação (LOD escore entre 2,0 e 3,6), muitas delas também foram investigadas por outros laboratórios e os resultados foram confirmados.

c) Outras formas de diabetes

Algumas formas de diabetes comumente chamadas de MODY (maturity-onset diabetes of the young) e que afetam a função normal das células beta pancreáticas, levando à secreção

diminuída de insulina, apresentam herança monogênica com padrão autossômico dominante. Seus locos estão localizados nos cromossomos 7p, 12q, 13 e 20q. Duas outras formas, uma que afeta a conversão de pró-insulina em insulina, e outra, que resulta de um número reduzido de receptores de insulina, também apresentam padrão autossômico dominante.

Algumas mutações de ponto no DNA mitocondrial estão associadas com diabetes mellitus. A forma mais conhecida é uma substituição no gene do tRNA da leucina, o qual desempenha um importante papel na tradução de outros genes, envolvidos na fosforilação oxidativa.

Existem ainda várias formas de diabetes, relativamente raras, manifestadas em conjunto com síndromes ou anormalidades fisiológicas, que podem apresentar padrão monogênico de herança.

3. OBJETIVOS

- 3.1. INVESTIGAR ASSOCIAÇÃO ENTRE A VARIANTE K (BCHE*539T) DA BUTIRILCOLINESTERASE E DIABETES MELLITUS DOS TIPOS 1 E 2.**

- 3.2. INVESTIGAR ASSOCIAÇÃO ENTRE A VARIANTE K E VARIÁVEIS BIOQUÍMICAS, ANTROPOMÉTRICAS, PRESSÕES ARTERIAIS E IDADE DE APARECIMENTO DA DOENÇA, EM DIABÉTICOS DOS TIPOS 1 E 2.**

- 3.3. INVESTIGAR RELAÇÃO DA VARIANTE K COM A SÍNDROME METABÓLICA EM DIABÉTICOS DO TIPO 2.**

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. AMOSTRAS

A amostra examinada nesta pesquisa foi coletada por intermédio do Ambulatório Especial de Diabetes do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná. É constituída de 249 pacientes, sendo 103 portadores de Diabetes Mellitus do tipo I e 146 portadores de Diabetes Mellitus do tipo 2.

O diagnóstico seguiu as recomendações da Sociedade Brasileira de Diabetes, onde são considerados: os valores de glicemia em jejum, a glicemia plasmática casual (definida como aquela realizada a qualquer hora do dia, sem observar o intervalo da última refeição), o teste de tolerância à glicose (TTG) e os sintomas clássicos do DM, que incluem poliúria, polidipsia e perda inexplicada de peso. O DM do tipo 1 é mais freqüentemente diagnosticado pela glicemia ao acaso e pela presença de sintomas, raramente pelo TTG. O critério de diferenciação entre DM do tipo 1 e DM do tipo 2 é o de tempo de permanência sem a necessidade de administração de insulina após o diagnóstico. Assim, se o paciente permaneceu sem receber insulina, por mais de um ano, é considerado do tipo 2.

Foram incluídos na amostra, consecutivamente, todos os pacientes com diabetes tipo 1 e 2, atendidos no Ambulatório Especial de Diabetes do Hospital de Clínicas, sem critérios de exclusão, à exceção do não comparecimento para a coleta. Os dados clínicos foram coletados sob a supervisão das Dras. Rosângela R. Réa, Rilene Figueiredo, Rosa Maria Vargas e Ana Cristina R. de Almeida.

As alíquotas de sangue foram coletadas com EDTA, após um jejum mínimo de 12 horas e centrifugadas a 2500 rpm por 20 minutos. O creme de leucócitos, com alguns

mililitros de hemácias, foi estocado a -20°C e, posteriormente, encaminhado ao Laboratório de Polimorfismos e Ligação para extração do DNA e genotipagem em relação à variante K da butirilcolinesterase.

O plasma foi utilizado para investigar os níveis de indicadores bioquímicos, bem como o grau de atividade da BChE e fenotipagem de outras variantes desta enzima, dentro do projeto “Variabilidade da Butirilcolinesterase no Diabetes Mellitus”, coordenado pela Dra. Vânia M. de Alcântara, professora do Departamento de Patologia Médica desta Universidade, co-orientadora deste trabalho e que supervisionou o processo de coleta das amostras de sangue e análises bioquímicas.

Além disso, das informações obtidas pela Dra. Vânia M. de Alcântara, utilizamos as seguintes variáveis: sexo, idade, peso, altura, índice de massa corporal (IMC), origem étnica, razão cintura quadril (RCQ), pressões arteriais sistólica e diastólica, idade de aparecimento do diabetes, colesterol total, triglicerídeos (TG), HDL-C, glicemia, hemoglobina glicosilada (HbA_{1C}), apolipoproteína B (Apo B), insulina, glicerol, alanina-aminotransferase (ALT), aspartato-aminotransferase (AST), atividade da butirilcolinesterase e fenótipos do loco *CHE2*.

A classificação dos indivíduos da amostra, quanto à origem étnica, foi realizada visualmente, baseando-se em características como a cor da pele, tipo de cabelo e forma dos lábios e nariz. Essa classificação permite indicar, de forma aproximada, a composição racial da amostra.

A idade média, calculada entre os portadores de Diabetes Mellitus do tipo 1 no momento da coleta, foi de $24,2 \pm 0,7$ anos (12 a 44 anos), a idade média de aparecimento do diabetes foi de $13,9 \pm 0,7$ anos, o IMC médio foi de $23,19 \pm 0,33$ (variando de 15,86 a

33,75). Predominam, neste grupo, os de origem euro-brasileira ($71,8\% \pm 4,4\%$) e os do sexo feminino ($60,2\% \pm 4,8\%$). A freqüência do fenótipo CHE2 C5+ foi de $13,59\% \pm 3,37\%$.

Entre os portadores de Diabetes Mellitus do tipo 2 observamos o seguinte: idade média de $55,2 \pm 0,9$ (19 a 77 anos), idade média de aparecimento do diabetes de $46,2 \pm 0,9$ anos (16,5 a 73 anos), IMC médio de $30,29 \pm 0,44$ (19,49 a 44,89), $60,9\% \pm 4,2\%$ de origem euro-brasileira, e $65,8\% \pm 3,9\%$ do sexo feminino. A freqüência do fenótipo CHE2 C5+ foi de $14,38\% \pm 2,90\%$.

Uma amostra de 944 doadores de sangue obtida do Centro de Hematologia do Paraná (HEMEPAR) em Curitiba, foi investigada em relação à variante K por Souza (2001) em nosso laboratório. As freqüências alélicas e genotípicas determinadas por esse autor em relação ao alelo *BCHE*539T*, foram usadas como controle para as comparações com as amostras de diabéticos. A idade média na amostra de doadores de sangue é de $30,8 \pm 0,3$ anos, predominando os de origem euro-brasileira ($95,1\% \pm 0,7\%$) e os do sexo masculino ($84,2\% \pm 1,2\%$).

Além disso, foram criadas a partir da amostra total de doadores de sangue ($N = 944$), duas sub-amostras controle, pareadas com os diabéticos dos tipos 1 e 2, pelo critério origem étnica, com $N = 103$ e $N = 146$, respectivamente.

4.2. MÉTODOS LABORATORIAIS

No Laboratório de Polimorfismos e Ligação da Universidade Federal do Paraná a extração do DNA foi feita de acordo com o método de LAHIRI e NURNBERGER (1991). A presença da variante K foi investigada por PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction-*

Restriction Fragment Length Polymorphism) através da técnica desenvolvida por SHIBUTA e cols. (1994), denominada PCR-PIRA (*Primer Introduced Restriction Analysis*). Adicionalmente, indivíduos classificados como “não usuais” por essa técnica, tiveram o DNA testado por SSCA (*Single Strand Conformation Analysis*). Uma amostra, cuja tipagem ficou duvidosa, foi submetida a seqüenciamento do DNA.

As demais análises foram realizadas pelo Laboratório de Bioquímica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (colesterol total, triglicerídeos, HDL-C, glicemia, insulina, AST e ALT), pelo Laboratório Frischmann Aisengart ($\text{HbA}_{1\text{C}}$ e Apo B) e pelo Laboratório de Bioquímica Clínica da Universidade Federal do Paraná (glicerol, atividade da butirilcolinesterase e fenotipagem do loco *CHE2*).

4.2.1. Extração do DNA

A extração do DNA de amostras de leucócitos de sangue periférico foi realizada de acordo com a técnica de LAHIRI e NURNBERGER (1991). Esta técnica caracteriza-se pelo uso de uma solução saturada de cloreto de sódio para promover a desidratação e a precipitação de proteínas, sem a necessidade de utilizar solventes orgânicos. Para promover a lise celular foi usado o Igepal-CA630 (Octilfenoxi-polietoxietanol; Sigma), em substituição ao Nonidet-P40 (Sigma).

Reagentes:

Tampão TKM1: 5 mL de tampão Tris-HCl-pH 7,6 1M, 5 mL de KCl 1M, 5 mL de MgCl_2 , 10 mL de EDTA 0,1M e 475 mL de água destilada.

Tampão TKM2: 0,5 mL de tampão Tris-HCl-pH 7,6 1M, 0,5 mL de KCL 1M, 0,5 mL de MgCl₂ 1M, 1mL de EDTA 0,1M, 20 mL de NaCl 1M e 27,5 mL de água destilada.

Tampão TE: 0,5 mL de tampão Tris-HCl-pH 8,0 1M, 0,5 mL de EDTA-pH 8,0 0,1M e 49 mL de água bidestilada.

Tampão Tris-HCl: 121,1 g de Tris, 700 mL de água destilada e HCl até alcançar o pH desejado.

O procedimento de extração segue os seguintes passos:

1. Descongelar o creme leucocitário e transferi-lo para tubos de centrifugação de 15 mL.
2. Completar o volume para 10 mL com tampão TKM1, que irá iniciar a solubilização de membranas.
3. Acrescentar 125 µL de IGEPAL e misturar bem o conteúdo, invertendo o tubo várias vezes.
4. Centrifugar a 2500 rpm por 20 minutos.
5. Desprezar o sobrenadante com cuidado e completar para 10 mL com tampão TKM1.
6. Ressuspender o precipitado utilizando pipeta Pasteur e em seguida agitar com o Vortex.
7. Centrifugar a 2500 rpm por 20 minutos.
8. Repetir os passos 5, 6 e 7 para lavar bem o precipitado.
9. Desprezar o sobrenadante e adicionar 800 µL de tampão TKM2.
10. Ressuspender delicadamente o precipitado utilizando micropipeta com ponteira de 1000 µL, e transferir todo o conteúdo para tubo eppendorf de 1,5 mL.
11. Acrescentar 50 µL de SDS (10%), misturar bem e incubar a 55°C por 16 horas.
12. Adicionar 300 µL de solução saturada de NaCl (6M), misturar bem e centrifugar a 12000 rpm por 20 minutos.

13. Transferir o sobrenadante para tubos de ensaio e acrescentar etanol absoluto gelado na proporção de 2 volumes de etanol para 1 volume do sobrenadante. Inverter delicadamente o tubo algumas vezes.
14. Pescar o DNA com micropipeta e transferi-lo para um tubo eppendorf.
15. Acrescentar etanol 70% para lavar o DNA. Esgotar o etanol e manter o tubo aberto em estufa a 37°C para permitir a evaporação completa do álcool.
16. Ressuspender o DNA em 200 µL de tampão TE e incubar em banho-maria a 55°C por três dias.
17. Manter em geladeira por três dias. Neste ponto o DNA já pode ser utilizado ou então estocado a -20°C.

4.2.2. Genotipagem da variante K por PCR-RFLP

Princípio da técnica

A mutação K é uma transição G/A, que altera a primeira base da seqüência de nucleotídeos que corresponde ao códon 539. Sua presença, entretanto, não cria nem destrói qualquer sitio de restrição. Dessa forma, a técnica desenvolvida por SHIBUTA e cols. (1994) prevê uma estratégia que resulta na construção de um sítio de restrição apropriado. A PCR utiliza dois iniciadores criados especificamente para amplificar parte do exon 4. O iniciador 3' (5' CCTGCTTCCACTCCCCATGCTG 3') liga-se à seqüência de nucleotídeos que corresponde às duas últimas bases do códon 539, aos códons 540 a 545 e às duas primeiras bases do códon 546. Esse iniciador, projetado por SHIBUTA e cols. (1994) apresenta uma substituição na quarta posição a partir da terminação 3' e foi denominado de K13 em nosso laboratório.

O iniciador APS (BARTELS e cols., 1992a): 5' (5'
 CGAAATTATTTTCAGTTATTGAAACAGATAAAAATT 3') liga-se do nucleotídeo 32 ao 69, à montante da junção do exon 3 com o exon 4.

Os segmentos de DNA produzidos pela PCR apresentam 106 pb. Se forem derivados da amplificação da seqüência usual exibem um sítio de restrição (GCAGC) identificado pela enzima *Fnu4HI* (figura 2) e, quando digeridos, geram dois fragmentos, um de 85 pb e outro de 21 pb. Entretanto, se os segmentos de DNA produzidos pela PCR derivam da seqüência não usual, são resistentes à ação da enzima e, mesmo na sua presença, permanecem inalterados, ou seja, com 106 pb.

Figura 2. O esquema mostra o princípio da técnica de PCR-PIRA. a) o segmento amplificado a partir da seqüência “usual” apresenta um sítio de identificação e corte da enzima *Fnu4HI*, gerando após digestão, dois fragmentos, um de 85 pb e outro de 21 pb. b) O segmento amplificado a partir da seqüência “variante” não apresenta tal sítio, e será resistente à ação da *Fnu4HI*.

a)

5'... [G A A] [G C A] [G A A] [T G G] ... 3'	Sequência usual
G T C G T A C C ...	Iniciador
5'... [G A A] [G C A] [G C A] [T G G] ... 3'	Produto da PCR do alelo usual
sítio de restrição da <i>Fnu4HI</i>	

b)

5'... [G A A] [A C A] [G A A] [T G G] ... 3'	Sequência variante
G T C G T A C C ...	Iniciador
5'... [G A A] [T C A] [G C A] [T G G] ... 3'	Produto da PCR do alelo K
ausência do sítio de restrição de <i>Fnu4HI</i>	

PCR (Polymerase Chain Reaction)

O volume total da PCR foi de 20 μ L, sendo 1 μ L de DNA genômico (aproximadamente 100 ng) e 19 μ L de Supermix (Invitrogen- 22mM Tris-HCl pH 8,4, 55mM KCl, 1,65mM MgCl₂, 220 μ M dGTP, 220 μ M dATP, 220 μ M dTTP, 220 μ M dCTP, 22 U Taq DNA-polimerase/mL), aos quais já haviam sido adicionados os iniciadores. A amplificação opera por 35 ciclos e foi feita em um termociclador Techgene-Ftgene2D. Cada ciclo consiste de 30 segundos a 94°C para desnaturação, 30 segundos a 58°C para anelamento e 30 segundos a 72°C para extensão do iniciador. A extensão final foi a 72°C por 10 minutos.

Digestão enzimática

Para promover a digestão dos segmentos amplificados foram acrescentados a cada amostra, 10 μ L de uma solução que continha: 0,2 μ L da enzima *Fnu*4HI (equivalente a 1 U), 1,65 μ L de tampão fornecido pelo fabricante (Biolabs-New England), 0,35 μ L de BSA e 7,8 μ L de água bidestilada. A incubação se deu a 37°C por cerca de 16 horas. Para evitar a evaporação do conteúdo durante a incubação, foram acrescentadas a cada tubo duas gotas de óleo mineral.

Eletroforese em gel de poliacrilamida

Para a separação dos fragmentos de DNA foi procedida uma eletroforese contínua em gel de poliacrilamida (8%), cuja solução estoque foi preparada da seguinte forma: 29 g de acrilamida, 1 g de bisacrilamida, 5mL de glicerol e água bidestilada até completar 100 mL.

A solução para o gel foi preparada nas seguintes proporções: 8 mL da solução estoque de poliacrilamida, 22 mL de tampão TBE 1X, 250 μ L de persulfato de amônia 10% (agente polimerizador da acrilamida) e 30 μ L de TEMED (agente catalisador da polimerização).

Nas cubas foi utilizado tampão TBE 1X.

O tampão TBE 5X estoque foi preparado da seguinte forma: 54 g de Tris, 27,5 g de ácido bórico, 20 mL de EDTA 0,5M - pH 8,0 e q.s.p. 1000 mL de água destilada.

O corante xileno cianol foi misturado ao produto da digestão na proporção de 1:1. Aplicaram-se 10 μ L desta mistura em cada ponto de origem. A corrida deu-se a 160 V por 1 hora e 15 minutos em temperatura de 4°C.

Coloração do gel (BUDOWLE e cols., 1991)

O gel, após ser retirado das placas, foi colocado em um recipiente de vidro e submetido ao seguinte tratamento:

1. Ácido nítrico (1%) por 3 minutos.
2. Nitrato de prata 0,01M por 20 minutos.
3. Solução contendo 170 mL de carbonato de sódio 0,28M e 92 μ L de formaldeído, até ser possível uma boa visualização das bandas. Esta solução deve ser preparada cerca de 5 minutos antes do uso.
4. Ácido acético (10%) por 5 minutos.
5. Glicerol (5%) por, pelo menos, 10 minutos.

Todo o processo foi feito sob agitação constante em aparelho apropriado e entre cada etapa era procedida a lavagem do gel com água destilada. Para a conservação, o gel foi embebido em uma solução contendo metanol (30%) e glicerol (1%) e prensado entre papel de filtro e papel celofane por alguns dias. A secagem foi feita a vácuo, sob aquecimento.

Interpretação dos Resultados

Indivíduos que não apresentam a mutação K, exibem apenas uma banda, (figura 3-a) referente ao fragmento de 85 pb, uma vez que o fragmento de 21pb, nas condições em que a

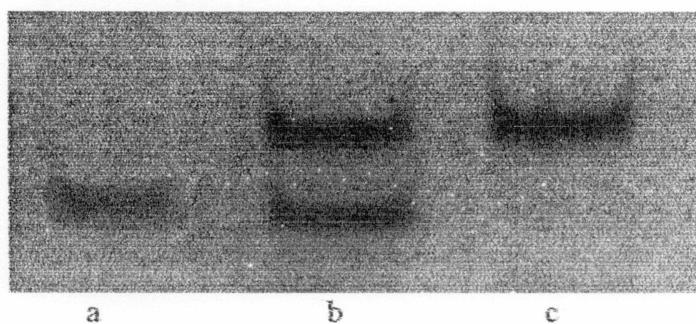
eletroforese se processou, migra para fora do gel. Amostras de homozigotos para a mutação K são totalmente resistentes à digestão pela *Fnu4HI* e exibem apenas a banda relativa ao fragmento de 106 pb (figura 3-c). Heterozigotos, portanto, exibem as duas bandas, a de 85 pb e a de 106 pb (figura 3-b).

4.2.3. Genotipagem da variante K por PCR-SSCA

Princípio da técnica

A técnica baseia-se no fato de que uma alteração em único nucleotídeo pode provocar mudanças na conformação assumida por fitas simples de DNA, determinando uma mobilidade eletroforética característica.

FIGURA 3. Padrões de genótipos obtidos por PCR-RFLP, após eletroforese em gel de poliacrilamida: a. UU; b. UK; c. KK.



PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Essa reação foi feita segundo o item 4.2.2., resultando na produção de segmentos de 189 pares de bases. Os iniciadores utilizados (HÖHLER e cols., 1995) foram os seguintes: 5' (5' TGATTAATACAACCTATTCC 3'), denominado em nosso laboratório de P45, liga-se à

montante da junção do intron 3 com o exon 4 (nt -31 a -12) e 3' (5' GAAAATATGTTCTATAAAGGG 3'), denominado em nosso laboratório de P43, liga-se do nucleotídeo 1738 ao 1758.

Eletroforese em gel de poliacrilamida

A solução usada para a preparação desse gel foi de composição idêntica àquela descrita no item 4.2.2.

Antes da aplicação das amostras, o gel foi submetido a uma pré-corrida de 50 minutos a 250 volts. Nas cubas usou-se o tampão TBE 1X.

O volume total aplicado em cada ponto de origem foi de 12 μ L, sendo 5 μ L do produto da PCR acrescidos de 7 μ L de corante (95% de formamida, 0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xileno cianol, 10mM de EDTA e 10mM de NaOII). Essa mistura era submetida, antes da aplicação, à desnaturação do DNA pelo calor a 94°C, durante 5 minutos, e utilizada imediatamente, evitando assim a renaturação do DNA.

A corrida deu-se a 250 volts por 4 horas e 30 minutos sob uma temperatura de 4°C.

Coloração do gel

O processo de coloração do gel foi o mesmo já descrito no item 4.2.2.

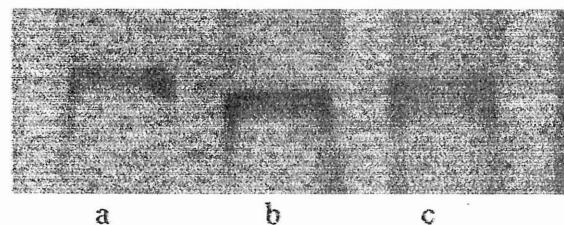
Interpretação dos resultados

A figura 4-a mostra a posição assumida no gel pelos fragmentos de DNA de fita simples (189 pb) que não apresentam a mutação K. Em 4-b, pode-se ver a banda formada pelos fragmentos com a mutação K, e em 4-c as duas bandas que caracterizam o heterozigoto.

4.2.4. Seqüenciamento do DNA

Dois seqüenciamentos da amostra 227 foram realizados a partir dos produtos de amplificação de PCR, utilizando-se, no primeiro, os iniciadores P45 e P43 e, no segundo, N45 (projeto no Laboratório de Polimorfismos e Ligação; 3'CTGTGTAGTTAGAGAAAA5') e P43. O material amplificado, depois de ser purificado com acetato de amônia e etanol, foi submetido à reação de seqüenciamento (ET-dye-terminator). A leitura foi procedida no seqüenciador MegaBACE.

FIGURA 4. Padrões de genótipos obtidos por PCR-SSCA, após eletroforese em gel de poliacrilamida: a. UU; b. KK; c. UK



4.2.5. Exames realizados em outros laboratórios

Para as quantificações efetuadas pelo Laboratório do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná utilizaram-se os seguintes métodos:

- a) Colesterol Total – método enzimático colorimétrico – Merck SMT.
- b) Triglicerídeos – método enzimático colorimétrico – Merck SMT.

- c) HDL-C – método direto homogêneo – Roche.
- d) Glicemia – método da glicose-hexoquinase – Merck Mega.
- e) Insulina –imunoensaio – Abbott Diagnostics
- f) AST – método cinético U.V. - Advia Bayer
- g) ALT - método cinético U.V. - Advia Bayer

As quantificações de HbA_{1C} e da apolipoproteína B (Apo B) foram realizadas pelo laboratório Frischmann Aisengart por cromatografia de alta precisão (HPLC) BIO-RAD e por turbidimetria – ROCHE, respectivamente.

A quantificação do glicerol foi realizada por método enzimático colorimétrico desenvolvido no Laboratório de Bioquímica Clínica da Universidade Federal do Paraná. Nesse laboratório foram determinados também: os fenótipos do loco *CHE2* (VAN ROS e VERVOORT, 1973) e a atividade da butirilcolinesterase (DIETZ e cols., 1973; modificado por EVANS e WROE, 1978).

4.3. MÉTODOS ESTATÍSTICOS

Utilizou-se o programa STATISTICA for Windows (STATSOFT, Inc., 1996) para cálculo de médias, erros padrões, variância, amplitudes de variação e coeficientes de correlação, bem como para as comparações por meio de testes χ^2 e t de Student. Com o uso desse mesmo programa foram realizadas análises de regressão múltipla escalonada. Nessas análises, as variáveis incluídas estavam codificadas da seguinte forma: sexo (1 = masculino; 2 = feminino), origem étnica (1 = euro-brasileira; 2 = afro-brasileira), fenótipos do loco *CHE2*

(1 = CHE2 C5-; 2 = CHE2 C5+), genótipos em relação à variante K (1 = UU; 2 = UK; 3 = KK) e classes em relação à presença ou não da variante K (1 = UU; 2 = UK+KK).

Nos casos de χ^2 com mais de duas classes, utilizou-se o programa CLUMP (SHAM e CURTIS, 1995).

As estimativas de freqüências genotípicas e alélicas foram feitas por contagem direta.

Foi considerado o limite de significância igual a 5%.

Para o cálculo de risco, utilizou-se a estimativa de “odds ratio”, pela aplicação do método de WOOLF (1955).

As seguintes variáveis, cujos valores não seguiam uma distribuição normal, foram transformadas por \ln :

- a) TG, AST, ALT e insulina da amostra de DM do tipo 1.
- b) TG, AST, ALT, insulina e glicose da amostra de DM do tipo 2.

5. RESULTADOS

5.1. METODOLÓGICOS

De um total de 251 amostras de sangue, coletadas no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, foi possível a extração do DNA de 249 amostras (99,2%). Todas as amostras de DNA obtidas foram amplificadas com sucesso, tanto na PCR para análise de RFLP, como na PCR para SSCA.

Inicialmente foi aplicada a técnica de análise de RFLP e que resultou em: 161 indivíduos classificados como usuais e 88 indivíduos classificados como não usuais. Os não usuais foram divididos provisoriamente em dois grupos: 79 possíveis heterozigotos (*BCHE/BCHE*539T*) para a variante K e 9 possíveis homozigotos (*BCHE*539T/BCHE*539T*). Estas 88 amostras foram então submetidas à genotipagem pela técnica de SSCA, sendo que 83 testes concordaram com a classificação provisória de análise por RFLP e 05 apresentaram resultado discordante, sendo seus testes repetidos.

A amostra de DNA do diabético do tipo 2 de número 227, cujo genótipo manteve-se duvidoso, foi seqüenciada, submetida a uma análise de RFLP com concentração modificada do gel de poliacrilamida e a uma SSCA com os iniciadores usados no teste de RFLP. Apenas após esses testes, seu genótipo pode ser estabelecido. A tabela 5 mostra esses resultados.

5.2. FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS

A tabela 6 mostra os resultados obtidos com a amostra de 103 pacientes portadores de Diabetes Mellitus do tipo 1, investigados em relação à presença da variante K da BChE.

Tabela 5. Quadro demonstrativo dos resultados obtidos nas genotipagens quanto à variante K (*BCHE*539T*), por meio das técnicas de PCR-RFLP, PCR-SSCA e seqüenciamento.

RESULTADOS		GENOTIPAGENS								
		1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a	7 ^a		
		RFLP	SSCA	RFLP	SSCA	RFLP ^b	SEQ ^b	SSCA ^c	N	GENÓTIPO
Concordantes	UU	--	--	--	--	--	--	--	161	UU
	UK	UK	--	--	--	--	--	--	74	UK
	KK	KK	--	--	--	--	--	--	09	KK
Discordantes	UK	UU	UU	UU	UU	--	--	--	03	UU
	UK	KK	KK	KK	KK	--	--	--	01	KK
	UK	KK	UK	KK	UK	KK	UK	UK	01	UK

^a RFLP com concentração do gel de poliacrilamida modificada.

^b Seqüenciamentos do DNA.

^c SSCA com iniciadores da RFLP.

A distribuição dos genótipos não difere estatisticamente da esperada pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2_{(1)} = 0,0026$; $p > 0,95$).

Tabela 6. Freqüências alélicas e genotípicas (%), referentes à variante K da butirilcolinesterase, observadas em pacientes com Diabetes Mellitus do tipo 1.

	N	% \pm E.P.
GENÓTIPOS		
UU	63	61,17 \pm 4,80
UK	35	33,98 \pm 4,67
KK	05	4,85 \pm 2,12
TOTAL	103	
ALELOS		
U	161	78,16 \pm 2,88
K	45	21,84 \pm 2,88
TOTAL	206	

Os resultados dos 146 diabéticos do tipo 2 são mostrados na tabela 7. A distribuição desses genótipos não difere significativamente da esperada pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2_{(1)} = 0,1755$; $p > 0,50$).

Verificou-se que, no total de pacientes diabéticos ($N = 249$), independentemente do tipo de diabetes que apresentam, a distribuição genotípica também está em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2_{(1)} = 0,1495$; $p > 0,50$).

Ao compararmos, por testes χ^2 , as freqüências alélicas e genotípicas encontradas em diabéticos do tipo 1, com as freqüências encontradas em diabéticos do tipo 2, observamos que as diferenças não são estatisticamente significativas. Esses resultados são apresentados na tabela 8.

Tabela 7. Freqüências alélicas e genotípicas (%), referentes à variante K da butirilcolinesterase, observadas em pacientes com Diabetes Mellitus do tipo 2.

	N	% ± E.P.
GENÓTIPOS		
UU	101	69,18 ± 3,82
UK	40	27,40 ± 3,69
KK	05	3,42 ± 1,50
TOTAL	146	
ALELOS		
U	242	82,88 ± 2,20
K	50	17,12 ± 2,20
TOTAL	292	

5.3. DIABETES MELLITUS, VARIANTE K E ORIGEM ÉTNICA

Ao analisar a composição étnica das amostras, verificou-se que 71,84% dos diabéticos do tipo 1 são euro-brasileiros ($N = 74$) e 28,16% são afro-brasileiros ($N = 29$).

Do total de 146 pacientes diabéticos do tipo 2, 138 foram classificados quanto à origem étnica e a distribuição encontrada foi a seguinte: 60,87% de euro-brasileiros ($N = 84$), 37,68% de afro-brasileiros ($N = 52$) e 1,45% de orientais ($N = 2$).

A distribuição étnica encontrada em diabéticos do tipo 1 foi comparada com a encontrada em diabéticos do tipo 2. Nesta comparação foram excluídos os indivíduos classificados como orientais ($N = 2$). Observa-se que as freqüências de afro-brasileiros entre diabéticos do tipo 2 (38,24%) e entre diabéticos do tipo 1 (28,16%) não diferem estatisticamente ($\chi^2_{(1)} = 2,66$; $p > 0,10$).

A tabela 9 mostra a distribuição genotípica e as freqüências da variante K, em diabéticos do tipo 1 classificados por origem étnica. Não foram observadas diferenças

Tabela 8. Comparação das freqüências alélicas e genotípicas (%) em relação à variante K entre diabéticos do tipo 1 e do tipo 2.

DIABÉTICOS	N	GENOTIPOS (%)				ALELOS (%)		
		UU	UK	KK	$\chi^2_{(2)}$ (p)	U	K	$\chi^2_{(1)}$ (p)
Tipo 1	103	61,17	33,98	4,85	1,77 (> 0,40)	78,16	21,84	1,74 (> 0,15)
Tipo 2	146	69,18	27,40	3,42		82,88	17,12	

Tabela 9. Distribuição dos genótipos e das freqüências alélicas em relação à variante K, em pacientes diabéticos do tipo 1, classificados por origem étnica.

ORIGEM ÉTNICA	N	GENÓTIPOS (%)			$\chi^2_{(2)} (p)$	ALELOS (%)		$\chi^2_{(1)} (p)$
		UU	UK	KK		U	K	
Euro-brasileiros	74	64,86	28,38	6,76	4,98 (>0,05)	79,05	20,95	0,25 (>0,60)
Afro-brasileiros	29	51,72	48,28	0		75,86	24,14	

estatisticamente significativas quando se comparou o grupo de euro-brasileiros com o de afro-brasileiros, tanto em relação às freqüências alélicas ($\chi^2_{(1)} = 0,25$; $p > 0,60$) como genotípicas ($\chi^2_{(2)} = 4,98$; $p > 0,05$).

O dados referentes aos pacientes do tipo 2 são mostrados na tabela 10. Também neste caso, não foram encontradas diferenças significativas ao se comparar o grupo de euro-brasileiros com o grupo de afro-brasileiros, tanto quanto às freqüências alélicas ($\chi^2_{(1)} = 0,42$; $p > 0,50$) como genotípicas ($\chi^2_{(2)} = 0,76$; $p > 0,70$).

A tabela 11 mostra a distribuição genotípica e as freqüências da variante K em pacientes euro-brasileiros, classificados por tipo de diabetes. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas quando se compararam os dois grupos, tanto para freqüências alélicas ($\chi^2_{(1)} = 0,31$; $p > 0,50$) como para as freqüências genotípicas ($\chi^2_{(2)} = 0,34$; $p > 0,80$).

A distribuição genotípica e as freqüências da variante K em pacientes afro-brasileiros, classificados por tipo de diabetes, são mostradas na tabela 12. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas quando se compararam os dois grupos, tanto para freqüências alélicas ($\chi^2_{(1)} = 1,89$; $p > 0,15$) como para as freqüências genotípicas ($\chi^2_{(2)} = 4,11$; $p > 0,10$).

5.4. FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DA VARIANTE K EM DIABÉTICOS E DOADORES DE SANGUE DE CURITIBA.

A tabela 13 mostra as freqüências alélicas e genotípicas em relação à variante K em diabéticos (tipos 1 e 2) e em doadores de sangue de Curitiba.

Tabela 10. Distribuição dos genótipos e das freqüências alélicas em relação à variante K, em pacientes diabéticos do tipo 2, classificados por origem étnica.

ORIGEM ÉTNICA	N	GENÓTIPOS (%)			$\chi^2_{(2)} (p)$	ALELOS (%)		$\chi^2_{(1)} (p)$
		UU	UK	KK		U	K	
Euro-brasileiros	84	67,86	27,38	4,76	0,76 (> 0,70)	81,55	18,45	0,42 (> 0,50)
Afro-brasileiros	52	71,16	26,92	1,92		84,62	15,38	

Tabela 11. Distribuição dos genótipos e das freqüências alélicas em relação à variante K, em pacientes euro-brasileiros, classificados por tipo de diabetes.

DIABETES	N	GENÓTIPOS (%)			$\chi^2_{(2)} (p)$	ALELOS (%)		$\chi^2_{(1)} (p)$
		UU	UK	KK		U	K	
Tipo 1	74	64,86	28,38	6,76	0,34 (> 0,80)	79,05	20,95	0,31 (> 0,50)
Tipo 2	84	67,86	27,38	4,76		81,55	18,45	

Tabela 12. Distribuição dos genótipos e freqüências alélicas em relação à variante K, em pacientes afro-brasileiros, classificados por tipo de diabetes

DIABETES	N	GENÓTIPOS (%)			$\chi^2_{(2)} (p)$	ALELOS (%)		$\chi^2_{(1)} (p)$
		UU	UK	KK		U	K	
Tipo 1	29	51,72	48,28	0	4,11 (> 0,10)	75,86	24,14	1,89 (> 0,15)
Tipo 2	52	71,16	26,92	1,92		84,62	15,38	

Tabela 13. Comparação das freqüências alélicas e genotípicas em relação à variante K, em diabéticos dos tipos 1 e 2 e em doadores de sangue de Curitiba.

AMOSTRAS	GENÓTIPOS			ALELOS			
	UU	UK	KK	$\chi^2_{(2)} (p)$	U	K	$\chi^2_{(1)} (p)$
103 doadores de sangue ^a	66,02%	31,07%	2,91%		81,55%	18,45%	
N	68	32	03		168	38	
				0,83 (> 0,65)			0,74 (> 0,35)
103 diabéticos do tipo 1	61,17%	33,98%	4,85%		78,16%	21,84%	
N	63	35	05		161	45	
				2,36 (> 0,30)			2,35 (> 0,10)
944 doadores de sangue	68,01%	28,92%	3,07%		82,47%	17,53%	
N	642	273	29		1557	331	
				0,18 (> 0,90)			0,03 (> 0,85)
146 diabéticos do tipo 2	69,18%	27,40%	3,42%		82,88%	17,12%	
N	101	40	05		242	50	
				2,89 (> 0,25)			1,31 (> 0,25)
146 doadores de sangue ^b	73,29%	26,03%	0,68%		86,30%	13,70%	
N	107	38	01		252	40	

^a sub-amostra de doadores de sangue, pareada com os DM do tipo 1, na proporção 1:1, por origem étnica.

^b sub-amostra de doadores de sangue, pareada com os DM do tipo 2, na proporção 1:1, por origem étnica.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas quando se comparou o grupo de diabéticos do tipo 1 com o de doadores de sangue, tanto quanto às freqüências alélicas ($\chi^2_{(1)} = 2,36$; $p > 0,30$) como quanto às freqüências genotípicas ($\chi^2_{(2)} = 2,35$; $p > 0,10$).

Também não foram observadas diferenças estatisticamente significativas quando se comparou o grupo de diabéticos do tipo 2 com o de doadores de sangue, tanto quanto às freqüências alélicas ($\chi^2_{(1)} = 0,03$; $p > 0,85$) como quanto às freqüências genotípicas ($\chi^2_{(2)} = 0,18$; $p > 0,90$).

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas quando se comparou o grupo de diabéticos do tipo 1 com a sub-amostra de doadores de sangue, pareada com os pacientes por origem étnica, tanto quanto às freqüências alélicas ($\chi^2_{(1)} = 0,74$; $p > 0,35$) como quanto às freqüências genotípicas ($\chi^2_{(2)} = 0,83$; $p > 0,65$).

Da mesma forma, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas quando se comparou o grupo de diabéticos do tipo 2 com a sub-amostra de doadores de sangue, pareada com os pacientes por origem étnica, tanto quanto às freqüências alélicas ($\chi^2_{(1)} = 1,31$; $p > 0,25$) como quanto às freqüências genotípicas ($\chi^2_{(2)} = 2,89$; $p > 0,25$).

5.5. ATIVIDADE DA BUTIRILCOLINESTERASE

A tabela 14 mostra os resultados de análises de variância das distribuições de atividades da BChE considerando-as nos genótipos UU, UK e KK, dentro dos tipos de diabetes 1 e 2. Essas análises de variância mostraram, em ambos os casos, resultados estatisticamente significativos.

Tabela 14. Atividades médias (\pm E.P.) da butirilcolinesterase (KU/L) em diabéticos dos tipos 1 e 2, classificados genotipicamente, em relação à variante K.

DIABETES	GENÓTIPOS	N	MÉDIA \pm E.P.	A.V. ^a	F (p)
Tipo 1	UU	63	5,42 \pm 0,16	3,06 - 8,48	
	UK	35	4,74 \pm 0,17	2,36 - 6,80	7,49 ($< 0,001$)
	KK	05	3,80 \pm 0,37	2,48 - 4,71	
Tipo 2	UU	101	6,33 \pm 0,15	1,08 - 10,05	
	UK	40	5,66 \pm 0,20	1,97 - 8,15	3,31 ($< 0,04$)
	KK	05	5,78 \pm 0,29	4,94 - 6,44	

^a Amplitude de variação

Na tabela 15 os genótipos da BChE foram agrupados em duas classes, de acordo com a presença ou ausência da variante K, tanto em diabéticos do tipo 1 como do tipo 2. As comparações das atividades médias da BChE mostraram que o genótipo usual possui atividade média significativamente mais alta que as classes genotípicas que possuem a variante K, em cada um dos tipos de diabetes. Além disso, diabéticos do tipo 2 possuem atividades médias da BChE superiores às encontradas no tipo 1, tanto no que se refere à atividade média total (tabela 15), como em relação às comparações entre os mesmos genótipos.

Os genótipos usuais dos tipos 1 e 2 apresentam atividades médias da BChE de, respectivamente $5,42 \pm 0,16$ e $6,33 \pm 0,15$ ($t = 4,01$; $p = 9,3 \cdot 10^{-5}$), enquanto os genótipos com a variante K (UK + KK) apresentam atividades médias, respectivamente, de $4,62 \pm 0,16$ e $5,68 \pm 0,18$ ($t = 4,33$; $p = 4,2 \cdot 10^{-5}$).

5.6. VARIANTE K E DEMAIS VARIÁVEIS DESSE ESTUDO

5.6.1. Diabetes Mellitus do tipo 1

A tabela 16 mostra as comparações de médias das quantificações bioquímicas, dados antropométricos e idade de aparecimento da doença, entre o grupo de pacientes com genótipo usual e o grupo de pacientes com a mutação K (genótipos UK e KK).

Na amostra de diabéticos do tipo 1, as comparações entre as médias, através do teste t , indicaram uma diferença estatisticamente significativa, apenas para a variável idade de aparecimento da doença ($t = 2,48$; $p < 0,02$). Enquanto no grupo usual a média é de $15,25 \pm 0,96$ anos, no grupo com a variante K a média cai para $11,67 \pm 1,00$ anos. Os dados das distribuições da idade de aparecimento da doença, nesses grupos, podem ser vistos

Tabela 15. Atividades médias (\pm E.P.) da butirilcolinesterase (KU/L) em diabéticos dos tipos 1 e 2, classificados pela presença ou não da variante K.

DIABETES	GENÓTIPO	N	MÉDIA \pm E.P.	A. V. ^a	t (p) ^b
TIPO 1	UU	63	5,42 \pm 0,16	3,06 - 8,48	3,43 ($< 9 \cdot 10^{-4}$)
	UK + KK	40	4,62 \pm 0,16	2,36 - 6,80	
	TOTAL	103	5,12 \pm 0,12	2,36 - 8,48	
TIPO 2	UU	101	6,33 \pm 0,15	1,08 - 10,05	2,58 ($< 0,02$)
	UK + KK	45	5,68 \pm 0,18	1,97 - 8,15	
	TOTAL	146	6,13 \pm 0,12	1,08 - 10,05	

a. Amplitude de variação.

b. Comparação entre atividades médias totais dos tipos 1 e 2 ($t = 5,82$; $p < 10^{-6}$).

Tabela 16. Médias (\pm E.P.) e amplitudes de variação (A.V.) das variáveis bioquímicas, antropométricas e idade de aparecimento da doença em diabéticos do tipo 1, classificados pela presença ou não da variante K.

VARIÁVEIS ^a	GENÓTIPO USUAL			GENÓTIPOS UK+ KK			t (p)
	MÉDIA \pm E.P.	A.V.	N	MÉDIA \pm E.P.	A.V.	N	
Bioquímicas							
Colesterol Total (mg/dL)	189,56 \pm 5,84	115,00 - 340,00	62	182,05 \pm 7,32	100,00-330,00	40	0,803 (= 0,424)
Triglicerídeos (mg/dL)	100,89 \pm 9,57	27,00 - 384,00	62	86,95 \pm 7,68	32,00-308,00	40	0,606 (= 0,546) ^b
HDL-C (mg/dL)	49,17 \pm 1,50	28,00 - 87,00	63	51,43 \pm 2,03	24,00-83,00	40	0,909 (= 0,365)
Glicose (mg/dL)	215,13 \pm 14,21	43,00 - 473,00	62	224,55 \pm 20,43	51,00-496,00	38	0,390 (= 0,698)
Apo B (mg/dL)	91,30 \pm 3,57	41,00 - 171,00	63	86,73 \pm 3,92	42,00-137,00	40	0,837 (= 0,404)
HbA _{1C} (%)	10,06 \pm 0,30	3,70 - 16,50	63	9,72 \pm 0,39	5,40-17,90	40	0,698 (= 0,487)
Insulina (μ UI/mL)	28,65 \pm 5,40	3,80 - 300,00	61	28,10 \pm 5,81	1,20-160,30	39	0,624 (= 0,534) ^b
Glicerol (mg/dL)	0,47 \pm 0,04	0,03 - 1,49	57	0,41 \pm 0,05	0,08 - 0,99	34	0,908 (= 0,367)
AST (U/L)	19,00 \pm 1,56	12,00 - 94,00	53	22,13 \pm 2,94	10,00 - 131,00	40	1,169 (= 0,245) ^b
ALT (U/L)	19,11 \pm 2,90	7,00 - 159,00	53	20,53 \pm 3,76	6,00 - 159,00	40	0,336 (= 0,738) ^b
Antropométricas							
Peso (Kg)	62,00 \pm 1,33	40,10 - 82,00	63	62,67 \pm 1,62	43,60-93,00	40	0,314 (= 0,754)
Altura (m)	1,63 \pm 0,01	1,48 - 1,83	62	1,63 \pm 0,01	1,49-1,85	39	0,179 (= 0,858)
IMC (Kg/m ²)	22,99 \pm 0,45	15,86 - 32,89	60	23,51 \pm 0,49	18,43-33,75	39	0,762 (= 0,448)
RCQ	0,82 \pm 0,01	0,67 - 0,97	59	0,82 \pm 0,01	0,66-0,99	40	0,607 (= 0,546)
Idade de aparecimento da doença (anos)	15,25 \pm 0,96	1,00 - 34,00	61	11,67 \pm 1,00	0,00-24,00	39	2,478 (= 0,015)*

^a IMC (índice de massa corporal); RCQ (razão entre a medida da cintura e a do quadril); AST (aspartato-aminotransferase); ALT (alanina-aminotransferase); ^b teste *t* realizado com valores de ln da variável; * estatisticamente significativo.

na tabela 17 e no gráfico 1. Observamos também que 43,6% (N = 17), dos que possuem a variante K, manifestaram a doença até os 10 anos de idade. Essa proporção cai para 26,2% (N = 16) no grupo de diabéticos do tipo 1 com genótipo usual.

A freqüência do alelo K ($30,61\% \pm 4,66\%$; N = 49) nos diabéticos com aparecimento da doença antes dos 13 anos (mediana) é significativamente mais alta ($\chi^2_{(1)} = 9,45$; $p = 0,002$) do que naqueles com idade de aparecimento da doença maior ou igual a 13 anos ($12,75\% \pm 3,30\%$; N = 51). Esses dois grupos foram comparados também, em relação à distribuição das freqüências genotípicas e a diferença foi estatisticamente significativa ($\chi^2_{(2)} = 9,97$; $p = 0,004$). Esses resultados são mostrados na tabela 18. A freqüência do alelo K no grupo de pacientes com idade de aparecimento da doença < 13 anos também é significativamente mais alta ($\chi^2_{(1)} = 10,72$; $p = 0,001$) que a observada na amostra controle (N = 944). Esses dois grupos foram comparados também, em relação à distribuição das freqüências genotípicas e a diferença foi estatisticamente significativa ($\chi^2_{(2)} = 10,72$; $p = 0,006$).

O valor de OR (odds ratio) é de 2,40 (1,35 a 4,28, com intervalo de confiança de 95%). Assim, o risco de desenvolvimento do diabetes mellitus do tipo 1 antes dos 13 anos de idade é cerca de 2,4 vezes maior para os portadores da variante K (genótipos UK ou KK) do que para os homozigotos usuais (UU).

O coeficiente de correlação entre a idade de aparecimento da doença e o genótipo, considerado em três classes, em relação à variante K é de -0,28 ($p = 0,005$). Quando consideraram-se duas classes (UU e UK+KK), os resultados foram: $r = -0,24$; $p = 0,015$. Com o objetivo de investigar melhor a relação entre a idade de aparecimento da doença e a variante K, foi feita uma análise de regressão múltipla escalonada, considerando-se a idade

Tabela 17. Idade de aparecimento do diabetes mellitus do tipo 1.

INTERVALO DE IDADE (anos)	GENÓTIPO USUAL			GENÓTIPOS UK + KK		
	N	%	% ACUMULADA	N	%	% ACUMULADA
0 a 5	4	6,5	6,5	5	12,8	12,8
> 05 a 10	12	19,7	26,2	12	30,8	43,6
> 10 a 15	23	37,7	63,9	13	33,3	76,9
> 15 a 20	7	11,5	75,4	2	5,1	82,0
> 20 a 25	8	13,1	88,5	7	18,0	100,0
> 25 a 30	5	8,2	96,7	-	-	-
> 30 a 35	2	3,3	100,0	-	-	-
Total	61	100,0		39	100,0	

Gráfico 1. Distribuições das freqüências da idade de aparecimento da doença em diabéticos do tipo 1, classificados pela presença ou não da variante K.

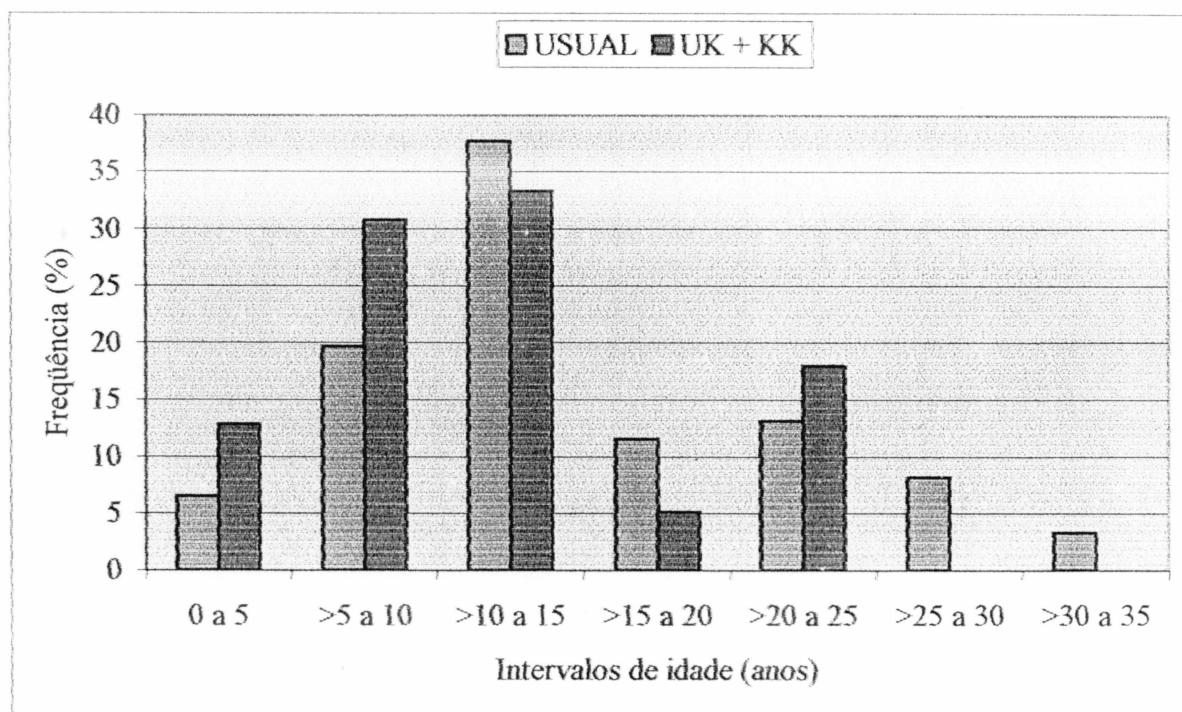


Tabela 18. Distribuição dos genótipos e das freqüências alélicas em relação à variante K, em pacientes diabéticos do tipo 1, classificados pela idade de aparecimento da doença.

IDADE DE APARECIMENTO DA DOENÇA	N	GENÓTIPOS (%)			ALELOS (%)		
		UU	UK	KK	$\chi^2_{(2)}(p)$	U	K
< 13 ANOS	49	46,94	44,90	8,16		69,39	30,61
					9,97 ($= 0,004$)		9,45 ($= 0,002$)
≥ 13 ANOS	51	74,51	25,49	0		87,25	12,75

de aparecimento da doença como a variável dependente. As variáveis independentes usadas no modelo foram as seguintes: sexo, origem étnica, fenótipo do loco *CHE2* e genótipo relativo à variante K (UU, UK e KK). Os resultados são apresentados na tabela 19. Não foram significativas as correlações entre idade de aparecimento do diabetes tipo 1 com as variáveis: sexo ($r = -0,05$; $p = 0,649$), origem étnica ($r = 0,15$; $p = 0,149$) e fenótipos do loco *CHE2* ($r = -0,07$; $p = 0,511$).

A média dos valores de pressão arterial diastólica observada no grupo usual ($N = 63$) foi de $72,94 \pm 1,15$ mmHg e de $74,59 \pm 1,75$ no grupo variante (UK+KK; $N = 37$). Em relação à pressão sistólica a média no grupo usual foi de $116,41 \pm 1,72$ e de $120,27 \pm 2,47$ no grupo variante. Como os valores das pressões arteriais sistólica e diastólica não apresentaram distribuição normal, mesmo após o ajuste com a conversão por ln (logaritmo neperiano), as médias não puderam ser comparadas pelo teste *t*. Assim, a comparação entre o grupo usual e o grupo variante deu-se através de teste χ^2 , a partir da classificação dos indivíduos em hipertensos no momento da coleta (valores $\geq 140/90$ mmHg) ou normotensos. A freqüência de hipertensos no grupo usual ($12,70\% \pm 4,19\%$) não diferiu estatisticamente daquela observada no grupo variante ($16,22\% \pm 6,06\%$; $\chi^2_{(1)} = 0,24$; $p > 0,60$).

Todas as variáveis mostradas na tabela 16 foram comparadas, também, em relação à variância entre o grupo de pacientes com genótipo usual e o grupo de pacientes com a mutação K (genótipos UK e KK). Somente a variável AST (ln) apresentou diferença estatisticamente significativa ($F = 1,79$; $p = 0,049$; variância maior no grupo com a mutação K). A partir da observação do gráfico 2, foram identificados e excluídos valores muito extremos e pouco representados ($> 4,4$). Mesmo após este procedimento, a variância para

Tabela 19. Resultados da regressão múltipla escalonada, na qual a idade de aparecimento do diabetes mellitus do tipo 1 (N = 100) foi a variável dependente.

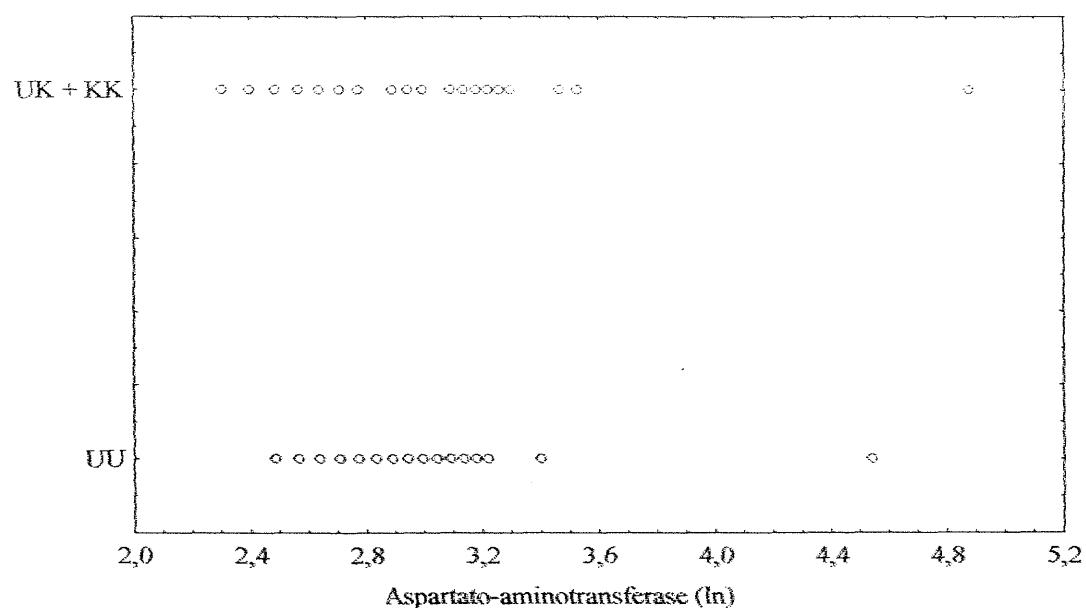
$\bar{Y} \pm D.P. = 13,85 \pm 7,24$		$a \pm E.P. = 17,00 \pm 2,13$		
VARIÁVEIS INDEPENDENTES ^a	$\bar{X} \pm D.P.$	$b \pm E.P.$	t	P
Genótipo em relação à variante K	1,43 \pm 0,57	- 3,55 \pm 1,22	2,91	0,0044
Origem étnica	1,34 \pm 0,59	1,82 \pm 1,18	1,54	0,1261

ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FONTE DE VARIAÇÃO	G.L.	SOMA DOS QUADRADOS	F	r^2
Regressão	2	519,38	5,40	0,10
Resíduo	97	4667,55	p = 0,006	
Total	99	5186,93		

^a As demais variáveis independentes: loco *CHE2* e sexo não mostraram correlação suficiente para entrar no modelo.

Gráfico 2. Distribuição dos valores de aspartato-aminotransferase, em diabéticos do tipo 1, classificados pela presença ou não da variante K.



AST (ln) manteve diferença significativa ($F = 1,85$; $p = 0,041$) entre o grupo usual (0,054) e o grupo com a variante K (0,1).

O gráfico 3 mostra a distribuição de freqüências dos valores de aspartato-aminotransferase (ln), em diabéticos do tipo 1, classificados em dois grupos: pacientes com genótipo usual e pacientes com a mutação K (genótipos UK e KK).

5.6.2. Diabetes Mellitus do tipo 2

Na amostra de diabéticos do tipo 2 (tabela 20), as comparações entre as médias, através do teste t, indicaram uma diferença estatisticamente significativa apenas para a variável RCQ ($t = 2,29$; $p = 0,023$). Enquanto no grupo usual a média é de $0,93 \pm 0,01$, no grupo com a variante K a média aumenta para $0,97 \pm 0,01$. O gráfico 4 mostra as distribuições de freqüências dos valores de RCQ nos dois grupos.

A razão cintura-quadril está positivamente correlacionada com o IMC (tabela 21), com os níveis de glicose e de triglicerídeos e com a variante K, tanto para as três classes genotípicas (UU, UK e KK) como para as categorias formadas pelo critério presença ou não da mutação K (UU e UK+KK). As demais variáveis analisadas e que não apresentaram correlação significativa com RCQ foram as seguintes: sexo, idade, origem étnica, pressão arterial diastólica, pressão arterial sistólica, colesterol total, HDL-C, AST, ALT, insulina, apo B, HbA_{1C}, atividade da butirilcolinesterase, glicerol e fenótipos do loco CHE2.

A tabela 22 apresenta os resultados de um modelo de regressão múltipla escalonada onde a variável dependente (RCQ) é testada em relação às variáveis citadas anteriormente e que apresentaram coeficientes de correlação significativos ou muito próximos da significância: IMC, níveis de glicose e de triglicerídeos, presença ou não da variante K e

Gráfico 3. Distribuições de freqüências dos valores de aspartato-aminotransferase (em ln), em diabéticos do tipo 1, classificados pela presença ou não da variante K.

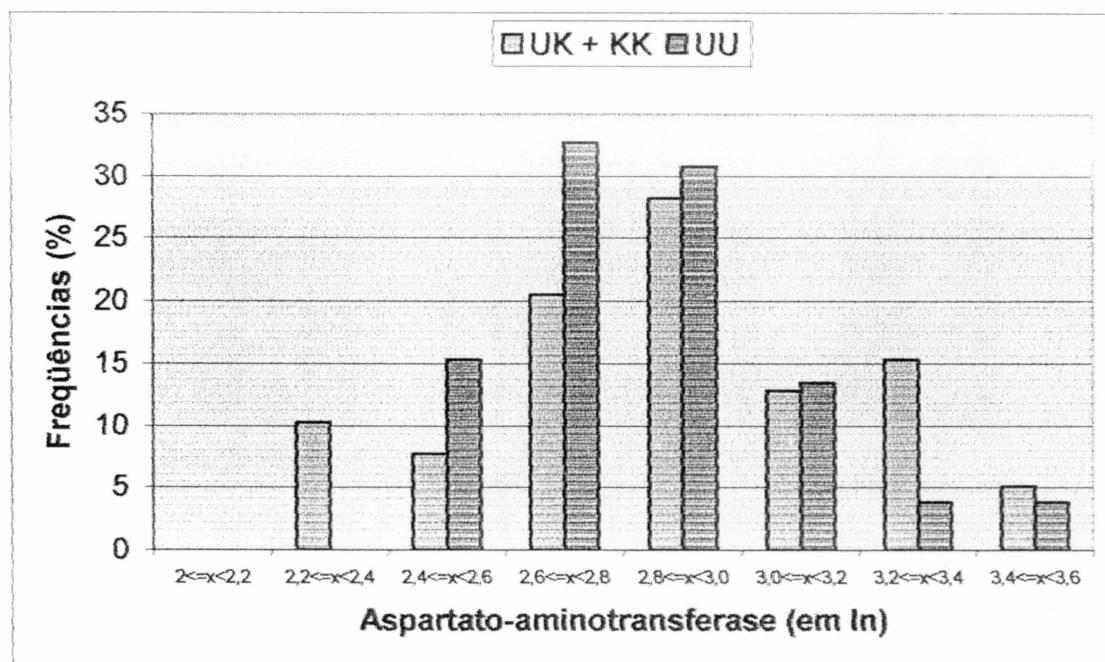


Tabela 20. Médias (\pm E.P.) e amplitudes de variação (A.V.) das variáveis bioquímicas, antropométricas e idade de aparecimento da doença em diabéticos do tipo 2, classificados pela presença ou não da variante K.

VARIÁVEIS *	GENÓTIPO USUAL			GENÓTIPOS UK+ KK			t (p)
	MÉDIA \pm E.P.	A.V.	N	MÉDIA \pm E.P.	A.V.	N	
Bioquímicas							
Colesterol Total (mg/dL)	224,96 \pm 5,39	121,00-477,00	100	216,84 \pm 6,85	123,00-320,00	45	0,876 (= 0,382)
Triglicerídeos (mg/dL)	173,85 \pm 13,16	53,00-867,00	100	192,40 \pm 22,69	41,00-957,00	45	0,666 (= 0,507) ^b
HDL-C (mg/dL)	44,79 \pm 1,27	24,00-96,00	97	44,73 \pm 1,62	27,00-77,00	45	0,028 (= 0,978)
Glicose (mg/dL)	173,84 \pm 6,27	84,00-405,00	101	195,51 \pm 12,20	57,00-442,00	45	1,403 (= 0,163) ^b
Apo B (mg/dL)	115,96 \pm 2,96	61,00-212,00	101	111,98 \pm 4,53	69,00-202,00	45	0,742 (= 0,459)
HbA _{1C} (%)	8,53 \pm 0,21	5,40-15,60	100	8,82 \pm 0,29	5,90-14,20	45	0,799 (= 0,426)
Insulina (μ UI/mL)	20,83 \pm 2,73	3,40-227,80	99	19,21 \pm 1,49	6,00-52,20	44	0,710 (= 0,479) ^b
Glicerol (mg/dL)	0,49 \pm 0,03	0,07-1,44	95	0,47 \pm 0,04	0,03-1,09	43	0,482 (= 0,630)
AST (U/L)	21,14 \pm 1,08	8,00 – 85,00	101	23,26 \pm 2,55	8,00 – 107,00	43	0,426 (= 0,671) ^b
ALT (U/L)	21,56 \pm 1,28	7,00 – 96,00	101	26,95 \pm 4,21	8,00 – 177,00	43	1,192 (= 0,235) ^b
Antropométricas							
Peso (Kg)	77,30 \pm 1,57	39,30-122,40	101	77,34 \pm 1,66	58,70-108,00	45	0,016 (= 0,987)
Altura (m)	1,61 \pm 0,01	1,42-1,80	101	1,59 \pm 0,02	1,30-1,82	45	0,688 (= 0,492)
IMC (Kg/m ²)	30,13 \pm 0,58	19,49-44,89	98	30,64 \pm 0,59	24,43-42,28	44	0,540 (= 0,590)
RCQ	0,93 \pm 0,01	0,48-1,22	96	0,97 \pm 0,01	0,71-1,17	43	2,293 (= 0,023)*
Idade de aparecimento da doença (anos)	45,85 \pm 1,07	16,50-67,00	95	46,87 \pm 1,78	24,00-73,00	43	0,514 (= 0,608)

* IMC (índice de massa corporal); RCQ (razão entre a medida da cintura e a do quadril); AST (aspartato-aminotransferase); ALT (alanina-aminotransferase); ^b teste *t* realizado com valores de ln da variável; * estatisticamente significativo.

Tabela 21. Coeficientes de correlação entre RCQ e variáveis, que apresentaram resultados estatisticamente significativos, em diabéticos do tipo 2.

VARIÁVEL ^a	N	r	p
Índice de massa corporal (IMC)	139	0,23	0,006
Glicose	139	0,20	0,020
Triglicerídeos	138	0,25	0,003
Variante K			
UU, UK e KK	139	0,18	0,034
UU e UK+KK	139	0,19	0,023

^a As variáveis glicose e triglicerídeos foram calculadas em logaritmo neperiano.

Gráfico 4. Distribuições de freqüências dos valores de RCQ, em diabéticos do tipo 2, classificados pela presença ou não da variante K.

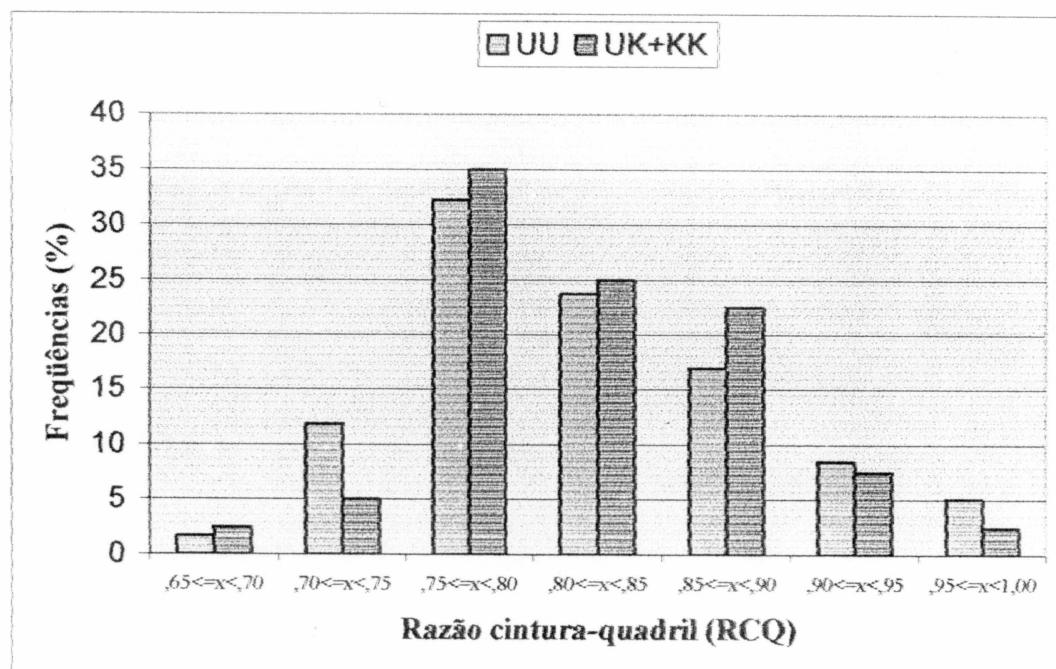


Tabela 22. Resultado da regressão múltipla escalonada, na qual considerou-se a RCQ como a variável dependente, em diabéticos do tipo 2 (N = 138).

	$\bar{Y} \pm D.P. = 0,94 \pm 0,09$	$a \pm E.P. = 0,70 \pm 0,07$		
VARIÁVEIS INDEPENDENTES ^a	$\bar{X} \pm D.P.$	$b \pm E.P.$	t	P
Triglicerídeos ^b	$5,12 \pm 0,37$	$0,030961 \pm 0,01$	2,56	0,012
Sexo	$1,67 \pm 0,47$	$-0,049097 \pm 0,015$	3,23	0,002
IMC	$30,24 \pm 5,31$	$0,003818 \pm 0,001$	2,73	0,007
Presença da variante K (UU e UK+KK)	$1,31 \pm 0,46$	$0,037204 \pm 0,015$	2,48	0,014

ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FONTE DE VARIAÇÃO	G.L.	SOMA DOS QUADRADOS	F	r^2
Regressão	4	0,20	7,62	0,19
Resíduo	133	0,88		
Total	137	1,08	p = 0,000015	

^a A variável glicose (em ln), incluída inicialmente como independente, não foi significativa e por isso retirada do presente modelo.

^b Variável em logaritmo neperiano.

sexo ($r = -0,17$; $p = 0,051$; $N = 139$). A análise de regressão múltipla escalonada mostrou que a RCQ, em média, aumenta com o nível de triglicerídeos, sendo maior em pessoas com maior IMC, em homens e em pessoas com a variante K.

A média dos valores de pressão arterial diastólica observada no grupo usual ($N = 98$) foi de $87,28 \pm 1,06$ mmHg e de $88,22 \pm 1,67$ no grupo variante (UK+KK; $N = 45$). Em relação à pressão sistólica a média no grupo usual foi de $141,17 \pm 1,73$ e de $141,33 \pm 2,63$ no grupo variante. Como os valores das pressões arteriais sistólica e diastólica não apresentaram distribuição normal, mesmo após o ajuste com a conversão por \ln (logaritmo neperiano), as médias não puderam ser comparadas pelo teste t . Assim, a comparação entre o grupo usual e o grupo variante deu-se através de teste χ^2 , a partir da classificação dos indivíduos em hipertensos no momento da coleta (valores $\geq 140/90$ mmHg) ou normotensos. A frequência de hipertensos no grupo usual ($67,35\% \pm 4,74\%$) não diferiu estatisticamente daquela observada no grupo variante ($71,11\% \pm 6,75\%$; $\chi^2_{(1)} = 0,20$; $p > 0,60$).

Todas as variáveis mostradas na tabela 20 foram comparadas, também, em relação à variância entre o grupo de pacientes com genótipo usual e o grupo de pacientes com a mutação K (genótipos UK e KK). Quatro variáveis apresentaram diferenças estatisticamente significativas: peso ($F = 2,01$; $p = 0,01$; variância no grupo usual = 250,37; variância no grupo com a mutação K = 124,26), IMC ($F = 2,15$; $p = 0,006$; variância no grupo usual = 33,15; variância no grupo com a mutação K = 15,43), AST em \ln ($F = 1,73$; $p = 0,028$; variância no grupo usual = 0,1455; variância = 0,2512 no grupo com a mutação K) e ALT em \ln ($F = 1,75$ $p = 0,025$; variância no grupo usual = 0,205; variância no grupo com a mutação K = 0,358). Posteriormente, a partir da observação dos gráficos 5, 6, 7 e 8,

Gráfico 5. Distribuição dos valores de peso (Kg), em diabéticos do tipo 2, classificados pela presença ou não da variante K.

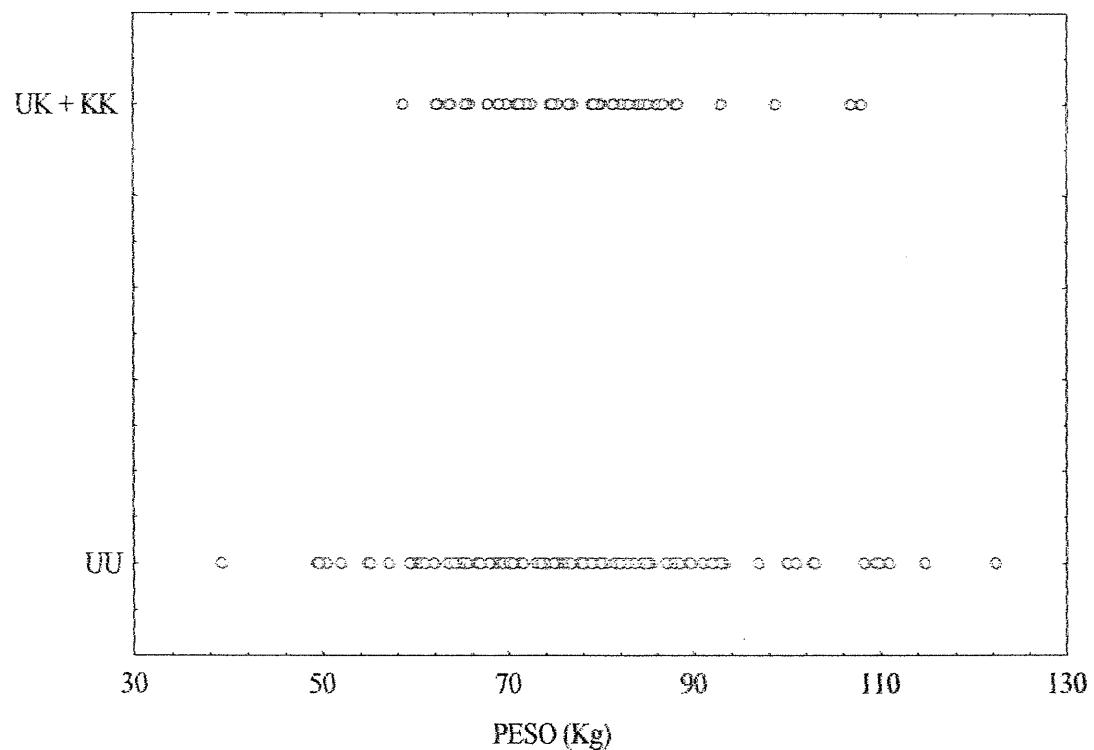


Gráfico 6. Distribuição dos valores de índice de massa corporal (IMC), em diabéticos do tipo 2, classificados pela presença ou não da variante K.

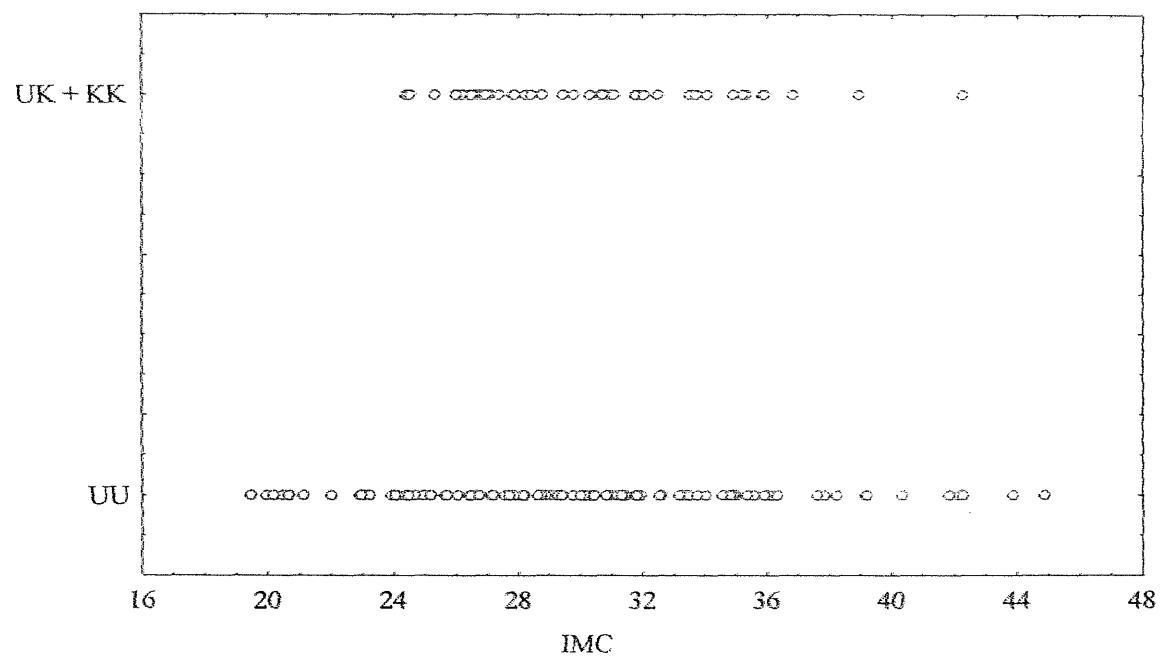


Gráfico 7. Distribuição dos valores de aspartato-aminotransferase (ln), em diabéticos do tipo 2, classificados pela presença ou não da variante K.

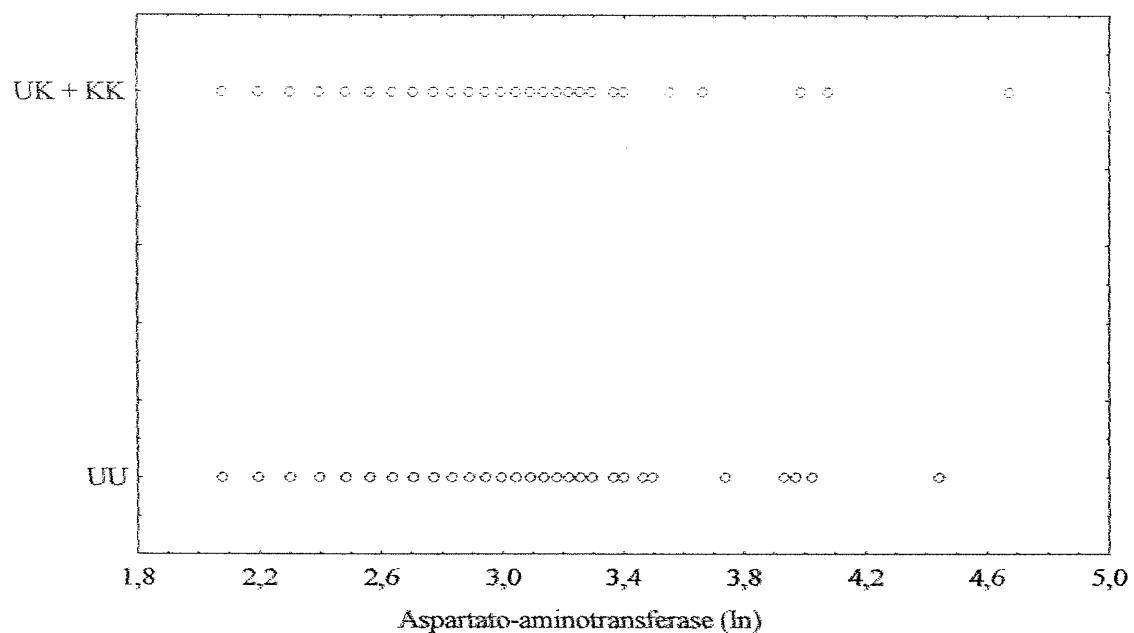
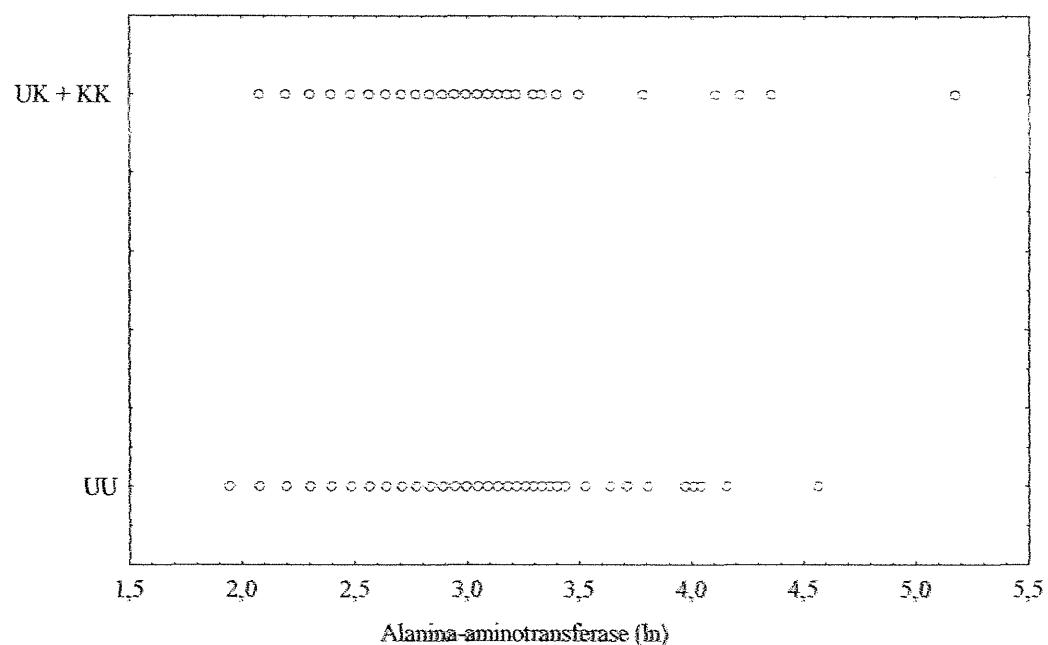


Gráfico 8. Distribuição dos valores de alanina-aminotransferase (ln), em diabéticos do tipo 2, classificados pela presença ou não da variante K.



procurou-se identificar valores muito extremos e pouco representados, respectivamente, para peso, IMC, AST e ALT. Para peso e IMC não foi necessário excluir qualquer caso. Entretanto, foram excluídos os valores maiores que 80 U/L para AST (N = 2) e os valores maiores que 170 U/L para ALT (N = 1). As comparações entre as variâncias foram então recalculadas e, para estas duas variáveis, não mostraram diferenças estatisticamente significativas: AST em ln ($F = 1,50$; $p > 0,10$) e ALT em ln ($F = 1,25$; $p > 0,30$).

Os gráficos 09 e 10 mostram as distribuições de freqüências dos valores de peso e IMC, respectivamente, em diabéticos do tipo 2, divididos em dois grupos: pacientes com genótipo usual e pacientes com a mutação K (genótipos UK e KK).

5.7. VARIANTE K E FATORES DE RISCO PARA SÍNDROME METABÓLICA EM DIABÉTICOS DO TIPO 2

5.7.1. Freqüências e fatores de risco

Do total de 146 pacientes diabéticos do tipo 2, 133 possuem informações completas em relação às seguintes variáveis: IMC, RCQ, PAS, PAD, TG, HDL-C e sexo, que permitem diagnosticar a Síndrome Metabólica (SM), na presença dos seguintes fatores de risco: obesidade (IMC e RCQ), hipertensão (PAS e PAD) e dislipidemia (TG e HDL-C). Observamos que, destes 133 pacientes, 63,16% (N = 84) apresentam além do próprio diabetes mellitus, pelo menos mais dois fatores de risco entre os três citados acima, podendo ser classificados como portadores da SM de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1999). Dos restantes, 6,01% (N = 8) não apresentaram nenhum dos 3 fatores de risco investigados neste estudo e não apresentam a SM. Por outro lado, 30,83 % (N = 41) dos pacientes apresentaram apenas 1 entre os 3 fatores de risco citados. Alguns desses pacientes

Gráfico 9. Distribuições de freqüências de peso (Kg) em diabéticos do tipo 2, classificados pela presença ou não da variante K.

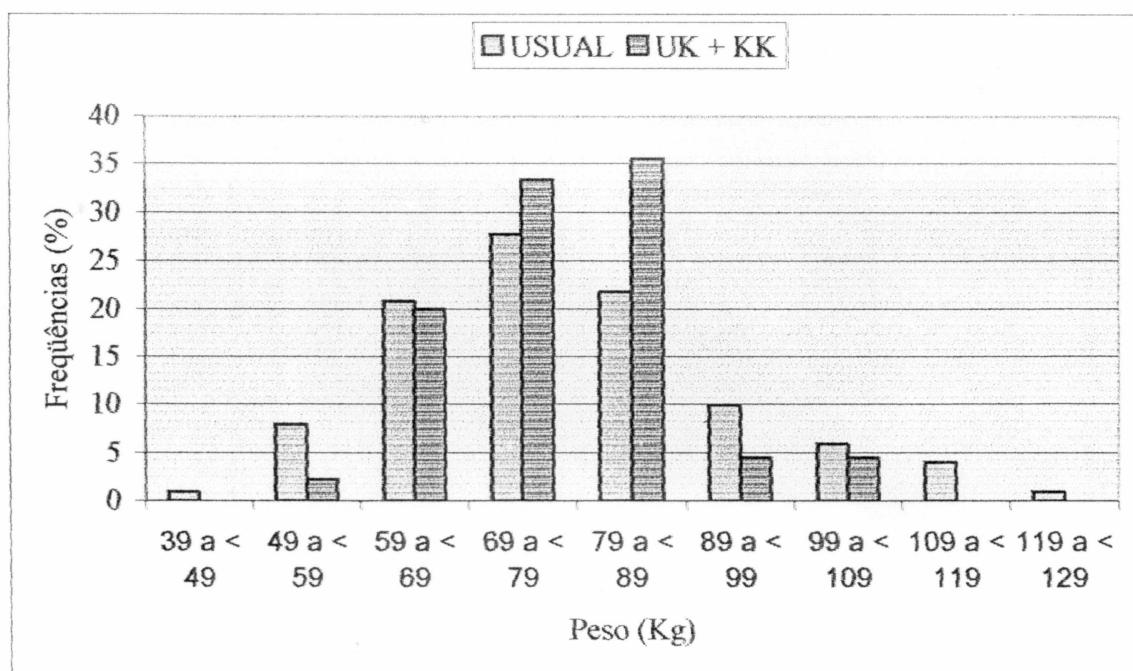
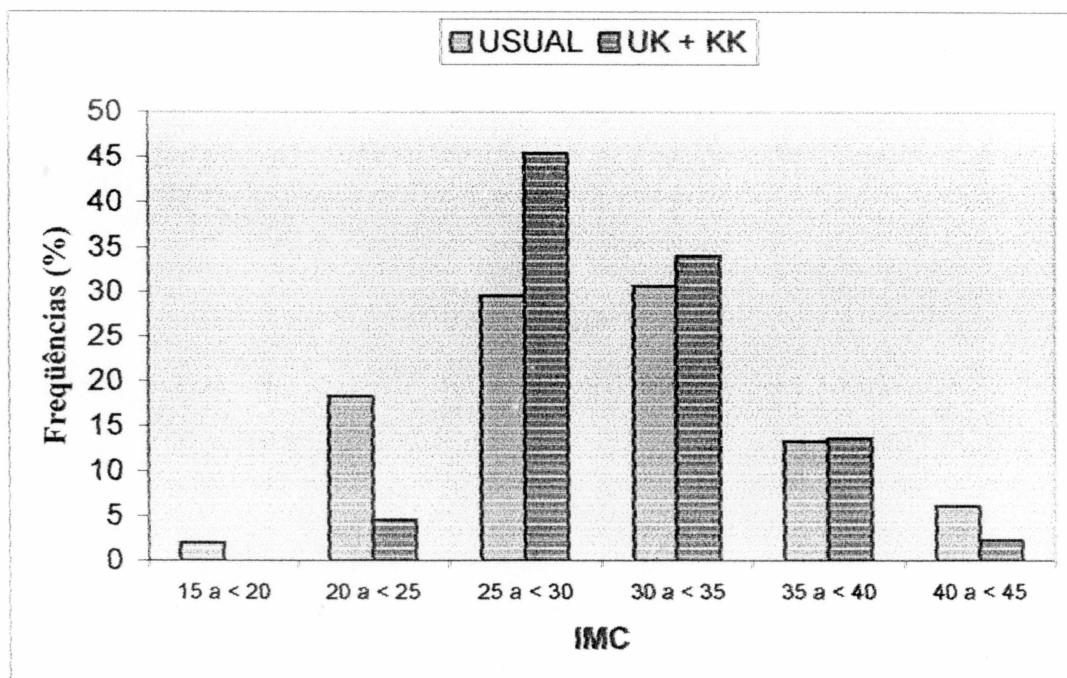


Gráfico 10. Distribuições de freqüências dos valores de índice de massa corporal (IMC), em diabéticos do tipo 2, classificados pela presença ou não da variante K.



podem apresentar SM, uma vez que não dispomos de informações de albuminúria, considerada pela OMS como outro fator de risco para a SM.

A tabela 23 resume estas freqüências nos grupos, conforme a ausência ou a presença de 1, 2 ou 3 fatores de risco, tanto em pacientes usuais (N = 90) como em pacientes com a mutação K (N = 38, genótipo UK e N = 5, genótipo KK).

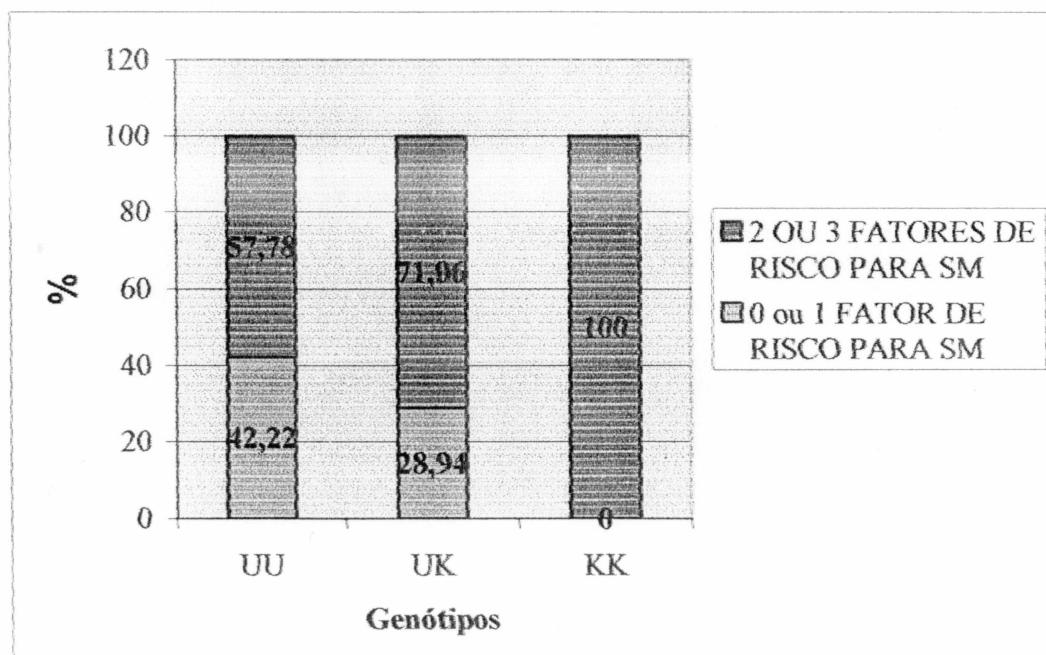
O gráfico 11 mostra as freqüências do grupo com 0 ou 1 fatores de risco para SM e do grupo com 2 ou 3 fatores de risco, nos 3 genótipos relativos à mutação K.

A partir da distribuição observada na tabela 23, foram procedidas as seguintes comparações através de testes χ^2 :

Tabela 23. Distribuição das freqüências de pacientes diabéticos do tipo 2, estudados quanto ao número de fatores de risco para Síndrome Metabólica e quanto aos genótipos relativos à mutação K.

FATORES DE RISCO	AMOSTRA TOTAL		GENÓTIPOS					
			UU		UK		KK	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Ausentes	8	6,01	6	6,67	2	5,26	0	0
1	41	30,83	32	35,56	9	23,68	0	0
2	57	42,86	35	38,89	18	47,37	4	80,00
3	27	20,30	17	18,89	9	23,68	1	20,00
Total	133	100	90	100	38	100	5	100

Gráfico 11. Distribuições das freqüências dos genótipos em relação à variante K, nos grupos: 0 ou 1, e 2 ou 3 fatores de risco para Síndrome Metabólica (SM).



- a) Comparação entre o grupo sem SM (0 ou 1 fator de risco) e o grupo com SM (2 ou 3 fatores de risco), considerando-se as 3 classes genotípicas: $\chi^2_{(2)} = 5,054$; $p = 0,08$; $N = 133$.
- b) Comparação entre os grupos sem SM (0 ou 1 fator de risco) e o grupo com SM (2 ou 3 fatores de risco), considerando-se duas classes genotípicas (UU e UK+KK): $\chi^2_{(1)} = 3,46$; $p = 0,06$; $N = 133$.

Os coeficientes de correlação, considerando-se as mesmas comparações dos itens a e b anteriores, foram, respectivamente, os seguintes:

- a) SM (sem e com) e genótipo em relação à mutação K (UU, UK e KK): $r = 0,19$; $p = 0,030$; $N = 133$.
- b) SM (sem e com) e genótipo em relação à mutação K (UU, UK+KK): $r = 0,16$; $p = 0,064$; $N = 133$.

A frequência do alelo *BCHE*539T* (mutação K) no grupo sem SM (0 ou 1 fatores de risco) foi de $11,22\% \pm 3,19\%$ e de $22,02\% \pm 3,20\%$ no grupo com SM (2 ou 3 fatores de risco). A diferença é estatisticamente significativa ($\chi^2_{(1)} = 4,88$; $p = 0,0272$).

5.7.2. Atividade da BChE

A atividade média (\pm E.P.) da butirilcolinesterase nos 133 pacientes investigados em relação aos fatores de risco para SM foi de $6,15 \pm 0,13$ KU/L.

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ao compararmos as atividades médias observadas nos grupos sem SM e com SM, seja no total da amostra, como na classe com genótipo usual e na classe com a mutação K. A tabela 24 mostra esses resultados.

Num grupo composto exclusivamente de heterozigotos (UK), as médias de atividade nos indivíduos com 0 ou 1 fatores de risco foi de $5,47 \pm 0,33$ KU/L ($N = 11$) e de $5,78 \pm 0,26$ KU/L ($N = 27$) nos indivíduos com 2 ou 3 fatores de risco. A diferença não é estatisticamente significativa ($t = 0,65$; $p = 0,52$).

Tabela 24. Comparações entre as atividades médias da butirilcolinesterase observadas no grupo com 0 ou 1 fator de risco para Síndrome Metabólica (SM) e no grupo com 2 ou 3 fatores de risco para SM, classificados em relação à presença ou não da mutação K.

AMOSTRA	FATORES DE RISCO				t	p
	0 ou 1	2 ou 3	MÉDIA \pm E.P.	N		
UU ($N = 90$)	$6,01 \pm 0,20$	38	$6,62 \pm 0,23$	52	1,94	0,056
UK+KK ($N = 43$)	$5,47 \pm 0,33$	11	$5,78 \pm 0,22$	32	0,70	0,486
TOTAL ($N = 133$)	$5,89 \pm 0,17$	49	$6,30 \pm 0,17$	84	1,58	0,116

6. DISCUSSÃO

6.1. METODOLOGIA

No presente trabalho, a técnica de RFLP com a estratégia de PCR-PIRA, desenvolvida por SHIBUTA e cols. (1994), foi empregada como metodologia principal na detecção da mutação K (*BCHE*539T*). Além disso, para obter mais segurança nos resultados, aplicou-se também a técnica de SSCA nas amostras classificadas como não usuais por RFLP.

Em trabalho anterior (SOUZA, 2001), desenvolvido no Laboratório de Polimorfismos e Ligação da UFPR, observou-se discrepância entre alguns dos resultados obtidos pelas duas técnicas. No presente estudo esta discrepância também foi observada, mas não impediu uma genotipagem bastante segura das amostras, pois a discrepância pode ser solucionada pela repetição de alguns ensaios e da utilização de algumas estratégias discutidas a seguir.

De um total de 249 amostras de DNA investigadas por RFLP, com o uso da técnica de PCR-PIRA (tabela 5), 161 mostraram clivagem total dos fragmentos amplificados (106 pb). A ação da enzima *Fnu4HI* evidenciou nestas amostras a presença do sítio de restrição formado a partir da seqüência do alelo usual e tais indivíduos puderam ser genotipados como homozigotos usuais. Considerando-se que a enzima de restrição foi capaz de cortar o DNA dos dois cromossomas de cada um desses indivíduos, não se teve dúvida quanto ao resultado dessas genotipagens.

As 88 amostras restantes mostraram clivagem apenas parcial dos fragmentos amplificados (supostas heterozigotas) ou não apresentaram qualquer clivagem (supostas homozigotas quanto à mutação K - *BCHE*539T/BCHE*539T*) e foram submetidas, então, a uma SSCA, com iniciadores diferentes daqueles usados na RFLP. O grau de concordância entre as técnicas de

RFLP e SSCA para essas 88 amostras foi de 94% (concordantes = 83) nesse primeiro teste. As 5 amostras com genotipagens discrepantes tiveram seus ensaios repetidos para ambas as técnicas e os resultados obtidos elevaram o grau de concordância para aproximadamente 99%. Os resultados das repetições para essas 5 amostras são apresentados e avaliados a seguir:

A) Três amostras classificadas inicialmente como heterozigotas por RFLP mostraram-se como UU em duas repetições pela mesma técnica. Supõe-se que os resultados do primeiro ensaio (falsos heterozigotos) possam ser atribuidos, mais provavelmente, a um problema de ação incompleta da enzima *Fnu4HI* naquele momento.

B) Uma amostra classificada inicialmente como heterozigota por RFLP mostrou-se como KK em duas repetições pela mesma técnica. Supõe-se que o resultado do primeiro ensaio possa ser devido a erro de procedimento no laboratório.

C) Uma amostra, codificada com o número 227, de uma paciente com diabetes mellitus do tipo 2, manteve a discrepância (UK por RFLP e KK por SSCA) mesmo após as repetições. Foi, então, investigada por meio de outras abordagens.

Essa amostra foi submetida a uma PCR-RFLP com concentração do gel de poliacrilamida (10%) maior que a utilizada até então (8%), aplicada juntamente com amostras controle. Tal procedimento buscava identificar uma possível diferença no fragmento de 85pb, supostamente resultante da clivagem pela enzima de restrição e que pudesse ser devido a uma outra mutação em um dos cromossomos ou a um produto espúrio da amplificação e que não se evidenciou pela SSCA. O resultado, entretanto, mostrou bandas em posições idênticas àquelas encontradas nas amostras controle (UK).

Em seguida, decidiu-se pelo seqüenciamento dos fragmentos de DNA dessa amostra onde foram utilizados os mesmos iniciadores da SSCA (P45 e P43). A leitura dessa seqüência mostrou

unicamente a presença da mutação K em todos os fragmentos amplificados, o que manteve inexplicada a presença de produtos de clivagem na técnica de RFLP, resultantes da presença do alelo usual.

No segundo seqüenciamento, amplificou-se uma região um pouco maior (Figura 5). Para tanto foram utilizados os iniciadores N45 e P43. A hipótese levantada foi que existisse uma mutação na região de pareamento do P45 e que não estivesse ocorrendo a amplificação dos segmentos de DNA onde a RFLP indicou a presença da seqüência usual. Assim um iniciador, a montante de P45, talvez pudesse fazer essa amplificação. A leitura dessa seqüência, entretanto, foi semelhante à obtida no primeiro seqüenciamento e a genotipagem da amostra permaneceu duvidosa.

Com base nos seqüenciamentos e analisando-se a figura 5, excluiu-se a possibilidade de mutação nas regiões correspondentes aos iniciadores N45, AP5, P45 e K13, enquanto permaneceu a possibilidade de mutação na região correspondente a P43, que impedisse o anelamento e, consequentemente, a amplificação do cromossomo que portasse o alelo usual.

Com esse raciocínio, planejou-se a amplificação pelos iniciadores AP5 e K13, seguida de SSCA. O resultado desse teste revelou o genótipo UK, confirmando a primeira genotipagem por RFLP.

Nossa hipótese é que a amostra 227 apresenta uma mutação nova que atinge a região de anelamento do iniciador P43. Esse iniciador é composto de 21 nucleotídeos e liga-se a uma região não codificadora do exon 4 (nt 1738 ao nt 1758), iniciando-se no 13º nucleotídeo após o código de terminação.

A região de anelamento do iniciador situa-se antes de dois sítios de poliadenilação (CA) e de dois sinais de poliadenilação (AATAAA e ATTAAA), conforme ARPAGAUS e cols. (1990).

Um dado importante a respeito da amostra 227 é a atividade da BChE (1,97 KU/L), que representa a atividade mínima dos variantes UK+KK dos diabéticos do tipo 1 e 2. Na amostra conjunta de todos os diabéticos (N = 249), apenas um outro indivíduo apresentou atividade mais baixa (1,08 KU/L). Na tabela 15 pode-se observar que a atividade média dos UK+KK de diabéticos do tipo 2 é de $5,68 \pm 0,18$ KU/L, variando de 1,97 a 8,15 KU/L. Com base nesses dados, pode-se inferir que essa suposta nova mutação condiciona uma enzima silenciosa, ou seja, com atividade inferior a 10% da atividade da enzima usual. Neste contexto, é interessante citar o trabalho de MURATANI e cols. (1991), que descreveram um caso de ausência de atividade da BChE em um paciente diabético do tipo 2, devida a uma inserção Alu (342 pb), em homozigose, localizada no exon 2 do gene *BCHE* (tabela 2).

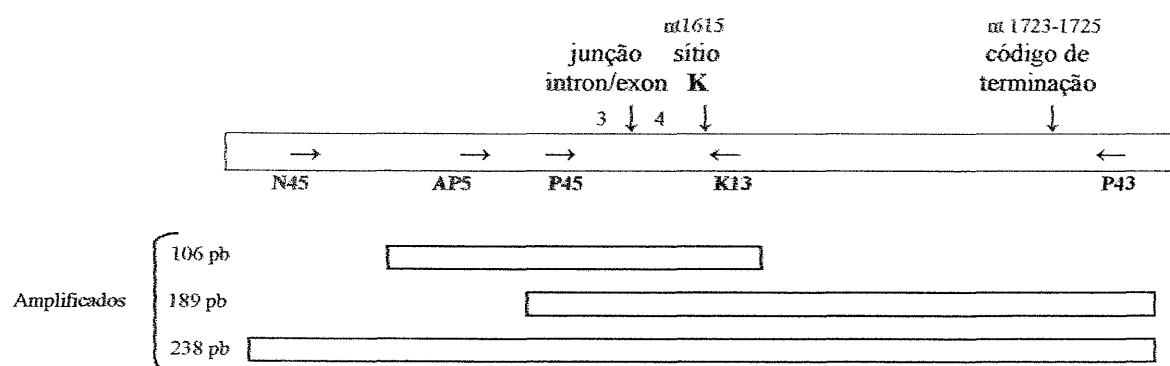
MIKAMI (comunic. pessoal, 2004) ao dividir uma amostra de doadores de sangue de Curitiba em três grupos de atividade da BChE: baixa ($\leq 4,0$ KU/L); média ($\geq 4,4$ e $\leq 4,9$ KU/L) e alta ($\geq 5,3$ KU/L) verificou a proporção de 26:6:1 variantes não usuais, respectivamente, ilustrando numericamente a associação entre variantes não usuais e a atividade baixa.

A elucidação do tipo de mutação presente na amostra 227 só será possível após novo seqüenciamento com iniciadores a jusante de P43. Caso se trate de uma deleção grande, poderá até incluir a parte codificadora. No nucleotídeo 1914 (região não codificadora) já foi descrita uma variante polimórfica (BARTELS e cols., 1992a), encontrada em 26% das pessoas estudadas.

6.2. FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS

A mutação K não é identificada seguramente por métodos de inibição enzimática, previamente utilizados na investigação das variantes genéticas não usuais da butirilcolinesterase.

Figura 5. Diagrama compreendendo o intron 3, exon 4 e parte da região a jusante, com indicação dos iniciadores usados nas amplificações e respectivos produtos.



Por isso, apesar de ter sido descrita pela primeira vez em 1978 (RUBINSTEIN e cols., 1978), existem apenas alguns estudos sobre sua freqüência em diferentes populações mundiais, por métodos moleculares de análise do DNA.

Observa-se que esta mutação é amplamente distribuída em diferentes grupos étnicos e certamente é a mutação não usual mais freqüente entre as detectadas em região codificadora desse gene. A freqüência alélica tem se situado, aproximadamente, entre 12% e 20% em populações não isoladas (cf. SOUZA e cols., 1998) e foi relatada como igual a $5,76\% \pm 2,30\%$ (ACUÑA e cols., 2003) e $3,77\% \pm 0,85\%$ (FURTADO e cols., comunicação pessoal), em Huilliches do Chile e em Guaraní do Mato Grosso do Sul, respectivamente.

No presente estudo foram examinados 498 alelos, todos de pacientes com diabetes mellitus e a freqüência observada foi de 19,1%. Por outro lado, se considerarmos o tipo de diabetes, observamos uma freqüência de 21,84% no tipo 1 contra 17,47% no tipo 2. Essa diferença entre os tipos de DM não é estatisticamente significativa mas aponta, para o tipo 1, um valor levemente alto se comparado à amplitude de variação observada em estudos anteriores em amostras populacionais.

As freqüências genotípicas, entre os grupos de diabéticos do tipo 1 e 2, também não diferiram estatisticamente e, em cada grupo, estão distribuídas de acordo com o teorema de Hardy-Weinberg.

6.3. VARIANTE K, DIABETES MELLITUS E ORIGEM ÉTNICA

Todos os 103 pacientes, que compõem a amostra de diabéticos do tipo 1, foram classificados quanto à origem étnica. Observa-se que 71,8% (N = 74) são de indivíduos euro-

brasileiros e 28,2% (N = 29) de afro-brasileiros. Dos 146 pacientes da amostra de diabéticos do tipo 2, 138 foram classificados quanto à origem étnica. Se excluirmos duas amostras de orientais, observaremos 61,83% (N = 84) de euro-brasileiros e 38,2% (N = 52) de afro-brasileiros. A diferença na composição étnica, observada entre as amostras DM do tipo 1 e DM do tipo 2, não é estatisticamente significativa.

A maior proporção de euro-brasileiros em relação a afro-brasileiros (2,6:1 em DM do tipo 1 e 1,6:1 em DM do tipo 2) é um dado esperado se considerarmos que a população de Curitiba, onde foi coletada a amostra, é predominantemente composta de população branca com ascendência européia. Entretanto, de acordo com os dados obtidos no censo demográfico de 1998, 81,7% da população de Curitiba foi classificada como de cor branca, 15,7% parda ou mulata, 1,7% negra e 0,9% ameríndia (IBGE, 1999). Excluindo-se os ameríndios, observa-se uma proporção de 4,7 euro-brasileiros : 1 afro-brasileiro. Aparentemente, as amostras de diabéticos do presente estudo apresentam maior proporção de afro-brasileiros do que a registrada pelo censo. Deve-se ressaltar, entretanto, que os critérios de classificação quanto à origem étnica utilizados no censo demográfico, baseados na auto-classificação, diferem dos utilizados neste estudo.

Fatores que também poderiam influir nas proporções étnicas encontradas nas amostras de diabéticos seriam: estratificação étnica na procura pelo atendimento no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná e diferença na incidência do DM, dependendo do grupo étnico. De qualquer maneira, os dados coletados no presente estudo não são suficientes para fazer inferências sobre nenhum desses dois aspectos.

É interessante ressaltar que, de acordo com a Associação Americana de Diabetes, os afro-norte-americanos apresentam um risco duas vezes maior de desenvolver diabetes do tipo 2 que a população geral dos EUA (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2003).

Em relação à mutação K, procurou-se detectar alguma diferença nas freqüências alélicas ou genotípicas que pudesse estar relacionada à etnia. Para tanto foram comparadas as freqüências entre euro e afro-brasileiros, dentro de cada amostra, ou seja, DM do tipo 1 (tabela 9) e DM do tipo 2 (tabela 10). Nenhuma diferença mostrou significância estatística. É interessante ressaltar, entretanto, um resultado próximo da significância quando se comparou a distribuição das freqüências genotípicas entre euro e afro-brasileiros no grupo de diabéticos do tipo 1. A observação da distribuição das freqüências indica, aparentemente, um discreto aumento de indivíduos heterozigotos entre afro-brasileiros, em detrimento dos homozigotos, comparativamente aos euro-brasileiros. De qualquer forma, esse efeito não pôde ser detectado nesse estudo, talvez devido ao tamanho relativamente pequeno desse grupo ($N = 29$).

Um outro tipo de comparação procurou detectar diferenças nas freqüências alélicas e genotípicas da mutação K que pudessem ser devidas ao tipo de diabetes que os indivíduos apresentavam. Para tanto foram comparadas as freqüências entre diabéticos do tipo 1 e tipo 2, analisadas no total de indivíduos euro-brasileiros ($N = 158$; tabela 11) e no total de afro-brasileiros ($N = 81$; tabela 12). Nenhum resultado significativo foi observado.

6.4. ATIVIDADE DA BUTIRILCOLINESTERASE

Diversas variantes genéticas da butirilcolinesterase provocam diminuição nos níveis de atividade plasmática desta enzima e isto não confere, ao indivíduo portador, nenhuma alteração orgânica evidente. Isto inclui as variantes chamadas “silenciosas” que são raras e podem conferir ausência total, ou um decréscimo de atividade maior que 90% (PRIMO-PARMO e cols., 1996).

A variante K é uma mutação de ponto que provoca a substituição de uma alanina por uma treonina na cadeia protéica e que resulta, no homozigoto, numa diminuição na atividade plasmática de cerca de 33% (RUBINSTEIN e cols., 1978; BARTELS e cols., 1992a). Essa diminuição é atribuída ao menor número de moléculas circulantes e duas hipóteses são mais plausíveis para explicar o fato: degradação acelerada ou síntese diminuída de moléculas da enzima. Por outro lado, ALTAMIRANO e cols. (2000), ao compararem a BChE usual com a BChE K, purificadas, mostraram que elas são cataliticamente similares frente aos substratos benzoilcolina e butiriltiocolina, e apresentam a mesma proporção de tetrâmeros em relação às outras formas moleculares da BChE.

No presente estudo, a mutação K influiu significativamente na diminuição da atividade tanto em DM do tipo 1 como em DM do tipo 2, como mostra a análise de variância das distribuições de atividades nos genótipos UU, UK e KK (tabela 14).

No DM do tipo 1, a média de atividade nos heterozigotos foi cerca de 13% menor que nos homozigotos usuais. Já nos homozigotos KK, a queda foi de 30% em relação aos usuais. Essas quedas estão de acordo com as descritas por RUBINSTEIN e cols. (1978) e por BARTELS e cols. (1992a). Nos DM do tipo 2, a diminuição da atividade média em heterozigotos, em relação aos usuais, foi de cerca de 11% e de apenas 9% no pequeno grupo de 5 homozigotos KK. Observa-se que nos DM do tipo 2 as diferenças de atividade da BChE entre os genótipos são significativas, mas não tão pronunciadas como em DM do tipo 1 (tabela 14).

MIKAMI (comunic. pessoal, 2004), estudando doadores de sangue (homens euro-brasileiros, fenótipo CHE2 C5-, idades entre 18 e 30 anos e IMC ≥ 20 e ≤ 25), encontrou atividades de $4,87 \pm 0,07$ UK/L, $4,21 \pm 0,10$ UK/L e $3,41 \pm 0,23$ UK/L, respectivamente em 253 homozigotos usuais, 98 heterozigotos e 15 homozigotos KK. As diferenças entre esses valores

são significativas. Os decréscimos na atividade da BChE, devido à presença da mutação K, são semelhantes aos encontrados nos diabéticos do presente estudo. FURTADO e cols. (manuscrito, 2004), estudando Guaranis do Mato Grosso do Sul, encontraram 29% menos atividade da BChE em heterozigotos ($3,23 \pm 0,19$; N = 13) do que em homozigotos usuais ($4,52 \pm 0,19$; N = 51).

Quando se classificou a amostra segundo o critério presença ou não da variante K (tabela 15), observou-se que nos DM do tipo 1 a queda de atividade proporcionada pela presença da variante K, em relação ao genótipo usual, foi de aproximadamente 15%, enquanto nos diabéticos do tipo 2 essa queda foi de 10%. Ambas as diferenças são significativas. Esses dados parecem mostrar efeito semelhante da variante K, em relação à queda de atividade da BChE, em diabéticos e normais.

Como, no presente estudo, não dispomos de uma amostra controle pareada por sexo, idade e origem étnica, com valores de atividade, não pudemos avaliar se o diabetes está conferindo um aumento significativo de atividade da BChE, mas constatamos que a média de $6,13 \pm 0,12$ KU/L encontrada no total de pacientes com DM do tipo 2 é maior ($p = 10^{-6}$) que a encontrada em DM do tipo 1 ($5,12 \pm 0,12$ KU/L). Esta tendência se mantém quando comparamos os valores por genótipos, ou seja:

- usuais DM do tipo 2 têm atividade maior que usuais DM do tipo 1 ($t = 4,01$; $p = 9 \times 10^{-5}$).
- variantes (UK+KK) DM do tipo 2 têm atividade maior que variantes (UK+KK) DM do tipo 1 ($t = 4,33$; $p = 4 \times 10^{-5}$).

Podemos fazer uma comparação geral dos valores de atividade da BChE, do presente estudo, com os encontrados em outros trabalhos (tabela 25).

A atividade média dos DM do tipo 2 do presente estudo ($6,13 \pm 0,12$) diferiu significativamente ($p < 0,001$) daquelas obtidas em três amostras de doadores de sangue de Curitiba, em controles não diabéticos e em diabéticos do tipo 2 (tabela 25). A atividade média

Tabela 25. Atividades médias (\pm E.P.) da butirilcolinesterase (KU/L) em diferentes amostras.

Tipo de amostra	N	Média \pm E.P.	Referência
Doadores de sangue de Curitiba-PR.*	113	$5,23 \pm 0,10$	CHAUTARD-FREIRE-MAIA e cols., 1991
	173	$4,52 \pm 0,09$	ALCÂNTARA e cols., 2001
	366	$4,63 \pm 0,06$	MIKAMI (comunic. pessoal), 2004
Controles não diabéticos	101	$4,23 \pm 0,19$	ABBOTT e cols., 1993
Diabéticos do tipo 1	56	$8,10 \pm 0,45$	
Diabéticos do tipo 2	51	$7,22 \pm 0,27$	
Diabéticos do tipo 1	103	$5,12 \pm 0,12$	Presente estudo
Diabéticos do tipo 2	146	$6,13 \pm 0,12$	

* amostras constituídas apenas de indivíduos com fenótipo CHE2 C5-

dos diabéticos DM do tipo 1 do presente estudo ($5,12 \pm 0,12$) diferiu significativamente ($p < 0,001$) daquelas obtidas em controles não diabéticos, em diabéticos do tipo 1 e em duas das três amostras de doadores de sangue de Curitiba (tabela 25).

Em experimentos com ratos, nos quais o diabetes foi induzido por drogas que destróem seletivamente as células beta pancreáticas, foi constatado um aumento de atividade da BChE (ANNAPURNA e cols., 1991; DAVE e KATYARE, 2002). Também em ratos com diabetes induzido, PATEL e cols. (1990) mostraram um aumento na atividade da BChE, acompanhado de um aumento nos níveis plasmáticos de triglicerídeos e glicerol. A administração de um inibidor específico da BChE reverteu aos níveis normais a glicose, os triglicerídeos e o glicerol. Segundo esses autores, o aumento de atividade da BChE poderia ser resposta à hipertrigliceridemia, ou então refletir um decréscimo na sua remoção da circulação, como consequência de microangiopatia renal originada pelo estado diabético.

6.5. INVESTIGAÇÃO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE A MUTAÇÃO K E DIABETES MELLITUS

6.5.1. Diabetes Mellitus do tipo I

A contribuição de um fator genético ou ambiental para uma doença complexa, seja no seu desencadeamento ou agravamento, é de difícil caracterização, pois pode ser obscurecida ou confundida com a contribuição de um outro fator. O estabelecimento de uma relação causal entre um alelo e a doença requer um conhecimento refinado acerca dos caminhos metabólicos do produto desse gene. Na maioria das vezes, isso não é possível e a descoberta de associações contribui apenas, gradativamente, para o entendimento da doença.

A investigação da etiologia do diabetes do tipo 1 reuniu, ao longo dos últimos anos, uma quantidade consistente de evidências, que mostram a sua natureza auto-imune. Fatores provavelmente ambientais atuariam em um indivíduo geneticamente suscetível.

A lesão que leva a um declínio na produção de insulina seria ocasionada pela infiltração de linfócitos T nas ilhotas pancreáticas e destruição das células beta produtoras da insulina. O papel das infecções virais na patogênese do diabetes do tipo 1 recebeu mais força com os novos dados, indicando uma influência importante de um grupo de enterovírus no desencadeamento da doença (AKERBLOM e cols., 2002).

Assim, genes relacionados ao sistema imunológico são fortes candidatos à associação com o DM do tipo 1 e isso tem se confirmado. Alguns alelos e haplótipos do sistema HLA têm sido bem comprovados como associados com DM do tipo 1. Segundo HAWA e cols. (2002), há evidências de que esses alelos associados operam com mais intensidade em crianças, mas têm um reduzido papel no DM do tipo 1 que se manifesta em adultos. Ainda segundo esses autores, o período crítico de ativação imune é provavelmente curto, mas é seguido de um processo de instalação de duração variável, o qual determinará a idade de aparecimento da doença. Portanto, durante o processo de instalação da doença podem estar envolvidos diversos genes e fatores ambientais.

O espectro de genes que podem atuar em pontos metabólicos importantes, de alguma maneira conferindo susceptibilidade a esta doença, é muito grande, e seus mecanismos estão longe de ser compreendidos.

Entre os fatores alimentares, o estudo das proteínas do leite de vaca tem recebido maior atenção, devido a trabalhos que mostram uma relação entre introdução precoce deste produto na dieta infantil e risco aumentado de diabetes do tipo 1. As vitaminas C, D e E, zinco e nicotinamida, parecem ter efeito protetor e ainda precisam ser melhor estudados. A obesidade e o crescimento linear muito rápido podem aumentar o risco de DM do tipo 1. Entre as toxinas, os

compostos N-nitrosos são os principais candidatos como fatores de risco (AKERBLOM e cols., 2002; VIRTANEN e KNIP, 2003).

A ação biológica da butirilcolinesterase no organismo não está esclarecida, mas sabe-se que esta enzima está presente em diversos tecidos, inclusive no pâncreas.

MAHMOUD e cols. (2003), ao estudarem um grupo de gestantes com hipertensão induzida pela gravidez e um grupo controle de gestantes normais, mostraram que, em ambos, a freqüência de células T ativadas era inversamente proporcional à atividade da BChE. Sugerem que uma baixa atividade dessa enzima possa conferir menor proteção contra a ação de toxinas ambientais com elevação da ativação imune, podendo contribuir com isso no desenvolvimento da hipertensão induzida por gravidez ou mesmo no insucesso da gravidez. Esses autores citam NAVARRO e cols. (2001) sobre a capacidade dos organofosfatos, conhecidos inibidores da BChE, em provocar disfunção imune. STERNFELD e cols. (1997) comentam sobre a potente capacidade da BChE de desintoxicação frente a uma grande variedade de xenobióticos que ameaçam a gravidez como, por exemplo, a cocaína e a alfa-solanina.

Em trabalho do Laboratório de Polimorfismos e Ligação da UFPR (FONTOURA-DA-SILVA e CHAUTARD-FREIRE-MAIA, 1996) mostrou-se que a BChE usual tem maior poder de proteger a acetilcolinesterase eritrocitária, frente ao efeito de agrotóxicos, que as variantes não usuais.

Nesse contexto é de interesse ressaltar que o alelo *BCHE*539T* confere uma redução de cerca de 33% no nível de atividade da BChE e, consequentemente, espera-se que apresente menor poder de desintoxicação.

Ao que sabemos, este é primeiro estudo de investigação de associação entre a freqüência da mutação K da butirilcolinesterase e o DM do tipo 1. Dados indicativos de associação entre a

variante K e o DM do tipo 2 foram relatados por HASHIM e cols. (2001). Apesar dos fatores etiológicos do desencadeamento dos tipos 1 e 2 de DM diferirem, com o desenvolvimento da doença no DM do tipo 2 também poderá ocorrer lesão de células beta pancreáticas, que é a característica inicial do DM de tipo 1. Em vista desse aspecto, consideramos que não seria improvável que a variante K pudesse ter também algum papel no DM de tipo 1.

A investigação de uma possível associação entre a mutação K da butirilcolinesterase e o DM do tipo 1 foi procedida, neste estudo, através da comparação entre as freqüências alélicas e genotípicas encontradas no grupo de diabéticos do tipo 1 ($N = 103$) e as freqüências observadas em uma amostra controle (SOUZA, 2001), constituída de doadores de sangue de Curitiba ($N = 944$). Além disso, as freqüências encontradas nos pacientes foram comparadas com as freqüências observadas numa sub-amostra extraída do total de doadores de sangue e pareada por origem étnica, na proporção de 1:1 com os paciente diabéticos.

Observou-se que a freqüência do alelo K nos diabéticos do tipo 1 (21,84%) é aparentemente maior que a encontrada na amostra de doadores de sangue (17,53%) e na amostra controle pareada (18,45%), mas as diferenças, em nenhum dos casos, mostraram significância estatística (tabela 13).

Em relação às freqüências genotípicas, observou-se que as freqüências de heterozigotos e homozigotos (KK) têm uma tendência a serem discretamente maiores nesses diabéticos que nos controles mas, também neste caso, não há diferenças estatisticamente significativas (tabela 13).

Uma outra abordagem, utilizada neste estudo, para investigar uma possível associação da mutação K com DM do tipo 1, foi a comparação das médias e variâncias, obtidas das quantificações bioquímicas, dados antropométricos e idade de aparecimento da doença (tabela 16), entre o grupo usual (UU) e o grupo variante (UK+KK).

As quantificações bioquímicas são indicadores diretos dos distúrbios metabólicos a que estão sujeitos os pacientes, mesmo sob orientação e cuidados médicos. Essas quantificações podem estar relacionadas ao diabetes em si (glicose, HbA_{1C}, insulina), aos distúrbios de lipides (CT, TG, HDL-C, apo B, glicerol) e à função hepática (AST, ALT).

Quando as variáveis da tabela 16 foram comparadas em relação às variâncias, entre os grupos usual e variante, apenas os níveis de AST em ln (aspartato-aminotransferase) mostraram diferenças significativas.

Os níveis plasmáticos das aminotransferases (AST e ALT) são comumente utilizados como indicadores de disfunção hepática, mas a etiologia desse aumento ainda é desconhecida. CLARK e cols. (2003) estudaram uma amostra (N = 15.676) da população norte-americana e mostraram que cerca de 31% dos casos de aumento dos níveis de AST ou ALT estão relacionados com história de alcoolismo, evidência de hepatite B ou C ou hemocromatose, mas os 69% restantes são de causa desconhecida. Mostraram ainda uma correlação positiva, nestes casos não explicados, entre os níveis aumentados e IMC, medida da cintura, TG, resistência à insulina e HDL baixo. Exclusivamente nas mulheres, os níveis altos estão correlacionados também com DM do tipo 2 e hipertensão.

Segundo KAPLAN e PESCE (1996), atividades elevadas de ALT e AST podem ser observadas nas seguintes doenças: infarto do miocárdio, infarto renal, distrofia muscular, doença de Gaucher, doença de Niemann-Pick, mononucleose infecciosa, leucemia mielocítica, hipertireoidismo e cetoacidose diabética.

A compreensão do resultado obtido aqui, ou seja, de uma variância maior dos valores de aspartato-aminotransferase nos variantes, comparativamente aos usuais, requer mais informações, as quais poderão ser obtidas em investigações posteriores.

Nenhuma das quantificações bioquímicas mostrou diferenças significativas nas médias entre os grupos usual e variante, através do teste *t* (tabela 16). Os dados antropométricos são semelhantes entre o grupo usual e variante.

A única variável que apresentou significância ($p = 0,015$) na comparação de médias foi a idade de aparecimento da doença (tabela 16). Ao que sabemos, esse dado não tinha sido ainda relatado. Na tabela 17, observa-se uma freqüência acumulada de 26,2% dos casos com surgimento até os 10 anos de idade nos usuais contra 43,6% nos variantes.

A freqüência do alelo K entre os diabéticos do tipo 1 com idade de aparecimento da doença inferior a 13 anos (mediana) foi significativamente maior que a encontrada entre diabéticos com idade de aparecimento de 13 anos ou mais (tabela 18). É interessante ressaltar que, nos diabéticos do tipo 1, cuja idade de aparecimento da doença é inferior a 13 anos, a freqüência de pacientes com a mutação K (53,06%) ultrapassa a freqüência de pacientes com o genótipo usual. Em nenhuma das populações já descritas (item 6.2), tal predominância foi verificada. No grupo, cuja idade de aparecimento da doença foi de 13 ou mais, essa freqüência é de 25,49% (tabela 18). Apesar de ser um número pequeno, salienta-se que todos os KK (N = 5) dessa amostra tiveram o aparecimento da doença antes dos 13 anos.

Os resultados da análise de regressão múltipla escalonada confirmam a indicação da associação da variante K com a idade mais precoce de aparecimento do DM do tipo 1.

A freqüência significativamente maior do alelo K nos diabéticos com aparecimento da doença antes dos 13 anos, quando comparada com as freqüências da população geral e da amostra controle pareada, sugere que essa mutação atuaria como fator de risco do diabetes mellitus do tipo 1. Não podemos, entretanto, excluir a possibilidade de que essa associação seja

devida a um desequilíbrio de ligação entre essa mutação e uma variante polimórfica localizada em outro gene, como também devida a um erro estatístico do tipo I.

Esses dados estão de acordo com os trabalhos que relacionam a atividade baixa da BChE e auto-imunidade e seria interessante a realização de pesquisa semelhante em outras amostras.

6.5.2. Diabetes mellitus do tipo 2

A investigação de uma possível associação entre a mutação K da butirilcolinesterase e o DM do tipo 2 foi procedida de forma semelhante àquela utilizada em DM do tipo 1, ou seja, através da comparação entre as freqüências alélicas e genotípicas encontradas na amostra de pacientes ($N = 146$) e as encontradas nos doadores de sangue de Curitiba ($N = 984$) e numa subamostra de doadores pareada por origem étnica ($N = 146$).

Observou-se que a freqüência do alelo K nos diabéticos (17,12%) é muito semelhante à freqüência encontrada nos doadores (17,53%) e, aparentemente, um pouco maior que a encontrada na amostra pareada por origem étnica (13,70%). As diferenças não são estatisticamente significativas. As comparações entre as distribuições de freqüências genotípicas também não apresentaram diferenças estatisticamente significativas (tabela 13).

Dessa forma, nesse estudo não foi constatada a esperada associação entre a freqüência da mutação K da butirilcolinesterase e o DM do tipo 2, de modo que os presentes dados não corroboram os obtidos por HASHIM e cols. (2001). Esses autores investigaram uma amostra composta de 276 indivíduos caucasóides, ingleses, com DM do tipo 2 e encontraram uma freqüência de 22,8% do alelo *BChE*539T*, significativamente maior ($p = 0,0017$) que a observada na amostra controle de não diabéticos (15,8%). Além disso, encontraram uma

freqüência maior ($p = 0,00079$) de homozigotos (KK) nos diabéticos (5,8%) que nos controles (2,6%). O valor de OR (odds ratio) foi de 1,44 (1,15 a 1,82), o que representa um aumento de 44% no risco para DM do tipo 2, associado à presença do alelo *BCHE*539T*.

Além disso, esses mesmos autores compararam as freqüências alélicas e genotípicas entre uma sub-amostra de 50 diabéticos que não faziam uso de insulina e uma sub-amostra de 225 diabéticos que utilizavam a insulina. A utilização de insulina exógena é um recurso para pessoas cuja função pancreática está sendo insuficiente para manter a glicemia em níveis aceitáveis. Assim, a necessidade do uso de insulina exógena foi utilizada na pesquisa como um indicador de disfunção das células beta pancreáticas. As comparações alélicas e genotípicas, entretanto, não mostraram diferenças significativas. Os autores argumentaram, então, que a mutação K não influiu no grau de disfunção das células beta pancreáticas o que seria esperado se tivesse alguma relação na deposição amilóide. A associação positiva encontrada no trabalho seria, segundo eles, devida a um desequilíbrio de ligação com variante de um loco de susceptibilidade ao DM do tipo 2, identificado por estudos de rastreamento do genoma e localizado em 3q27-qter, próximo ao gene *BCHE* (3q26.1-26.2).

A lesão pancreática está relacionada a um aumento da massa amilóide, em detrimento da massa de células responsáveis pela produção de insulina. Alguns autores acreditam que a natureza dessa lesão possa ser semelhante àquela encontrada em tecidos do cérebro na doença de Alzheimer. Existem diversos estudos que mostram uma associação positiva entre essa doença e o alelo *BCHE*539T* (LEHMANN e cols., 1997; McILROY e cols., 2000; TILLEY e cols., 1999; WIEBUSCH e cols., 1999).

O estudo de JOHANSEN e cols. (2003), em amostras da população dinamarquesa, também não confirmou a associação encontrada por HASHIM e cols. (2001). A freqüência do

alelo *BCHE*539T* em 809 diabéticos do tipo 2 foi de $20,5\% \pm 2,00\%$ contra $19,1\% \pm 2,4\%$ no grupo controle ($p = 0,64$).

Os estudos de associação, apesar de representarem uma ferramenta importante na dissecção genética de doenças complexas, apresentam um problema importante de irreprodutibilidade. Isto se deve, em grande parte, às diferenças encontradas entre populações no conjunto de seus genes e no contexto ambiental em que a associação se insere.

A mesma abordagem utilizada no DM do tipo 1 para investigar uma possível influência da mutação K foi utilizada na amostra DM do tipo 2, ou seja, comparação das médias e variâncias das quantificações bioquímicas, dados antropométricos e idade de aparecimento da doença (tabela 20), entre o grupo usual (UU) e o grupo variante (UK+KK).

Nossos dados apresentaram uma variância significativamente maior do IMC no grupo usual do que no grupo com a variante K. SOUZA e cols. (2004) também encontraram diferenças na variância do IMC na população geral, mas em sentido contrário ao observado em diabéticos do tipo 2 do presente estudo. Também é interessante observar que JOHANSEN e cols. (2003) encontraram entre os não-diabéticos, um valor significativamente maior na média do IMC nos indivíduos KK, comparativamente ao demais (UU + UK).

Nenhuma das médias de quantificações bioquímicas, comparadas pelo teste *t*, mostrou diferenças significativas entre os grupos usual e variante.

Em relação aos dados antropométricos encontrou-se uma diferença significativa ($p = 0,023$) entre as médias de RCQ (razão cintura-quadril) de usuais e de portadores da mutação K.

A regressão múltipla escalonada (tabela 22), em que a variável RCQ foi considerada como dependente, mostrou coeficientes de regressão significativos entre RCQ e as variáveis IMC, TG, sexo e variante K. A RCQ está correlacionada positivamente com IMC e TG, sendo

maior em homens e pessoas com a variante K. Esse resultado confirmou aquele obtido inicialmente, pela comparação de médias, e reforça achados anteriores da relação da variação K com IMC. No trabalho de SOUZA e cols. (2004), como foi o heterozigoto que mostrou maior variância do IMC do que os indivíduos usuais e KK, esses autores sugeriram que a associação fosse do próprio gene *BCHE* com o IMC.

A RCQ é um dos critérios usados para a inclusão de um paciente na categoria de Síndrome Metabólica. Nos dados do presente estudo, o coeficiente de correlação, entre os pacientes sem e com SM e genótipo em relação à mutação K (UU, UK e KK) foi significativo ($r = 0,19$; $p = 0,030$; $N = 133$). Além disso, a frequência da variante K no grupo sem SM foi de $11,22\% \pm 3,19\%$ e de $22,02\% \pm 3,20\%$ no grupo com SM, sendo essa diferença estatisticamente significativa ($\chi^2_{(1)} = 4,88$; $p = 0,0272$). Esses dados sugerem que, em DM do tipo 2, a presença da variante K predispõe para maior RCQ e, em consequência, para maior risco de Síndrome Metabólica nesses pacientes, o que indica maior gravidade da doença e maior risco de doença cardiovascular.

7. CONCLUSÕES

7.1. VARIANTE K E DIABETES MELLITUS DO TIPO I

- 1) As freqüências alélicas e genotípicas, encontradas nesses diabéticos, não diferem daquelas da amostra total de controles doadores de sangue de Curitiba e também não diferem da sub-amostra desses doadores de sangue pareada por origem étnica.
- 2) Comparando-se o grupo UU com o grupo UK+KK desses diabéticos, quanto às variáveis antropométricas (peso, altura, índice de massa corporal e razão cintura-quadril), bioquímicas (atividade da BChE, colesterol total, triglicerídeos, HDL-C, apo B, glicerol, glicose, insulina, HbA_{1C}, alanina amino-transferase e aspartato-aminotransferase), pressões arteriais e idade de aparecimento da doença, os seguintes resultados significativos foram encontrados:
 - 2.1. O grupo UK+KK mostrou menor média de idade de aparecimento da doença do que o grupo usual e, como esperado, também mostrou menor atividade média da BChE do que o usual.
 - 2.2. O grupo UK+KK apresentou variância maior nos níveis de aspartato-aminotransferase do que o grupo usual.
- 3) A freqüência do alelo K nos diabéticos com aparecimento da doença antes dos 13 anos (mediana) é significativamente mais alta do que naqueles com idade de aparecimento da doença maior ou igual a 13 anos e do que no grupo total de controles. Comparações semelhantes quanto a esses grupos, em relação às distribuições das freqüências genotípicas, também mostraram diferenças estatisticamente significativas. O valor de OR (odds ratio) indica uma susceptibilidade 2,4 vezes maior de desenvolvimento do DM do tipo 1 antes dos 13 anos de idade para os portadores da variante K (genótipos UK ou KK) do que para os homozigotos usuais (UU).

7.2. VARIANTE K E DIABETES MELLITUS DO TIPO 2

- 1) As freqüências alélicas e genotípicas, encontradas nesses diabéticos, não diferem da amostra total dos controles doadores de sangue de Curitiba e também não diferem da sub-amostra desses mesmos doadores de sangue pareada por origem étnica.
- 2) Comparando-se o grupo UU com o grupo UK+KK desses diabéticos, quanto às variáveis antropométricas, bioquímicas, pressões arteriais e idade de aparecimento da doença, os seguintes resultados significativos foram encontrados:
 - 2.1) O grupo UK+KK mostrou maior média da razão cintura-quadril do que o grupo usual e, como esperado, também mostrou menor atividade média da BChE do que o usual.
 - 2.2) O grupo UK+KK apresentou variâncias menores do que o grupo usual em relação a peso e índice de massa corporal.
- 3) A relação positiva entre presença ou não da variante K e razão cintura-quadril (RCQ) nesse diabético foi confirmada por análise de regressão múltipla escalonada. A RCQ, em média, aumenta com o nível de triglicerídeos, com o índice de massa corporal, em homens e diabéticos com a variante K.
- 4) A freqüência da variante K foi significativamente mais alta nesses diabéticos com Síndrome Metabólica do que naqueles sem essa síndrome.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, C.A.; MACKNESS, M.I.; KUMAR, S.; OLUKOYA, O.A.; GORDON, C.; ARROL, S. Relationship between serum butyrylcholinesterase activity, hypertriglyceridemia and insulin sensitivity in diabetes mellitus. *Clin. Sci.*, v. 85, p. 77-81, 1993.
- ACUÑA, M.; EATON, L.; RAMIREZ, N.R.; CIFUENTES, L.; LLOP, E. Genetic variants of serum butyrylcholinesterase in Chilean Mapuche Indians. *Am. J. Phys. Anthropol.*, v. 121, p. 81-85, 2003.
- AKERBLOM, H.K.; VAARALA, O.; HYÖTY, H.; KNIP, M. Environmental factors in the etiology of type 1 diabetes. *Am. J. Med. Genet.*, v. 115 (1), p. 18-29, 2002.
- ALCÂNTARA, V.M. *Fenótipos da butirilcolinesterase e suas relações com dados antropométricos, bioquímico-hormonais e pressão arterial em obesos e na população geral de Curitiba, PR*. Curitiba, 2000. Tese (Doutorado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- ALCÂNTARA, V.M.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A.; CULPI, L. Freqüências dos alelos CHE1*F e CHE1*K da colinesterase do soro, em brancos e negrões de Curitiba. *Ciênc. Cult.*, v. 40 (supl), p. 808-809, 1988.
- ALCÂNTARA, V.M.; OLIVEIRA, L.C.; RÉA, R.R.; SUPLICY, H.L.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Butyrylcholinesterase and obesity in individuals with the CHE2 C5+ and CHE2 C5- phenotypes. *Int. J. Obesity*, v. 27, p. 1557-1564, 2003.
- ALCÂNTARA V.M.; RODRIGUES, L.C.; OLIVEIRA, L.C.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Association of the *CHE2* locus with body mass index and butyrylcholinesterase activity. *Hum. Biol.*, v. 73, p. 587-595, 2001.
- 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 (2), p. 869-877, 2000.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Disponível em: < <http://www.diabetes.org/home-diabetes.jsp> > Acesso em : 10 Out 2002.
- ANNAPURNA, V.; SENCIALL, I.; DAVIS, A.J.; KUTTY, K.M. Relationship between pseudocholinesterase and triglycerides 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.; LOCKRIDGE, O. Structure of the gene for human butyrylcholinesterase. Evidence for a single copy. *Biochem.*, v. 29, p. 124-131, 1990.
- AUGUSTINSSON, K.B. Cholinesterase and anticholinesterase agents. In: *Handbook of experimental pharmacology*. Koelle, G.B. (org). Berlin: Springer-Verlag, pp. 89-128, 1963.
- BALASUBRAMANIAN, A.S.; BHANUMATHY, C.D. Noncholinergic functions of cholinesterases. *FASEB J.*, v. 7, p. 1354-1358, 1993.
- BARTELS, C.F.; JENSEN, F.S.; LOCKRIDGE, O.; VAN DER SPEK, A.F.L.; RUBINSTEIN, H.M.; LUBRANO, T.; LA DU, B.N. DNA mutation associated with the human butyrylcholinesterase K-variant and its linkage to the atypical variant mutation and other polymorphic sites. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 50, p. 1086-1103, 1992a.
- BARTELS, C.F.; JAMES, K.; LA DU, B.N.; DNA mutations associated with the human butyrylcholinesterase J-variant. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 50, p. 1104-1114, 1992b.
- BERRY, W.T.C.; COWIN, P.J.; DAVIES, D.R. A relationship between body fat and plasma pseudo-cholinesterase. *Br. J. Nutr.*, v. 8, p. 79-82, 1954.
- BUDOWLE, B.; CHAKRABORTY, R.; GIUSTI, A.M.; EISENBERG, A.J.; ALLEN, R.C. Analysis of the VNTR locus DIS80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 48, p. 137-144, 1991.
- 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.
- CHU, M.I.; FONTAINE, P.; KUTTY, K.M.; MURPHY, D.; REDHEENDRIAN, R. Cholinesterase in serum and low density lipoprotein of hyperlipidemic patients. *Clin. Chim. Acta*, v. 85, p. 55-59, 1978.
- CLARK, J.M.; BRANCATI, F.L.; DIEHL, A.M. The prevalence and etiology of elevated aminotransferase levels in the United States. *Am. J. Gastroenterol.*, v. 98, p. 960-967, 2003.
- CUCUIANU, M.; POPESCU, T.A.; HARAGUS, St. Pseudocholinesterase in obese and hyperlipemic subjects. *Clin. Chem. Acta*, v. 22, p. 151-155, 1968.

- CUCUIANU, M.; POPESCU, T.A.; OPINCARU, A.; HARAGUS, St. Serum pseudocholinesterase and ceruloplasmin in various types of hyperlipoproteinemia. *Clin. Chim. Acta*, v. 59, p. 19-27, 1975.
- DAVE, K.R.; KATYARE, S.S. Effect of alloxan-induced diabetes on serum and cardiac butyrylcholinesterase in the rat. *J. Endocrinol.*, v. 175, p. 241-250, 2002.
- DEEB, S.S.; FAJAS, L.; NEMOTO, M.; PIHLAJAMAKI, J.; MYKKANEN, L. A Pro12Ala substitution in PPAR γ 2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nat. Genet.*, v. 20, p. 284-287, 1998.
- DIETZ, A.A.; RUBINSTEIN, H.M.; LUBRANO, T. Colorimetric determination of serum cholinesterase and its genetic variants by the propionylthiocoline-dithiobis (nitrobenzoic-acid) procedure. *Clin. Chem.*, v. 19, p. 1309-13, 1973.
- EVANS, R.T.; WROE, J. Is serum cholinesterase activity a predictor of succinyl choline sensitivity? An assessment of four methods. *Clin. Chem.*, v. 24, p. 1762-1766, 1978.
- FADEL-PICHETH, C.M.T. *Variabilidade do loco BCHE da butirilcolinesterase e peso do adulto em amostra de Curitiba*. Curitiba, 1991. 117 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – 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.
- FONTOURA-DA-SILVA, S.E.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Butyrylcholinesterase variants (BCHE and CHE2 loci) associated with erythrocyte acetylcholinesterase inhibition in farmers exposed to pesticides. *Hum. Hered.*, v. 46, p. 143-147, 1996.
- FURTADO, L.; SOUZA, R.L.R.; TSUNETO, L.T.; PETZL-ERLER, M.L.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Genetic variability of butyrylcholinesterase in Brazilian Guarani Indians of Mato Grosso do Sul (manuscrito), 2004.
- GARY, J.P.; DIETZ, A.A.; LUBRANO, T.; FORD, P.C.; JAMES, K.; RUBINSTEIN, H.M. New allele at cholinesterase locus 1. *J. Med. Genet.*, v. 13, p. 38-42, 1976.
- GÄTKE, M.R.; OSTERGAARD, D.; BUNDGAARD, J.R.; VARIN, F.; VIBY-MOGENSEN, J. Response to mivacurium in a patient compound heterozygous for a novel and known silent mutation in the butyrylcholinesterase gene – Genotyping by sequencing. *Anesthesiology*, v. 95, p. 600-606, 2001.
- GAUGHAN, G.; PARK, H.; PRIDDLE, J.; CRAIG, I.; CRAIG, S. Refinement of the localization of human butyrylcholinesterase to chromosome 3q26.1-q26.2 using a PCR-derived probe. *Genomics*, v. 11, p. 455-458, 1991.

- GNATT, A.; PRODY, C.A.; ZAMIR, R.; LIEMAN-HURWITZ, J.; ZAKUT, H.; SOREQ, H. Expression of alternatively terminated unusual human butyrylcholinesterase messenger RNA transcripts, mapping to chromosome 3q26-ter, in nervous system tumors. *Cancer Res.*, v. 50, p. 1983-7, 1990.
- GREENBERG, C.P.; PRIMO-PARMO, S.L.; PANTUCK, E.J.; LA DU, B.N. Prolonged response to succinylcholine: a new variant of plasma cholinesterase that is identified as normal by traditional phenotyping methods. *Anesth. Analg.*, v. 81, p. 419-421, 1995.
- GRUNDY, S.M. Hypertriglyceridemia, insulin resistance and the metabolic syndrome. *Am. J. Cardiol.*, v. 83, p. 25F-29F, 1999.
- HADA, T.; MURATANI, K.; OHUE, T.; IMANISHI, H.; MORIWAKI, Y.; ITO, M.; AMURO, Y.; HIGASHINO, K. A variant serum cholinesterase and a confirmed point mutation at Gly-365 to Arg found in a patient with liver cirrhosis. *Internal Medicine*, v. 31, p. 357-362, 1992.
- HARRIS, H. *The principles of human biochemical genetics*. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical, 1980.
- HARRIS, H.; HOPKINSON, D.A.; ROBSON, E.B. Two-dimensional electrophoresis of pseudocholinesterase components in human serum. *Nature*, v. 196, p. 1296-1298, 1962.
- HARRIS, H.; WHITTAKER, M. Differential inhibition of human serum cholinesterase with fluoride: recognition of two new phenotypes. *Nature*, v. 191, p. 496-498, 1961.
- HASHIM, Y.; SHEPHERD, D.; WILTSHERE, S.; HOLMAN, R.R.; LEVY, J.C.; 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.
- HAWA, M.I.; BEYAN, H.; BUCKLEY, L.R.; LESLIE, R.D.G. Impact of genetic and non-genetic factors in type 1 diabetes. *Am. J. Med. Genet.*, v. 115, p. 8-17, 2002.
- HIDAKA, K.; IUCHI, I. Determination of gene mutation of silent serum cholinesterase and its epidemiologic characters in the Japanese. *Rinsho Byori*, v. 43, p. 786-91, 1995.
- HIDAKA, K.; IUCHI, I.; YAMASAKI, T.; OHHARA, M.; SHODA, T.; PRIMO-PARMO, S.L.; LA DU, B.N. Identification of two different genetic mutations associated with silent phenotypes for human serum cholinesterase in Japanese. *Rinsho Byori*, v. 40, p. 535-540, 1992.
- HIDAKA, K.; WATANABE, Y.; TOMITA, M.; UEDA, N.; HIGASHI, M.; MINATOGAWA, Y.; IUCHI, I. Gene analysis of genomic DNA from stored serum by polymerase chain

reaction: identification of three missense mutations in patients with cholinesterasemia and ABO genotyping. *Clin. Chim. Acta.*, v. 303(1-2), p. 61-67, 2001.

HÖHLER, T.; RITTNER, C.; SCHEINER, P.M.; BÜSCHENFELDE, K.M. Cholinesterase variants: rapid characterization by PCR/SSCP and evidence for molecular homogeneity. *J. Med. Genet.*, v. 32, p.109-112, 1995.

IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA). < <http://www.ibge.gov.br/> > Acesso em : 27 Dez 2002.

JENSEN, F.S.; BARTELS, C.F.; LA DU, B.N. Structural basis of the butyrylcholinesterase H-variant segregating in two families. *Pharmacogenetics*, v. 2, p. 234-240, 1992.

JOHANSEN, A.; NIELSEN, E.M.D.; HAMID, Y.H.; DRIVSHOLM, T.; BORCH-JOHNSEN, K.; HANSEN, T.; PEDERSEN, O. Studies of association between the butyrylcholinesterase K polymorphism and type 2 diabetes and prediabetic traits. *Diabetologia*, v. 46, supl. 2, p. A1-471, 2003.

JUUL, P. Human plasma cholinesterase isoenzymes. *Clin. Chem. Acta.*, v. 19, p. 205-208, 1968.

KALOW, W.; 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.

KAPLAN, L.A.; PESCE, A.J. *Clinical Chemistry. Theory, analysis, correlation*. Filadélfia: Mosby-Year Book, 3a. ed., p 516, 1996.

KUTTY, K.M. Review: Biological function of cholinesterase. *Clin. Biochem.*, v. 13, p. 239-243, 1980.

KUTTY, K.M.; JAIN, R.; HUANG, S.; KEAN, K. Serum pseudocholinesterase: high density lipoprotein cholesterol ratio as an index of risk for cardiovascular disease. *Clin. Chim. Acta*, v. 115, p. 55-61, 1981.

LA DU, B.N.; BARTELS, C.F.; NOGUEIRA, C.P.; ARPAGAUS, M.; LOCKRIDGE, O. Proposed nomenclature for human butyrylcholinesterase genetic variants identified by DNA sequencing. *Cell. Mol. Neurobiol.*, v. 11, p. 79-89, 1991.

LAHIRI, D.K.; NURNBERGER Jr, J.I. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucl. Acids Res.*, v. 19, p. 5444, 1991.

LAYER, P.G. Comparative localization of acetylcholinesterase and pseudocholinesterase during morphogenesis of the chick brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 80, p. 6413-6417, 1983.

LAYER, P.G. Expression and possible functions of cholinesterases during chicken neurogenesis. *Cholinesterases: Structure, Functions, Mechanism, Genetics and Cell Biology*. American Chemical Society. Washington DC., p. 350-357, 1991.

LEHMANN, D.J.; JOHNSTON, C.; SMITH, A.D.; Synergy between genes for butyrylcholinesterase K variant and apolipoprotein E4 in late-onset confirmed Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet.*, v. 6, p. 1933-36, 1997.

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

LOHMUELLER, K.; PEARCE, C.L.; PIKE, M.; LANDER, E.S.; HIRSCHHORN, J.N. Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease. *Nat. Genet.*, v. 33, p. 177-182, 2003.

MAEKAWA, M.; SUDO, K.; KANNO, T.; KOTANI, K.; DEY, D.C.; ISHIKAWA, J.; IZUME, M. Genetic mutations of butyrylcholine esterase identified from phenotypic abnormalities in Japan. *Clin. Chem.*, v. 43, p. 924-929, 1997.

MAEKAWA, M.; SUDO, K.; KANNO, T.; KOTANI, K.; DEY, D.C.; ISHIKAWA, J.; IZUME, M.; ETOH, K. Genetic basis of the silent phenotype of serum butyrylcholinesterase in three compound heterozygotes. *Clin. Chim. Acta.*, v. 235, p. 41-57, 1995.

MAGARIAN, E.O.; DIETZ, A.J. Correlation of cholinesterase with serum lipids and lipoproteins. *J. Clin. Pharmacol.*, v. 27, p. 819-820, 1987.

MAHMOUD, F.; HAINES, D.; ABUL, H.; OMU, A. Butyrylcholinesterase activity and pregnancy-associated differences in immunologically relevant peripheral blood leukocyte populations. *Am. J. Reprod. Immunol.*, v. 50, p. 77-82, 2003.

MASSON, P. A naturally occurring molecular form of human plasma cholinesterase is an albumin conjugate. *Biochem. Biophys. Acta.*, v. 988, p. 258-266, 1989.

MASSON, P. Molecular heterogeneity of human plasma cholinesterase. In *Cholinesterases. Structure, Function, Mechanisms, Genetics and Cell Biology*. J. Massoulié e cols. eds. Washington DC: American Chemical Society, p. 42-45, 1991.

McGUIRE, M.C.; NOGUEIRA, C.P.; BARTELS, C.F.; LIGHTSTONE, A.H.; HAJRA, A.; VAN DER SPEK, A.F.L.; LOCKRIDGE, O.; LA DU, B.N. Identification of the structural

- mutation responsible for the dibucaine-resistant (atypical) variant form of human cholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 86, p. 953-957, 1989.
- McILROY, S.P.; CRAWFORD, V.L.; DYNAN, K.B.; McGLEENON, B.M.; VAHIDASSR, M.D.; LAWSON, J.T.; PASSMORE, A.P. Butyrylcholinesterase K variant is genetically associated with late onset Alzheimer's disease in Northern Ireland. *J. Med. Genet.*, v. 37, p. 182-185, 2000.
- MILLARD, C.B.; BROOMFIELD, C.A. A computer model of glycosylated human butyrylcholinesterase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 189, p. 1280-1286, 1992.
- MUENSCH, H.; GOEDDE, H-W.; YOSHIDA, A. Human serum cholinesterase subunits and number of active sites of the major component. *Eur. J. Biochem.*, v. 70, p. 217-223, 1976.
- MURATANI, K.; HADA, T.; YAMAMOTO, Y.; KANEKO, T.; SHIGETO, Y.; OHUE, T.; FURUYAMA, J.; HIGASHINO, K. Inactivation of the cholinesterase gene transposition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 88, p. 11313-11319, 1991.
- NAVARRO, H.A.; BASTA, P.V.; SEIDLER, F.J.; SLOTKIN, T.A. Neonatal chlorpyrifos administration elicits deficits in immune function in adulthood: a neural effect? *Brain Res. Dev.*, v. 130, p. 249-252, 2001.
- NICOLET, Y.; LOCKRIDGE, O.; MASSON, P.; FONTECILLA-CAMPS, J.C.; NACHON, F. Crystal structure of human butyrylcholinesterase and its complexes with substrate and products. *J. Biol. Chem.*, v. 278, p. 41141-41147, 2003.
- NISTOR, T.; CUCUIANU, M.; HANCU, N.; ORBAL, P. Serum cholinesterase activity correlated with serum insulin and C-peptide levels. *Fiziologia*, v. 8, p. 2-5, 1998.
- NOGUEIRA, C.P.; BARTELS, C.F.; McGUIRE, M.C.; ADKINS, S.; LUBRANO, T.; RUBINSTEIN, H.M.; LIGHTSTONE, H.; VAN DER SPEK, A.F.L.; LOCKRIDGE, O.; LA DU, B.N. Identification of two different point mutations associated with the fluoride-resistant phenotype for human butyrylcholinesterase. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 51, p. 821-828, 1992.
- NOGUEIRA, C.P.; McGUIRE, M.C.; GRAESER, C.; BARTELS, D.F.; ARPAGAUS, M.; VAN DER SPEK, A.F.L.; LIGHTSTONE, H.; LOCKRIDGE, O.; LA DU, B.N. Identification of a frameshift mutation responsible for the silent phenotype of human serum cholinesterase, GLY117(GGT→GGAG). *Am. J. Human. Genet.*, v. 40, p. 934-940, 1990.
- PATEL, B.N.; MACKNESS, M.I.; HARTY, D.W.; ARROL, S.; BOOT-HANDFORD, R.P.; DURRINGTON, P.N. Serum esterase activities and hyperlipidaemia in the streptozotocin-diabetic rats. *Biochem. Biophys. Acta*, v. 1035, p. 113-116, 1990.

- 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.
- PUGLIESE, A.; ZELLER, M.; FERNANDEZ, A.I.; ZALCBERG, L.J.; BARTLETT, R.J. The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlated with allelic variation at the INS VNTR-IDDM2 susceptibility locus for type 1 diabetes. *Nat. Genet.*, v. 15, p. 293-297, 1997.
- 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.
- RIZK, N.; DUNBAR, J.C. Insulin-mediated increase in sympathetic nerve activity is attenuated by C-peptide in diabetic rats. *Exp. Biol. Med.*, v.229 (1), p.80-84, 2004.
- ROBSON, E.B.; HARRIS, H. Further data on the incidence and genetics of the serum cholinesterase phenotype C5+. *Ann. Hum. Genet.*, v. 29, p. 403-408, 1966.
- RUBINSTEIN, H.M.; E_1^K , another quantitative variant at cholinesterase locus 1. *J. Med. Genet.*, v. 15, p. 27-29, 1978.
- SAKAMOTO, N.; HIDAKA, K.; FUSISAWA, T.; MAEDA, M.; IUCHI, I. Identification of a point mutation associated with a silent phenotype of human serum butyrylcholinesterase – a case of a familial cholinesterasemia. *Clin. Chim. Acta.*, v. 274, p. 159-166, 1998.
- SHAFFERMAN, A.; KRONMAN, C.; FLASHNER, Y.; LEITNER, M.; GROSFELD, H.; ORDENTLICH, A.; GOZES, Y.; COHEN, S.; ARIEL, N.; BARAK, D.; HAREL, M.; SILMAN, I.; SUSSMAN, J.L.; VELAN, B. Mutagenesis of human acetylcholinesterase. Identification of residues involved in catalytic activity and in polypeptide folding. *J. Biol. Chem.*, v. 267, p. 17640-17648, 1992.
- STERNFELD, M.; BEN-ARI, S.; RACHMILEWITZ, J.; GLICK, C.; LOEWENSTEIN-LICHENSTEIN, Y.; SOREQ, H.; ANDRES, C.; ZAKUT, H.; TIMBERG, R. Normal and atypical butyrylcholinesterases in placental development, function, and malfunction. *Cellular Mol. Neurobiol.*, v. 17, p. 315-332, 1997.
- SHAM, P.C.; CURTIS, D. Monte Carlo tests for associations between disease and alleles at highly polymorphic loci. *Ann. Hum. Genet.*, v. 59, p. 97-105, 1995.
- SHIBUTA, K.; ABE, M.; SUZUKI, T. A new detection method for the K variant of butyrylcholinesterase based on PCR primer introduced restriction analysis (PCR-PIRA). *J. Med. Genet.*, v. 31, p. 576-579, 1994.

SIMPSON, N.E.; KALOW, W. Comparisons of two methods for typing of serum cholinesterase and prevalence of its variants in a Brazilian population. *Amer. J. Hum. Genet.*, v. 17, p. 156-162, 1965.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. *Diagnóstico e Classificação do Diabetes Mellitus e Tratamento do Diabetes Mellitus Tipo 2*. Disponível em: <<http://www.diabetes.org.br/>> Acesso em: 20 jul. 2002.

SOMORIN, O.; SKOREPA, J. Aliesterase activity in normal and postheparin human blood sera. *J. Biochem.*, v. 83, p. 617-623, 1978.

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 hybridization to chromosome 3 and 16. *Hum. Genet.*, v. 77, p. 325-328, 1987.

SOUZA, R.L.R. *Variação fenotípica e genotípica da butirilcolinesterase humana e sua relação com altura e índice de massa corporal*. Curitiba, 2001. 146 f. Tese (Doutorado 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 Brazilian populations of European and African origin. *Hum. Biology*, v. 70, p. 965-970, 1998.

SOUZA, R.L.R.; FADEL-PICHET, C.; ALLENBRANDT, K.V.; FURTADO, L.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Possible influence of *BCHE* locus of butyrylcholinesterase on Stature and Bodymass index. *Am. J. Phys. Anthropol.*, (no prelo), 2004.

SUDO, K.; MAEKAWA, M.; AKIZUKI, S.; MAGARA, T.; OGASAWARA, H.; TANAKA, T. Human butyrylcholinesterase L330I mutation belongs to a fluoride-resistant gene, by expression in human fetal kidney cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 240, p. 372-375, 1997.

SUDO, K.; MAEKAWA, M.; KANNO, T.; AKIZUKI, S.; MAGARA, T. Three different point mutation in the butyrylcholinesterase gene of three Japanese subjects with a silent phenotype: possible Japanese type alleles. *Clinical Biochem.*, v. 29, p. 165-169, 1996.

TILLEY, L.; MORGAN, K.; GRAINGER, J.; MARSTERS, P.; MORGAN, L.; LOWE, J.; XUEREB, J.; WISCHIK, C.; HARRINGTON, C.; KALSHEKER, N. Evaluation of polymorphisms in the presenilin-1 gene and the butyrylcholinesterase gene as risk factors

- in sporadic Alzheimer's disease. *Eur. J. Hum. Genet.*, v. 7(6), p. 659-663, 1999.
- 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. Belge Méd. Trop.*, v. 53, p. 633-644, 1973.
- VIRTANEN, S.M.; KNIP, M. Nutritional risk predictors of beta cell autoimmunity and type 1 diabetes at a young age. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 78 (6), p. 1053-67, 2003.
- WELTER, M.; ALCÂNTARA, V.M.; RÉA, R.R.; VARGAS, R.M.; FIGUEIREDO, R.; PICHETH, G.; SCARTEZINI, M.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Fenótipo CHE2 C5+ da butirilcolinesterase no diabetes mellitus. *Anais do VI Encontro Paranaense de Genética*, p. 26, 1 CD Rom, 2002.
- WHITTAKER, M. **Cholinesterase**. New York: Karger, Basel, v. 11, p. 1-126, 1986.
- WIEBUSCH, H.; POIRIER, J.; SEVIGNY, P.; SCHAPPERT, K. Further evidence for a synergistic association between APOE epsilon 4 and BCHE-K in confirmed Alzheimer's disease. *Hum. Genet.*, v.104, p. 158-163, 1999.
- WOOLF, B. On estimating the relation between blood group and disease. *Ann. Hum. Genet.*, v. 19, p. 251-253, 1955.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. Report of a WHO Consultation. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus**. 1999.
- YANG, F.; LUM, J.B.; MCGILL, J.R.; MOORE, C.M.; NAYLOR, S.L.; VAN BRAGT, P.H.; BALDWIN, W.D.; BOWMAN, B.H. Human transferrin cDNA characterization and chromosomal localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 81, p. 2752-2756, 1984.

APÊNDICE

Listagem das variáveis que, investigadas nas amostras de pacientes com diabetes mellitus dos tipos 1 e 2, receberam códigos de classificação visando à análise estatística.

VARIÁVEIS	CÓDIGOS
Sexo	1 = masculino; 2 = feminino
Origem étnica ^a	1 = euro-brasileira; 2 = oriental; 3 = afro-brasileira
Fenótipos do gene <i>CHE2</i>	0 = <i>CHE2</i> C5- ; 1 = <i>CHE</i> C5+
Genótipos relativos à variante K	1 = UU; 2 = UK; 3 = KK
Presença ou não da variante K	1 = ausente (UU); 2 = presente (UK+KK)

^a recodificada em algumas análises em : 1 = euro-brasileira; 2 = afro-brasileira