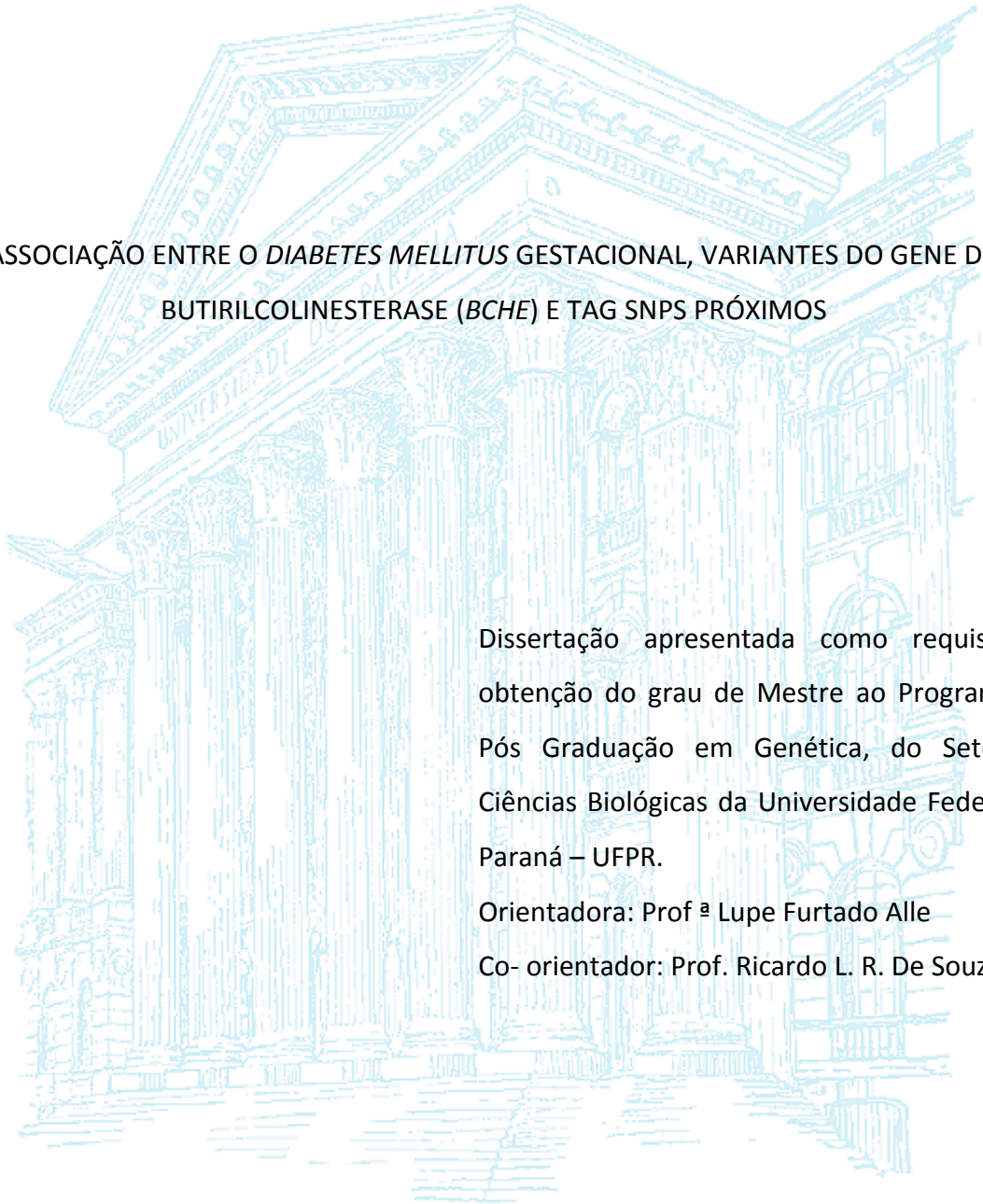
LARISSA OLIVEIRA GUIMARÃES

ASSOCIAÇÃO ENTRE O *DIABETES MELLITUS* GESTACIONAL, VARIANTES DO GENE DA BUTIRILCOLINESTERASE (*BCHE*) E TAG SNPS PRÓXIMOS



Dissertação apresentada como requisito à obtenção do grau de Mestre ao Programa de Pós Graduação em Genética, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná – UFPR.

Orientadora: Prof ª Lupe Furtado Alle

Co- orientador: Prof. Ricardo L. R. De Souza

CURITIBA

2011

LARISSA OLIVEIRA GUIMARÃES

ASSOCIAÇÃO ENTRE O *DIABETES MELLITUS* GESTACIONAL, VARIANTES DO GENE DA BUTIRILCOLINESTERASE (*BCHE*) E TAG SNPS PRÓXIMOS

Dissertação apresentada como requisito à obtenção do grau de Mestre ao Programa de Pós Graduação em Genética, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná – UFPR.

Orientadora: Prof ª Lupe Furtado Alle

Co- orientador: Prof. Ricardo L. R. De Souza

CURITIBA

2011

Agradecimentos

À Deus, que me fortaleceu em momentos de dificuldade, dando-me serenidade para seguir com meus propósitos na vida acadêmica e pessoal. Não importa o que digam, acredito, confio e agradeço, à minha maneira.

À minha família, em especial aos meus pais, Luciene e Napoleão, que me apontaram a melhor direção a seguir, me ajudaram a construir a base de quem sou. Ensinaram-me, sobretudo, que nossas conquistas devem ocorrer pelos nossos próprios esforços, e me prepararam com valores morais e éticos para seguir minha caminhada; a minha avó Mariita, pelo apoio, presença e acolhimento; a minha irmã Graziella, pelos momentos de descontração e pelo compartilhamento de aflições, alegrias, segredos e ferramentas de informática. Amo vocês.

À minha orientadora, Profª Lupe Furtado Alle, por sua atenção e carinho; por aceitar me orientar mesmo não me conhecendo pessoalmente; por confiar em mim e em meu trabalho; por apoiar minhas decisões, sugestões, e me ajudar a organizar meus pensamentos científicos; por me ensinar que por maior que pareça o problema, ele nunca é grande demais para que nós não consigamos resolvê-lo. Por sua sabedoria, amizade, inteligência, e por, de fato, me orientar. Muito obrigada, professora.

Ao meu co-orientador, Prof. Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza, que me ensinou bastante com sua maneira sempre serena de lidar com as tarefas diárias, e a sua enorme disponibilidade para resolver muitas das minhas dúvidas.

À professora Marina Isabel M. de Almeida, por me proporcionar a experiência com os alunos do curso de Zootecnia, pelo apoio, carinho, compreensão e amizade. Aprendi muito com a senhora.

À professora Valéria Roxo, por me acompanhar ao longo do projeto de pesquisa, sugerindo alterações necessárias, pelo incentivo e carinho.

À professora Ana Angélica Leal Barbosa, por me indicar o Programa de Pós-Graduação em Genética da UFPR e me incentivar a prestar seleção de mestrado.

À Izabella Castilhos e ao Prof. Geraldo Picheth pela parceria nas pesquisas.

Aos meus colegas de Laboratório, por me receberem de maneira tão acolhedora; por me ensinarem muito dentro do Laboratório de Polimorfismos; por dividirmos os melhores momentos de conversas no Lab, de reuniões, de longas esperas na fila do RU...

Às “meninas da Farmácia” Gleyse Freire Bono, Mariana Borges Brandão e Thaís Emi Setoguchi por construírem comigo a parte prática do nosso estudo e por desenvolvermos juntas formas para optimizar nosso trabalho.

Aos amigos Cynthia Hernandes Costa, Dellyana Boberg, Fabiana Andrade, Georgia Gelmini, Giovana Marques da Cruz, Juliana Marta, Laércio Piancini, Mariane Madalozzo, Nathacha Baretto, Rodrigo Schuh e Thaís Chaves. Obrigada pela convivência diária. Vocês me ensinaram muito e facilitaram a minha adaptação a Curitiba. Obrigada pela amizade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética da UFPR, que me permitiu a continuação na vida acadêmica.

Ao Programa REUNI pela concessão da bolsa de mestrado.

“A experiência não é o que acontece com um homem; é o que o homem faz com o que acontece com ele”.

(Aldous Huxley)

Lista de tabelas

Referencial teórico

Tabela 1 Atividades biológicas propostas das colinesterases 10

Tabela 2 Alguns fatores que estão associados ao aumento da atividade da BChE 13

Tabela 3 Alguns fatores que estão associados à redução da atividade da BChE 14

Tabela 4 Lista de variantes descritas do gene *BCHE*, com a localização, alteração de nucleotídeo e o nome do alelo 16

Capítulo 1

Tabela 1 Média ± DP (desvio padrão) de idade, Índice de Massa Corporal (IMC) e características clínicas das pacientes com DMG e do grupo de gestantes que não apresentaram a doença, com os valores de $t(p)$ e $F(p)$ para a comparação entre os grupos 29

Tabela 2 Médias (± DP), variâncias (S^2), amplitudes de variação (AV) da atividade enzimática (KU/L) nas grávidas com DMG e nos controles e valores de t (p) e F (p) para a comparação entre as médias e variâncias 29

Tabela 3 Frequências (± EP) e número de indivíduos com fenótipo CHE2 C5+ e CHE2 C5– nos grupos de pacientes com DMG e controle. Valor de χ^2 (p) para a comparação das frequências fenotípicas entre grávidas com DMG e controles 30

Tabela 4 Frequências genotípicas e alélicas (± EP) no sítio *-116* no gene *BCHE* em pacientes com DMG e no grupo controle 31

Tabela 5 Média (± DP) da atividade da BChE nos indivíduos homozigotos para o alelo usual e nos indivíduos heterozigotos para o alelo *-116A* em pacientes com DMG e gestantes não diabéticas (grupo controle) 31

Capítulo 2

Tabela 1 Frequências genotípicas e alélicas ± EP no SNP rs4440084 a montante do gene *BCHE* em pacientes com DMG e no grupo controle 48

Tabela 2 Frequências genotípicas e alélicas ± EP no SNP rs2863381 a montante do gene *BCHE* em pacientes com DMG e no grupo controle 49

Tabela 3 Frequências genotípicas e alélicas ± EP do sítio 1615 (rs1803274) no gene *BCHE* em pacientes com DMG e no grupo controle 50

Tabela 4 Frequências genotípicas e alélicas ± EP no SNP rs7624915 a jusante do gene *BCHE* em pacientes com DMG e no grupo controle 51

Tabela 5 Frequências genotípicas e alélicas ± EP no SNP rs4387996 a jusante do gene *BCHE* em pacientes com DMG e no grupo controle 51

Tabela 6 Frequências haplotípicas no grupo de gestantes com DMG e no grupo de gestantes não diabéticas (controle) 52

Tabela 7 Resultados dos testes de desequilíbrio de ligação entre os SNPs estudados . 54

Apêndice 1

Tabela1 Média ± DP da atividade da BChE nos indivíduos homozigotos para o alelo G, heterozigotos e homozigotos para o alelo C (rs4440084) e os valores de *t* (*p*) para comparação entre os genótipos em pacientes com DMG e gestantes não diabéticas 74

Tabela 2 Média ± DP da atividade da BChE nos indivíduos homozigotos para o alelo T, heterozigotos e homozigotos para o alelo C (rs2863381) e os valores de *t* (*p*) para comparação entre os genótipos em pacientes com DMG e gestantes não diabéticas 75

Tabela 3 Média ± DP da atividade da BChE nos indivíduos homozigotos para o alelo G, heterozigotos e homozigotos para o alelo A (rs1803274) e os valores de *t* (*p*) para comparação entre os genótipos em pacientes com DMG e gestantes não diabéticas 76

Tabela 4 Média ± DP da atividade da BChE nos indivíduos homozigotos para o alelo C, heterozigotos e homozigotos para o alelo A (rs7624915) e os valores de *t* (*p*) para comparação entre os genótipos em pacientes com DMG e gestantes não diabéticas 77

Tabela 5 Média ± DP da atividade da BChE nos indivíduos homozigotos para o alelo G, heterozigotos e homozigotos para o alelo A (rs4387996) e os valores de *t* (*p*) para comparação entre os genótipos em pacientes com DMG e gestantes não diabéticas 78

Lista de figuras

Referencial teórico

Figura 1 Esquema da sobreposição da BChE nativa (azul claro), *Tc*AChE (rosa), e *Dm*AChE - *Drosophila melanogaster* (verde) em torno da entrada do sítio ativo. Apenas o loop acyl exibe diferenças conformacionais significativas nas três enzimas. Os aminoácidos que diferem entre BChE e *Tc*AChE estão retratados em azul claro e rosa, respectivamente. Fonte: Nicolet *et al.*, 2003 12

Figura 2 Desenho esquemático do gene *BCHE*, mostrando os quatro exons, o número de pares de bases que os compõem e os sítios -116 e 1615 de duas variantes estudadas no presente estudo. A região hachurada corresponde à proteína madura. Fonte: Furtado-Alle, 2005 15

Capítulo 2

Figura 1 Gráficos exemplificando os resultados da genotipagem em tempo real de um dos SNPs estudados. Da esquerda para a direita observa-se: o gráfico que determina o genótipo do homozigoto para um dos alelos, o do heterozigoto e o do homozigoto para o outro alelo 46

Figura 2 Gráfico gerado no programa Excel exemplificando os resultados de uma placa de PCR em tempo real para um dos SNPs estudados. O círculo verde destaca os indivíduos homozigotos para o alelo marcado com o fluoróforo VIC; o círculo roxo, os indivíduos heterozigotos; e, o círculo azul, os indivíduos homozigotos para o alelo marcado com o fluoróforo FAM. No círculo vermelho estão as amostras não amplificadas 47

Apêndice 2

Figura 1 Interface do programa realplex de genotipagem em tempo real, mostrando a disposição para a leitura das amostras e os gráficos gerados 83

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

AChE	Acetilcolinesterase
BChE	Butirilcolinesterase
BCHE	Gene da Butirilcolinesterase
CHE2	Loco condicionador do complexo C5 da butirilcolinesterase
DM	*Diabetes Mellitus*
DMG	*Diabetes Mellitus* Gestacional
HDL	*High Density lipoprotein*
HLA	*Human Leucocyte Antigen*
IMC	Índice de Massa Corporal
Kb	Kilobases
kg/m^2	Quilogramas/metro^2
KU/L	KiloUnidades/Litro
LDL	*Low Density Lipoprotein*
mg/dL	Miligramas/decilitro
MODY	*Maturity-onset diabetes of the young*
nt	Nucleotídeo
OR	*Odds Ratio*
pb	Pares de bases
PCR	*Polymerase Chain Reaction*
SNP	*Single Nucleotide Polymorphism*
TOTG	Teste Oral de Tolerância à Glicose
VLDL	*Very Low Density Lipoprotein*

Resumo

A butirilcolinesterase (BChE) é uma esterase sérica polimórfica codificada pelo gene *BCHE* (3q26.1-q26.2). Estudos prévios mostram que a atividade da BChE está aumentada no *Diabetes Mellitus* dos tipos 1 e 2. A atividade da enzima também é aumentada quando a forma heteróloga C5, determinada tanto pelo loco *BCHE*, como pelo loco *CHE2* (2q33-35), está presente; porém, está reduzida em presença de uma variante no nucleotídeo -116 do gene *BCHE*, denominada *-116A*. Associação entre o diabetes e variantes do gene *BCHE* já foi encontrada por nosso grupo em estudos anteriores, bem como por outros pesquisadores, entretanto, estudos com ênfase nas bases genéticas do *Diabetes Mellitus* gestacional (DMG) são escassos. O presente estudo analisou a atividade da BChE, os fenótipos do loco *CHE2*, a frequência de duas variantes dentro do gene *BCHE* (rs1126680 - nt *-116* e rs1803274 - nt 1615) e variáveis antropométricas e bioquímicas associadas ao diabetes em amostra de pacientes com DMG (N=150) e em amostra controle de gestantes que não apresentaram a doença (N=295), ambas provenientes da cidade de Curitiba – PR. Além das variantes do gene *BCHE*, quatro Tag-SNPs próximos à sua região foram considerados neste estudo. A média de atividade enzimática foi significativamente mais alta no grupo controle que no grupo de gestantes com DMG, mas nos dois grupos foi significativamente menor que a média da atividade na população de Curitiba. A frequência do fenótipo CHE2 C5+ foi semelhante em grávidas com DMG, controles e na população de Curitiba. As frequências genotípicas e alélicas de todos os SNPs não diferiram entre os dois grupos amostrais. A correlação positiva entre IMC e colesterol LDL nas grávidas diabéticas, permite-nos afirmar que a BChE apresenta um papel no metabolismo de lipídios também no DMG. Entretanto, o efeito redutor do diabetes gestacional sobre a atividade da BChE foi mais forte que o efeito intensificador característico da obesidade, pois embora as grávidas diabéticas tenham IMC maior, apresentaram atividade enzimática média menor que o grupo de gestantes não diabéticas. O alelo *-116A* diminui a atividade da BChE, de modo independente das alterações fisiológicas provocadas pela gravidez e pelo DMG, pois a redução significativa da atividade enzimática ocorre nos grupos controle, de pacientes e em indivíduos da população em geral. Nas análises haplotípicas observou-se que o grupo de grávidas com DMG apresentou 21 haplótipos mais frequentes, enquanto o grupo de gestantes não diabéticas apresentou 24 haplótipos, dos quais 16 foram comuns aos dois grupos amostrais. As frequências dos

haplótipos H3 (GTGGAA), H7 (GTAACG) e H11 (GTAGCG) apresentaram diferença significativa entre o grupo de gestantes com DMG e o grupo controle. Quando calculados os valores do *Odds ratio* (*OR*) para estes haplótipos, o haplótipo H3, mais comum nos indivíduos do grupo controle, apresentou um efeito protetor ao DMG (*OR*= 0,54; 0,30 ≤ μ ≤ 0,98; IC 95% (*p*< 0,05)). Os haplótipos H7 (*OR*= 3,9; 1,28 ≤ μ ≤ 11,85; IC 95% (*p*< 0,05)) e H11 (*OR*= 8,46; 0,94 ≤ μ ≤ 76,40; IC 95% (p < 0,05)), mais frequentes nas pacientes com DMG, representaram haplótipos de predisposição à doença. Sugerem-se como explicações para estes resultados significativos: 1) um efeito regulatório destes haplótipos na expressão da BChE que esteja associado ao DMG, ou ainda, 2) um desequilíbrio de ligação entre os haplótipos e outro gene situado próximo do gene *BCHE*. Os SNPs a montante do gene *BCHE* encontraram-se em desequilíbrio de ligação, bem como os SNPs a jusante do gene *BCHE*. Destaca-se ainda o forte desequilíbrio de ligação já conhecido entre as variantes nos sítios -116 e 1615 do gene *BCHE*, que se confirmou no presente estudo.

Abstract

Butyrylcholinesterase (BChE) is a polymorphic serum esterase encoded by *BCHE* gene (3q26.1-q26.2). Previous studies showed that BChE activity is increased in types 1 and 2 diabetes. The enzyme activity is also increased when the heterologous form C5, determined by both *BCHE* and *CHE2* locus(2q33-35), is present, but it is decreased in the presence of a variant at nucleotide -116 of the *BCHE* gene, called *-116A*. Association between diabetes and *BCHE* gene variants was found by our group on previous studies, as well as by other researchers, however, studies emphasizing the genetics base of gestational *Diabetes Mellitus* (GDM) are scarce. This study examined BChE activity, *CHE2* locus phenotypes, the frequency of two *BCHE* gene variants (rs1126680 - nt *-116* e rs1803274 - nt 1615), and anthropometric and biochemical variables associated with diabetes in a sample of patients with GDM (N = 150) and a control sample of pregnant women who did not have the disease (N = 295), both from Curitiba - PR. Beyond *BCHE* gene variants, four Tag-SNPs close to its region were considered on this study. The enzyme activity average was significantly higher in the control group than in the pregnant women group with GDM, but on both groups was significantly lower than the activity average in the population of Curitiba. The frequency of CHE2 C5+ phenotype was similar in pregnant women with GDM, control group and in the population of Curitiba. Genotypic and allelic frequencies of all SNPs did not differ between sample groups. The positive correlation between BMI and LDL cholesterol on diabetic pregnant women, permit us say that BChE presents a role on lipid metabolism also on GDM. However, the lowering effect of gestational diabetes on BChE activity was stronger than the characteristic enhancer effect of obesity, because although the diabetic pregnant women have a higher BMI, they presented a lower enzyme activity average than the non-pregnant women group. The *-116A* allele had decreased BChE activity, independently from physiological changes caused by the pregnancy and by GDM, because the enzyme activity reduction occured in the control and patients groups and in individuals from general population. On haplotype analysis we observed that the group of pregnant women with GDM presented 21 more frequent haplotypes, whereas the group of non-diabetic pregnant women presented 24 haplotypes, of which 16 were common on both sample groups. The frequencies of H3 (GTGGAA), H7 (GTAACG) e H11 (GTAGCG) haplotypes presented significantly difference between the group of pregnant women with GDM and control group.

When calculated the *Odds ratio* (*OR*) values for these haplotypes, H3 haplotype, more common in control group individuals, presented a protective effect of DMG (*OR*= 0,54; 0,30 ≤ μ ≤ 0,98; IC 95% (*p*< 0,05)). H7 (*OR*= 3,9; 1,28 ≤ μ ≤ 11,85; IC 95% (*p*< 0,05)) and H11 haplotypes (*OR*= 8,46 ; 0,94 ≤ μ ≤ 76,40; IC 95% (*p*< 0,05)), more frequent on GDM patients, represented haplotypes of predisposition to the disease. We suggest for explaining these significantly results: 1) a regulatory effect of these haplotypes on BChE activity that is associated with GDM, or, 2) a linkage disequilibrium between the haplotypes and another gene located close *BCHE* gene. The SNPs upstream *BCHE* gene were on linkage disequilibrium, as well as the SNPs downstream *BCHE* gene. We still stand the strong linkage disequilibrium already known between the variants on -116 and 1615 sites of *BCHE* gene that was confirmed on the present study.

Sumário

1. Introdução 01
2. Revisão Bibliográfica 02
2.1. Aspectos gerais do *Diabetes Mellitus* 02
2.2. *Diabetes Mellitus* gestacional (DMG) 04
2.3. Bases genéticas do *Diabetes Mellitus* 06
2.4. Colinesterases 09
2.5. Características da butirilcolinesterase (BChE) 11
2.6. Gene *BCHE* 14
2.6.1. Variabilidade da BChE e do gene *BCHE* 15
2.6.1.1. Variantes -*116A* e *1615A* do gene *BCHE* 17
2.6.1.2. Loco *CHE2* 18
2.7. SNPs rs4440084, rs2863381, rs7624915, rs4387996 18
2.8. Associação entre DM e variantes do gene *BCHE* 19
2.8.1. Associação entre DMG e variantes do gene *BCHE* 20
3. Objetivos 21
3.1. Objetivo geral 21
3.2. Objetivos específicos 21
4. Capítulo 1 22
Resumo 22
Abstract 22
Introdução 23
Materiais e Métodos 25
Amostra 25
Coleta de soro 25
Extração de DNA 26
Quantificação do DNA genômico 26
Determinação da atividade da BChE 26
Fenotipagem do loco *CHE2* 26
Genotipagem da variante -*116A* (rs1126680) do gene *BCHE* 26
Análise estatística 27

Resultados 27
Características Clínicas e Antropométricas 27
Atividade da BChE 27
Fenotipagem do loco *CHE2* e atividade da BChE 30
Frequências da variante -*116A* (rs1126680) 30
Variante -*116A* (rs1126680) e Atividade da BChE 30
Discussão 32
Agradecimentos 35
Referências 36
5. Capítulo 2 41
Resumo 41
Abstract 41
Introdução 42
Materiais e Métodos 44
Amostra 44
Extração e quantificação do DNA genômico 45
Pesquisa das variantes alélicas 45
Análise estatística 45
Resultados 46
Frequências alélicas e genotípicas 47
Frequências dos SNPs rs4440084 e rs2863381 47
Frequências da variante *1615A* (*K*) (rs1803274) 49
Frequências dos SNPs rs7624915 e rs4387996 50
Frequências haplotípicas e O*dds Ratio* (*OR*) 52
Desequilíbrio de ligação 54
Discussão 54
Agradecimentos 57
Referências 57
6. Discussão geral 60
7. Conclusões 64
8. Referências 65

Apêndice 1 74
Análises complementares 74
SNP rs4440084 (a montante do gene *BCHE*) X Atividade da BChE 74
SNP rs2863381 (a montante do gene *BCHE*) X Atividade da BChE 75
SNP rs1803274 (dentro do gene *BCHE*, variante *1615A*) X Atividade da BChE 75
SNP rs7624915 (a jusante do gene *BCHE*) X Atividade da BChE 76
SNP rs4387996 (a jusante do gene *BCHE*) X Atividade da BChE 77
Apêndice 2 79
Materiais e Métodos 79
Amostra populacional 79
Critérios para caracterização da amostra 79
Extração de DNA e coleta de soro 80
Quantificação do DNA genômico 80
Determinação da atividade da BChE 80
Fenotipagem do loco *CHE2* 81
Genotipagem dos SNPs localizados nos sítios -116 e 1615 do gene *BCHE* e dos SNPs a montante e a jusante do gene *BCHE*: Genotipagem em tempo real 82
Análise estatística 84
Anexos: Anexo 1 85
Anexo 2 87
Anexo 3 88

1. Introdução

O *Diabetes Mellitus* gestacional (DMG) é caracterizado por intolerância à glicose com início ou primeiro diagnóstico durante o segundo ou terceiro trimestres da gestação e sua incidência é estimada em 3% a 10% das gestantes. Está associado a problemas no desenvolvimento fetal, incluindo óbito fetal intrauterino. Muitas pesquisas são necessárias para se entender os mecanismos do DMG, inclusive sua evolução após a gravidez.

A butirilcolinesterase (BChE) é uma esterase sérica polimórfica, codificada pelo gene *BCHE* (3q26.1-q26.2) que possui quatro exons formados por 2.445 pares de bases. Sua função no organismo e o seu substrato natural permanecem desconhecidos, mas já foi associada ao metabolismo de lípides e à proteção da acetilcolinesterase e a patologias como obesidade, diabetes, Doença Arterial Coronariana, câncer e Hanseníase.

Diversos estudos sugerem que a base genética do DMG é semelhante à do *Diabetes Mellitus* do tipo II (DM2). Nos dois tipos de diabetes não ocorre deficiência acentuada na produção da insulina, mas uma resistência à ação dessa substância e o DMG aumenta as chances de a mulher desenvolver o DM2 no futuro. Associações entre DM2 e BChE já foram encontradas por nosso grupo em estudos anteriores, bem como por outros pesquisadores, especialmente em relação à variante *1615A* (*K*) do gene *BCHE*. A variante *-116A* do gene *BCHE* está em desequilíbrio de ligação com a variante *1615A* (*K*) e é associada à diminuição da atividade enzimática. Embora alguns estudos não tenham encontrado associação entre a mutação *1615A* (*K*) e o DM2, eles não levaram em consideração o genótipo do sítio -116. A análise dos haplótipos referentes às mutações *-116A* e *1615A* (*K*) trará informação mais detalhada a respeito da possível associação entre BChE e DMG. Além disso, a fenotipagem do loco *CHE2*, que sabidamente influencia na atividade enzimática, também deve contribuir para a melhor compreensão do papel da BChE no DMG.

Além das variantes do gene *BCHE*, quatro Tag-SNPs (rs4440084; rs2863381; rs7624915; rs4387996) próximos à sua região foram considerados neste estudo. Estes SNPs podem estar associados à patogênese de doenças metabólicas por estarem em desequilíbrio de ligação com variantes de outro (s) gene (s) que de fato participe do desenvolvimento de doenças.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Aspectos gerais do *Diabetes Mellitus*

A Organização Mundial da Saúde define o *Diabetes Mellitus* (DM) como uma desordem metabólica de etiologia múltipla caracterizada por hiperglicemia crônica com distúrbios no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, resultante de defeitos da secreção ou ação da insulina, ou ainda da combinação de ambos (WHO, 1999). A doença é altamente heterogênea, ou seja, causas genéticas diferentes, e talvez não genéticas, produzem essa condição clínica, que por isso é apresentada em algumas variedades comuns e incomuns (Vogel E Motulsky, 2000). O *Diabetes Mellitus* pode apresentar-se com sintomas característicos como sede, poliúria, embaçamento na visão e perda de peso. Em suas formas mais severas, um estado de cetoacidose pode desenvolver estupor, coma e, na ausência de tratamento adequado, pode levar à morte (WHO, 1999).

A investigação dos hormônios pancreáticos, especialmente da insulina, trouxe grande contribuição ao conhecimento relativo do *Diabetes Mellitus*, assim como proporcionou tratamento aos portadores da doença, permitindo a sua sobrevivência com a terapia de reposição do hormônio. Entretanto, na segunda metade do século XX ocorreu um crescimento enorme na incidência do *Diabetes Mellitus*, e nessa evolução observou-se que o número de indivíduos que desenvolvem a doença por falência pancreática primária permanece relativamente baixo. A perda da homeostasia glicêmica na grande maioria dos portadores do *Diabetes Mellitus*, que a princípio produzem o hormônio, é devida a um estado de resistência à ação da insulina desenvolvido ao longo da vida (Aires, 2008).

Desde a década de 1980, após a identificação de diversas formas que o *Diabetes Mellitus* pode apresentar, as classificações e os critérios diagnósticos para a doença sofreram modificações. A classificação etiológica adequada é essencial para o estabelecimento da melhor terapia e do diagnóstico precoce para se prevenir o aparecimento de complicações crônicas. No ano de 1997 foi classificado em quatro classes clínicas: 1) *Diabetes Mellitus* do tipo I ou imunomediado; 2) *Diabetes Mellitus* do tipo II; 3) Outros tipos específicos de D*iabetes Mellitus, e*; 4) *Diabetes Mellitus* gestacional (Projeto Diretrizes, 2004).

O *Diabetes Mellitus* do tipo I desenvolve-se como um resultado da destruição das células β pancreáticas e é caracterizado pela deficiência absoluta de insulina (e, portanto,

designado como diabetes insulino-dependente - termo não mais aceito), por um começo abrupto de sintomas, propensão à cetose e dependência de insulina exógena para a sobrevivência (Pociot e McDermott, 2002). Os marcadores da destruição imune incluem os auto-anticorpos contra as células das ilhotas, contra a insulina e contra a descarboxilase do ácido glutâmico (GAD) (Projeto Diretrizes, 2004). Esta forma da doença acomete de 5-10% das pessoas afetadas pelo *Diabetes Mellitus* e a taxa de destruição das células β pancreáticas é bem variável, sendo mais rápida em alguns indivíduos (principalmente bebês e crianças) e mais lenta em outros (principalmente adultos) (American Diabetes Association, 2004).

O *Diabetes Mellitus* do tipo II é provocado por um defeito na secreção de insulina que se agrava devido ao fator concomitante de resistência à insulina (Projeto Diretrizes, 2004). A resistência à ação da insulina apresenta-se no tecido muscular e adiposo e no fígado, acompanhada de menor secreção de insulina. Nos últimos anos, ficou evidente que inúmeros fatores podem regular negativamente a ação da insulina, agindo tanto no receptor de insulina quanto em moléculas pós-receptor (Aires, 2008). Um destes fatores é a exposição crônica a altas concentrações de ácidos graxos livres ou mesmo de glicose (Randle, 1994).

Apesar de este tipo de diabetes ser o mais frequente dentre os casos de diabetes – representa de 90 a 95% dos casos (Projeto Diretrizes, 2004) - sua etiologia específica não está claramente estabelecida como no diabetes do tipo I, mas se sabe que a destruição auto-imune do pâncreas não está envolvida (Gross *et al.*, 2002). Além disso, ao menos inicialmente, e frequentemente ao longo da vida, esses indivíduos não necessitam do tratamento com insulina para sobreviverem (American Diabetes Association, 2002). Também ao contrário do diabetes do tipo I, a maioria dos pacientes apresenta obesidade (Gross, *et al.*, 2002).

Observa-se que com o aumento na incidência de obesidade (as alterações vistas atualmente nos hábitos de vida favorecem essa patologia), o *Diabetes Mellitus*, principalmente do tipo II, tornou-se uma epidemia, com prevalência crescente em todo o mundo (Projeto Diretrizes, 2004). Estima-se que mais de 220 milhões de pessoas em todo o mundo tenham diabetes (WHO, 2011).

Os outros tipos específicos de diabetes, baseados na classificação do Projeto Diretrizes, incluem os defeitos genéticos das células, os defeitos genéticos na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino, endocrinopatias, diabetes quimicamente induzido

ou induzido por drogas, formas incomuns de diabetes imunomediado e outros fatores genéticos algumas vezes associados ao diabetes do tipo II (Projeto Diretrizes, 2004).

Alguns casos raros de *Diabetes Mellitus* são formas monogênicas. Essas formas monogênicas são chamadas de *MODY* (*maturity-onset diabetes of the young*), sendo que apenas recentemente o caráter monogênico foi demonstrado. Os *MODY* são numerados de acordo com o gene comprometido (Aires, 2008).

O *Diabetes Mellitus* gestacional é definido como qualquer grau de intolerância à glicose com início ou primeira detecção durante a gravidez (Projeto Diretrizes, 2004) e será discutido mais detalhadamente a seguir.

2.2. *Diabetes Mellitus* gestacional (DMG)

O D*iabetes Mellitus* gestacional (DMG) caracteriza-se por intolerância a carboidratos, resultando em hiperglicemia de níveis variados com surgimento, ou primeiramente detectada durante a gravidez (WHO, 1999). Semelhante a outras formas de hiperglicemia, o DMG é caracterizado pela insuficiência na função das células β pancreáticas em captar as partículas de insulina disponíveis (Buchanan *et al.*, 2007).

A gestação é um estado hiperinsulinêmico caracterizado por uma diminuição da sensibilidade à insulina, parcialmente explicada pela presença de hormônios diabetogênicos, tais como a progesterona, o cortisol, a prolactina e o hormônio lactogênico placentário. Os níveis glicêmicos de jejum tendem a ser mais baixos na gestante, contudo, os valores pós-prandiais são mais altos, sobretudo naquelas em que não há aumento adequado da liberação de insulina (Maganha *et al.*, 2003).

O DMG é considerado uma patologia grave, uma vez que pode provocar o nascimento de fetos macrossômicos, pré-eclâmpsia e ainda morte perinatal (Schmidt *et al.*, 2001). No Brasil, o Ministério da Saúde, a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) e o Grupo de Trabalho em Diabetes e Gravidez (GTDG) recomendam que o rastreamento dessa enfermidade seja universal - a partir da vigésima semana de gestação (Dode e Santos, 2009).

Dependendo da população estudada e dos meios diagnósticos utilizados, a incidência de intolerância à glicose irá variar entre 3 e 10% das gestações, embora 80% ou mais desses casos apenas se apresentem durante a gravidez com rápidos episódios de hiperglicemia (Lobato, 2002).

Pacientes com DMG assemelham-se a pacientes com *Diabetes Mellitus* do tipo II, já que apresentam uma diminuição ainda mais acentuada da sensibilidade periférica à insulina, além de uma secreção diminuída de insulina, explicando os picos pós-prandiais. Entretanto, a fisiopatologia do DMG não está totalmente elucidada. Se todas as gestantes fossem resistentes à insulina, a incidência do DMG seria superior aos níveis encontrados (Maganha *et al.*, 2003).

Alguns fatores são considerados de risco para o DMG tais quais: 1) idade superior a 25 anos; 2) obesidade ou ganho excessivo de peso na gravidez atual; 3) deposição central excessiva de gordura corporal; 4) história familiar de diabetes em parentes de 1^{o} grau; 5) baixa estatura (1,50cm); 6) crescimento fetal excessivo, polidrâmnio, hipertensão ou pré-eclâmpsia na gravidez atual; 7) antecedentes obstétricos de morte fetal ou neonatal, de macrossomia ou de *Diabetes Mellitus* gestacional (Reichelt *et al.*, 2002).

Mulheres com menos de 25 anos de idade, com peso corpóreo normal, que não apresentem histórico familiar para o diabetes, histórico de metabolismo anormal de glicose ou ainda de insucesso obstétrico e não sejam membros de grupo étnico com alta prevalência de diabetes constituem um grupo com menor risco de desenvolver intolerância à glicose. Os grupos étnicos com alta prevalência da doença são americanos de origem hispânica, asiática, africana, de ilhas do Pacífico e nativos americanos. As gestantes que se enquadram em todos estes critérios não necessitam ser rastreadas para a doença (American Diabetes Association, 2004).

No Brasil adotou-se como critério diagnóstico de DMG o teste oral de tolerância à glicose (TOTG) – 100 g, caracterizando como hiperglicemia na gestação (HGG) a determinação glicêmica das 8 (basal) às 18h a cada duas horas, mantendo-se ingestão de uma dieta geral com 2.840 kcal, fracionada em desjejum, almoço e lanche. São considerados valores normais os menores do que 90 mg/dL e 130 mg/dL para as condições de jejum e pós-prandiais, respectivamente. (Silva *et al.*, 2003). Pelos critérios apresentados pela American Diabetes Association (2004), duas medidas excedendo esses valores já são suficientes para a detecção do DMG. O teste é uma medida da capacidade das células β de secretar insulina e da capacidade da insulina de reduzir a concentração de glicose no sangue (Fox, 2007).

Mulheres apresentando muitas características consideradas de risco para o DMG devem ser acompanhadas desde a primeira visita pré-natal, devendo ser submetidas ao teste de verificação dos níveis de glicose. Se as dosagens compatíveis com o diagnóstico de

DMG não forem observadas no primeiro teste, mas a paciente apresentar fatores de risco à doença, ela deverá ser acompanhada até a 24ª - 28ª semana de gestação. Na presença de hiperglicemia, o diagnóstico deve ser confirmado em um dia subsequente (American Diabetes Association, 2004).

Deve-se salientar que não é pequena a quantidade de problemas que contribuem para a mortalidade perinatal em gestações diabéticas, dentre os quais podem ser citados macrossomia, traumatismos decorrentes do parto, hipoglicemia, hipocalcemia, icterícia, distúrbios respiratórios, malformações congênitas, policitemia com hiperviscosidade sanguínea, hipertrofia cardíaca, hipomagnesemia, natimortalidade, crescimento intra-uterino retardado, entre outros. Em longo prazo, a prole resultante de gestações complicadas pelo diabetes pode sofrer de obesidade, diabetes e déficits neuropsicológicos (Lobato, 2002).

Em estudo realizado no Canadá, com mulheres nos períodos pré e pós-parto, foram identificados quatro grupos metabolicamente distintos de tolerância à glicose na gravidez, cujas diferenças na sensibilidade à insulina, função das células β e no metabolismo da glicose persistiram nos três meses após o parto. Observa-se ainda que qualquer grau anormal na homeostase da glicose na gravidez (não apenas no DMG) prediz intolerância à glicose nos três meses após o parto. Assim, o rastreamento de DMG no período pré-parto é importante para identificação de risco futuro de pré-diabetes e diabetes do tipo II (Retnakaran *et al.*, 2008). Outro estudo realizado na Dinamarca evidenciou que um ambiente intrauterino hiperglicêmico parece estar primariamente envolvido na patogênese do *Diabetes Mellitus* do tipo II/pré-diabetes. Este estudo foi realizado observando-se a descendência adulta de mulheres caucasianas com DMG em tratamento nutricional ou diabetes do tipo I durante a gravidez (Clausen *et al.*, 2008).

2.3. Bases genéticas do *Diabetes Mellitus*

O *Diabetes Mellitus* representa um grupo heterogêneo de distúrbios. A doença apresenta características genéticas complexas, pois além da participação de múltiplos locos gênicos, fatores ambientais também desempenham papel importante (Vogel e Motulsky, 2000).

Alguns fenótipos diabéticos distintos podem ser identificados em termos de etiologia específica e/ou patogênese, mas, em muitos casos, fenótipos sobrepostos tornam as

classificações etiológica e patogênica difíceis (Pociot e McDermott, 2002). Desta forma, uma abordagem utilizando ferramentas da biologia molecular, como estudos de SNPs, pode auxiliar no entendimento das bases genéticas do *Diabetes Mellitus*, facilitando o tratamento da doença.

A susceptibilidade genética em membros de uma família é claramente dependente do grau de identidade genética com o probando, e na verdade o risco do *Diabetes Mellitus* do tipo I em famílias apresenta uma correlação não-linear com o número de alelos compartilhados com o probando; o maior risco é observado em gêmeos monozigóticos (100% de identidade genética), seguido de parentes de 1° e 2° graus (50 e 25% de identidade genética, respectivamente) (Pociot e McDermott, 2002).

O diabetes do tipo I pode ter padrão monogênico de herança, resultante de mutações no gene *Fox P3*, que controla o desenvolvimento das células T regulatórias (Eisenbarth e Jeffrey, 2008). Entretanto, a forma mais desafiadora para a ciência é representada pelo distúrbio em forma multifatorial. As associações mais fortes, tanto de susceptibilidade quanto de proteção para o diabetes do tipo I são com moléculas de HLA (DR e DQ). No entanto, múltiplos genes adicionais são candidatos para a susceptibilidade ao diabetes, especialmente após a aplicação de análises genômicas na verificação de risco à doença (Eisenbarth, 2007).

O *Diabetes Mellitus* do tipo II é comum na meia-idade e nos mais idosos, mas geralmente é mais brando. Os fatores genéticos têm um papel importante, evidenciados pela alta taxa de concordância em gêmeos idênticos (Vogel e Motulsky, 2000). Um histórico de DM2 em parentes de primeiro grau duplica o risco ao diabetes (Elbein, 1997).

No momento, são conhecidos alguns genes implicados em formas monogênicas de diabetes (*MODY*, diabetes mitocondrial), no entanto, nas formas mais comuns a doença é de caráter poligênico. Entretanto, poucos genes são associados à doença de uma forma reprodutível nos diferentes grupos populacionais estudados. Cada um destes poligenes apresenta um papel isolado muito pequeno, atuando na modulação de fenótipos associados ao diabetes (Reis e Velho, 2002).

No diabetes do tipo *MODY*, o caráter monogênico foi demonstrado recentemente. Os *MODY* são numerados de acordo com o gene comprometido. Os *MODY 1*, *3* e *5* decorrem de mutações nos genes *HNF* (*4α*, *1α* e *3β*, respectivamente). Os HNF (*hepatocyte nuclear factor*) são fatores transcricionais responsáveis pela expressão de vários genes, entre os quais o da

insulina, nas células β, e genes de enzimas do metabolismo da glicose, no fígado. O *MODY2* decorre de uma mutação no gene da glicoquinase, o que prejudica a metabolização da glicose tanto nas células β, comprometendo a secreção de insulina induzida pela glicose, como no fígado, comprometendo a metabolização hepática da glicose. O *MODY4* decorre de mutação no gene *PDX1* (*pancreas duodenum homeobox 1*), um fator transcricional importante para a expressão da insulina, da somatostatina e de vários outros genes que se expressam tanto na ilhota pancreática como no duodeno; em homozigose induz agenesia (ausência) de pâncreas. Finalmente, o *MODY6* decorre de mutação no gene da *NeuroD1*, um importante fator transcricional na ilhota, que regula a expressão no gene da insulina, entre outros (Aires, 2008).

Segundo uma meta-análise publicada no ano de 2009, alguns genes podem ser considerados para a melhor compreensão das bases genéticas do diabetes do tipo II. O primeiro gene candidato a ser fortemente associado à doença foi o *TCF7L2*, que foi avaliado em estudos com pacientes de outras etnias. Os genes *IGF2BP2*, *CDKAL1*, *CDKN2A/B*, *HHEX*, *SLC30A8* e *KCNJ11* mostraram associação em japoneses; os genes *IGF2BP2*, *SLC30A8*, *HHEX*, *CDKAL1*, *CDKN2A/B* e *FTO*, em asiáticos de Hong Kong e da Coréia; *CDKAL1*, *CDKN2A/B*, *HHEX* e *SLC30A8* em chineses da etnia Han; e *IGF2BP2*, *PPARG2* e *FTO* em Índios Siques (Sanghera *et al.*, 2009).

Uma variedade de fatores ambientais pode estar envolvida na expressão clínica do diabetes do tipo II, tais quais grau e tipo de obesidade, sedentarismo, má nutrição nos períodos fetal e perinatal e diferentes tipos de drogas tais como esteróides, diuréticos e agentes anti-hipertensivos. Ressalta-se que a obesidade, um dos chamados determinantes ambientais para esta doença, está claramente sob controle genético (Velho e Froguel, 1997). Como a obesidade e o *Diabetes Mellitus* do tipo II aparecem frequentemente associados, acredita-se que possam apresentar genes em comum para explicar sua base genética. Estes genes associados à obesidade irão influenciar na homeostase glicídica alterando fatores como massa gordurosa, sensibilidade à insulina e padrão secretório da insulina (Reis e Velho, 2002).

Existem relativamente poucas pesquisas que visam compreender as bases genéticas do *Diabetes Mellitus* gestacional. Dentre os fatores que dificultam os estudos genéticos desta patologia estão encontrar e acompanhar mulheres que pretendam ficar grávidas – o acompanhamento no período anterior à gravidez é importante, já que é feito todo um

estudo baseado no histórico das pacientes; e encontrar famílias com múltiplos casos de DMG, o que está parcialmente relacionado à baixa prevalência da doença (Watanabe *et al.*, 2007).

Sabe-se que entre mulheres com risco prévio para o DMG, aquelas com histórico familiar de *Diabetes Mellitus* do tipo II, mais provavelmente apresentam não apenas fatores de risco para doenças cardiovasculares, incluindo síndrome metabólica e diabetes do tipo II, mas também risco aumentado de já terem vivenciado eventos cardiovasculares em idade precoce (Carr *et al.*, 2006). Por causa de tais associações, pode-se esperar que genes relacionados à patogênese das doenças cardiovasculares também possam estar envolvidos no desenvolvimento do *Diabetes Mellitus* gestacional.

A predisposição genética ao DMG foi relatada por variações nos genes codificadores do receptor de insulina (*INSR*), fator de crescimento semelhante à insulina 2 (*IGF2*), receptor β3-adrenérgico (*ADRB3*), entre outros genes importantes. Entretanto, muitos estudos mostram-se controversos, o que pode estar relacionado ao baixo poder dos testes utilizados, ao pequeno efeito de muitas variantes comuns ou à heterogeneidade das populações (Shaat *et al.*, 2005). Os estudos realizados por Shaat *et al.* (2005 e 2007) analisou o efeito de genes de proteínas envolvidas no mecanismo do canal de potássio e observou que o polimorfismo *E23K* do gene *KCNJ11* parece predispor ao DMG em mulheres escandinavas e que a variante 7903146 do gene *TCF7L2*, que codifica um fator de transcrição, também apresenta associação com o DMG.

Como observado, muitas lacunas permeiam a compreensão da etiologia do diabetes em suas diversas formas. Esta incompreensão começa a estimular os cientistas a realizarem análises moleculares, principalmente com genes candidatos à doença e genes associados a outros distúrbios metabólicos que interferem no *Diabetes Mellitus*.

2.4. Colinesterases

As esterases podem ser classificadas em três tipos principais de acordo com seu substrato preferencial. As esterases aromáticas hidrolisam ésteres aromáticos, as aliesterases hidrolisam, preferencialmente, ésteres alifáticos e as colinesterases hidrolisam, com maior eficiência, ésteres de colina (Furtado-Alle, 2005).

Duas enzimas diferentes hidrolisam a acetilcolina nos vertebrados. A acetilcolinesterase (AChE; EC 3.1.1.7) finaliza a ação da acetilcolina na membrana pós-

sináptica na junção neuromuscular. A outra enzima hidrolisa acetilcolina, assim como outros ésteres de colina, mas sua função fisiológica não é conhecida. Ela é denominada butirilcolinesterase, pseudocolinesterase, colinesterase não-específica ou apenas colinesterase (BChE; EC 3.1.1.8) (Chatonnet e Lockridge, 1989). As colinesterases apresentam ainda funções não colinérgicas (Tabela 1).

Tabela 1. Atividades biológicas propostas das colinesterases.

Atividade Biológica	**Colinesterases**
Atividade de aril-acilamidase amino-sensível (AAA)	AChE e BChE
Atividade de Metalocarboxipeptidase	AChE e BChE
Hidrólise de cocaína	BChE
Diferenciação celular neural	AChE e BChE
Divisão celular e tumorigênese	AChE e BChE
Funções na *substantia nigra* (abertura do canal de potássio)	AChE
Interação célula-célula	AChE e BChE

Fonte: Adaptado de BALASUBRAMANIAN E BHANUMATHY, 1993.

As duas colinesterases conhecidas, AChE e BChE, predominam, respectivamente, nos eritrócitos, neurônios, gânglios do sistema nervoso autônomo e placas motoras terminais e no plasma, fígado, neuróglias, pâncreas e paredes do tubo digestivo (Siqueira *et al.*, 1978).

Tanto BChE quanto AChE existem sob a forma de subunidades catalíticas. As formas globulares G1, G2 e G4 contêm uma, duas ou quatro subunidades. Estas formas são prontamente extractáveis em fortes tampões pouco iônicos ou fortemente ligadas a membranas e necessitam de solvente para sua solubilização. Formas com um perfil mais alongado são chamadas assimétricas e estas não interagem com detergentes, mas são solubilizadas em tampões com alta concentração de sal. As formas assimétricas contêm ainda um a três tetrâmeros das subunidades ligados por pontes dissulfídricas a uma calda semelhante a colágeno. A forma mais complexa, A12, apresenta 12 subunidades. As formas podem ser classificadas como hidrofílicas, solúveis em água ou ligadas a uma membrana/matriz extracelular por meio de fortes interações com outras moléculas (Chatonnet e Lockridge, 1989).

Dada sua complexa estrutura e seu amplo modo de ação, as colinesterases parecem desempenhar importante papel no desenvolvimento de diversas patologias, como resistência à insulina, obesidade, *Diabetes Mellitus* do tipo II, hipertensão, hiperlipidemias, síndrome metabólica e doença de Alzheimer (Das, 2007).

2.5. Características da butirilcolinesterase (BChE)

A butirilcolinesterase é bastante estudada por farmacologistas porque é responsável pela hidrólise da succinilcolina, uma droga utilizada em cirurgias como um bloqueador de ação curta do receptor de acetilcolina (Chatonnet e Lockridge, 1989), devido à hidrólise da cocaína (Nachon *et al.*, 2002) ou por causa de sua inibição em trabalhadores em contato com pesticidas (Wilson *et al.*, 2009). Esta enzima, quando isolada do plasma humano, geralmente apresenta-se em uma estrutura globular e tetramérica (Blong *et al.*, 1997). Observa-se ainda que a BChE está presente em quase todos os tecidos, com exceção dos eritrócitos (Lockridge e La Du, 1982).

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

Através de eletroforese bi-dimensional em papel filtro e em gel de amido pH 8,6, é possível verificar as cinco formas moleculares principais da butirilcolinesterase existentes no organismo humano: monômero (C1), dímero (C3) e tetrâmero (C4), também o monômero ligado à albumina sérica (C2) e o tetrâmero ligado à uma substância desconhecida (C5) (Lockridge *et al.*, 1979). Além destas, outras classificações para as formas da BChE são encontradas.

A forma mais comum dentre as citadas acima é a C4. As quatro subunidades desta forma da colinesterase sérica humana são idênticas, no que diz respeito ao seu peso molecular, e estão arranjadas como um dímero de dímeros. Em cada dímero, uma única ponte ligante dissulfídrica liga duas subunidades idênticas. Estas pontes ligantes dissulfídricas não são necessárias à função ou estrutura, já que sua redução ou alquilação resulta em uma enzima totalmente ativa e continua sendo um tetrâmero. Parece, portanto, que ligações não-covalentes mantêm as quatro subunidades unidas. Até o momento, uma

função foi encontrada para tais ligações, que é a estabilização da molécula contra a inativação pelo calor (Lockridge *et al.*, 1979).

No ano de 2002, Nachon *et al.* (2002) obtiveram a primeira cristalização da BChE através da construção da BChE humana recombinante, em que foram suprimidos 4 dos 9 sítios de N-glicosilação e foi deletado o domínio de oligomerização.

Experimentos no ano de 2003 demonstraram por meio de arranjos computacionais, a estrutura cristalizada para a BChE humana. Observou-se que a estrutura completa da BChE assemelha-se à *Tc*AChE (AChE de *Torpedo californica*). Entretanto, BChE não forma o dímero observado em estruturas prévias de *Tc*AChE, AChE de camundongos e AChE humana (Figura 1) (Nicolet *et al.*, 2003).

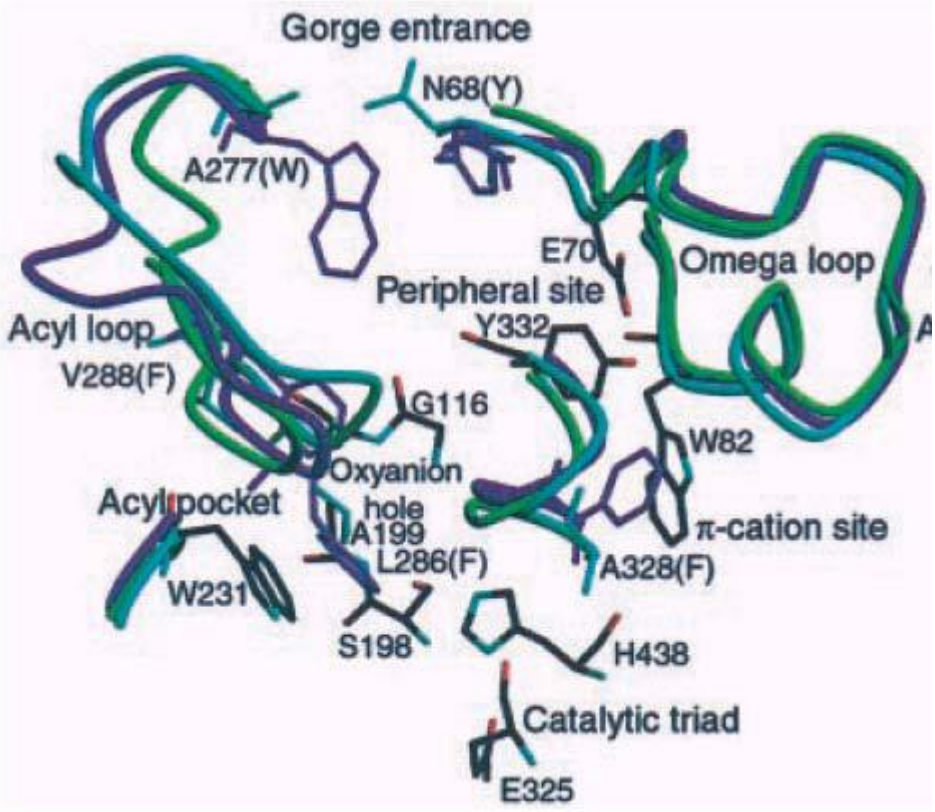


Figura 1. Esquema da sobreposição da BChE nativa (azul claro), *Tc*AChE (rosa), e *Dm*AChE - *Drosophila melanogaster* (verde) em torno da entrada do sítio ativo. Apenas o loop acyl exibe diferenças conformacionais significativas nas três enzimas. Os aminoácidos que diferem entre BChE e *Tc*AChE estão retratados em azul claro e rosa, respectivamente. Fonte: Nicolet *et al.*, 2003.

Diversos fatores e patologias podem influenciar a atividade da BChE, como destacado nas tabelas 2 e 3. Além das implicações da atividade da BChE representadas nas tabelas 2 e

3, outra observação pertinente ao presente estudo é que em adultos a atividade da BChE é mais elevada em homens do que em mulheres devido a uma aparente modulação hormonal negativa desencadeada pelo estrógeno. Um decréscimo na atividade foi detectado após a décima semana de gravidez, o qual prossegue por dez dias a seis semanas após o parto. A média da atividade enzimática se reduz 25% durante a gravidez e 33% após o parto (Whittaker, 1980).

Tabela 2. Alguns fatores que estão associados ao aumento da atividade da BChE.

Tipo	**Condição**
Oligogênico	Fenótipo CHE2 C5+
Multifatorial	Obesidade
	Diabetes Mellitus dos tipos I e II
	Hiperproteinemia
	Psoríase
	Hipertensão
	Tirotoxicose
	Nefrose
	Alcoolismo
	Esquizofrenia

FONTE: Whittaker, 1980.

Tabela 3. Alguns fatores que estão associados à redução da atividade da BChE.

Fatores
Variantes do gene *BCHE*
Gravidez
Período perinatal e infância
Doenças hepáticas (hepatite aguda, crônica, cirrose, metástases hepáticas)
Infarto do miocárdio
Doenças do colágeno (distrofia muscular progressiva, miotonia congênita, dermatomiosite)
Hiperpirexia
Tuberculose
Infecção aguda
Carcinoma
Choque cirúrgico
Anemia crônica
Má nutrição
Mixoedema
Terapia por raios-X
Drogas anticâncer
Pílula anticontraceptiva
Organofosforados

FONTE: Adaptado de Whittaker, 1980 e Whittaker, 1986.

2.6. Gene *BCHE*

Localizado na região 3q26.1-q26.2, o gene *BCHE* tem 64.558 kb e possui quatro exons formados por 2.445 pares de bases (Arpagaus *et al.*, 1990).

Como a BChE é formada por 574 resíduos de aminoácidos, apenas 1.722 pares de bases codificam para a enzima madura, sendo que os 723 pares de bases não codificantes da enzima madura correspondem ao exon 1, à parte inicial do exon 2 e à parte final do exon 4. O exon 1 (149 pb) contém sequências não traduzidas e dois sítios potenciais de início de tradução nos códons -69 e -47. O exon 2 (1.525 pb) contém 83% da sequência codificadora da proteína madura, incluindo a extremidade N-terminal, o sítio ativo e um terceiro possível

sítio de início de tradução no códon -28. O primeiro códon que codifica para o peptídeo maduro é numerado como +1 e está localizado no exon 2. O exon 3 tem 167 nucleotídeos e o exon 4 (604 pb) codifica a extremidade C-terminal da proteína e a região 3' não traduzida que contém dois sinais de poliadenilação (Arpagaus *et al.*, 1990). O intron 1 tem 6.272 kb, o intron 2 tem 56.512 kb e o intron 3 tem 12.638 kb (Figura 2).

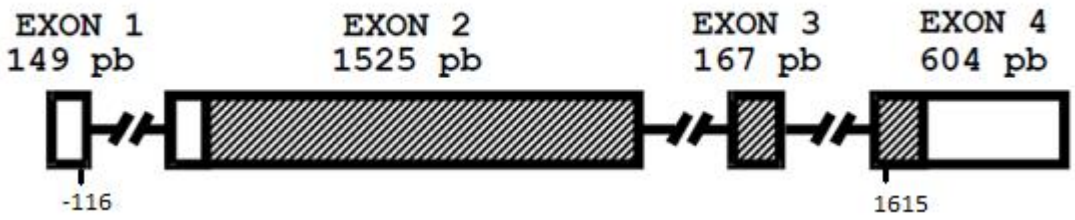


Figura 2. Desenho esquemático do gene *BCHE*, mostrando os quatro exons, o número de pares de bases que os compõem e os sítios -116 e 1615 de duas variantes estudadas no presente estudo. A região hachurada corresponde à proteína madura. Fonte: Furtado-Alle, 2005.

Um único sítio de início da transcrição foi encontrado no gene *BCHE* humano e este sítio localiza-se 157 pb à montante da Met^{-28}, o sítio de início da tradução. As sequências consenso CAAT e TATA estão ausentes; o elemento iniciador caracteriza-se como uma sequência rica em pirimidinas (5'Pi-PiCAPiPiPiPiPi-3'), em que A é o sítio de início da transcrição (Jbilo *et al.*, 1994).

2.6.1. Variabilidade da BChE e do gene *BCHE*

A existência de variabilidade genética da BChE foi pela primeira vez constatada em pacientes que sofriam de apnéia e paralisia muscular prolongadas quando submetidos a doses farmacológicas de succinilcolina, um relaxante muscular pré-operatório (Kalow e Genest, 1957). A identificação de algumas variantes pode ser dada por meio de inibição enzimática. O uso dos inibidores DL-propanolol e Ro2-0683 [dimetilcarbamato de brometo de (2-hidroxi-5-fenil-benzil) trimetil amônio] e de acetato de α-naftila como substrato (Alcântara *et al.*, 1991; Picheth *et al.*, 1994) possibilita a classificação de alguns fenótipos. Dibucaína e fluoreto de sódio também podem ser utilizados como inibidores para evidenciar variantes fenotípicas da BChE.

Cerca de 70 variantes do gene *BCHE* já foram descritas (Souza *et al.*, 2005 e Mikami, 2005) e estão representadas na tabela 4. Muitas destas estão envolvidas no desenvolvimento de diversas patologias.

Tabela 4 – Lista de variantes descritas do gene *BCHE*, com a localização, alteração de nucleotídeo e o nome do alelo.

Nucletídeo	Alteração	Nome
Exon 1		
-116	TGC>TAC	-116
Exon 2		
9-11	CATCAT>CAT	I4del
16	ATT>TT	I6fs
35	AAA>AGA	K12R
45	GGG>GGC	G15G
71	ACG>ATG	T24M
82	TTT>ATT	F28I
98	TAT>TGT	Y33C
109	CCT>TCT	P37S
208	GAT>CAT	D70H
209	GAT>GGT	D70G (A)
223	GGC>CGC	G75R
270	GAA>GAC	E90D
286	AAT>TAT	N96Y
297	ATT>ATG	I99M
298	CCA>TCA	P100S
318	AAT>AAAT	N106fs
344	GGT>GAT	G115D
351	GGT>GGAG	G117fs
355	CAA>TAA	Q119X
375	TTA>TTT	L125F
383	TAT>TGT	Y128C
395	GCT>GCTA	A134fs
424	GTG>ATG	V142M (H)
486	GCT>GCC	A162A
510	GAT>GAG	D170E
514	CAG>TAG	Q172X
551	GCC>GTC	A184V (SC)
592	AGT>GGT	S198G
596	GCA>GTA	A199V
601	GCA>ACA	A201T
607	TCA>CCA	S203P
728	ACG>ATG	T243M (F-1)
748	ACT>CCT	T250P
765	GAG>GAC	E255D
800	AAA>AGA	K267R
811	GAA>TAA	E271X
880	GTG>ATG	V294M
cont. exon 2		
920	CTT>CCT	L307P
943	ACC>AACC	T315fs
943	ACC>TCC	T315S
988	TTA>ATA	L330I
997	GGT>TGT	G333C
1020-1021	GAT>GATA	D340insA
1062-1076		K355insALU
1093	GGA>CGA	G365R
1169	GGT>GTT	G390V (F-2)
1200	TGC>TGA	C400X
1240	CGT>TGT	R386C
1253	TTC>TCC	F418S
1270	CGA>TGA	R424X
1273	TCC>CCC	S425P
1294	GAA>TAA	E432X
1303	GGA>AGA	G435R
1336	TTT>GTT	F446V
1351	GAA>TAA	E451X
1378	GAG>AAG	E460K
1393	AGA>TGA	R465X
1408	CGG>TGG	R470W
1411	TGG>CGG	W471R
Intron 2		
IVS2-8	T>G	
Exon 3		
1490	GAA>GTA	E497V (J)
1500	TAT>TAA	Y500X
1504	TTT>CTT	F474L
1543	CGT>TGT	R515C
1553	CAA>CTA	Q518L
Íntron 3		
IVS3-14	T>C	
Exon 4		
1615	GCA>ACA	A539T (K)
1719-1720	delT	L574fsX576
1914	A>G	1914

FONTE: Adaptado de Souza *et al.*, 2005 e Mikami, 2005.

As variantes *V142M* (*H*), *E497V* (*J*), *1615A* ou *A539T* (K) e algumas das variantes silenciosas, todas caracterizadas como variantes quantitativas, nas quais, devido a alterações na produção, estabilidade e meia-vida das moléculas, ocorre uma redução no número de

moléculas circulantes eficazes. Testes de inibição são incapazes de discriminar entre variantes quantitativas e a enzima comum, exceto em presença de uma variante heterozigota atípica (Bartels *et al.*, 1992).

2.6.1.1. Variantes *-116A* e *1615A* do gene *BCHE*

Neste estudo foram analisadas duas variantes do gene *BCHE*, a *-116A* (*-116G>A*) e a *1615A* (*1615G>A*) (conhecida como variante *K*), sendo que em euro-descendentes a frequência da primeira é de 8% (Bartels *et al.*, 1990) e da segunda variante citada é de 18,4% (Souza *et al.*, 1998).

A variante *1615A* (GCA → ACA, Ala-Thr^{539}) foi descrita pela primeira vez por Rubinstein *et al.* (1978), em um estudo com 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 (Rubinstein *et al.*, 1978).

Altamirano *et al.* (2000), ao compararem a enzima usual com a determinada pela mutação *1615A*, verificaram que estas não apresentaram diferenças com relação a afinidade e taxa de catálise de substratos, taxa de secreção da célula e formação sérica de tetrâmero. Em vista desses dados, sugerem que a diminuição no número de moléculas circulantes da BChE pode ser causada por mutações na região regulatória ou promotora do gene *BCHE*.

O exon 1 do gene *BCHE* contém um sítio polimórfico no nucleotídeo -116 (TGC/TAC; rs1126680), conhecido como variante *-116A* (Bartels *et al.*, 1990). No trabalho de Bartels *et al.* (1990), o heterozigoto G/A para a variante *-116A* foi sempre heterozigoto ou homozigoto para a variante *1615A*, e testes estatísticos confirmaram o desequilíbrio de ligação entre essas variantes.

Furtado-Alle *et al.* (2008) verificaram a atividade da butirilcolinesterase e as frequências das variantes *-116A* e *1615A* do gene *BCHE*, e encontraram evidências de que a baixa atividade da enzima está associada à variante *-116A*. De fato, foi encontrado forte desequilíbrio de ligação entre as variantes *-116A* e *1615A*, sendo que a maioria dos cromossomos portando a variante *-116A* também continha a variante *1615A*. Embora a baixa atividade da BChE observada esteja associada à presença das duas variantes, é importante mencionar que a atividade média da enzima em sua forma selvagem não difere quando apenas a variação no nucleotídeo 1615 está presente.

Mesmo que a variante *-116A* esteja situada em região não-codificadora da proteína madura, ela está localizada em uma região transcrita, o que pode afetar a transcrição ou até a tradução do gene. Desta forma, pode-se sugerir que a variante *-116A* possa interferir na ligação de elementos regulatórios ou ainda que uma variante no sítio de regulação da expressão gênica esteja em desequilíbrio de ligação com a variante *-116A*, causando a redução da atividade da butirilcolinesterase (Furtado-Alle *et al.*, 2008).

2.6.1.2. Loco *CHE2*

Além de apresentar formas diversas, devidas às variantes que codificam o gene *BCHE*, outro loco pode aumentar a variabilidade da BChE. Nos anos de 1962 e 1963, Harris *et al.* (Harris *et al.*, 1962, 1963, *Apud* Andrade, 2007), usando eletroforese bidimensional em papel e gel de amido, verificaram a presença de outra forma molecular da BChE. Além das bandas C1, C2, C3 e C4, foi observada uma banda extra, denominada C5, em 14 dos 300 indivíduos analisados, representando 4,6% da amostra. A banda C5 é determinada tanto pelo loco *BCHE*, como pelo loco *CHE2* (2q33-35; Eiberg *et al.*, 1989, *Apud* Andrade, 2007).

O loco *CHE2* codifica uma substância, cuja natureza permanece parcialmente desconhecida, que se liga à enzima, sendo responsável pelo surgimento da forma heteróloga da BChE que mostra a banda eletroforética C5. Li *et al.* (2008) identificaram peptídios ricos em prolina, e propõem que os peptídios organizam as quatro subunidades da BChE no formato de tetrâmero. Estes autores identificaram o gene *RAPH1* (Ras-associated and PHdomains, que codifica a lamelipodina) como um bom candidato para produzir esta substância que se liga a BChE na forma C5.

A variabilidade do loco *CHE2* é determinada através de métodos eletroforéticos que identificam os fenótipos CHE2 C5+ e CHE2 C5-, caracterizados pela presença e pela ausência da banda C5, respectivamente. O fenótipo CHE2 C5+ apresenta, em média, 25% a mais de atividade que o fenótipo CHE2 C5-. A frequência do fenótipo CHE2 C5+ na população do sul do Brasil é de cerca de 10% (Chautard-Freire-Maia *et al.,* 1991).

2.7. SNPs rs4440084, rs2863381, rs7624915, rs4387996

Tag-SNPs constituem um conjunto de SNPs que capturam grande parte da variação genética em uma região, e podem ser usados em estudos de associação para reduzir o número de SNPs necessários para a detecção de associação, através de desequilíbrio de

ligação entre uma característica de interesse e uma região do genoma (NCBI, Acessado em 21/10/2009).

Dois SNPs a montante do gene *BCHE* (rs4440084, rs2863381) e dois a jusante (rs7624915, rs4387996) são considerados Tag-SNPs, pois têm alto grau de desequilíbrio de ligação com os SNPs em seu entorno. A frequência dos alelos desses SNPs está próxima de 0,5 na população Caucasóide.

2.8. Associação entre DM e variantes do gene *BCHE*

O primeiro relato de aumento na atividade da BChE em diabéticos foi feito por Antopol *et al.* (1937) e, após este, vários estudos encontraram relação entre a atividade da butirilcolinesterase e o *Diabetes Mellitus* (Pavkovic *et al.*, 2003; Abbott *et al.*, 1993).

Hashim *et al.* (2001) encontraram associação da variante *1615A* do gene *BCHE* e o *Diabetes Mellitus* do tipo II em indivíduos caucasianos; Pavkovic *et al.* (1993) relataram que tanto pacientes com tolerância prejudicada à glicose, como com D*iabetes Melittus* do tipo II, possuem atividade da BChE levemente maior do que aqueles que apresentam somente hiperlipidemia; Abbott *et al.* (1993) encontraram valores elevados de atividade da BChE em pacientes/ diabéticos com hipertrigliceridemia.

Lepienski *et al.* (2006) em amostra de pacientes com DM1 encontraram associação positiva do alelo *1615A* e a idade de aparecimento da doença ≤12 anos. Estes autores concluíram que este alelo, ou outra variante em desequilíbrio de ligação com ele, poderia predispor ao aparecimento precoce do DM1. Eles explicam ainda que a ausência de diferença na frequência desse alelo entre DM1 e controles poderia ser explicada por duas situações: 1) o alelo *1615A* não predispõe ao DM1, mas somente à sua manifestação precoce; 2) O DM1 é doença de etiologia heterogênea e que esse alelo pode estar associado positivamente somente com o tipo de DM1 de aparecimento precoce (Lepienski *et al.*, 2006, *Apud* Oliveira, 2006). Esses resultados também foram encontrados por Oliveira (2006), assim como as sugestões dadas para explicar a existência dessa associação. Além dos trabalhos de Lepienski *et al.* (2006) e Oliveira (2006), que foram realizados por membros de nosso grupo, Fernandes (2010) analisou a frequência das variantes *1615A* e *-116A* bem como de SNPs situados próximos à região do gene *BCHE* em duas amostras de pacientes com DM1 e uma amostra controle. Constatou-se neste estudo uma associação de DM1 com dois dos SPNs estudados, situados a jusante do gene BCHE.

O estudo de Johansen *et al.* (2004) contraria a associação entre variantes do gene BCHE e o diabetes. Este estudo não encontrou associação entre a variante *1615A* do gene *BCHE* e o *Diabetes Mellitus* do tipo II em população de caucasianos. A diferença entre os resultados dos diversos estudos apresentados demonstra a necessidade de mais pesquisas.

2.8.1. Associação entre DMG e variantes do gene *BCHE*

Diversas linhas de evidências sugerem que o DMG compartilha a etiologia genética do DM2 e reforçam a hipótese de que a ocorrência de DMG revela a existência de predisposição ao DM2. Nos dois tipos de diabetes não ocorre deficiência acentuada na produção da insulina, mas uma resistência à ação dessa substância e o DMG aumenta as chances de a mulher desenvolver o DM2 no futuro. A gravidez é estressor ambiental que pode catalisar o desenvolvimento de DM2 em mulheres geneticamente predispostas (Robitaille e Grant, 2008). Lauenborg *et al.* (2009) verificaram prevalência de alelos conhecidos de predisposição ao DM2 em pacientes com DMG, indicando a associação entre DMG e tais alelos e enfatizando a semelhança etiológica entre as doenças.

Associação entre DM2 e BChE já foi encontrada por nosso grupo em estudos anteriores (Alcântara *et al.*, 2002 e 2005), bem como por outros pesquisadores, especialmente em relação à variante *K* do gene *BCHE* (Hashim *et al.*, 2001; Iwasaki *et al.*, 2007, Vaisi-Raygani *et al.*, 2008). A variante *-116A* do gene *BCHE* está em desequilíbrio de ligação com a variante *1615A* e é associada à diminuição da atividade enzimática (Furtado-Alle *et al.*, 2008). Embora o estudo de Johansen *et al.* (2004) não tenha encontrado associação entre a mutação *1615A* e o DM2, este não levou em consideração o genótipo do sítio *-116*. A análise dos haplótipos referentes às mutações *-116A* e *1615A* trará informação mais detalhada a respeito da possível associação entre BChE e DMG. Além disso, a fenotipagem do loco *CHE2*, que sabidamente influencia na atividade enzimática, também deve contribuir para a melhor compreensão do papel da BChE no DMG.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

✓ Investigar a associação entre o *Diabetes Mellitus* gestacional (DMG), variantes da butirilcolinesterase e SNPs a montante e a jusante do gene *BCHE* por meio de estudo caso-controle.

3.2. Objetivos específicos

✓ Analisar as frequências das variantes -*116A* (rs1126680) e *1615A* (rs1803274), de dois SNPs a montante (rs4440084, rs2863381) e de dois a jusante (rs7624915, rs4387996) do gene *BCHE*, bem como as frequências dos haplótipos em amostra de pacientes com *Diabetes Mellitus* gestacional (DMG) e em amostra controle, ambas provenientes da cidade de Curitiba - PR;

✓ Analisar a atividade da BChE em amostra de pacientes com *Diabetes Mellitus* gestacional (DMG) e em amostra controle, ambas provenientes da cidade de Curitiba - PR;

✓ Fenotipar o loco *CHE2* em amostra de pacientes com *Diabetes Mellitus* gestacional (DMG) e em amostra controle, ambas provenientes da cidade de Curitiba - PR;

✓ Comparar as frequências dos fenótipos no loco *CHE2* e a média da atividade enzimática em amostra de pacientes com *Diabetes Mellitus* gestacional (DMG) e em amostra controle, com dados da população de Curitiba;

✓ Investigar a associação em uma análise conjunta de todas as variantes estudadas (gene *BCHE* e variantes a montante e a jusante do gene *BCHE*), a atividade da BChE, a fenotipagem do loco *CHE2* e o *Diabetes Mellitus* gestacional.

✓ Investigar a correlação entre as variáveis analisadas no presente estudo e os seguintes dados amostrais: Índice de Massa Corporal (IMC), idade e dosagens bioquímicas.

4. Capítulo 1

Atividade da butirilcolinesterase (BChE) e *Diabetes Mellitus* gestacional (DMG)

Resumo: Diversas condições interferem na atividade da butirilcolinesterase (BChE), reduzindo-a, como a gravidez ou a presença da variante -*116A* do gene da butirilcolinesterase (*BCHE*) ou aumentando-a, como a obesidade e o *Diabetes Mellitus* tipo I e II e a presença da forma heteróloga C5. A relação da BChE com o *Diabetes Mellitus* gestacional (DMG), entretanto, ainda não está bem definida. O presente estudo analisou a atividade da BChE e a variante -*116A*, além de variáveis antropométricas e bioquímicas associadas ao diabetes em amostra de pacientes com DMG (N=150) e em amostra controle de gestantes sem a doença (N=295). Observou-se que a atividade média da BChE está significativamente reduzida no grupo controle, quando comparada à população em geral e ainda mais reduzida nas gestantes com DMG. A frequência do fenótipo CHE2 C5+ é semelhante em grávidas com DMG e controles, e a atividade da BChE não foi significativamente aumentada nos indivíduos com este fenótipo. A frequência do alelo -*116A* não diferiu entre os grupos, e este reduziu significativamente a atividade da BChE, de modo independente das alterações fisiológicas provocadas pela gravidez e pelo DMG. O efeito redutor do DMG sobre a atividade da BChE é mais forte que o efeito intensificador característico da obesidade, pois embora as grávidas diabéticas tenham IMC maior, apresentam atividade enzimática média menor que o grupo de gestantes não diabéticas. Sugere-se que o estresse oxidativo resultante da gestação e da hiperglicemia seja o responsável pela redução na atividade da BChE.

Palavras-chave: Loco *CHE2*, variante -*116A*; alterações na atividade da BChE.

Abstract: Many conditions interfere on butyrylcholinesterase (BChE) activity, decreasing it like on pregnancy or in the presence of butyrylcholinesterase gene (*BCHE*) variant -*116A*, or increasing it, like on obesity and type I and II *Diabetes Mellitus* and in the presence of the heterologous C5 form. The relationship between BChE and gestational *Diabetes Mellitus* (GDM), however, is not yet well defined. The present study examined BChE activity and -*116A* variant, in addition to anthropometric and biochemical variables associated with diabetes in a sample of patients with GDM (N=150) and in a control sample of pregnant

women without the disease (N=295). We observed that BChE activity average is significantly decreased on control group, when compared with the general population and that it is still more decreased on GDM pregnant women. The frequency of CHE2 C5+ phenotype is similar on pregnant women with GDM and controls, and BChE activity was not significantly increased on individuals with this phenotype. The frequency of *-116A* allele did not differ among the groups, and it significantly decreased BChE activity, in an independent way from the physiological changes caused by pregnancy and by GDM. The lowering effect of GDM on BChE activity is stronger than the characteristic enhancer effect of obesity, because although the diabetic pregnant women have a higher BMI, they present a lower enzyme activity average than the non-pregnant women group. We suggest that oxidative stress resultant both from pregnancy and hyperglycemia is responsible for the decrease on BChE activity.
Keywords: *CHE2* locus, *-116A* variant, changes on BChE activity.

Introdução

A butirilcolinesterase humana (BChE; EC 3.1.1.8) é uma esterase sérica que hidrolisa a acetilcolina, assim como outros ésteres de colina, mas sua função fisiológica não é conhecida (Chatonnet e Lockridge,1989). Ela predomina no plasma, fígado, neuróglias, pâncreas e paredes do tubo digestivo (Siqueira *et al.*, 1978), e sua atividade já foi associada a diversos fatores e patologias. A obesidade (Alcântara *et al.*, 2003; Randell *et al.*, 2005; Iwasaki *et al.*, 2007), a hipertensão arterial (Alcântara *et al.*, 2002), e o *Diabetes Mellitus* dos tipos I e II (DM1 e DM2) (Antopol *et al.*, 1937; Pavkovic *et al.*, 1993; Abbott *et al.*, 1993) já foram associados ao aumento da atividade da enzima, enquanto, o infarto do miocárdio (Whittaker, 1986) e a presença de determinadas variantes do gene da butirilcolinesterase (*BCHE*) (Babaoglu *et al.*, 2004; Valle *et al.*, 2006 e Furtado-Alle *et al.*, 2008) foram associados à redução da atividade enzimática. Um decréscimo na atividade também foi detectado após a décima semana de gravidez, persistindo por dez dias (redução de 25%) a seis semanas após o parto (redução de 33% na atividade da enzima) (Whittaker, 1980).

O D*iabetes Mellitus* gestacional (DMG) - intolerância a carboidratos, resultando em hiperglicemia de níveis variados com surgimento, ou primeiramente detectada durante a gravidez (WHO, 1999) – afeta de 3 a 10% das gestações (Lobato, 2002), e representa uma condição de risco à mãe e ao feto (Schmidt *et al.*, 2001). Durante a gravidez, quando ocorre a produção aumentada de estrógenos pela placenta (Maganha *et al.*, 2003), foi observada a

diminuição da atividade da BChE (Whittaker, 1986). Contudo, não existem muitos estudos que visem compreender o comportamento da atividade da BChE em gestantes com o *Diabetes Mellitus*, patologia que já foi diversas vezes associada ao aumento da atividade da enzima.

Mahmoud *et al.* (2006) e Omu *et al.* (2010) relatam o aumento significativo entre a atividade da BChE em grávidas não diabéticas quando comparada à atividade em pacientes com DMG, entretanto, o tamanho amostral estudado é relativamente pequeno e não foram consideradas outras variáveis que sabidamente afetam a atividade da BChE.

Sabendo-se que variantes no gene da butirilcolinesterase (*BCHE*) - localizado na região 3q26.1-q26.2 (Soreq *et al.*, 1987), com 64.558 kb e quatro exons formados por 2.445 pares de bases (Arpagaus *et al.*, 1990) – já foram associadas ao DM1 e DM2 (Iwasaki *et al.*, 2007; Alcântara *et al.*, 2002 e 2005; Hashim *et al.*,2001; Lepienski *et al.*, 2006; Oliveira, 2006, Vaisi-Raygani *et al.*, 2008), uma associação com o DMG não pode ser descartada. O gene é bastante polimórfico, e cerca de 65 variantes já foram descritas (Souza *et al.*, 2005).

O exon 1 do gene *BCHE* contém um sítio polimórfico no nucleotídeo -116 (TGC/TAC), conhecido como variante *-116A*, cuja frequência em euro-descendentes é de 8% (Bartels *et al.*, 1990). Furtado-Alle *et al.* (2008) verificaram que a atividade da BChE é significativamente reduzida em portadores da variante *-116A*.

Além do loco *BCHE* (3q26.1-26.2), o loco *CHE2* (2q33-35) também determina a variabilidade da BChE (Harris *et al.*, 1962; Masson *et al.*, 1990). O loco *CHE2* codifica uma substância, cuja natureza permanece parcialmente desconhecida, que se liga a enzima, sendo responsável pelo surgimento da forma heteróloga da BChE que mostra a banda eletroforética C5. A variabilidade do loco *CHE2* é determinada através de métodos eletroforéticos que identificam os fenótipos CHE2 C5+ e CHE2 C5-, caracterizados pela presença e pela ausência da banda C5, respectivamente. O fenótipo CHE2 C5+ apresenta, em média, 25% a mais de atividade que o fenótipo CHE2 C5-. A frequência do fenótipo CHE2 C5+ na população do sul do Brasil é de cerca de 10% (Chautard-Freire-Maia *et al.*, 1991).

Considerando-se a escassez de estudos visando compreender a fisiopatologia do DMG, este estudo tem por objetivo principal verificar a atividade da BChE e seu comportamento em relação ao DMG. Algumas variáveis que influenciam na atividade da enzima foram consideradas, a fim de se compreender se estas se comportam da mesma maneira na presença da patologia. A variante *-116A* geralmente está associada à redução da

atividade enzimática, enquanto o fenótipo CHE2 C5+ costuma ser associado ao seu aumento. Além destes objetivos, o nosso estudo verificou as correlações entre a atividade da BChE, suas variantes e as variáveis bioquímicas e antropométricas das amostras estudadas (Idade, Índice de Massa Corporal (IMC), colesteróis total, HDL e LDL e triglicérides), e tem por característica um tamanho amostral maior que outros estudos realizados (Mahmoud *et al.*, 2006; Omu *et al.*, 2010).

Materiais e Métodos

Amostra. Os conjuntos amostrais estudados foram compostos por: a) gestantes com DMG (n=150); por b) um grupo controle (n=295) de gestantes não-diabéticas, com idades gestacionais variadas e c) amostra populacional constituída por 400 doadores de sangue utilizada para estimativa da atividade média populacional da BChE. Os critérios utilizados para a caracterização dos grupos de pacientes com DMG e o grupo controle estão de acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2006) e com a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD, 2009), e são os seguintes: a) Grupo com Diabetes Gestacional (DMG) - gestantes apresentando glicemia de jejum superior a 100mg/dL com posterior confirmação através do teste oral de tolerância a glicose (TOTG) com 75g de sobrecarga, apresentando glicemia superior a 140 mg/dL após 2 horas à dose de glicose; e, b) Grupo controle - gestantes apresentando glicemia de jejum inferior a 85mg/dL. Não foram incluídas na amostra, pacientes com insuficiência renal e doença cardiovascular. O grupo de gestantes diabéticas foi obtido no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (Unidade de Diabetes do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital de Clínicas da UFPR- SEMPR) e as amostras para o grupo controle foram obtidas no Laboratório Municipal de Curitiba. As coletas foram realizadas entre os anos de 2007 e 2009. As pacientes concordaram em participar do estudo através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria Municipal de Saúde da Prefeitura Municipal de Curitiba.

Coleta de soro. As amostras de sangue periférico das pacientes, coletadas sem anticoagulante, em tubo seco com gel separador, foram obtidas durante os exames de rotina, conforme o protocolo do Serviço de Atendimento à gestante, não havendo coleta específica para este projeto. Foram então centrifugadas para separar o soro em alíquotas, e

o soro, mantido em freezer a -20°C até a realização das análises. Amostras hemolisadas foram excluídas de todos os ensaios. As quantificações das dosagens bioquímicas em soro foram realizadas em sistema automatizado Architect (Abbott), com calibradores e controles Trulab.

Extração do DNA. A extração de DNA genômico das amostras foi realizada pelo método de *salting out* (Lahiri e Nurnberger, 1991), com algumas modificações, ou foi utilizado o reagente *Blood Genomic Prep Mini Spin* (GE Healthcare). As amostras foram estocadas em *freezer* a -20°C.

Quantificação do DNA genômico. Após a extração, o DNA genômico foi quantificado conforme Witter e Kusukawa (2006). As amostras foram diluídas 1:50 com água ultra-pura e quantificadas por espectrofotometria em 260nm (Bio Photometer, Eppendorf). Todas as amostras de DNA foram padronizadas para a concentração de 100ng/µL, por diluição com água ultra-pura estéril.

Determinação da atividade da BChE . Para a determinação da atividade da BChE foi utilizada a técnica de Dietz *et al.* (1972), modificada por Evans e Wroe (1978). A dosagem do produto formado foi realizada em espectrofotômetro ajustado em 410 nm e com todos os reagentes mantidos em banho-maria a 25°C. A medida da atividade enzimática foi dada em KU/L.

Fenotipagem do loco CHE2. Para a fenotipagem do loco *CHE2* foi utilizada a técnica desenvolvida por Robinson *et al.* (1957) para fenotipagem de variantes da hemoglobina, posteriormente modificada por Van Ros e Vervoort (1973) para aplicação à BChE e com adaptações subsequentes de Fadel-Picheth (1991) e Souza (1995).

Genotipagem da variante –116A (rs1126680) do gene BCHE. A reação de PCR em tempo real foi realizada no aparelho Mastercycler Realplex 2 (Eppendorf), com o uso do Kit de Genotipagem TaqMan SNP (Applied Biosystems, código de referência 27847456). O mix de reação para cada amostra com volume total de 8,5µl, foi composto por 4,0µl de TaqMan Universal PCR Master Mix, 0,3µl do Kit de Genotipagem TaqMan SNP específico e 4,2µl de água ultra-pura. A este volume de mix para a reação foi acrescentado 2µl do DNA extraído. Os ciclos de amplificação foram: 1º passo de 2 minutos a 50^{o}C; 2º passo de 10 minutos a 95^{o}C; 3º passo repetido 45 vezes de 15 segundos a 95^{o}C intercalados por 60 segundos a 60^{o}C.

Análise estatística. As médias ± DP, correlações entre as variáveis antropométricas e bioquímicas e a atividade da BChE, frequências dos fenótipos do loco *CHE2*, variâncias e testes de Mann-Whitney e *t* para comparações das médias das variáveis quantitativas entre os grupos foram calculados com o auxílio do programa Statistica para Windows (Statsoft Inc., 1996). As frequências alélicas e genotípicas em pacientes e controles foram obtidas por contagem direta e comparadas entre os grupos através do teste do qui-quadrado com o uso do programa Statistica para Windows (Statsoft Inc., 1996). O valor da probabilidade para os testes comparativos considerados significativos considerou $p<0.05$ (5%).

Resultados

Características Clínicas e Antropométricas. A tabela 1 mostra as médias ± desvio padrão (DP) de idade, Índice de Massa Corporal (IMC) e dados clínicos das pacientes com DMG e do grupo controle, com os valores de *t* (*p*) e F (*p*) para a comparação entre os grupos. As gestantes consideradas diabéticas foram submetidas ao Teste Oral de Tolerância a Glicose 75g (TOTG) para confirmação do diagnóstico.

Como mostrado na tabela 1, os dados referentes ao IMC, colesterol total, colesterol HDL e triglicérides apresentaram diferença significativa entre os grupos de grávidas com DMG e de gestantes não-diabéticas. O tamanho amostral para as análises dos dados clínicos diferiu, pois não foi possível obter algumas informações de todas as pacientes da amostra.

Atividade da BChE. A medida da atividade enzimática foi verificada em 150 pacientes com DMG e em 295 gestantes do grupo controle. As médias (± DP), variâncias (S^2) e amplitudes de variação (AV) da atividade enzimática (KU/L) nas pacientes com DMG e nos controles, bem como os valores de *t* (*p*) e F (*p*) para a comparação entre as médias e variâncias são mostrados na tabela 2.

A média da atividade enzimática (± DP) foi significativamente mais alta no grupo controle (2,83 KU/L ± 0,89 KU/L) que no grupo de gestantes com DMG (2,26 KU/L ± 0,59 KU/L; t= -7,06, p= 6,66 x10^{-12}), mas nos dois grupos foi significativamente menor que a média da atividade na amostra da população em geral (n= 400; 4,95 KU/L ± 1,96 KU/L; t= -19,07 e p<0,00001 para grávidas não diabéticas; t= -16,19 e p<0,00001 para pacientes com DMG).

A correlação de Pearson confirmou a associação entre IMC e a atividade da BChE (r=0,18, p<0,05) em grávidas diabéticas, considerando-se que o IMC em gestantes com DMG foi significativamente mais elevado que nas grávidas que não apresentaram a doença. O

colesterol LDL e a atividade da BChE também estavam associados (r=-0,19, p<0,05), confirmando a associação da BChE com o metabolismo de lípides também no DMG. Nas gestantes do grupo controle, o colesterol total, a fração do colesterol HDL e os níveis de triglicérides apresentaram correlação negativa com a atividade da BChE (r=-0,12; r=-0,49 e r=-0,19, respectivamente, p<0,05).

Tabela 1. Média ± DP (desvio padrão) de idade, Índice de Massa Corporal (IMC) e características clínicas das pacientes com DMG e do grupo de gestantes que não apresentaram a doença, com os valores de *t* (*p*) e F (*p*) para a comparação entre os grupos.

	DMG (N= 150)		**Controles (N= 295)**			
	Média ± DP	S^2	**Média ± DP**	S^2	***t* (*p*)**	**F (*p*)**
Idade (anos)	31,79 ± 6,11	37,38	24,96 ± 6,26	39,14	10,79 (2,97 X 10^{-24})*	1,05 (0,76)
IMC (kg/m^2)[*1]	33,39 ± 6,11	37,37	25,09 ± 4,63	21,39	15,77 (<0,00001)*	1,75 (7,3 X 10^{-5})*
Colesterol total (mg/dL)[*2]	226,50 ± 47,46	2252,58	201,51 ± 53,19	2830,01	4,49 (9 X 10^{-6})*	1,26 (0,15)
Colesterol LDL (mg/dL)[*2]	125,77 ± 42,71	1823,94	123,94 ± 43,25	1870,95	0,39 (0,69)	1,03 (0,88)
Colesterol HDL (mg/dL)[*2]	56,82 ± 15,07	227,13	53,05 ± 16,07	258,37	2,32 (0,02)*	1,14 (0,39)
Triglicérides (mg/dL)[*2]	225,34 ± 73,11	5345,00	122,60 ± 57,47	3303,32	15,29 (<0,00001)*	1,62 (0,001)*
Glicemia (mg/dL)[*3]	94,16 ± 23,11	534,04	82,16 ± 6,76	45,67	8,23 (2,16 X 10^{-15})*	11,69 (<0,00001)*

*Diferença significativa; *[1] Índice de Massa Corporal. *[2] Algumas informações não estavam disponíveis para todos os indivíduos estudados: os valores referentes às dosagens de colesterol total, colesterol LDL e triglicérides estão disponíveis para 122 pacientes com DMG; os valores referentes às dosagens de colesterol HDL estão disponíveis para 139 pacientes com DMG; os valores referentes ao IMC estão disponíveis para 142 pacientes com DMG; *[3] As pacientes com suspeita de DMG foram submetidas ao Teste Oral de Tolerância a Glicose 75g (TOTG);

Tabela 2. Médias (± DP), variâncias (S^2), amplitudes de variação (AV) da atividade enzimática (KU/L) nas grávidas com DMG e nos controles e valores de *t* (*p*) e F (*p*) para a comparação entre as médias e variâncias.

Grupos	**Média ± DP (KU/L)**	S^2	**AV**	***t* (*p*)**	**F (*p*)**
DMG	2,26 ± 0,59	0,36	0,67 – 4,39	-7,06 (6,66x10^{-12})*	2,22 (1,22x10^{-7})*
Controle	2,83 ± 0,89	0,79	0,76 – 5,56		

*Diferença significativa.

Fenotipagem do loco CHE2 e Atividade da BChE. A tabela 3 mostra as frequências ± erro padrão (EP) dos fenótipos CHE2 C5+ e CHE2 C5- nos grupos analisados (grávidas com DMG e controles), além das comparações entre as frequências dos fenótipos do loco *CHE2* entre os dois grupos. A frequência (± EP) do fenótipo CHE2 C5+ foi semelhante em grávidas com DMG e controles (4,67 ± 0,1% e 8,14 ± 0,09%, respectivamente; χ^2= 1,85; *p*= 0,17), e ambas não diferiram em relação à população em geral (10,23% ± 0,60; χ^2= 0,42; *p*= 0,52, quando comparada ao grupo controle; e χ^2= 3,69; *p*= 0,06, quando comparada ao grupo de gestantes com DMG). Não foi encontrada diferença significativa entre a atividade da BChE em indivíduos classificados de acordo com o fenótipo do loco *CHE2* nos dois grupos amostrais estudados (*Z*=0,72; *p*=0,47, para o grupo de gestantes com DMG e *Z*=-1,82; *p*=0,07, para o grupo controle).

Tabela 3. Frequências (± EP) e número de indivíduos com fenótipo CHE2 C5+ e CHE2 C5- nos grupos de pacientes com DMG e controle. Valor de χ^2 (*p*) para a comparação das frequências fenotípicas entre grávidas com DMG e controles.

	DMG (N=150)		Controle (N=295)		
Fenótipos	**N**	**% ± EP**	**N**	**% ± EP**	**χ^2 (*p*)**
CHE2 C5+	7	4,67% ± 0,1%	24	8,14% ± 0,09%	1,85 (0,17)
CHE2 C5-	143	95,33% ± 0,1%	71	91,86% ± 0,09%	

Frequências da variante -116A (rs1126680). As frequências genotípicas para o sítio -116 estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg e não diferiram entre pacientes com DMG e controles (χ^2= 1,92, *p*= 0,38) (Tabela 4). A frequência do alelo *-116A* não diferiu entre pacientes com DMG e controles (7,69% ± 0,09% e 5,76% ± 0,04%, respectivamente, χ^2= 1,20, *p*= 0,27) (Tabela 4). O tamanho amostral para a análise da variante é menor que o tamanho amostral inicial – grupo de gestantes com DMG (n= 143) - pois o DNA não pôde ser coletado em todas as amostras.

Variante -116A (rs1126680) e Atividade da BChE. Nos dois grupos avaliados, a média da atividade da BChE (± DP) foi significativamente mais alta nos indivíduos homozigotos para o alelo usual do que nos indivíduos heterozigotos com o alelo *-116A* (2,31 KU/L ± 0,61 e 1,93 KU/L ± 0,42; t=2,53, p=0,01, para gestantes com DMG; e 2,88 KU/L ± 0,88 e 2,39 KU/L ± 0,81; *t*= 2,96, *p*= 0,003, para grávidas não-diabéticas, respectivamente) (Tabela 5).

Tabela 4. Frequências genotípicas e alélicas (± EP) no sítio -116 no gene *BCHE* em pacientes com DMG e no grupo controle.

	DMG (N= 143)	**χ^2 (*p*)**	**Controle (N= 295)**	**χ^2 (*p*)**
***-116A* (rs1126680) do gene BCHE**				
Genótipos				
GG	123 (86,01% ± 0,24%)	1,85 (0,39)	262 (88,81% ± 0,11%)	0,001 (0,99)
GA	18 (12,59% ± 0,23%)		32 (10,85% ± 0,11%)	
AA	2 (1,40% ± 0,08%)		1 (0,34% ± 0,02%)	
				1,92 (0,38)
Alelos				
G	264 (92,31% ± 0,09%)		556 (94,24% ± 0,04%)	1,20 (0,27)
A	22 (7,69% ± 0,09%)		34 (5,76% ± 0,04%)	

Tabela 5. Média (± DP) da atividade da BChE nos indivíduos homozigotos para o alelo usual e nos indivíduos heterozigotos para o alelo *-116A* em pacientes com DMG e gestantes não diabéticas (grupo controle).

	Média da Atividade da BChE ± DP (KU/L)			
	DMG	***t* (*p*)**	**Controles**	***t* (*p*)**
Genótipos no sítio -116		2,53 (0,01)*		2,96 (0,003)*
GG	2,31 ± 0,61		2,88 ± 0,88	
GA	1,93 ± 0,42		2,39 ± 0,81	

*Diferença significativa

Discussão

A gravidez está associada a alterações fisiológicas que incluem o aumento da ingestão calórica, o maior acúmulo de massa gordurosa e um aumento progressivo na resistência à insulina (Tham *et al.*, 2009). Os níveis de resistência à insulina nesta condição aproximam-se no final da gravidez, à resistência à insulina observada em indivíduos com DM2. A resistência à insulina surge como resultado da combinação entre o excesso de gordura corporal materno e os efeitos de hormônios placentários que reduzem a sensibilidade à insulina. As células β pancreáticas normalmente aumentam a secreção de insulina para compensar esta resistência ao hormônio. No DMG, a hiperglicemia resulta de um suplemento de insulina inadequado à demanda do tecido, para a regulação normal da glicose presente no sangue (Buchanan e Xiang, 2005).

Em nosso estudo, o IMC aumentado significativamente em grávidas com DMG, provavelmente favorece a resistência à insulina, posicionando estas gestantes em um grupo de risco ao DMG. A média de idade mais elevada nas gestantes com DMG e o aumento significativo nas dosagens de colesterol e triglicérides nas pacientes, quando comparadas ao grupo controle, são outros fatores que as incluem neste grupo. Tais resultados estão de acordo com os critérios estabelecidos por Carpenter e Coustan (1982) para fatores de risco ao DMG e utilizados como parâmetros nas recomendações da American Diabetes Association (2004).

A butirilcolinesterase já foi diversas vezes associada a patologias como resistência à insulina, obesidade, DM2, hipertensão, hiperlipidemias, síndrome metabólica e doença de Alzheimer (Das, 2007). No presente estudo, os grupos de gestantes avaliados apresentaram correlações entre a BChE e os seguintes dados clínicos e antropométricos: IMC; colesterol total e suas frações - HDL e LDL - e triglicérides. Estes dados são consistentes com diversas informações presentes na literatura. Randell *et al.* (2005) e Valle *et al.* (2006), estudando fatores considerados de risco à síndrome metabólica e à doença cardiovascular, em mulheres e homens, encontraram associações entre a atividade da BChE e o IMC, o colesterol e suas frações, a insulina e outros fatores de risco. Os dados de Alcântara *et al.* (2005) concordaram com estes resultados, e acrescentaram que a atividade da BChE pode ser considerada um parâmetro secundário na identificação da síndrome metabólica. Acredita-se que as altas frequências de hiperinsulinemia e hipertrigliceridemia em indivíduos obesos poderiam estar envolvidas nas alterações metabólicas associadas às mudanças na

atividade da BChE (Alcântara *et al.*, 2005). Iwasaki *et al.* (2007) também encontraram associação entre a atividade da BChE e parâmetros para a identificação do excesso de gordura corporal, além do perfil lipídico, inclusive com os níveis de triglicérides. Estes autores sugerem que a atividade da BChE esteja envolvida no metabolismo dos triglicérides e no fluxo de ácidos graxos livres entre o tecido adiposo e o fígado, para regular o excesso de gordura corporal (Iwasaki *et al.*, 2007).

A correlação positiva entre a atividade da BChE e o IMC no grupo de gestantes com DMG, que não foi observada no grupo de gestantes sem a doença, pode ser explicada pelo IMC reduzido nas gestantes do grupo controle, quando comparado ao IMC das gestantes do grupo com DMG. Os parâmetros bioquímicos – colesterol e triglicérides – estão diretamente relacionados ao IMC, que neste caso está reduzido, explicando as correlações negativas.

Diversos estudos informam que a atividade da BChE em pacientes com DM1 e DM2 está aumentada em relação à atividade da enzima na população em geral (Antopol *et al.*, 1937; Pavkovic *et al.*, 1993; Abbott *et al.*, 1993). A atividade da BChE no DM1 já foi correlacionada à concentração sérica de triacilglicerol e no DM2, à sensibilidade à insulina (Abbott *et al.*, 1993). Estes resultados confirmam que a BChE desempenha uma função no metabolismo alterado de lipoproteínas num estado de hiperglicemia associada à resistência ou à deficiência à insulina, e o aumento da atividade da enzima deve-se ao metabolismo alterado de lipídios.

Mesmo que o DMG apresente etiologia semelhante à do DM2, a BChE não age de forma igual nas duas doenças. O fator determinante para esta alteração é a gestação. Durante a gravidez de mulheres saudáveis, foi evidenciada a redução da atividade da BChE (Blitt *et al.*, 1977; Howard *et al.*, 1978; Whittaker, 1986; Tham *et al.*, 2009), informação corroborada pelo presente estudo, quando se compara a atividade média das gestantes do grupo controle com a atividade enzimática média da população em geral. Wyse *et al.* (2004) sugerem que há uma redução na atividade da BChE em situações de estresse oxidativo, e a gravidez é considerada um importante estressor ambiental (Robitaille e Grant, 2008).

A média da atividade da BChE no grupo de gestantes com DMG, quando comparada à média da atividade na população em geral, mostrou-se ainda mais reduzida que a média nas gestantes do grupo controle. Apesar de os estudos envolvendo a BChE e o DMG serem escassos, os resultados de Mahmoud *et al.* (2006) e Omu *et al.* (2010) relatam uma redução significativa na atividade da BChE em pacientes com DMG quando comparada à atividade

em grávidas não diabéticas, concordando com os resultados deste estudo. Contudo, nesses dois estudos não houve comparação com a média da população em geral.

A gravidez proporciona ao organismo níveis de estresse oxidativo muito mais elevados que na ausência desta condição, e a hiperglicemia intensifica este estresse (Ramkumar *et al.*, 2005). Orhan *et al.* (2003), em estudo com biomarcadores de estresse oxidativo, sugerem que o estresse oxidativo acompanha as complicações de doenças como *Diabetes Mellitus* na gravidez. Deste modo, a redução da atividade da BChE em pacientes com DMG não é decorrente apenas da gravidez, mas do efeito conjunto da gestação e da doença.

Na literatura não foram encontrados relatos sobre a frequência do fenótipo CHE2 C5+ em gestantes com DMG. Cwiertnia *et al.* (2010) relatam frequência deste fenótipo semelhante em pacientes com DM1 e DM2 e a frequência de cerca de 10% observada na população do sul do Brasil. Apesar do presente estudo apresentar frequências do fenótipo CHE2 C5+ semelhantes nas comparações realizadas, observou-se uma tendência a diferir estatisticamente entre a frequência deste fenótipo nos grupos de gestantes diabéticas e da população de Curitiba. É possível que fatores fisiológicos próprios ao DMG estejam influenciando na formação e/ou detecção da forma molecular C5. Como a substância que se liga ao tetrâmero da BChE para gerar a forma C5 do composto enzimático permanece parcialmente desconhecida, não se pode sugerir um mecanismo que explique tal observação.

A presença do fenótipo CHE2 C5+ está relacionada ao aumento significativo da atividade da BChE na população em geral, em obesos e em pacientes com DM1 e DM2 (Whittaker, 1980; Alcântara *et al.*, 2001; Cwiertnia *et al.*, 2010). Neste estudo não foi verificado aumento significativo na atividade da BChE em pacientes ou em controles, sugerindo que o efeito redutor da gestação sobre a atividade da BChE impede o aumento característico do fenótipo CHE2 C5+.

O presente estudo não encontrou diferença significativa entre a frequência do alelo -*116A* nos dois grupos amostrais estudados. Mesmo que não haja outros estudos sobre a frequência deste alelo em gestantes com o DMG, estudos avaliando a frequência em pacientes com outros tipos de *Diabetes Mellitus* também não observaram esta associação. As variantes *1615A* e *-116A* do gene *BCHE* não estiveram em associação com o DM1

(Fernandes, 2010) e a variante *1615A* não apresentou associação com o DM2 (Johansen *et al.*, 2004).

A atividade da BChE é reduzida em presença da variante *-116A* (Furtado-Alle *et al.*, 2008). No presente estudo, esta redução também foi observada de forma significativa na comparação entre as gestantes homozigotas para o alelo G X heterozigotas para o alelo A, nos grupos de gestantes com DMG e controle. É importante destacar que os efeitos genéticos da variante *-116A* e os efeitos fisiológicos do DMG e da gestação contribuem independentemente na atividade da BChE. A gravidez sabidamente leva a uma diminuição da atividade da BChE e a mutação *-116A*, quando somada a esse estado continua associada à redução da atividade da BChE.

Conclui-se que a BChE está associada ao metabolismo de lípides também em gestantes com o DMG, em que a atividade da enzima encontra-se bastante reduzida. Neste estudo, o efeito redutor do DMG sobre a atividade da BChE é mais forte que o efeito intensificador característico da obesidade, pois embora as grávidas diabéticas tenham IMC maior, apresentam atividade enzimática média menor que o grupo de gestantes não diabéticas. Do mesmo modo, o fenótipo CHE2 C5+, sabidamente associado ao aumento da atividade da BChE, não tem tal efeito em gestantes. Tal fato pode ser atribuído ao aumento do estresse oxidativo decorrente de duas condições associadas: a gestação e o DMG. O DMG leva a uma diminuição da atividade da BChE que independe de variáveis da enzima como a presença do fenótipo CHE2 C5+ e do genótipo do sítio -116 do gene *BCHE*. Por outro lado, a mutação *-116A* leva a uma diminuição da atividade enzimática que é independente da gestação e do DMG. Assim, cada fator altera a atividade enzimática independentemente: mulheres grávidas não diabéticas têm atividade significativamente mais baixa da BChE que a população em geral; pacientes com DMG têm atividade ainda mais baixa que grávidas não diabéticas e nos dois grupos, assim como na população em geral (Furtado-Alle *et al.*, 2008), a mutação *-116A* leva a uma diminuição da atividade da BChE.

Agradecimentos

Ao grupo do Laboratório de Bioquímica Clínica do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Paraná e da Unidade de Diabetes do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital de Clínicas da UFPR- SEMPR.

Ao apoio financeiro Capes/REUNI.

Referências

Abbott CA, Mackness MI, Kumar S, Olukoga OA, Gordon C, Arrol S. Relationship between serum butyrylcholinesterase activity, hypertriglyceridemia in insulin sensitivity in diabetes. *Clin Sci* 85: 77-81, 1993.

Alcântara VM, Rodrigues LC, Oliveira LC, Chautard-Freire-Maia EA. Association of the CHE2 locus with body mass index and butyrylcholinesterase activity. *Hum Biol* 73: 587-95, 2001.

Alcântara VM, Chautard-Freire-Maia EA, Scartezini M, Cerci MS, Braun-Prado K, Picheth G. Butyrylcholinesterase activity and risk factors for coronary artery disease. *Scand J Clin Lab Invest* 62: 399-404, 2002.

Alcântara VM, Oliveira LC, Réa RR, Suplicy HL, Chautard-Freire-Maia EA. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27: 1557-64, 2003.

Alcântara VM, Oliveira LC, Réa RR, Suplicy HL, Chautard-Freire-Maia EA. Butyrylcholinesterase activity and metabolic syndrome in obese patients. *Clin Chem Lab Med* 43: 285-288, 2005.

American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of *Diabetes Mellitus*. *Diabetes Care* 27: 5-10, 2004.

Antopol W, Tuchman L, Schifrin A. Cholinesterase activity of human sera with special reference to hyperthyroidism. *Proc Soc Exp Biol Med* 36: 4650, 1937.

Arpagaus M, Kott M, Vatsis KP, Bartels CF, La Du BN, Lockridge O. Structure of the gene for human butyrylcholinesterase. Evidence for a single copy. *Biochemistry* 29: 124-131, 1990.

Babaoglu MO, Ocal T, Bayar B, Kayaalp SO, Bozkurt A. Frequency and enzyme activity of the butyrylcholinesterase K-variant in a Turkish population. *Eur J Clin Pharmacol* 59: 875-877, 2004.

Bartels CF, Van Der Spek AFL, La Du BN. Two polymorphisms in the noncoding regions of the *BCHE* gene. *Nucleic Acids Res* 18: 6171, 1990.

Blitt CD, Petty WC, Alberternst EE, Wright BJ. Correlation of plasma cholinesterase activity and duration of action of succinylcholine during pregnancy. *Anesth Analg* 56: 78-83, 1977.

Buchanan TA, Xiang AH. Gestational *Diabetes Mellitus*. *J Clin Investig* 115: 485-491, 2005.

Carpenter MW, Coustan DR. Criteria for screening tests for gestational diabetes. *Am J Obstet Gynecol* 144: 768-773, 1982.

Chatonnet A, Lockridge O. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochem J* 260: 625-634, 1989.

Chautard-Freire-Maia EA, Primo-Parmo SL, Picheth G, Lourenço MAC, Vieira MM. The C5 isozyme of serum cholinesterase and adult weight. *Hum Hered* 41: 330-339, 1991.

Cwiertnia MM, Alcântara VM, Réa RR, Faria ACRA, Picheth G, Scartezini M, Graef LE, Welter M. Butyrylcholinesterase and *diabetes mellitus* in the CHE2 C5- and CHE2 C5+ phenotypes. *Arq Bras Endocrinol Metab* 54: 60-67, 2010.

Das UN. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as possible markers of low-grade systemic inflammation. *Med Sci Monit* 13: RA214-221, 2007.

Dietz AA, Ribinstein HM, Lubrano T, Hodges LK. Improved method for the differentiation of cholinesterase variants. *Am J Genet* 24: 58-64, 1972.

Evans RT, Wroe J. Is serum cholinesterase activity a predictor of succinyl choline sensitivity? An assessment of four methods. *Clin Chem* 24: 1762-1766, 1978.

Fadel-Picheth C. Variabilidade do loco BCHE da butirilcolinesterase e peso do adulto em amostra de Curitiba. Dissertação de Mestrado. Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1991.

Fernandes AB. Associação entre o gene da butirilcolinesterase e diabete melito tipo 1. Dissertação de mestrado. Curitiba, 2010. Programa de Pós-graduação em Genética. Universidade Federal do Paraná.

Furtado-Alle L, Andrade FA, Nunes K, Mikami LR, Souza RLR, Chautard-Freire-Maia EA. Association of variants of the −116 site of the butyrylcholinesterase *BCHE* gene to enzyme activity and body mass index. *Chem Biol Inter* 175: 115–118, 2008.

Harris H, Hopkinson DA, Robson EB. Two-dimensional electrophoresis of pseudocholinesterase components in human serum. *Nature* 196: 1296-1298, 1962.

Hashim Y, Shepherd D, Wiltshire S, Holman RR, Levy JC, Clark A, Cull CA. Butyrylcholinesterase K variant on chromosome 3q is associated with Type II diabetes in white Caucasian subjects. *Diabetologia* 44: 2227-2230, 2001.

Howard JK, East NJ, Chaney JL. Plasma cholinesterase activity in early pregnancy. *Arch Environ Health* 33: 277-279, 1978.

Iwasaki T, Yoneda M, Nakajima A, Terauchi Y. Serum butyrylcholinesterase is strongly associated with adiposity, the serum lipid profile and insulin resistance. *Intern Med* 46: 1633-1639, 2007.

Johansen A, Nielsen EM, Andersen G, Hamid YH, Jensen DP, Glümer C, Drivsholm T, Borch-Johnsen K, JØrgensen T, Hansen T, Pedersen O. Large-scale studies of the functional K

variant of the butyrylcholinesterase gene in relation to Type 2 diabetes and insulin secretion. *Diabetologia* 47: 1437-41, 2004.

Lahiri DK, Nurnberger Jr JL. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 19: 5444, 1991.

Lepienski LM, Souza RLR, Chautard-Freire-Maia EA, Alcântara VM, Réa RR. Variant K of butyrylcholinesterase and risk of early-onset type 1 diabetes mellitus in Euro-Brazilians**.** *Diabetes Obes Metab* 8: 709-711, 2006.

Lobato G. Screening do Diabetes Gestacional, 2002. Acces: http://www.medcenter.com/Medscape/content.aspx?LangType=1046&menu_id=945&id=557#. Acessado em: 20/03/2011.

Maganha CA, Vanni DGBS, Bernardini, MA, Zugaib M. Tratamento do diabetes melito gestacional. *Rev Assoc Med Bras* 49: 330-334, 2003.

Mahmoud FF, Haines DD, Abul HT, Omu AE, Abu-Donia MB. Butyrylcholinesterase Activity in Gestational Diabetes: Correlation with Lymphocyte Subpopulations in Peripheral Blood. *Am J Reprod Immunol* 56: 185-92, 2006.

Masson P, Chatonnet A, Lockridge O. Evidence for a single butyrylcholinesterase gene in individuals carrying the C5 plasma cholinesterase variant (CHE2). *FEBS Lett* 262: 115-118, 1990.

Oliveira LC. Investigação de associação das variantes do nucleotídeo -116 do gene *BCHE* da butirilcolinesterase em diabete melito tipo 1. Dissertação de mestrado. Curitiba, 2006. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Paraná.

Omu AE, Al-Azemi MK, Omu FE, Fatinikun T, Abraham S, George S, Mahnazhath N. Butyrylcholinesterase activity in women with diabetes mellitus in pregnancy: correlation with antioxidant activity. *J Obstet Gynaecol* 30: 122-126, 2010.

Orhan H, Onderoglu L, Yücel A, Sahin G. Circulating biomarkers of oxidative stress in complicated pregnancies. *Arch Gynecol Obstet* 267: 189-195, 2003.

Pavkovic E, Simon V, Reiner E, Sucic M, Lipovac V. Serum paraoxonase and cholinesterase activities in individuals with lipid and glucose metabolism disorders. *Chem Biol Interact* 87: 179-182, 1993.

Ramkumar KM, Latha M, Ashokkumar N, Pari L, Ananthan R. Modulation of impaired cholinesterase activity in experimental diabetes: effect of Gymnema montanum leaf extract. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 16: 17-35, 2005.

Randell EW, Mathews MS, Zhang H, Seraj JS, Sun G. Relationship between serum butyrylcholinesterase and the metabolic syndrome. *Clin Biochem* 38: 799-805, 2005.

Robinson AR, Robson M, Harrison AP, Zuelzer WW. A new technique for differentiation of hemoglobin. *J Lab Clin Med* 50: 745-752, 1957.

Robitaille J, Grant A. The genetics of gestational *Diabetes mellitus*: evidence for relationship with type 2 *Diabetes mellitus*. *Genet Med* 10: 240-250, 2008.

Schmidt MI, Duncan BB, Reichelt AJ, Branchtein L, Matos MC, E Forti AC, Spichler ER, Pousada JMDC, Teixeira MM, Yamashita T. Gestational *Diabetes Mellitus* diagnosed with a 2-h 75-g oral glucose tolerance test and adverse pregnancy outcomes. *Diabetes Care*, 24: 1151-1155, 2001.

Siqueira MEPB, Fernícola, NAGG, Borges EL. Determinação de níveis normais de colinesterase plasmática e eritrocitária. *Rev Saúde Públ* 12: 340-344, 1978.

Sociedade Brasileira de Diabetes. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2009. Versão para Download disponível em: http://www.sbd.org.br. Acessado em: 20/02/2011.

Soreq H, Zamir R, Zevin-Sonkin D, Zakut H. Human cholinesterase genes localized by hybridization to chromosomes 3 and 16. *Hum Genet* 77: 325-328, 1987.

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

Souza RLR, Mikami LR, Maegawa ROB, Chautard-Freire-Maia EA. Four new mutations in the *BCHE* gene of butyrylcholinesterase in a Brazilian blood donor sample. *Mol Genet Metab* 84: 349-353, 2005.

Statsoft Inc. Statistica for Windows (Computer program manual). Tulsa, 1996. 1cd.

Tham E, Liu J, Innis S, Thompson D, Gaylinn BD, Bogarin R, Haim A, Thorner MO, Chanoine JP. Acylated ghrelin concentrations are markedly decreased during pregnancy in mothers with and without gestational diabetes: relationship with cholinesterase. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296: E1093–E1100, 2009**.**

Vaisi-Raygani A, Rahimi Z, Entezami H, Kharrazi H, Bahrhemand F, Tavilani H, Rezaei M, Kiani A, Nomanpour B, Pourmotabbed T. Butyrylcholinesterase K variants increase the risk of coronary artery disease in the population of western Iran. *Scand J Clin Lab Invest* 68: 123-129, 2008.

Valle A, O'Connor DT, Taylor P, Zhu G, Montgomery GW, Slagboom PE, Martin NG, Whitfield JB. Butyrylcholinesterase: Association with the Metabolic Syndrome and Identification of 2 Gene Loci Affecting Activity. *Clin Chem* 52: 1014-1020, 2006.

Van Ros G, Vervoort T. Frequencies of the "atypical" and C5 variants of serum cholinesterase in Zairians and Belgians. Detection of the C5 variant by agar gel electrophoresis with an acid buffer. *Ann Soc Belg Med Trop* 53: 633-644, 1973.

Whittaker M. Plasma cholinesterase variants and the anaesthetist. *Anesthesia* 35: 174-197, 1980.

Whittaker M. Monographs in Human Genetics: Cholinesterase. 65-74, 1986.

Witter CT, Kusukawa N. Nucleic acid techniques. In: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. *Elsevier* 1407-1449, 2006.

World Health Organization - WHO. Report of a WHO Consultation: Diagnosis and Classification of *Diabetes Mellitus* and its complications. Department of Noncommunicable Disease Surveillance. Genebra, 1999.

World Health Organization - WHO. Guidelines for the prevention, management and care of *Diabetes mellitus*. *Geneva: World Health Organization* 32: 1-82, 2006.

Wyse AT, Stefanello FM, Chiarani F, Delwing D, Wannmacher CM, Wajner M. Arginine administration decreases cerebral cortex acetylcholinesterase and serum butyrylcholinesterase probably by oxidative stress induction. *Neurochem Res* 29: 385-389, 2004.

5. Capítulo 2

Estudo de variantes do gene *BCHE* (*-116A* E *1615A*) e SNPs em seu entorno em grávidas diabéticas

Resumo: Localizado na região 3q26.1-q26.2, o gene *BCHE* tem 64.558 kb. Suas variantes já foram associadas a diversas patologias, inclusive ao *Diabetes Mellitus* tipo I e II. Contudo, estudos com ênfase nas bases genéticas do *Diabetes Mellitus* gestacional (DMG) são escassos. No presente estudo foram avaliadas duas variantes do gene *BCHE* (*-116A* e *1615A*) em amostra de pacientes com DMG (N=143) e em amostra controle de gestantes que não apresentaram a doença (N=295), ambas provenientes da cidade de Curitiba – PR. Além das variantes do gene *BCHE*, quatro Tag-SNPs próximos à sua região foram considerados neste estudo. As frequências genotípicas dos cinco SNPs estudados estavam em Equilíbrio de Hardy-Weinberg e não diferiram entre o grupo de pacientes com DMG e o grupo controle. As frequências alélicas também não diferiram significativamente entre os dois grupos amostrais. O grupo de grávidas com DMG apresentou 21 haplótipos mais frequentes, enquanto o grupo de gestantes não diabéticas apresentou 24. Dos haplótipos mais frequentes, 16 foram comuns aos dois grupos amostrais. As frequências de três haplótipos apresentaram diferença significativa entre o grupo de gestantes com DMG e o grupo controle. Um dos haplótipos foi mais comum nas gestantes do grupo controle, apresentando um efeito protetor ao DMG (*OR*= 0,54; 0,30 ≤ μ ≤ 0,98; IC 95% (*p*< 0,05)). Os outros dois haplótipos que diferiram entre os grupos, foram mais frequentes nas pacientes com DMG (*OR*= 3,9; 1,28 ≤ μ ≤ 11,85; IC 95% e *OR*= 8,46; 0,94 ≤ μ ≤ 76,40; IC 95% (p<0,05)), representando haplótipos de predisposição à doença. Sugerem-se como explicações para estes resultados significativos: 1) um efeito regulatório desses haplótipos na expressão da BChE que esteja associado ao DMG, ou ainda, 2) um desequilíbrio de ligação entre os haplótipos e outro gene situado próximo do gene *BCHE*.

Palavras-Chave: Butirilcolinesterase, *Diabetes Mellitus* gestacional, Tag SNPs, Desequilíbrio de ligação.

Abstract: Located at 3q26.1-q26.2, *BCHE* gene has 64.558 kb. Its variants had already been associated with many diseases, including type I and II *Diabetes Mellitus*. However studies

emphasizing the genetics base of gestational *Diabetes Mellitus* (GDM) are scarce. In the present study, we evaluated two BCHE gene variants (*-116A* e *1615A*) in a sample of patients with GDM (N=143) and in a control sample of pregnant women that did not present the disease (N=295), both from Curitiba – PR. Beyond *BCHE* gene variants, four Tag-SNPs close to its region were considered on this study. Genotypic frequencies of the five studied SNPs were on Hardy-Weinberg Equilibrium and did not differ between the group of GDM patients and control group. Allelic frequencies did not significantly differ between the two studied groups. The group of pregnant women with GDM presented 21 more frequent haplotypes, whereas the group of non-diabetic pregnant women presented 24. By these more frequent haplotypes, 16 were common on both sample groups. The frequencies of three haplotypes presented significantly differences between the group of pregnant women with GDM and the control group.

One of these haplotypes was more common on pregnant women of the control group, presenting a protective effect to DMG (*OR*= 0,54; 0,30 ≤ μ ≤ 0,98; IC 95% (*p*< 0,05)). The other two haplotypes that differed among the groups, were more frequent on GDM patients (*OR*= 3,9; 1,28 ≤ μ ≤ 11,85; IC 95% e *OR*= 8,46; 0,94 ≤ μ ≤ 76,40; IC 95% (*p*< 0,05)), representing haplotypes of predisposition to the disease. We suggest for explanation of these significant results: 1) a regulatory effect of these haplotypes on BChE activity that is associated with GDM, or, 2) a linkage disequilibrium between the haplotypes and another gene located close *BCHE* gene.

Keywords: Butyrylcholinesterase, Gestational *Diabetes Mellitus*, Tag SNPs, Linkage disequilibrium.

Introdução

Localizado na região 3q26.1-q26.2, o gene *BCHE* tem 64.558 kb e possui quatro exons formados por 2.445 pares de bases (Arpagaus *et al.*, 1990). Cerca de 65 variantes do gene *BCHE* já foram descritas (Souza *et al.*, 2005) e muitas destas estão envolvidas no desenvolvimento de diversas patologias.

A variante *1615A* (GCA → ACA, Ala-Thr^{539}; rs 1803274) foi descrita pela primeira vez por Rubinstein *et al.* (1978) e sua frequência em euro-descendentes é de 18,4% (Souza *et al.*, 1998). Acreditava-se que esta variante fosse responsável pela redução da atividade enzimática da BChE; entretanto, ao comparar a enzima usual com a determinada pela

mutação *1615A*, verificou-se que estas não apresentaram diferenças com relação a afinidade e taxa de catálise de substratos, taxa de secreção da célula e formação sérica de tetrâmero (Rubinstein *et al.*, 1978).

O exon 1 do gene *BCHE* contém um sítio polimórfico no nucleotídeo -116 (TGC/TAC; rs1126680), conhecido como variante *-116A* (Bartels *et al.*, 1990). No trabalho de Bartels *et al.* (1990), o heterozigoto G/A para a variante *-116A* foi sempre heterozigoto ou homozigoto para a variante *1615A*, e testes estatísticos confirmaram o desequilíbrio de ligação entre essas variantes. A frequência da variante *-116A* em euro-descendentes é de 8% (Bartels *et al.*, 1990).

O *Diabetes Mellitus* representa um grupo heterogêneo de distúrbios. A doença apresenta características genéticas complexas, pois além da participação de múltiplos locos gênicos, fatores ambientais também desempenham papel importante (Vogel e Motulski, 2000). Estima-se que mais de 220 milhões de pessoas em todo o mundo apresentem alguma forma de diabetes (WHO, 2011).

Uma das formas de diabetes é representada pelo *Diabetes Mellitus* gestacional (DMG). O DMG caracteriza-se por intolerância a carboidratos, resultando em hiperglicemia de níveis variados com surgimento, ou primeiramente detectada durante a gravidez (WHO, 1999). Pacientes com DMG assemelham-se a pacientes com *Diabetes Mellitus* do tipo II, já que apresentam uma diminuição ainda mais acentuada da sensibilidade periférica à insulina, além de uma secreção diminuída deste hormônio. Entretanto, a fisiopatologia do DMG não está totalmente elucidada. Se todas as gestantes fossem resistentes à insulina, a incidência do DMG seria superior aos níveis encontrados (Maganha *et al.*, 2003).

Diversos estudos para verificar a associação entre o *Diabetes Mellitus* e variantes do gene *BCHE* foram realizados. Hashim *et al.* (2001) encontraram associação entre a variante *1615A* do gene *BCHE* e o *Diabetes Mellitus* do tipo II (DM2) em indivíduos caucasianos, embora não tenham verificado o genótipo do sítio -116; Lepienski *et al.* (2006) e Oliveira (2006) em amostra de pacientes com *Diabetes Mellitus* do tipo I (DM1) encontraram associação positiva entre o alelo *1615A* e a idade de aparecimento da doença ≤12 anos. Estes autores concluíram que esse alelo, ou outra variante em desequilíbrio de ligação com ele, poderia predispor ao aparecimento precoce do DM1. Em contrapartida aos resultados positivos na associação entre variantes do gene *BCHE* e as formas de *Diabetes Mellitus*, o

trabalho de Johansen *et al.* (2004), em população de caucasianos, não encontrou associação entre a variante *1615A* do gene *BCHE* e o DM2.

Estudos genéticos buscando compreender as bases do DMG são escassos. Considerando-se que variantes do gene *BCHE* já foram associadas ao DM1 e ao DM2, estudos com o DMG seriam interessantes. Desta forma, o presente estudo buscou avaliar as frequências de duas variantes do gene *BCHE* (*-116A* e *1615A*) em amostra de pacientes com DMG (N=143) e em amostra controle de gestantes que não apresentaram a doença (N=295), ambas provenientes da cidade de Curitiba – PR. Foram ainda analisadas as frequências de quatro Tag-SNPs - conjunto de SNPs que capturam grande parte da variação genética em uma região (NCBI), neste caso da região 3q que circunda o gene *BCHE* – sendo dois a montante do gene *BCHE* (rs4440084, rs2863381) e dois a jusante (rs7624915, rs4387996). Estes Tag-SNPs foram escolhidos, pois apresentam alto grau de desequilíbrio de ligação com os SNPs em seu entorno, e sua frequência está próxima de 0,5 na população Caucasóide.

Materiais e Métodos

Amostra. Os dois conjuntos amostrais estudados foram compostos por a) gestantes com DMG (n=143) e por b) um grupo controle (n=295) de gestantes não-diabéticas. Os critérios utilizados para a caracterização dos grupos de pacientes com DMG e do grupo controle estão de acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2006) e com a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD, 2009), e são os seguintes: a) Grupo com *Diabetes Mellitus* gestacional (DMG) - gestantes apresentando glicemia de jejum superior a 100mg/dL com posterior confirmação através do teste oral de tolerância a glicose (TOTG) com 75g de sobrecarga, apresentando glicemia superior a 140 mg/dL após 2 horas à dose de glicose; e, b) Grupo controle - gestantes apresentando glicemia de jejum inferior a 85mg/dL. Não foram incluídas na amostra, pacientes com insuficiência renal e doença cardiovascular. O grupo de gestantes diabéticas foi obtido no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (Unidade de Diabetes do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital de Clínicas da UFPR- SEMPR) e as amostras para o grupo controle foram obtidas no Laboratório Municipal de Curitiba. As coletas foram realizadas entre os anos de 2007 e 2009. As pacientes concordaram em participar do estudo através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de

Ciências da Saúde da UFPR e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria Municipal de Saúde da Prefeitura Municipal de Curitiba.

Extração e Quantificação do DNA genômico. A extração de DNA genômico das amostras foi realizada pelo grupo do Laboratório de Bioquímica Clínica do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Paraná. Os métodos de extração utilizados seguiram o protocolo descrito por Lahiri e Nurnberger (1991), com algumas modificações, ou foi utilizado o reagente *Blood Genomic Prep Mini Spin* (GE Healthcare, art 28-9042-65). Após a extração, o DNA genômico foi quantificado conforme Witter e Kusukawa (2006). As amostras foram diluídas 1:50 com água ultra-pura e quantificadas por espectrofotometria em 260nm (Bio Photometer, Eppendorf). Todas as amostras de DNA foram padronizadas para a concentração de 100ng/µL, por diluição com água ultra-pura estéril. Alíquotas das amostras foram estocadas a -20°C no Laboratório de Polimorfismos e Ligação do Departamento de Genética – Universidade Federal do Paraná.

Pesquisa das variantes alélicas. A reação de PCR em tempo real foi realizada no aparelho Mastercycler Realplex 2 (Eppendorf). Para a genotipagem dos SNPs rs4440084 e rs2863381 (localizados à montante do gene *BCHE*), rs1126680 (nt -116) e rs1803274 (nt 1615) (localizados dentro do gene *BCHE*), e rs7624915 e rs4387996 (localizados à jusante do gene *BCHE*) foram utilizados os Kits de Genotipagem TaqMan SNP (Applied Biosystems). Os códigos de referência dos Taqman SNPs são os seguintes: 30562516 (rs4440084), 16078795 (rs2863381), 27847456 (rs1126680), 27479669 (rs1803274), 11801211 (rs7624915) e 31743514 (rs4387996). Para a análise de cada um dos SNPs foi preparado um mix de reação com volume total de 8,5µl para cada amostra, composto por 4,0µl de TaqMan Universal PCR Master Mix, 0,3µl do Kit de Genotipagem TaqMan SNP específico e 4,2µl de água ultra-pura. A este volume de mix para a reação foi acrescentado 2µl do DNA extraído. Os ciclos de amplificação foram: 1º passo de 2 minutos a 50^{o}C; 2º passo de 10 minutos a 95^{o}C; 3º passo repetido 45 vezes de 15 segundos a 95^{o}C intercalados por 60 segundos a 60^{o}C. Foram utilizadas amostras com genótipos já conhecidos para garantir a identificação precisa dos genótipos.

Análise Estatística. As frequências alélicas e genotípicas em pacientes e controles foram obtidas por contagem direta e comparadas entre os grupos através do teste do qui-quadrado com o uso do programa BioEstat versão 5.0 (Ayres *et al.*, 2007). Os testes para verificar o desequilíbrio de ligação entre as variantes analisadas foram realizados por meio

do programa Arlequin versão 3.0 (Excoffier *et al.*, 2005). O programa Arlequin versão 3.0 também foi utilizado para o cálculo das freqüências haplotípicas, dos valores de D e D' e testes de χ^2 para o equilíbrio de Hardy-Weinberg dos haplótipos. A análise de associação foi feita de acordo com o método de Woolf (1955), sendo calculados os respectivos *odds ratio* (*OR*). O valor da probabilidade para os testes comparativos considerados significativos considerou $p<0.05$ (5%). *Ver Detalhes da Metodologia no Apêndice 2.

Resultados

A pesquisa das variantes alélicas foi feita por PCR em tempo real e a figura 1 ilustra um exemplo de resultado da genotipagem contendo os três genótipos possíveis para uma das variantes estudadas. Os fluoróforos FAM e VIC marcaram pares de primers para todas as variantes estudadas. A figura 2 mostra um exemplo de gráfico gerado no programa Excel utilizado para facilitar a classificação dos genótipos observados.

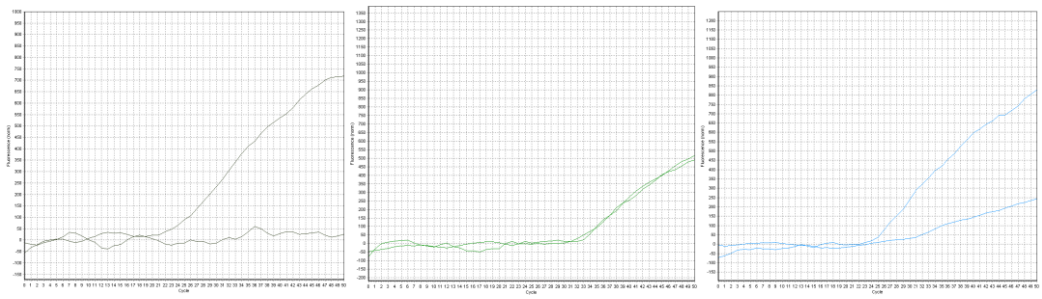


Figura 1. Gráficos exemplificando os resultados da genotipagem em tempo real de um dos SNPs estudados. Da esquerda para a direita observa-se: o gráfico que determina o genótipo do homozigoto para um dos alelos, o do heterozigoto e o do homozigoto para o outro alelo.

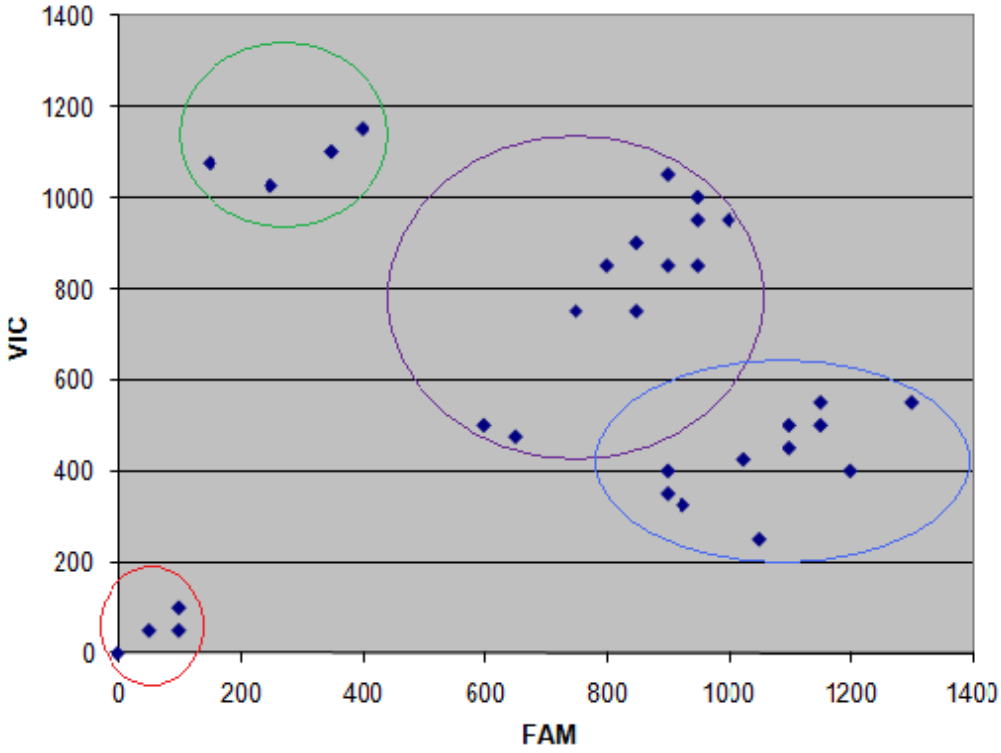


Figura 2. Gráfico gerado no programa Excel exemplificando os resultados de uma placa de PCR em tempo real para um dos SNPs estudados. O círculo verde destaca os indivíduos homozigotos para o alelo marcado com o fluoróforo VIC; o círculo roxo, os indivíduos heterozigotos; e, o círculo azul, os indivíduos homozigotos para o alelo marcado com o fluoróforo FAM. No círculo vermelho estão as amostras não amplificadas.

Frequências alélicas e genotípicas. Os resultados das frequências alélicas e genotípicas e o teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg estão explicitados abaixo, de acordo com a disposição dos SNPs no braço longo do cromossomo 3, ordenando-se a partir do telômero, sendo este o sentido do gene *BCHE*. Foram feitas comparações entre as frequências alélicas no grupo de grávidas com DMG e no de gestantes não diabéticas.

Frequências dos SNPs rs4440084 e rs2863381. As frequências genotípicas ± erro padrão (EP) para o SNP rs4440084 estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg e não diferiram entre pacientes com DMG e controles (χ^2=3,64, p=0,16) (Tabela 1). A frequência ± EP dos alelos G (59,09% ± 0,17% e 56,95% ± 0,08%) e C (40,91% ± 0,17% e 43,05% ± 0,08%, χ^2=0,36, p=0,55) não diferiram entre pacientes com DMG e controles, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1. Frequências genotípicas e alélicas ± EP no SNP rs4440084 a montante do gene *BCHE* em pacientes com DMG e no grupo controle.

	DMG (N= 143)	**χ^2 (*p*)**	**Controle (N= 295)**	**χ^2 (*p*)**
SNP rs4440084				
Genótipos				
GG	56 (39,16% ± 0,34%)	4,41	95 (32,20% ± 0,16%)	0,03
GC	57 (39,86% ± 0,34)	(0,11)	146 (49,49% ± 0,17%)	(0,99)
CC	30 (20,98% ± 0,28%)		54 (18,31% ± 0,13%)	
				3,64
				(0,16)
Alelos				
G	169 (59,09% ± 0,17%)		336 (56,95% ± 0,08%)	0,36
C	117 (40,91 ± 0,17%)		254 (43,05% ± 0,08%)	(0,55)

As frequências genotípicas ± EP para o SNP rs2863381 estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg e não diferiram entre pacientes com DMG e controles (χ^2= 0,07, *p*= 0,97) (Tabela 2). A frequência ± EP dos alelos T (75,52% ± 0,15% e 74,75% ± 0,07%) e C (24,48% ± 0,15% e 25,25% ± 0,07%, χ^2= 0,06, *p*= 0,80) não diferiram entre pacientes com DMG e controles, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2. Frequências genotípicas e alélicas ± EP no SNP rs2863381 a montante do gene *BCHE* em pacientes com DMG e no grupo controle.

	DMG (N= 143)	**χ^2 (*p*)**	**Controle (N= 295)**	**χ^2 (*p*)**
SNP rs2863381				
Genótipos				
TT	81 (56,64% ± 0,35%)	0,07	164 (55,59% ± 0,17%)	0,07
TC	54 (37,76% ± 0,34%)	(0,97)	113 (28,31% ± 0,15%)	(0,97)
CC	8 (5,6% ± 0,16%)		18 (6,1% ± 0,08%)	
				0,07
				(0,97)
Alelos				
T	216 (75,52% ± 0,15%)		441 (74,75% ± 0,07%)	0,06
C	70 (24,48 ± 0,15%)		149 (25,25% ± 0,07%)	(0,80)

Frequências da variante 1615A (K) (rs1803274). As frequências genotípicas ± EP para os genótipos no sítio 1615 do gene *BCHE* estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg e não diferiram entre pacientes com DMG e controles (χ^2= 0,56, *p*= 0,75) (Tabela 3). A frequência ± EP do alelo *1615A* não diferiu entre pacientes com DMG e controles (17,13% ± 0,13% e 17,12% ± 0,06%, respectivamente, χ^2= 0,00, *p*= 0,99) (Tabela 3).

Tabela 3. Frequências genotípicas e alélicas ± EP do sítio 1615 (rs1803274) no gene *BCHE* em pacientes com DMG e no grupo controle.

	DMG (N= 143)	**χ^2 (*p*)**	**Controle (N= 295)**	**χ^2 (*p*)**
***1615A* do gene *BCHE* (rs1803274)**				
Genótipos				
GG	100 (69,93% ± 0,32%)	1,12	203 (68,81% ± 0,16%)	0,02
GA	37 (25,87% ± 0,31%)	(0,57)	83 (28,24% ± 0,15%)	(0,99)
AA	6 (4,20% ± 0,14%)		9 (3,05% ± 0,06%)	
				0,56
				(0,75)
Alelos				
G	237 (82,87% ± 0,13%)		489 (82,88% ± 0,06%)	0,00
A	49 (17,13% ± 0,13%)		101 (17,12% ± 0,06%)	(0,99)

Frequências dos SNPs rs7624915 e rs4387996. As frequências genotípicas ± EP para os SNPs rs7624915 e rs4387996 estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg e não diferiram entre pacientes com DMG e controles (χ^2= 3,65, *p*= 0,16, para o SNP rs7624915 e χ^2= 3,58, *p*= 0,17, para o SNP rs4387996) (Tabelas 4 e 5, respectivamente).

As frequências ± EP dos alelos C (55,94% ± 0,17% e 49,15% ± 0,08%) e A (44,06% ± 0,17% e 50,85% ± 0,08%, para pacientes com DMG e grupo controle, respectivamente), referentes ao SNP rs7624915 não diferiram estatisticamente entre pacientes com DMG e controles (χ^2= 3,56, *p*= 0,06), embora tenham apresentado uma tendência a diferirem estatisticamente (Tabela 4).

As frequências ± EP dos alelos G (66,78% ± 0,16% e 66,1% ± 0,08%) e A (33,22% ± 0,16% e 33,9% ± 0,08%, para pacientes com DMG e grávidas não diabéticas, respectivamente), para o SNP rs4387996 não diferiram entre pacientes com DMG e controles (χ^2= 0,04, *p*= 0,84) (Tabela 5).

Tabela 4. Frequências genotípicas e alélicas ± EP no SNP rs7624915 a jusante do gene *BCHE* em pacientes com DMG e no grupo controle.

	DMG (N= 143)	**χ^2 (*p*)**	**Controle (N= 295)**	**χ^2 (*p*)**
SNP rs7624915				
Genótipos				
CC	49 (34,27% ± 0,33%)	2,08	76 (25,76% ± 0,15%)	1,21
CA	62 (43,36% ± 0,35%)	(0,35)	138 (46,78% ± 0,17%)	(0,55)
AA	32 (22,37% ± 0,29%)		81 (27,46% ± 0,15%)	
				3,65
				(0,16)
Alelos				
C	160(55,94% ± 0,17%)		290 (49,15% ± 0,08%)	3,56
A	126 (44,06 ± 0,17%)		300 (50,85% ± 0,08%)	(0,06)

Tabela 5. Frequências genotípicas e alélicas ± EP no SNP rs4387996 a jusante do gene *BCHE* em pacientes com DMG e no grupo controle.

	DMG (N= 143)	**χ^2 (*p*)**	**Controle (N= 295)**	**χ^2 (*p*)**
SNP rs4387996				
Genótipos				
GG	69 (48,25% ± 0,35%)	3,88	127 (43,05% ± 0,17%)	0,24
GA	53 (37,06% ± 0,34%)	(0,14)	136 (46,1% ± 0,17%)	(0,88)
AA	21 (14,69% ± 0,25%)		32 (10,85% ± 0,11%)	
				3,58
				(0,17)
Alelos				
G	191 (66,78% ± 0,16%)		390 (66,1% ± 0,08%)	0,04
A	95 (33,22 ± 0,16%)		200 (33,9% ± 0,08%)	(0,84)

Frequências haplotípicas e Odds Ratio (OR). Os SNPs utilizados para a inferência dos haplótipos foram ordenados segundo a disposição dos SNPs no DNA a partir do telômero. Foram desta forma, dispostos baseando-se na localização do gene *BCHE*: a montante, dentro e a jusante do gene *BCHE*.

O SNP rs1126680 (sítio da variante *-116A* do gene *BCHE*) foi incluído nas análises haplotípicas, mesmo não apresentando os dados de frequências alélicas e genotípicas neste artigo. Estas informações fazem parte de outro artigo de mesma autoria, apresentado na seção "Capítulo 1" desta dissertação.

O grupo de grávidas com DMG apresentou um total de 21 haplótipos, enquanto o grupo de gestantes não diabéticas apresentou um total de 24 haplótipos distintos. Do total de haplótipos observados, 16 são comuns aos dois grupos amostrais. Observou-se ainda que o haplótipo mais frequente (TGGGCG) é comum aos dois grupos estudados. A tabela 6 representa os haplótipos para os grupos de gestantes com DMG e não diabéticas, bem como suas frequências.

As frequências dos haplótipos H3 (GTGGAA), H7 (GTAACG) e H11 (GTAGCG) (tabela 6) apresentaram diferença significativa entre o grupo de gestantes com DMG e o grupo controle (p= 0,04; p= 0,02; e, p= 0,04, respectivamente).

Os haplótipos H7 e H11 foram mais frequentes no grupo de gestantes com DMG (6,30% e 2,79%, respectivamente) que no grupo de gestantes sem a doença (1,69%, para o haplótipo H7 e 0,34% para o haplótipo H11). O haplótipo H3 foi mais comum entre os indivíduos do grupo controle (18,98%, contra 11,19% no grupo de gestantes com DMG).

Quando calculados os valores do *odds ratio* (*OR*) para estes haplótipos, os três apresentaram diferença significativa. O haplótipo H3 apresentou *OR*= 0,54; 0,30 ≤ μ ≤ 0,98; IC 95% (p< 0,05), o haplótipo H7 (*OR*= 3,9; 1,28 ≤ μ ≤ 11,85; IC 95% (p< 0,05)) e o haplótipo H11 (*OR*= 8,46 ; 0,94 ≤ μ ≤ 76,40; IC 95% (p< 0,05)).

Tabela 6. Frequências haplotípicas no grupo de gestantes com DMG e no grupo de gestantes não diabéticas (controle). As barras indicam a ausência de indivíduos portando o haplótipo.

FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS		
Haplótipos	**DMG (N=143)/frequência**	**Controles (N=295)/frequência**
H1. GTGGCG	20 (20,98%)	78 (26,44%)
H2. GTGACG	18 (12,59%)	52 (17,63%)
H3. GTGGAA	16 (11,19%)	56 (18,98%)
H4. GTGGAG	14 (9,79%)	15 (5,08%)
H5. CTGGAA	13 (9,09%)	25 (8,47%)
H6. GTGGCA	12 (8,40%)	11 (3,73%)
H7. GTAACG	09 (6,30%)	5 (1,69%)
H8. GTGGAG	06 (4,19%)	8 (2,71%)
H9. CTGGCG	04 (2,79%)	9 (3,05%)
H10. GCGGAG	04 (2,79%)	3 (1,02%)
H11. GTAGCG	04 (2,79%)	1 (0,34%)
H12. CTGACA	02 (1,40%)	2 (0,68%)
H13. GCAACA	1 (0,70%)	3 (1,02%)
H14. GCGGCG	1 (0,70%)	3 (1,02%)
H15. CCGGAG	1 (0,70%)	2 (0,68%)
H16. GTAACA	1 (0,70%)	1 (0,34%)
H17. CTGGCA	02 (1,40%)	_____
H18. GCGACG	02 (1,40%)	_____
H19. GTGAAG	1 (0,70%)	_____
H20. CTAACG	1 (0,70%)	_____
H21. CTAGCG	1 (0,70%)	_____
H22. GCAACG	_____	6 (2,03%)
H23. GTAAAA	_____	6 (2,03%)
H24. CCGGAA	_____	4 (1,36%)
H25. CCAGAG	_____	1 (0,34%)
H26. CCGAAG	_____	1 (0,34%)
H27. CCGACG	_____	1 (0,34%)
H28. CTGAAA	_____	1 (0,34%)
H29. GTAGAG	_____	1 (0,34%)

Desequilíbrio de ligação. Os resultados dos testes de desequilíbrio de ligação entre os SNPs estudados encontram-se representados na tabela 7.

Tabela 7. Resultados dos testes de desequilíbrio de ligação entre os SNPs estudados.

	rs4440084	rs2863381	rs1126680	rs1803274	rs7624915	rs4387996
rs4440084	X	0,1376	0,6185	0,6308	0,5588	0,3528
rs2863381	<0,05	X	0,2645	0,2241	0,1322	0,3193
rs1126680	<0,005	<0,001	X	0,7370	0,5199	0,1782
rs1803274	<0,001	<0,005	<0,001	X	0,8040	0,5776
rs7624915	<0,001	0,1772	<0,001	<0,001	X	0,6220
rs4387996	<0,001	<0,05	0,2073	<0,001	<0,001	X

*Sequência de SNPs dos haplótipos. Valores significativos de *p* em rosa e valores não significativos em cinza; valores significativos de D' em azul e não significativos em verde.

Os SNPs rs4440084 e rs2863381 a montante do gene *BCHE* encontraram-se em desequilíbrio de ligação (*D´*= 0,1376, *p*< 0,05); os SNPs rs7624915 e rs4387996 a jusante do gene *BCHE* também estavam em desequilíbrio de ligação (*D´*= 0,6220 e *p*< 0,001). Destacou-se ainda o desequilíbrio de ligação já conhecido entre as variantes nos sítios -116 e 1615 do gene *BCHE* (*D´*= 0,7370, *p*< 0,001).

Discussão

Existem relativamente poucas pesquisas que visam compreender as bases genéticas do DMG (Watanabe *et al.*, 2007). Quanto à fisiopatologia da doença, sabe-se que pacientes com DMG assemelham-se a pacientes com DM2 já que apresentam uma diminuição ainda mais acentuada da sensibilidade periférica à insulina, além de uma secreção diminuída deste hormônio (Maganha *et al.*, 2003). Entretanto, se todas as gestantes fossem resistentes à insulina, a incidência do DMG seria superior aos níveis encontrados (Maganha *et al.*, 2003). Estas informações sugerem que variantes genéticas associadas tanto ao DM1, quanto ao DM2 podem ser comuns ao DMG.

As variantes *-116A* e *1615A* do gene *BCHE* já foram associadas em diversos trabalhos ao *Diabetes Mellitus* (Hashim *et al.*, 2001; Lepienski *et al.*, 2006; Oliveira, 2006), seja ele do tipo I ou II. Johansen *et al.* (2004) não encontraram associação entre a variante *1615A* do gene *BCHE* com o DM2, concordando com os resultados encontrados no presente estudo.

Apesar da associação encontrada por Oliveira (2006), esta autora sugere que as variantes nos sítios -116 e 1615 não parecem ser os verdadeiros fatores predisponentes à doença em idade precoce. Ela sugere ainda que outro gene em desequilíbrio de ligação com

estas variantes do gene *BCHE* seja o responsável por esta associação. Desta forma, o estudo dos Tag-SNPs no entorno do gene *BCHE* permitiram verificar se, de fato, as variantes do gene *BCHE* estão associadas ao diabetes ou se são outras variantes em desequilíbrio de ligação com as do gene *BCHE*.

O SNP rs7624915 apresentou uma tendência a diferir entre os grupos amostrais avaliados. Este Tag-SNP situa-se a jusante do gene *BCHE*, ou seja, algum gene nesta posição pode estar associado ao DMG.

Fernandes (2010), em amostra de pacientes com DM1, encontrou associação entre os dois SNPs aqui estudados, situados a jusante do gene *BCHE* (rs7624915 e rs4387996) e a doença. Este autor sugere o gene *SI* (sucraseisomaltase), situado à jusante do gene *BCHE* como um bom candidato para esta associação. Por isso, em nosso laboratório estão sendo realizados outros estudos para verificar se há associação entre variantes do gene *SI* e o diabetes.

Nas análises haplotípicas, o SNP rs1126680 (sítio da variante *-116A*) foi incluído, mesmo não apresentando os dados de frequências alélicas e genotípicas neste artigo. Estas informações fazem parte do artigo apresentado na seção “Capítulo 1” desta dissertação, pois a variante neste sítio está associada ao tema apresentado no “Capítulo 1” - redução na atividade da butirilcolinesterase (BChE).

No total de haplótipos observado, o grupo de grávidas com DMG apresentou 21 haplótipos, enquanto o grupo de gestantes não diabéticas apresentou 24 haplótipos distintos. É possível que esta pequena diferença no número de haplótipos mais frequentes encontrado seja devido ao tamanho amostral maior do grupo controle.

A frequência do haplótipo H3 (GTGGAA) foi significativamente maior no grupo de gestantes não diabéticas quando comparada ao grupo com DMG (18,98% e 11,19%, respectivamente; p= 0,04) e o *OR* correspondente a esta relação é de 0,54 (0,30 ≤ μ ≤ 0,98; IC 95% (p< 0,05). Isto indica um efeito protetor deste haplótipo ao DMG.

Os haplótipos H7 (GTAACG) (6,30% e 1,69%, para os grupos de gestantes com DMG e controle, respectivamente) e H11 (GTAGCG) (2,79% no grupo de grávidas diabéticas e 0,34% no grupo controle), apresentaram *OR* correspondentes a um efeito de predisposição ao DMG, pois foram mais frequentes no grupo de gestantes com a doença.

Nos haplótipos H3, H7 e H11, os quatro últimos alelos foram divergentes. Estes alelos estavam presentes nos sítios rs1126680 (nt -116) e rs1803274 (nt 1615), dentro do gene

BCHE, e rs7624915 e rs4387996, a jusante do gene *BCHE*. No haplótipo H3 (efeito protetor) está presente o alelo usual -*116G*, enquanto que nos haplótipos H7 e H11 (efeito de predisposição) ocorre o alelo variante -*116A*, associado a uma diminuição da atividade da BChE (Furtado-Alle *et al.*, 2008). De modo análogo, nos SNPs rs7624915 e rs4387996, a jusante do gene *BCHE*, estão presentes dois nucleotídeos A no haplótipo H3 e os nucleotídeos C e G nos haplótipos H7 e H11.

O único alelo que diferiu entre os dois haplótipos de predisposição ao DMG pertence ao SNP rs1803274, em que o haplótipo H7 apresentou a mutação no sítio 1615 e o haplótipo H11 teve o alelo usual. Este alelo corresponde ao da variante *K* da BChE e originalmente foi associado a uma diminuição da atividade enzimática (Rubinstein *et al.*, 1978). Trabalhos posteriores demonstraram que a enzima variante *K* não difere da enzima usual (Altamirano *et al.*, 2000) e que a redução da atividade enzimática é dependente da presença concomitante da mutação -*116A* (Furtado-Alle *et al.*, 2008). Como os haplótipos H7 e H11 não diferem em relação ao seu efeito sobre o DMG (predisposição), é possível sugerir que a presença do variante *1615A* nestes haplótipos não esteja relacionada ao DMG.

Assim, sugerem-se duas hipóteses para explicar estes resultados significativos: 1) um efeito regulatório, decorrente da presença concomitante dos alelos A no sítio -116, C e G nos SNPs rs7624915 e rs4387996 presente nos haplótipos H7 e H11, que leve a uma alteração na expressão da BChE que esteja associada ao DMG, ou ainda, 2) um desequilíbrio de ligação entre os haplótipos e outro gene situado próximo do gene *BCHE*.

Bartels *et al.* (1990) observaram um forte desequilíbrio de ligação entre as variantes -*116A* e *1615A* do gene *BCHE*. Nossas análises também constataram este desequilíbrio de ligação (D´= 0,7370, p< 0,001). Os primeiros estudos sobre as variantes do gene *BCHE* atribuíram à variante *1615A* (GCA → ACA, Ala-Thr^{539}), conhecida como variante *K*, o papel de reduzir a atividade da butirilcolinesterase (BChE) em cerca de 33% (Rubinstein *et al.*, 1978). Furtado-Alle *et al.* (2008), sabendo do desequilíbrio de ligação entre as duas variantes encontraram evidências de que a baixa atividade da enzima está associada à variante -*116A*.

Conclui-se que os alelos dos SNPs estudados - a montante (rs4440084 e rs2863381), dentro (rs1126680 e rs1803274) e a jusante (rs7624915 e rs4387996) do gene *BCHE* não apresentaram associação com o *Diabetes Mellitus* gestacional. Os alelos do SNP rs7624915 apresentaram uma tendência a diferirem entre os grupos de gestantes com DMG e de grávidas não diabéticas, que pode indicar uma associação entre a doença e variantes de

outro gene situado a jusante do gene *BCHE*. As análises haplotípicas indicaram que três haplótipos estudados divergiram entre os grupos amostrais, podendo representar um efeito regulatório na expressão da BChE que esteja associado ao DMG, ou ainda, um desequilíbrio de ligação entre os haplótipos e outro gene situado próximo do gene *BCHE*.

Agradecimentos

Ao grupo do Laboratório de Bioquímica Clínica do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Paraná e da Unidade de Diabetes do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital de Clínicas da UFPR- SEMPR.

Ao apoio financeiro Capes/REUNI.

Referências

Altamirano CV, Bartels CF, Lockridge O. The butyrylcholinesterase K-variant shows similar cellular protein turnover and quaternary interaction to the wild type enzyme. *J Neurochem* 74: 869-877, 2000.

Arpagaus M, Kott M, Vatsis KP, Bartels CF, La Du BN, Lockridge O. Structure of the gene for human butyrylcholinesterase. Evidence for a single copy. *Biochemistry* 29: 124-131, 1990.

Ayres M, Ayres Jr M, Ayres DL, Santos AAS. BioEstat 5.0. Aplicações Estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas (software), 2007.

Bartels CF, Van Der Spek AFL, La Du BN. Two polymorphisms in the noncoding regions of the *BCHE* gene. *Nucleic Acids Res* 18: 6171, 1990.

Excoffier. Laval LG, Schneider S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47-50, 2005.

Furtado-Alle L, Andrade FA, Nunes K, Mikami LR, Souza LRL, Chautard-Freire-Maia EA. Association of variants of the −116 site of the butyrylcholinesterase *BCHE* gene to enzyme activity and body mass index. *Chem Biol Inter* 175: 115–118, 2008.

Hashim Y, Shepherd D, Wiltshire S, Holman RR, Levy JC, Clark A, Cull CA. Butyrylcholinesterase K variant on chromosome 3q is associated with Type II diabetes in white Caucasian subjects. *Diabetologia* 44: 2227-2230, 2001.

Johansen A, Nielsen EM, Andersen G, Hamid YH, Jensen DP, Glümer C, Drivsholm T, Borch-Johnsen K, JØrgensen T, Hansen T, Pedersen O. Large-scale studies of the functional K

variant of the butyrylcholinesterase gene in relation to Type 2 diabetes and insulin secretion. *Diabetologia* 47: 1437-41, 2004.

Lahiri DK, Nurnberger Jr JL. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 19: 5444, 1991.

Lepienski LM, Souza RLR, Chautard-Freire-Maia EA, Alcântara VM, Réa RR. Variant K of butyrylcholinesterase and risk of early-onset type 1 diabetes mellitus in Euro-Brazilians**.** *Diabetes Obes Metab* 8: 709-711, 2006.

Maganha CA, Vanni DGBS, Bernardini, MA, Zugaib M. Tratamento do diabetes melito gestacional. *Rev Assoc Med Bras* 49: 330-334, 2003.

National Center For Biotechnologe Information (NCBI). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/224589815?report=genbank&from=166973395&to=167037952&strand=true.

Oliveira LC. Investigação de associação das variantes do nucleotídeo -116 do gene *BCHE* da butirilcolinesterase em diabete melito tipo 1. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2006.

Rubinstein HM, Dietz AA, Lubrano T. $E1^K$, another quantitative variant at cholinesterase locus 1. *J Med Genet* 15: 27-29, 1978.

Sociedade Brasileira de Diabetes. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2009. Versão para Download disponível em: HTTP://www.sbd.org.br.

Souza RLR, Castro RMV, Freund AA, Culpi L, Chautard-Freire-Maia EA. Frequencies of the butyrylcholinesterase K mutation in Brazilian populations of European and African origin. *Hum Biol* 70: 965-970, 1998.

Souza RLR, Mikami LR, Maegawa ROB, Chautard-Freire-Maia EA. Four new mutations in the *BCHE* gene of butyrylcholinesterase in a Brazilian blood donor sample. *Mol Genet Metab* 84: 349-353, 2005.

Statsoft Inc. Statistica for Windows (Computer program manual). Tulsa, 1996. 1cd.

Vogel F, Motulski AG. Genética Humana. Problemas e abordagens. *Guanabara Koogan* 3: 199-200, 2000.

Watanabe RM, Black MH, Xiang AH, Allayee H, Lawrence JM, Buchanan TA. Genetics of Gestational Diabetes Mellitus and Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 30: S134-140, 2007.

Witter CT, Kusukawa N. Nucleic acid techniques. In: BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R.; BRUNS, D. E. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. *Elsevier* 1407-1449, 2006.

Woolf B. On estimating the relation between blood group and disease. *Ann Hum Genet* 19: 251-253, 1955.

World Health Organization - WHO. Report of a WHO Consultation: Diagnosis and Classification of *Diabetes Mellitus* and its complications. Department of Noncommunicable Disease Surveillance. Genebra, 1999.

World Health Organization - WHO. Guidelines for the prevention, management and care of *Diabetes mellitus*. *Geneva: World Health Organization* 32: 1-82, 2006.

World Health Organization – WHO. Diabetes Media Center. Disponível em: http:// www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/. Acessado em: 20/03/2011.

6. Discussão geral

A BChE devido ao seu amplo modo de ação já foi diversas vezes associada a patologias como resistência à insulina, obesidade, DM2, hipertensão, hiperlipidemias, síndrome metabólica e doença de Alzheimer (Das *et al.*, 2007). Um fator comum a algumas destas desordens metabólicas é a alteração no metabolismo de lípides, que já foi diversas vezes associada à atividade da BChE (Randell *et al.*, 2005; Valle *et al.*, 2006; Alcântara *et al.*, 2005; Iwasaki *et al.*, 2007). A correlação observada no presente estudo a atividade da BChE, IMC e colesterol LDL nas grávidas diabéticas, sugere um papel para a BChE no metabolismo de lipídios, também no *Diabetes Melittus* gestacional.

Iwasaki *et al.* (2007) sugerem que a atividade da BChE esteja envolvida no metabolismo dos triglicérides e no fluxo de ácidos graxos livres entre o tecido adiposo e o fígado, para regular o excesso de gordura corporal. Há ainda evidências de que a BChE forma, por meio de uma ligação física, um complexo com VLDL (*very low density lipoprotein*) e participa na origem da LDL (Kutty, 1980 *Apud* Oliveira 2006).

Com base em dados de diversos estudos de associação, em que a atividade da BChE ou variantes do gene *BCHE* foram associados ao *Diabetes Mellitus* do tipo I e II (Antopol *et al.*, 1937; Pavkovic *et al.*, 1993, Abbott *et al.*, 1993), o presente estudo objetivou compreender melhor estas relações com o DMG. Apesar de o DMG assemelhar-se ao DM2, suas bases não são exatamente as mesmas, ou então a frequência do DMG seria superior à observada (Maganha *et al.*, 2003).

Whittaker (1980) relata a redução na atividade da enzima durante a gravidez e após o parto, bem como o aumento da atividade da BChE em patologias como o *Diabetes Mellitus*, entretanto, não apresenta resultados que associem estas duas condições. Blitt *et al.* (1977), Howard *et al.* (1978) e Tham *et al.* (2009) também observaram esta redução na atividade da BChE durante a gravidez.

Omu *et al.* (2010) realizaram uma pesquisa sobre a atividade da butirilcolinesterase em pacientes com DMG e controles, mas não era foco de seu estudo verificar qualquer tipo de associação com variantes alélicas. Estes autores observaram uma redução na atividade da BChE em gestantes com DMG quando comparada às gestantes que não apresentaram a doença (Omu *et al.*, 2010), e este mesmo resultado foi encontrado por Mahmoud *et al.* (2006). Embora estes dois estudos concordem que há uma redução significativa na atividade

da BChE em gestantes com DMG, eles não buscaram comparar a atividade enzimática destas gestantes com a média da atividade na população em geral e observar como a BChE se comporta em presença de outras variáveis associadas à enzima. Além disso, o tamanho amostral destes estudos foi bastante reduzido quando comparado ao de nosso estudo. Portanto, os resultados desta pesquisa auxiliam ainda mais na compreensão da relação entre DMG e BChE, e na busca por genes e produtos gênicos que, de fato, estejam envolvidos na patogênese do DMG.

Uma explicação para a redução da atividade da BChE durante a gravidez é o estresse gerado por esta condição (Robitaille e Grant, 2008) acentuado pelo estresse oxidativo causado pela hiperglicemia (Wyse *et al.*, 2004).

Na literatura não foram encontrados relatos sobre a frequência do fenótipo CHE2 C5+ em gestantes com DMG. Cwiertnia *et al.* (2010) relatam frequência deste fenótipo semelhante em pacientes com DM1 e DM2 e a frequência de cerca de 10% observada na população do sul do Brasil. Apesar do presente estudo apresentar frequências do fenótipo CHE2 C5+ semelhantes nas comparações realizadas, observou-se uma tendência a diferir estatisticamente entre a frequência deste fenótipo nos grupos de gestantes diabéticas e da população de Curitiba. É possível que fatores fisiológicos próprios ao DMG estejam influenciando na formação e/ou detecção da forma molecular C5. Como a substância que se liga ao tetrâmero da BChE para gerar a forma C5 do composto enzimático permanece parcialmente desconhecida, não se pode sugerir um mecanismo que explique tal observação.

A presença do fenótipo CHE2 C5+ está relacionada ao aumento significativo da atividade da BChE (Whittaker, 1980). Neste estudo, nos indivíduos do grupo controle, há um aumento da atividade da BChE nas grávidas com fenótipo CHE2 C5+, mesmo que este não seja significativo. A atividade média da BChE em pacientes com DMG que apresentam fenótipo CHE2 C5+ é bastante semelhante àquela observada nos indivíduos com o fenótipo CHE2 C5-. Considerando-se a baixa frequência do fenótipo CHE2 C5+ observada nas pacientes com DMG, acredita-se que tal fator tenha influenciado também na distribuição dos valores de atividade enzimática entre os indivíduos de fenótipo CHE2 C5+ e CHE2 C5-.

Quanto aos estudos envolvendo as bases genéticas do DMG sabe-se que são bastante escassos, até mesmo porque as bases fisiológicas da doença não estão completamente elucidadas, e a amostra apresenta certa dificuldade para ser coletada.

No presente estudo, o alelo *-116A* - já conhecido por estar associado à redução da atividade da BChE (Furtado-Alle *et al.*, 2008) - diminui a atividade da BChE, de modo independente das alterações fisiológicas provocadas pela gravidez e pelo DMG, pois a redução da atividade enzimática ocorre nos grupos controle e de pacientes.

O alelo *-116A* está em desequilíbrio de ligação com a variante *1615A* (Bartels *et al.*, 1990), e à variante *1615A* foi atribuído papel de redução na atividade da BChE. O estudo realizado por Furtado-Alle *et al.*, (2008) observou, contudo, que a variante *-116A* é a verdadeira responsável pela redução na atividade da enzima. Hashim *et al.* (2001) encontraram associação entre o alelo *1615A* e DM2, com o aumento no risco de desenvolver a doença, associado à presença de *1615A*, estimado em 44%. No presente trabalho, não foram verificadas diferenças significativas entre as frequências alélicas e genotípicas para o sítio 1615 entre pacientes e controles. Desse modo, para o DMG não foi detectada a mesma associação encontrada para o DM2. É importante salientar que embora já tenha sido proposto que DMG e DM2 tenham etiologia semelhante, diferem quanto aos seus efeitos na atividade da BChE. Enquanto em pacientes com DM2 é verificado um aumento significativo, em pacientes com DMG há um decréscimo, também significativo, na atividade da BChE.

As frequências alélicas e genotípicas das demais variantes analisadas também foram semelhantes em pacientes e controles. Apesar de terem sido semelhantes, as frequências alélicas para o SNP rs7624915 tenderam a diferir entre os grupos amostrais estudados. Fernandes (2010) observou diferenças nas frequências alélicas de dois SNPs a jusante do gene *BCHE* com o *Diabetes Mellitus* do tipo I, e estes SNPs foram os mesmos aqui abordados. Este autor sugere o estudo de variantes do gene *SI* (sucraseisomaltase), situado a jusante do gene *BCHE* para verificar uma possível associação com a doença. Por isso, em nosso laboratório estão sendo realizados outros estudos para verificar se há associação entre variantes do gene *SI* e o diabetes.

Foram encontradas diferenças significativas em três haplótipos entre gestantes com DMG e saudáveis. O haplótipo H3 (GTGGAA) foi significativamente mais frequente no grupo de gestantes não diabéticas quando comparado ao grupo com DMG (18,98% e 11,19%, respectivamente; p= 0,04) e o *OR* correspondente a esta relação é de 0,54 ($0,30 \leq \mu \leq 0,98$; IC 95% ($p< 0,05$). Isto indica um efeito protetor deste haplótipo ao DMG.

Os haplótipos H7 (GTAACG) (6,30% e 1,69%, para os grupos de gestantes com DMG e controle, respectivamente) e H11 (GTAGCG) (2,79% no grupo de grávidas diabéticas e 0,34%

no grupo controle), apresentaram *OR* correspondentes a um efeito de predisposição ao DMG, pois foram mais frequentes no grupo de gestantes com a doença.

Os resultados das análises dos haplótipos sugerem duas possibilidades distintas: um efeito dos haplótipos, provavelmente em regiões regulatórias do gene, sobre a expressão da BChE e que poderia levar a uma associação com o DMG; ou desequilíbrio de ligação entre os haplótipos e outros genes. A primeira hipótese pode ser investigada em estudos futuros que analisem conjuntamente tais haplótipos, expressão do gene *BCHE* e formas moleculares da BChE e a segunda hipótese pela busca de outros genes relacionados ao DMG situados a jusante do gene *BCHE* no cromossomo 3.

7. Conclusões

✓ A BChE foi associada ao metabolismo de lipídios também em pacientes com DMG, uma vez que apresentou correlações significativas com as médias de IMC e colesterol LDL no grupo de grávidas diabéticas;

✓ O DMG foi associado a uma atividade significativamente mais baixa da BChE, tanto em relação ao grupo controle como em relação à população em geral. Sugere-se assim, que o estresse oxidativo causado pela gravidez e pela hiperglicemia sejam os responsáveis pela redução da atividade da enzima;

✓ A frequência do fenótipo CHE2 C5+ foi semelhante em grávidas com DMG, controles e na população de Curitiba. Acredita-se que o DMG influencie na formação e/ou detecção da banda C5;

✓ As frequências alélicas de todas as variantes analisadas no presente estudo não diferiram entre os grupos de pacientes com DMG e grávidas não-diabéticas, desta forma, os SNPs estudados não apresentaram associação com o DMG. Apesar destes resultados, o SNP rs7624915, a jusante do gene *BCHE*, apresentou uma tendência a diferir estatisticamente entre os grupos amostrais estudados. Desta forma, sugere-se o estudo de genes situados próximos a esta posição;

✓ O alelo *-116A* reduziu a atividade da BChE, de modo independente das alterações fisiológicas provocadas pela gravidez e pelo DMG;

✓ O haplótipo H3 (GTGGAA) apresentou um efeito protetor ao DMG, enquanto H7 (GTAACG) e H11 (GTAGCG) representaram haplótipos de predisposição à doença. Tais resultados significativos podem ser devidos a 1) um efeito regulatório desses haplótipos na expressão da BChE que esteja associado ao DMG, ou ainda, 2) um desequilíbrio de ligação entre os haplótipos e outro gene situado próximo do gene *BCHE*.

8. Referências

Abbott CA, Mackness MI, Kumar S, Olukoga OA, Gordon C, Arrol S. Relationship between serum butyrylcholinesterase activity, hypertriglyceridemia in insulin sensitivity in diabetes. *Clin Sci* 85: 77-81, 1993.

Aires MM. Fisiologia. 3ª ed. Rio de Janeiro: *Guanabara Koogan* p. 1032-1048, 2008.

Alcântara VM, Chautard-Freire-Maia EA, Picheth G, Vieira MM. A method for serum cholinesterase phenotyping. *Rev Bras Genet* 14: 841-846, 1991.

Alcântara VM, Rodrigues LC, Oliveira LC, Chautard-Freire-Maia EA. Association of the CHE2 locus with body mass index and butyrylcholinesterase activity. *Hum Biol* 73: 587-95, 2001.

Alcântara VM, Chautard-Freire-Maia EA, Scartezini M, Cerci MS, Braun-Prado K, Picheth G. Butyrylcholinesterase activity and risk factors for coronary artery disease. *Scand J Clin Lab Invest* 62: 399-404, 2002.

Alcântara VM, Oliveira LC, Réa RR, Suplicy HL, Chautard-Freire-Maia EA. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27: 1557-64, 2003.

Alcântara VM, Oliveira LC, Réa RR, Suplicy HL, Chautard-Freire-Maia EA. Butyrylcholinesterase activity and metabolic syndrome in obese patients. *Clin Chem Lab Med* 43: 285-288, 2005.

Altamirano CV, Bartels CF, Lockridge O. The butyrylcholinesterase K-variant shows similar cellular protein turnover and quaternary interaction to the wildtype enzyme. *J Neurochem* 74: 869-877, 2000.

American Diabetes Association. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus**.** *Diabetes Care* 25: S5–20, 2002.

American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of *Diabetes Mellitus*. *Diabetes Care* 27: 5-10, 2004.

Andrade FA. Variantes dos sítios -116 E 1615 do gene *BCHE* da butirilcolinesterase humana e índice de massa corporal. Curitiba, 2007. Dissertação de mestrado. Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná.

Antopol W, Tuchman L, Schifrin A. Cholinesterase activity of human sera with special reference to hyperthyroidism. *Proc Soc Exp Biol Med* 36: 4650, 1937.

Arpagaus M, Kott M, Vatsis KP, Bartels CF, La Du BN, Lockridge O. Structure of the gene for human butyrylcholinesterase. Evidence for a single copy. *Biochemistry* 29: 124-131, 1990.

Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina. Projeto Diretrizes: Diabetes mellitus: Classificação e Diagnóstico, v.4, 2004.

Ayres M, Ayres Jr M, Ayres DL, Santos AAS. BioEstat 5.0. Aplicações Estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas (software), 2007.

Babaoglu MO, Ocal T, Bayar B, Kayaalp SO, Bozkurt A. Frequency and enzyme activity of the butyrylcholinesterase K-variant in a Turkish population. *Eur J Clin Pharmacol* 59: 875-877, 2004.

Balasubramanian AS, Bhanumathy CD. Noncholinergic functions of cholinesterases. *FASEB J* 7: 1354-1358, 1993.

Bartels CF, Van Der Spek AFL, La Du BN. Two polymorphisms in the noncoding regions of the *BCHE* gene. *Nucleic Acids Res* 18: 6171, 1990.

Bartels CF, Jensen FS, Lockridge 0, Van Der Spek AFL, Rubinstein HM, Lubrano T, La Du BN. 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* 50: 1086-1103, 1992.

Blitt CD, Petty WC, Alberternst EE, Wright BJ. Correlation of plasma cholinesterase activity and duration of action of succinylcholine during pregnancy. *Anesth Analg* 56: 78-83, 1977.

Blong RM, Bedows E, Lockridge O. Tetramerization domain of human butyrylcholinesterase is at the C-terminus. *Biochem J* 327:747-757, 1997.

Buchanan TA, Xiang AH. Gestational *Diabetes Mellitus*. *J Clin Investig* 115: 485-491, 2005.

Buchanan TA, Xiang A, Kjos SL, Watanabe R. What is gestational diabetes? *Diabetes Care* 30: S105-111, 2007.

Carpenter MW, Coustan DR. Criteria for screening tests for gestational diabetes. *Am J Obstet Gynecol* 144: 768-773, 1982.

Carr DB, Utzschneider KM, Hull RL, Tong J, Wallace TM, Kodama K, Shofer JB, Heckbert S, Boyko EJ, Fujimoto WY, Kahn SE. Gestational *Diabetes Mellitus* increases the risk of cardiovascular disease in women with a family history of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 29: 2078-2083, 2006.

Chatonnet A, Lockridge O. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochem J* 260: 625-634, 1989.

Chautard-Freire-Maia EA, Primo-Parmo SL, Picheth G, Lourenço MAC, Vieira MM. The C5 isozyme of serum cholinesterase and adult weight. *Hum Hered* 41: 330-339, 1991.

Clausen TD, Mathiesen ER, Hansen T, Pedersen O, Jensen DM, Lauenborg J, Damm P. High prevalence of type 2 diabetes and pre-diabetes in adult offspring of women with gestational diabetes mellitus or type 1 diabetes: the role of intrauterine hyperglycemia. *Diabetes Care* 31: 340-346, 2008.

Cwiertnia MM, Alcântara VM, Réa RR, Faria ACRA, Picheth G, Scartezini M, Graef LE, Welter M. Butyrylcholinesterase and *diabetes mellitus* in the CHE2 C5- and CHE2 C5+ phenotypes. *Arq Bras Endocrinol Metab* 54: 60-67, 2010.

Das UN. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as possible markers of low-grade systemic inflammation. *Med Sci Monit* 13: RA214-221, 2007.

Dietz AA, Ribinstein HM, Lubrano T, Hodges LK. Improved method for the differentiation of cholinesterase variants. *Am J Genet* 24: 58-64, 1972.

Dode MASO, Santos IS. Fatores de risco para diabetes mellitus gestacional na coorte de nascimentos de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil, 2004. *Cad Saúde Pública* 25: 1141-1152, 2009.

Eiberg H, Nielsen LS, Klausen J, Dahlén M, Kristensen M, Bisggard ML, Moller N, Mohr J. Linkage between serum cholinesterase 2 (CHE2) and crystallin gene cluster (CRYG): assignment to chromosome 2. Clin Genet 35: 313-321, 1989.

Eisenbarth GS. Update in type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 92: 2403-2407, 2007.

Eisenbarth GS, Jeffrey J. Tha natural history of type 1A diabetes. *Arq Bras Endocrinol Metab* 52: 146-155, 2008.

Elbein SC. The genetics of human noninsulin-dependent (type 2) *Diabetes Mellitus*. *J Nutr* 127: S1891-1896, 1997.

Evans RT, Wroe J. Is serum cholinesterase activity a predictor of succinyl choline sensitivity? An assessment of four methods. *Clin Chem* 24: 1762-1766, 1978.

Excoffier. Laval LG, Schneider S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47-50, 2005.

Fadel-Picheth C. Variabilidade do loco BCHE da butirilcolinesterase e peso do adulto em amostra de Curitiba. Dissertação de Mestrado. Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1991.

Fernandes AB. Associação entre o gene da butirilcolinesterase e diabete melito tipo 1. Curitiba, 2010. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Genética. Universidade Federal do Paraná.

Fox SI. Fisiologia Humana. 7ª ed. São Paulo: *Editora Manole*, 2007, p. 613-620.

Furtado-Alle L. Variabilidade genética da butirilcolinesterase e obesidade. Curitiba, 2005. Tese de doutorado. Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná.

Furtado-Alle L, Andrade FA, Nunes K, Mikami LR, Souza RLR, Chautard-Freire-Maia EA. Association of variants of the −116 site of the butyrylcholinesterase *BCHE* gene to enzyme activity and body mass index. *Chem Biol Inter* 175: 115–118, 2008.

Gross JL, Silveiro SP, Camargo JL, Reichelt AJ, De Azevedo MJ. Diabetes Melito: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico. *Arq Bras Endocrinol Metab* 46: 16-26, 2002.

Harris H, Hopkinson DA, Robson EB. Two-dimensional electrophoresis of pseudocholinesterase components in human serum. *Nature* 196: 1296-1298, 1962.

Harris H, Robson EB, Glen-Bott AM, Thornton JA. Evidence for nonallelism between genes affecting human serum cholinesterase. *Nature* 200: 1185-1187, 1963.

Hashim Y, Shepherd D, Wiltshire S, Holman RR, Levy JC, Clark A, Cull CA. Butyrylcholinesterase K variant on chromosome 3q is associated with Type II diabetes in white Caucasian subjects. *Diabetologia* 44: 2227-2230, 2001.

Howard JK, East NJ, Chaney JL. Plasma cholinesterase activity in early pregnancy. *Arch Environ Health* 33: 277-279, 1978.

Iwasaki T, Yoneda M, Nakajima A, Terauchi Y. Serum butyrylcholinesterase is strongly associated with adiposity, the serum lipid profile and insulin resistance. *Intern Med* 46: 1633-1639, 2007.

Jbilo O, Toutant JP, Vatsis KP, Chatonnet A, Lockridge O. Promoter and transcription start site of human and rabbit butyrylcholinesterase genes. *J Biol Chem* 269: 20829-20837, 1994.

Johansen A, Nielsen EM, Andersen G, Hamid YH, Jensen DP, Glümer C, Drivsholm T, Borch-Johnsen K, JØrgensen T, Hansen T, Pedersen O. Large-scale studies of the functional K variant of the butyrylcholinesterase gene in relation to Type 2 diabetes and insulin secretion. *Diabetologia* 47: 1437-41, 2004.

Kalow W, Genest K. A method for the detection of atypical forms of human serum cholinesterase. Determination of dibucaine numbers. *Canad J Biochem Physiol* 35: 339-346, 1957.

Lahiri DK, Nurnberger Jr JL. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 19: 5444, 1991.

Lauenborg J, Grarup N, Damm P, Borch-Johnsen K.; JØrgensen T, Pedersen O, Hansen T. Common type 2 diabetes risk gene variants associate with gestational diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 94: 145-150, 2009.

Li H, Schopfer LM, Masson P, Lockridge O. Lamellipodin proline rich peptides associated with native plasma butyrylcholinesterase tetramers. *Biochem J* 411: 425–432, 2008.

Lepienski LM, Souza RLR, Chautard-Freire-Maia EA, Alcântara VM, Réa RR. Variant K of butyrylcholinesterase and risk of early-onset type 1 diabetes mellitus in Euro-Brazilians**.** *Diabetes Obes Metab* 8: 709-711, 2006.

Lobato G. Screening do Diabetes Gestacional, 2002. Disponível em: http://www.medcenter.com/Medscape/content.aspx?LangType=1046&menu_id=945&id=557#. Acessado em 21/10/2009.

Lockridge O, Eckerson HW, La Du BN. Interchain disulfide bonds and subunit organization in human serum cholinesterase. *J Biol Chem* 254: 8324-8330, 1979.

Lockridge O, La Du BN. Loss of the interchain disulfide peptide and dissociation of the tetramer following limited proteolysis of native human serum cholinesterase. *J Biol Chem* 257: 12012-12018, 1982.

Lockridge O, Adkins S, La Du BN. Location of disulfid bonds within the sequence of human serum cholinesterase. *J Biol Chem* 262: 12945-12952, 1987.

Maganha CA, Vanni DGBS, Bernardini, MA, Zugaib M. Tratamento do diabetes melito gestacional. *Rev Assoc Med Bras* 49: 330-334, 2003.

Mahmoud FF, Haines DD, Abul HT, Omu AE, Abu-Donia MB. Butyrylcholinesterase Activity in Gestational Diabetes: Correlation with Lymphocyte Subpopulations in Peripheral Blood. *Am J Reprod Immunol* 56: 185-92, 2006.

Masson P, Chatonnet A, Lockridge O. Evidence for a single butyrylcholinesterase gene in individuals carrying the C5 plasma cholinesterase variant (CHE2). *FEBS Lett* 262: 115-118, 1990.

Mikami LR. Variabilidade dos exons 2 e 4 do gene *BCHE* e sua relação com a atividade da butirilcolinesterase. Curitiba, 2005. Tese de doutorado. Programa de Pós-graduação em Genética. Universidade Federal do Paraná.

Nachon F, Nicolet Y, Viguié N, Masson P, Fontecilla-Camps JC, Lockridge O. Engineering of a monomeric and low-glycosylated form of human butyrylcholinesterase: Expression, purification, characterization and crystallization. *Eur J Biochem* 269: 630-637, 2002.

National Center For Biotechnologe Information (NCBI). Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/224589815?report=genbank&from=166973395&to=167037952&strand=true.

Nicolet Y, Lockridge O, Masson P, Fontecilla-Camps JC, Nachon F. Crystal structure of human butyrylcholinesterase and of its complexes with substrate and products. *J Biol Chem* 278: 41141-41147, 2003.

Oliveira LC. Investigação de associação das variantes do nucleotídeo -116 do gene *BCHE* da butirilcolinesterase em diabete melito tipo 1. Curitiba, 2006. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Paraná.

Omu AE, Al-Azemi MK, Omu FE, Fatinikun T, Abraham S, George S, Mahnazhath N. Butyrylcholinesterase activity in women with diabetes mellitus in pregnancy: correlation with antioxidant activity. *J Obstet Gynaecol* 30: 122-126, 2010.

Orhan H, Onderoglu L, Yücel A, Sahin G. Circulating biomarkers of oxidative stress in complicated pregnancies. *Arch Gynecol Obstet* 267: 189-195, 2003.

Pavkovic E, Simon V, Reiner E, Sucic M, Lipovac V. Serum paraoxonase and cholinesterase activities in individuals with lipid and glucose metabolism disorders. *Chem Biol Interact* 87: 179-182, 1993.

Picheth G, Fadel-Picheth C, Primo-Parmo SL, Chautard-Freire-Maia EA, Vieira MM. An improved method for butyrylcholinesterase phenotyping. *Biochem Genet* 32: 83-89, 1994.

Pociot F, McDermott MF. Genetics of type 1 diabetes mellitus**.** *Genes Immun* 3: 235-249, 2002**.**

Ramkumar KM, Latha M, Ashokkumar N, Pari L, Ananthan R. Modulation of impaired cholinesterase activity in experimental diabetes: effect of Gymnema montanum leaf extract. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 16: 17-35, 2005.

Randle PJ. Mechanism modifying glucose oxidation in diabetes mellitus. *Diabetologia* 37: S155-S161, 1994.

Reichelt AJ, Oppermann MLR, Schmidt MI. Recomendações da 2ª reunião do grupo de trabalho em diabetes e gravidez. *Arq Bras Endocrinol Metab* 46: 574-581, 2002.

Reis AF, Velho G. Bases genéticas do *Diabetes mellitus* tipo 2. *Arq Bras Endocrinol Metab* 46: 426-432, 2002.

Retnakaran R, Oi Y, Sermer M, Connely PW, Hanley AJG, Zinman B. Glucose intolerance in pregnancy and future risk of pre-diabetes or diabetes. *Diabetes Care* 31: 2026-2031, 2008.

Robinson AR, Robson M, Harrison AP, Zuelzer WW. A new technique for differentiation of hemoglobin. *J Lab Clin Med* 50: 745-752, 1957.

Robitaille J, Grant A. The genetics of gestational *Diabetes mellitus*: evidence for relationship with type 2 *Diabetes mellitus*. *Genet Med* 10: 240-250, 2008.

Rubinstein HM, Dietz AA, Lubrano T. $E1^K$, another quantitative variant at cholinesterase locus 1. *J Med Genet* 15: 27-29, 1978.

Sanghera DK, Been L, Ortega L, Wander GS, Mehra NK, Aston CE, Mulvihill JJ, Ralhan S. Testing the association of novel meta-analysis-derived diabetes risk genes with type II diabetes and related metabolic traits in Asian Indian Sikhs. *J Hum Genet* 54: 162-168, 2009.

Schmidt MI, Duncan BB, Reichelt AJ, Branchtein L, Matos MC, E Forti AC, Spichler ER, Pousada JMDC, Teixeira MM, Yamashita T. Gestational *Diabetes Mellitus* diagnosed with a 2-h 75-g oral glucose tolerance test and adverse pregnancy outcomes. *Diabetes Care* 24: 1151-1155, 2001.

Shaat N, Ekelund M, Lernmark Å, Ivarsson S, Almgren P, Berntorp K, Groop L. Association of the E23K polymorphism in the *KCNJ11* gene with gestational diabetes mellitus. *Diabetologia* 48: 2544-2551, 2005.

Shaat N, Lernmark Å, karlsson E, Ivarsson S, Parikh K, Berntorp K, Groop L. A variant in the transcription factor 7-like 2 (*TCF7L2*) gene is associated with an increased risk of gestational diabetes mellitus. *Diabetologia* 50: 972-979, 2007.

Silva MRG, Calderon IMP, Gonçalves LC, Aragon FF, Padovani CR, Pimenta WP. Ocorrência de diabetes melito em mulheres com hiperglicemia em gestação prévia. *Rev Saúde Públ* 37: 345-350, 2003.

Siqueira MEPB, Fernícola, NAGG, Borges EL. Determinação de níveis normais de colinesterase plasmática e eritrocitária. *Rev Saúde Públ* 12: 340-344, 1978.

Sociedade Brasileira de Diabetes. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2009. Versão para Download disponível em: http://www.sbd.org.br.

Soreq H, Zamir R, Zevin-Sonkin D, Zakut H. Human cholinesterase genes localized by hybridization to chromosomes 3 and 16. *Hum Genet* 77: 325-328, 1987.

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

Souza RLR, Castro RMV, Freund AA, Culpi L, Chautard-Freire-Maia EA. Frequencies of the butyrylcholinesterase K mutation in Brazilian populations of European and African origin. *Hum Biol* 70: 965-970, 1998.

Souza RLR, Mikami LR, Maegawa ROB, Chautard-Freire-Maia EA. Four new mutations in the *BCHE* gene of butyrylcholinesterase in a Brazilian blood donor sample. *Mol Genet Metab* 84: 349-353, 2005.

Statsoft Inc. Statistica for Windows (Computer program manual). Tulsa, 1996. 1cd.

Tham E, Liu J, Innis S, Thompson D, Gaylinn BD, Bogarin R, Haim A, Thorner MO, Chanoine JP. Acylated ghrelin concentrations are markedly decreased during pregnancy in mothers with and without gestational diabetes: relationship with cholinesterase. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296: E1093–E1100, 2009**.**

Vaisi-Raygani A, Rahimi Z, Entezami H, Kharrazi H, Bahrhemand F, Tavilani H, Rezaei M, Kiani A, Nomanpour B, Pourmotabbed T. Butyrylcholinesterase K variants increase the risk of coronary artery disease in the population of western Iran. *Scand J Clin Lab Invest* 68: 123-129, 2008.

Valle A, O'Connor DT, Taylor P, Zhu G, Montgomery GW, Slagboom PE, Martin NG, Whitfield JB. Butyrylcholinesterase: Association with the Metabolic Syndrome and Identification of 2 Gene Loci Affecting Activity. *Clin Chem* 52: 1014-1020, 2006.

Van Ros G, Vervoort T. Frequencies of the "atypical" and C5 variants of serum cholinesterase in Zairians and Belgians. Detection of the C5 variant by agar gel electrophoresis with an acid buffer. *Ann Soc Belg Med Trop* 53: 633-644, 1973.

Velho G, Froguel P. Genetic determinants of non-insulin-dependent diabetes mellitus: strategies and recent results. Diabetes Metab 23: 7-17, 1997.

Vogel F, Motulsky AG. Genética Humana. Problemas e abordagens. 3ª ed. Rio de Janeiro: *Guanabara Koogan*, 2000, p. 199-200.

Watanabe RM, Black MH, Xiang AH, Allayee H, Lawrence JM, Buchanan TA. Genetics of Gestational Diabetes Mellitus and Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 30: S134-140, 2007.

Whittaker M. Plasma cholinesterase variants and the anaesthetist. *Anesthesia* 35: 174-197, 1980.

Whittaker M. Monographs in Human Genetics: Cholinesterase. 65-74, 1986.

Wilson BW, Henderson JD, Furman JL, Zeller BE, Michaelson D. Blood cholinesterases from Washington State orchard workers. *Bull Environ Contam Toxicol* 83: 59–61, 2009.

Witter CT, Kusukawa N. Nucleic acid techniques. In: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. *Elsevier* 1407-1449, 2006.

Woolf B. On estimating the relation between blood group and disease. *Ann Hum Genet* 19: 251-253, 1955.

World Health Organization - WHO. Report of a WHO Consultation: Diagnosis and Classification of *Diabetes mellitus* and its complications. Department of Noncommunicable Disease Surveillance. Genebra, 1999.

World Health Organization - WHO. Guidelines for the prevention, management and care of *Diabetes mellitus*. *Geneva: World Health Organization* 32: 1-82, 2006.

World Health Organization – WHO. Diabetes Media Center. Disponível em: http:// www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/. Acessado em 20/03/2011.

Wyse AT, Stefanello FM, Chiarani F, Delwing D, Wannmacher CM, Wajner M. Arginine administration decreases cerebral cortex acetylcholinesterase and serum butyrylcholinesterase probably by oxidative stress induction. *Neurochem Res* 29: 385-389, 2004.

Apêndice 1

Análises Complementares. Além das comparações apresentadas no Capítulo 1 para verificar a média da atividade da BChE entre os indivíduos homozigotos para o alelo usual X heterozigotos com o alelo *-116A*, foram ainda realizados outros testes para comparar a média da atividade da BChE e os diversos genótipos nos sítios a montante (rs4440084, rs2863381), dentro (rs1803274) e a jusante (rs7624915, rs4387996) do gene *BCHE*.

SNP rs4440084 (a montante do gene BCHE) X Atividade da BChE. A tabela 1 apresenta as médias ± o desvio padrão (± DP) da atividade da BChE para os três genótipos possíveis e as comparações realizadas (genótipos GG X GC; GG X CC; e GC X CC). Nos grupos de gestantes com DMG e gestantes não diabéticas, a média da atividade da BChE não diferiu significativamente entre os genótipos (tabela 1).

Tabela 1. Média ± DP da atividade da BChE nos indivíduos homozigotos para o alelo G, heterozigotos e homozigotos para o alelo C (rs4440084) e os valores de *t* (*p*) para comparação entre os genótipos em pacientes com DMG e gestantes não diabéticas.

	Média da Atividade da BChE ± DP (KU/L)	
	DMG (N=143)	**Controles (N=295)**
Genótipos no sítio rs4440084		
GG	2,22 ± 0,68	2,75 ± 0,87
GC	2,28 ± 0,60	2,87 ± 0,90
CC	2,27 ± 0,45	2,86 ± 0,89
Comparações	***t* (*p*)**	***t* (*p*)**
GG X GC	0,53 (0,60)	-1,00 (0,32)
GG X CC	0,36 (0,72)	-0,73 (0,47)
GC X CC	0,11 (0,91)	0,06 (0,95)

SNP rs2863381 (a montante do gene BCHE) X Atividade da BChE. A tabela 2 apresenta as médias ± DP da atividade da BChE para os três genótipos possíveis e as comparações realizadas (genótipos TT X TC; TT X CC; e TC X CC). Nos grupos de gestantes com DMG e gestantes não diabéticas, a média da atividade da BChE não diferiu significativamente entre os genótipos (tabela 2).

Tabela 2. Média ± DP da atividade da BChE nos indivíduos homozigotos para o alelo T, heterozigotos e homozigotos para o alelo C (rs2863381) e os valores de *t* (*p*) para comparação entre os genótipos em pacientes com DMG e gestantes não diabéticas.

	Média da Atividade da BChE ± DP (KU/L)	
	DMG	**Controles**
Genótipos no sítio rs2863381		
TT	2,33 ± 0,61	2,85 ± 0,84
TC	2,17 ± 0,57	2,79 ± 0,96
CC	2,10 ± 0,76	2,91 ± 0,91
Comparações	***t* (*p*)**	***t* (*p*)**
TT X TC	-1,53 (0,13)	0,57 (0,57)
TT X CC	-0,98 (0,33)	-0,29 (0,77)
TC X CC	0,30 (0,76)	-0,51 (0,61)

SNP rs1803274 (dentro do gene BCHE, sítio da variante 1615A) X Atividade da BChE. A tabela 3 apresenta as médias ± DP da atividade da BChE para os três genótipos possíveis e as comparações realizadas (genótipos GG X GA; GG X AA; e GA X AA). Nos grupos de gestantes com DMG e gestantes não diabéticas, a média da atividade da BChE diferiu significativamente entre os genótipos GG X GA (*t*= 2,17, *p*= 0,03 e *t*= 3,64, *p*= 0,0003, para o grupo de grávidas com DMG e o grupo controle, respectivamente) e GG X AA (*t*= 2,29, *p*=

0,02, para gestantes com DMG; e, *t*= 2,28, *p*= 0,02, para grávidas do grupo controle). A média da atividade da BChE no heterozigoto GA quando comparada ao homozigoto para a variante *1615A* não diferiu significativamente nos dois grupos amostrais avaliados (tabela 3).

Considerando-se o forte desequilíbrio de ligação existente entre as variantes *1615A* e *-116A*, e que a variante *-116A* está associada à redução da atividade da BChE (Furtado-Alle *et al.*,2008), a diferença entre a atividade da BChE foi esperada.

Tabela 3. Média ± DP da atividade da BChE nos indivíduos homozigotos para o alelo G, heterozigotos e homozigotos para o alelo A (rs1803274) e os valores de *t* (*p*) para comparação entre os genótipos em pacientes com DMG e gestantes não diabéticas.

	Média da Atividade da BChE ± DP (KU/L)	
	DMG	**Controles**
Genótipos no sítio rs1803274		
GG	2,34 ± 0,57	2,97 ± 0,90
GA	2,09 ± 0,65	2,55 ± 0,78
AA	1,77 ± 0,44	2,27 ± 0,82
Comparações	***t* (*p*)**	***t* (*p*)**
GG X GA	2,17 (0,03)*	3,64 (0,0003)*
GG X AA	2,39 (0,02)*	2,28 (0,02)*
GA X AA	1,16 (0,25)	1,04 (0,30)

*Diferença significativa

SNP rs7624915 (a jusante do gene BCHE) X Atividade da BChE. A tabela 4 apresenta as médias ± DP da atividade da BChE para os três genótipos possíveis e as comparações realizadas (genótipos CC X CA; CC X AA; e CA X AA). Nos grupos de gestantes com DMG e gestantes não diabéticas, a média da atividade da BChE não diferiu significativamente entre os genótipos (tabela 4).

Tabela 4. Média ± DP da atividade da BChE nos indivíduos homozigotos para o alelo C, heterozigotos e homozigotos para o alelo A (rs7624915) e os valores de *t* (*p*) para comparação entre os genótipos em pacientes com DMG e gestantes não diabéticas.

	Média da Atividade da BChE ± DP (KU/L)	
	DMG	**Controles**
Genótipos no sítio rs7624915		
CC	2,15 ± 0,65	2,74 ± 0,96
CA	2,27 ± 0,62	2,78 ± 0,83
AA	2,37 ± 0,47	3,00 ± 0,91
Comparações	***t* (*p*)**	***t* (*p*)**
CC X CA	1,00 (0,32)	0,32 (0,75)
CC X AA	1,60 (0,11)	1,77 (0,08)
CA X AA	-0,74 (0,46)	1,87 (0,07)

SNP rs4387996 (a jusante do gene BCHE) X Atividade da BChE. A tabela 5 apresenta as médias ± DP da atividade da BChE para os três genótipos possíveis e as comparações realizadas (genótipos GG X GA; GG X AA; e GA X AA). Nos grupos de gestantes com DMG e gestantes não diabéticas, a média da atividade da BChE não diferiu significativamente entre os genótipos (tabela 5).

Tabela 5. Média ± DP da atividade da BChE nos indivíduos homozigotos para o alelo G, heterozigotos e homozigotos para o alelo A (rs4387996) e os valores de *t* (*p*) para comparação entre os genótipos em pacientes com DMG e gestantes não diabéticas.

	Média da Atividade da BChE ± DP (KU/L)	
	DMG	**Controles**
Genótipos no sítio rs4387996		
GG	2,18 ± 0,67	2,85 ± 0,93
GA	2,29 ± 0,53	2,77 ± 0,85
AA	2,40 ± 0,51	3,01 ± 0,88
Comparações	***t* (*p*)**	***t* (*p*)**
GG X GA	-0,91 (0,36)	-0,69 (0,49)
GG X AA	-1,35 (0,18)	-0,90 (0,37)
GA X AA	-0,83 (0,41)	-1,42 (0,16)

Apêndice 2

Materiais e Métodos

O projeto no qual este está inserido foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR sob o Registro CEP/SD: 565.102.08.06 e CAAE: 0135.0.208.091-08 e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria Municipal de Saúde da Prefeitura Municipal de Curitiba sob o Registro 97/2008.

Amostra populacional. Para a realização do presente estudo foi utilizado um conjunto amostral de 150 pacientes com *Diabetes Mellitus* gestacional (DMG) e uma amostra controle composta por 295 gestantes que não apresentaram a patologia. Algumas informações não estavam disponíveis para algumas pacientes, e o DNA não pôde ser extraído para todas as amostras. O grupo de gestantes diabéticas foi obtido no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (Unidade de Diabetes do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital de Clínicas da UFPR- SEMPR) coordenado pelas Doutoras Rosângela R. Réa e Ana Cristina Ravazzani. As amostras para o grupo controle foram obtidas no Laboratório Municipal de Curitiba. As coletas foram realizadas entre os anos de 2007 e 2009, com o auxílio do grupo do Laboratório de Bioquímica Clínica do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Paraná. As pacientes concordaram em participar do estudo através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE, anexo 1). O anexo 2 mostra a planilha utilizada na coleta de dados antropométricos, clínicos e laboratoriais.

Critérios para a caracterização da amostra. Os critérios utilizados para a caracterização dos grupos de pacientes com DMG e controle estavam de acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2006) e com a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD, 2009), e estão listados a seguir:

- Grupo com Diabetes Gestacional (DMG): Gestantes apresentando glicemia de jejum superior a 100mg/dL com posterior confirmação através do teste oral de tolerância a glicose (TOTG) com 75g de sobrecarga, apresentando glicemia superior a 140 mg/dL após 2 horas à dose de glicose;
- Grupo controle: Gestantes apresentando glicemia de jejum inferior a 85mg/dL.

Não foram incluídas na amostra pacientes que apresentaram insuficiência renal e doença cardiovascular.

Extração do DNA e coleta de soro. As amostras de sangue periférico das pacientes foram coletadas com $EDTAK_3$ (Vacutainer, BD) e sem anticoagulante, em tubo seco com gel separador. As amostras foram obtidas durante os exames de rotina, conforme o protocolo do Serviço de Atendimento à gestante, não havendo coleta específica para este projeto. Foram então centrifugadas para separar o soro em alíquotas, e o soro, mantido em freezer a -20°C até a realização das análises. Amostras hemolisadas (0,82% do total) foram excluídas de todos os ensaios.

A coleta e a extração de DNA genômico das amostras foram realizadas pelo grupo do Laboratório de Bioquímica Clínica do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Paraná, pois o projeto é realizado em parceria com este grupo. Os métodos de extração utilizados seguiram o protocolo descrito por Lahiri e Nurnberger (1991), com algumas modificações (Anexo 3), ou foi utilizado o reagente *Blood Genomic Prep Mini Spin* (GE Healthcare, art 28-9042-65).

Alíquotas das amostras foram estocadas a -20°C no Laboratório de Polimorfismos e Ligação.

Quantificação do DNA genômico. Após a extração, o DNA genômico foi quantificado conforme Witter e Kusukawa (2006), técnica também realizada pelo grupo do Laboratório de Bioquímica Clínica do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Paraná. As amostras foram diluídas 1:50 com água ultra-pura e quantificadas por espectrofotometria em 260nm (Bio Photometer, Eppendorf). Todas as amostras de DNA foram padronizadas para a concentração de 100ng/µL, por diluição com água ultra-pura estéril.

Determinação da atividade da BChE. Para a determinação da atividade da BChE foi utilizada a técnica de Dietz *et al.* (1972), modificada por Evans e Wroe (1978), cujo princípio é a hidrólise da propioniltiocolina pela butirilcolinesterase, produzindo ácido propiônico e tiocolina, a qual reage com o DTNB (ácido 5,5'-bisditio-2-nitrobenzóico), gerando 5-tio-2-nitrobenzoato de coloração amarela. A dosagem do produto formado foi realizada em espectrofotômetro ajustado em 410 nm e com todos os reagentes mantidos em banho-maria a 25°C. O tampão fosfato 0,1 M utilizado na reação (pH 7,6) foi preparado pela mistura de duas soluções "a" e "b" até a obtenção do pH adequado. A solução "a" continha 4,73 g de Na_2HPO_4 anidro (PM = 141,96) em 1000 mL de água destilada. A solução "b" continha 13,61 g de KH2PO4 anidro (PM = 136,09) em 1000 mL de água destilada. O DTNB (0,423 mM) foi dissolvido em tampão fosfato na proporção de 167 mg por 1000 mL. O substrato

(propioniltiocolina 100 mM) foi preparado com 303 mg de iodeto de propioniltiocolina (PM = 303,2) em 10 mL de água destilada. Tubos contendo 2,2 mL de tampão fosfato com DTNB, e outros tubos contendo 50 µL de soro diluídos em 5 mL de água destilada foram mantidos por vinte minutos no banho-maria a 25°C antes da leitura em espectrofotômetro. Após os vinte minutos foram adicionados 250 µL do soro diluído e 50 µL de substrato ao tubo contendo o tampão fosfato com DTNB, iniciando-se assim a leitura. A primeira leitura, chamada A0, era efetuada imediatamente após a colocação dos reagentes na cubeta termostatizada do espectrofotômetro. As leituras A1, A2 e A3 foram efetuadas com um, dois e três minutos a partir da leitura A0. Após as quatro leituras, foi calculado o Δ/minuto (variação de absorbância por minuto). Para a obtenção da atividade (KU/L), Δ/minuto foi multiplicado pelo fator 73,53 e por 1.000.

Para a padronização da técnica foram utilizadas amostras do *pool* de soros coletado de membros do grupo de pesquisa.

Fenotipagem do loco CHE2. Para a fenotipagem do loco *CHE2* foi utilizada a técnica desenvolvida por Robinson *et al.* (1957) para fenotipagem de variantes da hemoglobina, posteriormente modificada por Van Ros e Vervoort (1973) para aplicação à BChE e com adaptações subsequentes de Fadel Picheth (1991) e Souza (1995).

O gel de ágar foi preparado com uma solução de Bacto ágar (Difco) a 1,4% p/v em tampão citrato de sódio, pH 6,2 (solução estoque de tampão citrato de sódio 50 mM, pH 6,7; pH ajustado com ácido cítrico 30%) e água destilada. O pH da solução contendo tampão citrato de sódio e água destilada foi ajustado a valores que variaram entre 6,42 e 6,48, e então foi adicionado 0,7 g de Bacto ágar. Esta solução era aquecida até que o ágar fosse totalmente dissolvido, sendo importante não deixar que a solução fervesse. Após o aquecimento a solução era vertida sobre uma placa de vidro de 230 x 160 mm. Quando o gel estivesse completamente resfriado, era colocado na geladeira e mantido em repouso por pelo menos 12 horas a fim de diminuir o efeito da eletroendosmose. Após este período de repouso as amostras de plasma eram aplicadas no gel através da extremidade de uma lâmina de metal (5 x 5 x 0,1 mm) onde eram colocados 2 µL de plasma ou soro. A placa contendo as amostras era então submetida à eletroforese com tampão citrato pH 6,2 nas cubas (diluído em uma proporção de 1/10), por três horas e meia (a 4°C; 75 V e 35 mA).

Após a corrida eletroforética, despejou-se sobre a placa o cromógeno-substrato que era preparado imediatamente antes do uso. A solução cromógeno-substrato foi preparada

utilizando-se Fast Red TR Salt (SIGMA F-2768) a 0,1% p/v em tampão fosfato de sódio pH 7,1 (670 mL de Na2HPO4, 0,2 M e 330 mL de NaH2PO4, 0,2 M) e solução de α-naftilacetato 30 mM (2,5% v/v). A placa com o cromógeno-substrato era incubada por cerca de 30 minutos a 37°C. Após a revelação das bandas a placa era lavada com água para retirar o excesso de corante. O gel era então colocado entre uma folha de papel cartão e uma folha de papel filtro, prensado entre duas placas de vidro e levado à estufa a 37°C até completa secagem. A folha de papel filtro era trocada após 10 minutos para retirar o excesso de umidade.

Devido à baixa atividade da BChE observada nas gestantes, a frequência do fenótipo CHE2 C5+ estava bastante reduzida em relação à população de Curitiba. Desta forma, a técnica de eletroforese em gel de ágar ácido sofreu modificações para que o volume de plasma utilizado na reação pudesse ser aumentado sem dificultar a observação no gel. O volume do gel foi aumentado para 70mL, dos quais 7mL eram de tampão citrato de sódio, pH 6,2, completado com água destilada. O volume do plasma aplicado foi aumentado para 4µL e a forma de aplicação foi alterada. Fazia-se um corte no gel com a extremidade da lâmina de metal e no local era aplicado o plasma com o auxílio da pipeta. Após ajuste do pH, que não foi alterado, adicionou-se 0,98 g de Bacto Ágar; o tempo da corrida eletroforética foi de cinco horas e as condições da corrida foram mantidas; o volume da solução cromógeno-substrato foi alterado de acordo com as proporções do gel de 70mL.

Para aumentar a confiabilidade dos resultados foram utilizadas como controles amostras com fenótipo CHE2 C5+ previamente conhecido, e com atividade reduzida.

Genotipagem dos SNPs localizados nos sítios –116 e 1615 do gene BCHE e dos SNPs a montante e a jusante do gene BCHE: Genotipagem em tempo real. A reação de PCR em tempo real foi realizada no aparelho Mastercycler Realplex 2 (Eppendorf), localizado na Unidade de Sequenciamento e Análise de DNA - SEAD. Estes termocicladores são especiais, pois permitem a detecção e medida de produtos gerados durante cada ciclo da PCR. A emissão dos compostos fluorescentes gera um sinal que aumenta na proporção direta da quantidade de produto da PCR.

Para a genotipagem dos SNPs rs1803274 e rs1126680 (localizados dentro do gene *BCHE*), rs2863381 e rs4440084 (localizados a montante) e rs7624915 e rs4387996 (localizados a jusante do gene *BCHE*) foram utilizados os Kits de Genotipagem TaqMan SNP (Applied Biosystems). Os códigos de referência dos Taqman SNP foram os seguintes: 27479669 (rs1803274), 27847456 (rs1126680), 16078795 (rs2863381), 30562516

(rs4440084), 11801211 (rs7624915) e 31743514 (rs4387996). Este *kit* consiste de 2 oligonucleotídeos iniciadores específicos não marcados (primers) e duas sondas, que consistem de oligonucleotídeos específicos para cada alelo marcados com diferentes fluorescências, como por exemplo: VIC, emitindo coloração vermelha sinalizava Alelo A e FAM com a coloração verde sinalizava Alelo B.

Para a identificação dos alelos presentes em cada SNP para cada indivíduo da amostra, foi utilizado o seguinte protocolo: preparo do mix de reação com volume total de 8,5µl, sendo destes 4,0µl de TaqMan Universal PCR Master Mix, 0,3µl do Kit de Genotipagem TaqMan SNP específico e 4,2µl de água ultra-pura. A este volume de mix para a reação foram acrescentados 2µl do DNA extraído.

O uso do aparelho para este protocolo de genotipagem é realizado em três etapas. A primeira é a chamada pré-leitura, na qual é lida a fluorescência basal da placa antes do processo de amplificação. A segunda é a amplificação em si, realizada para todos os segmentos dentro dos seguintes padrões de PCR: 1º passo de 2 minutos a 50°C; 2º passo de 10 minutos a 95°C; 3º passo repetido 45 vezes de 15 segundos a 95°C intercalados por 60 segundos a 60°C. A terceira etapa é a chamada pós-leitura, que se resume na análise dos dados gerados antes, durante e após a amplificação, resultando no genótipo de cada indivíduo analisado e sua plotagem em um gráfico (Figura 1).

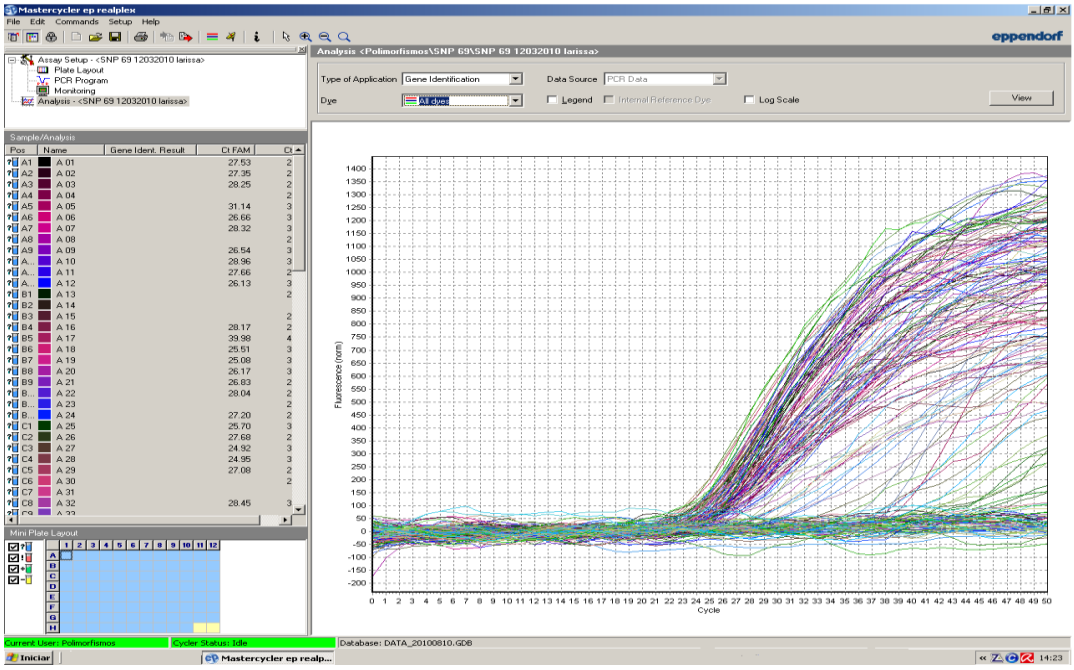


Figura 1. Interface do programa realplex de genotipagem em tempo real, mostrando a disposição para a leitura das amostras e os gráficos gerados.

Para melhor visualização dos genótipos de cada SNP estudado, foram feitas planilhas no programa Excel, contemplando os valores de florescência para os respectivos fluoróforos presentes na reação (FAM e VIC), e foram plotados gráficos xy para agrupar genótipos semelhantes. Para as amostras que se apresentaram em zonas do gráfico que não estivessem contidas nos distintos grupos dos genótipos, a reação deveria ser repetida.

Os dois SNPs a montante do gene (rs2863381, rs4440084) e os dois a jusante (rs7624915, rs4387996) foram escolhidos por serem T*ag*-SNPs, ou seja, têm alto grau de desequilíbrio de ligação com os SNPs em seu entorno e também foram selecionados por terem a frequência de seus alelos próximas de 0,5 na população Caucasóide. Essas informações foram obtidas através dos dados do HapMap, utilizando o programa Haploview (http://www.hapmap.org).

Foram utilizadas amostras com genótipo já conhecido para garantir a classificação precisa dos genótipos.

Análise estatística. Criou-se uma planilha de dados no programa Excel, sendo esta exportada para o programa Statistica para Windows (Statsoft, Inc. 1996). As médias ± DP, correlações entre as variáveis antropométricas e bioquímicas e a atividade da BChE, frequências dos fenótipos do loco *CHE2*, variâncias e testes *t* para comparações das médias das variáveis quantitativas entre os grupos foram realizadas neste programa. As frequências alélicas e genotípicas em pacientes e controles foram obtidas por contagem direta e comparadas entre os grupos através do teste do qui-quadrado, com o auxílio do programa BioEstat versão 5.0 (Ayres, 2007). O teste para verificar o desequilíbrio de ligação entre as variantes analisadas foi realizado por meio do programa Arlequin versão 3.0 (Excoffier *et al.*, 2005). O programa Arlequin versão 3.0 também foi utilizado para a inferência dos haplótipos, o cálculo das frequências haplotípicas, dos valores de D e D' e testes de χ^2 para o equilíbrio de Hardy-Weinberg dos haplótipos. A análise de associação foi feita de acordo com o método de Woolf (1955), sendo calculados os respectivos *odds ratio* (*OR*). O valor da probabilidade para os testes comparativos considerados significativos considerou $p<0.05$ (5%).

Anexos

Anexo 1

Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)

a) Você está sendo convidado a participar de um estudo intitulado "**Estudos fenotípicos e genotípicos de polimorfismos dos genes do receptor para produtos de glicação avançada (RAGE), Preprogrelina e Glucoquinase no diabetes gestacional**". É através das pesquisas clínicas que ocorrem os avanços importantes em todas as áreas, e sua participação é fundamental.

b) É importante que você leia e entenda toda a informação dada.

c) O objetivo desta pesquisa é estudar variações genéticas no DNA e asociá-las com o processo do diabetes gestacional.

d) Caso você participe da pesquisa, não será necessário nenhum procedimento específico, pois será utilizado o sangue já coletado para outros exames de rotina não trazendo para você nenhum desconforto ou risco a mais, a não ser a coleta a qual você já irá realizar para outros exames.

e) Não há riscos adicionais envolvidos na sua participação.

f) Contudo, os benefícios esperados são: conhecer as variações genéticas dos genes em estudo na população brasileira, procurar marcadores de risco ou proteção para o diabetes gestacional e fornecer elementos para a elaboração de futuras políticas públicas.

g) Os pesquisadores Izabella Ribeiro Castilhos dos Santos, Farmacêutica Bioquímica, mestranda do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná (contato: izabellacrs@hotmail.com fone: (41) 3252-8328), Cyntia Maria Telles Fadel Picheth, professora do programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (fpicheth@ufpr.br fone: (41) 3360-4086) e Geraldo Picheth, professor do curso de Farmácia da Universidade Federal do Paraná (gpicheth@ufpr.br fone: 3360-4067) que poderão ser contatados (na Universidade Federal do Paraná, Curso de Farmácia, Rua Prof. Lothario Meissner, 632, Jardim Botânico, CEP 80210-170 em horário comercial) são os responsáveis pelo projeto e poderão esclarecer eventuais dúvidas a respeito desta pesquisa.

h) Estão garantidas todas as informações que você queira, antes, durante e depois do estudo.

i) A sua participação neste estudo é voluntária (sua escolha). Você tem a liberdade de se recusar a participar ou, se aceitar participar, retirar seu consentimento a qualquer momento. Este fato não irá afetar de nenhuma maneira seu atendimento, que está garantido.

j) As informações relacionadas ao estudo poderão ser inspecionadas pelos pesquisadores que executam a pesquisa e pelas autoridades legais. No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a **confidencialidade (**sigilo**)** seja mantida.

k) Todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa (exames, medicamentos etc.) **não** são de sua responsabilidade.

l) Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer valor em dinheiro.

m) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

n) As amostras serão conservadas após a realização da pesquisa para posterior utilização em outras pesquisas científicas similares, mantendo-se a confidencialidade (sigilo) das mesmas, como dito acima.

Eu, _____ li o texto acima e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual fui convidado a participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios do estudo e os tratamentos alternativos. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação no estudo a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta decisão afete meu tratamento. Eu entendi o que não posso fazer durante o tratamento e sei que qualquer problema relacionado ao tratamento será tratado sem custos para mim. Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

_____

(Assinatura do sujeito de pesquisa ou responsável legal)

Local e data

_____

Izabella Castilhos Ribeiro dos Santos

Pesquisadora responsável

Anexo 2

Planilha para coleta de dados das gestantes diabéticas

Caracterização do Paciente	Nº protocolo	Data
Nome:		____/___/___

Dados clínicos

N	Dados	Obs.
1	Semana de gestação	[ ] semanas Número de gestações:
2	Idade	[ ] anos
3	Peso	Antes= [ ]kg Depois= [ ]kg
4	Altura	[ ] cm
5	IMC	
6	Etnia	(1)= Euro brasileiro (2)= Afro brasileiro (3)= Índio (4)= Oriental
7	Dieta	(1)= Sim (2)= Não
8	Pressão Arterial (PA)	[_____/_____] mmHg
9	Tabagismo	(1) = Nunca fumou (2) = Ex-fumante (3) = Fumante
10	Fatores de risco	Idade: (1)= Sim (2) = Não Obesidade: (1)= Sim (2)= Não Macrossomia: (1)= Sim (2)= Não _____ Aborto(s): (1)= Sim (2)= Não Se sim, quantos: ____ Gravidez prévia com DG: (1)= Sim (2)= Não Morte neonatal: (1)= Sim (2)= Não
11	História familiar de diabetes	Pais: (1) = Sim (2) = Não Avós: (1) = Sim (2) = Não Demais familiares: (1)=Sim (2)= Não _____
12	História familiar de DAC	Pais: (1)= Sim (2) Não Avós: (1)= Sim (2)= Não Demais familiares: (1)= Sim (2)= Não _____
13	Medicamentos:	a) Hipoglicemiantes: (1) = Sim (2) = Não Quais: b) Hipolipemiantes: (1) = Sim (2) = Não Quais: c) Anti-hipertensivos: (1) = Sim (2) = Não Quais: d) Insulina: (1)= Sim (2)= Não Outros:
14	Exames:	Glicemia de jejum: TOTG: Perfil: Pós-prandial: Hb glicada: TSH: Outros:
15	Outras patologias:	

Anexo 3

Método de extração de DNA genômico.

Modificações no método de Lahiri e Nurnberger, 1991.

Etapas	Ações
1	Coletar de 3 a 5 mL de sangue total em tubo de EDTA Centrifugar o tubo de sangue por 10 min a 4000 rpm Remover o plasma Separar o creme leucocitário (*buffy coat*)
2	Em tudo Eppendorf colocar 900 μL de TKM1 contendo NP-40 (ou Triton X-100) a 2,5% Adicionar 250 μL do *buffy coat* Homogeneizar em vortex Centrifugar por 5 min a 10000 rpm Desprezar quase todo o sobrenadante, deixando aproximadamente 500 μL
3	*Completar o volume do tubo com TKM1 (sem NP-40 ou Triton X-100) Homogeneizar em vortex Centrifugar por 5 min a 10000 rpm Desprezar todo o sobrenadante * Repetir esta etapa até que o sedimento esteja limpo
4	Completar o volume do tubo com água ultra pura Homogeneizar em vortex Centrifugar por 5 min a 13000 rpm Desprezar todo o sobrenadante
5	Adicionar ao sedimento: 40 μL de tampão de proteinase K 20 μL de proteinase K 10 μL de SDS 20% 120 μL de água ultra pura Homogeneizar em vortex Colocar em banho-maria 65 ºC por 40 min Em 20 min de banho-maria, homogeneizar novamente os tubos em vortex
6	Tirar os tubos do banho-maria e esfriar em temperatura ambiente Adicionar 100 μL de Cloreto de Sódio 6M Homogeneizar Centrifugar por 10 min a 13000 rpm
7	Transferir o **SOBRENADANTE** para um novo tubo Eppendorf Adicionar 700 μL de etanol absoluto Homogeneizar por inversão Centrifugar por 2 min a 13000 rpm Desprezar sobrenadante
8	Adicionar 700 μL de etanol 70% Homogeneizar em vortex Centrifugar por 2 min a 13000 rpm Desprezar sobrenadante Deixar os tubos secar em temperatura ambiente, estufa a 37 ºC, ou em bloco de aquecimento a 65 ºC
9	Depois de seco, reconstituir com 80 a 100 μL de água ultra pura Homogeneizar bem em vortex Deixar 1 hora a 65 ºC