

Lisangela Cristina Oliveira

**Investigação de associação das variantes do nucleotídeo
-116 do gene *BCHE* da butirilcolinesterase em diabete
melito tipo 1.**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a Dr^a Cyntia M. Telles Fadel-Picheth.

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Eleidi A. Chautard-Freire-Maia.

**Curitiba
2006**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Dra. Eleidi Alice Chautard-Freire Maia sou muito grata pelo ensinamento científico do qual jamais esquecerei e muito enriqueceu a minha vida profissional, por abrir as portas do Laboratório de Polimorfismo e Ligação e da sua sala para a realização deste trabalho, por sua dedicação, e incentivo.

À Prof^a Dra. Cynthia Fadel Pichet, minha orientadora que muito contribuiu através de sua visão crítica e minuciosa, sempre atenta à detalhes importantes.

À Prof^a Dra. Vânia Manfredini de Alcântara, por quem tenho muito carinho desde os remotos tempos da iniciação científica e que sempre incentivou e acreditou num potencial que nem eu mesma acreditava. Obrigada pela confiança, credibilidade, dedicação e orientação ao longo dos longos 10 anos que se passaram.

À Prof^a Dr^a Almeriane Santos pela competência, carinho e dedicação. Por ensinar com amor e entusiasmo nos fazendo “viajar” na hematopoiese e sonhar que um dia possamos ter tanta didática quanto ela.

Aos colegas de Laboratório de Polimorfismo e Ligação, do Departamento de Genética da UFPR, pela companhia sempre agradável, por ter dividido o espaço, as experiências as soluções de poliacrilamida e outras. Principalmente ao Prof. Dr. Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza, que sempre sorridente, dedicado e prestativo contribuiu imensamente na realização do trabalho prático e na elucidação de dúvidas teóricas também. A Cristiana amiga fiel. A Lupe, que no “recordar é viver” de quando nos encontrávamos, mesmo que esporadicamente, contribuiu para o meu crescimento pessoal e científico.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas e ao Programa da Pós-Graduação em Genética da UFPR (aos demais Laboratórios do Departamento de Genética da UFPR que colaboraram emprestando equipamentos e soluções quando necessário).

Aos colegas de mestrado do Curso de Ciências Farmacêuticas do Departamento de Farmácia da UFPR, que passaram a grandes amigos: Caroline Luise Prochaska, Ângela Florão, Jeanine Marie Nardin e Juliana Borges Negrão, obrigada pelo apoio e amizade.

Ao Dr. Luiz Marcelo LaValle, Denise Vilarinho e Luciana Kotaka, pelo seu profissionalismo e competência.

A minha amiga do coração Simone Graebin, pela sua sensatez, dedicação, preocupação, carinho e amizade em todos os momentos da vida, e principalmente por sua presença.

A minha mãe Terezinha, pelo esforço e dedicação que me possibilitou o acesso e conclusão à graduação, primeira passo rumo a realização deste e pelo fato de existir.

Aos meus irmãos: Luiz Cezar, por ter sido grande incentivador desse projeto e por seu carinho tímido. E ao Branco pelo carinho, compreensão e solidariedade.

A todos que de alguma forma contribuíram para que eu chegasse até aqui, que não foram citados mais com certeza estão no meu coração.

Mas principalmente agradeço a Ele o Grande Incentivador e Promotor de mais uma realização, DEUS. Por ser essa energia maravilhosa que nos conforta, dá a força necessária para superar os obstáculos, lucidez nas decisões e luz no momento mais difícil.

“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe Tudo. Todos nós sabemos alguma coisa. Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso, aprendemos sempre”.

Paulo Freire

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS, QUADROS E TABELAS.....	VII
LISTA DE ABREVIACÕES.....	X
RESUMO.....	XI
ABSTRACT.....	XII
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	2
2.1. NOMENCLATURA.....	2
2.2. ESTERASES.....	2
2.3. ESTRUTURA E FORMAS MOLECULARES DA BChE.....	3
2.4. O GENE BCHE: LOCALIZAÇÃO E ESTRUTURA.....	4
2.5. VARIABILIDADE GENÉTICA.....	5
2.6. FUNÇÃO DA BChE.....	10
2.7. DIABETE MELITO.....	12
2.8. GENÉTICA DO DM1.....	17
2.9. BUTIRILCOLINESTERASE E DIABETE MELITO.....	18
3. OBJETIVOS.....	21
3.1. OBJETIVO GERAL.....	21
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
4.1. MATERIAL.....	22
4.1.1. Amostras de pacientes diabéticos do tipo 1.....	22
4.1.2. Amostra do grupo controle.....	23
4.2. MÉTODOS LABORATORIAIS.....	23
4.2.1. Extração do DNA genômico das amostras de sangue periférico.....	23
4.2.2. Quantificação e diluição do DNA genômico das amostras de diabéticos do tipo 1.....	24
4.2.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR) do Exon 1.....	25
4.2.4. Análise do DNA amplificado, pela Técnica de SSCA (Análise Conformacional da Fita Simples).....	25
4.2.5. Coloração do gel de poliacrilamida a 10%.....	27
4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27
4.3.1. STATISTICA for Windows (STATSOFT, Tulsa).....	28
4.3.2. CLUMP (Sham e Curtis, 1995).....	28

4.3.3. ARLEQUIM 2.000 (Schneider et al., 2000).....	28
4.3.4. ODDS RATIO	29
4.3.5. TESTE DE NEWMAN KEULS.....	30
5. RESULTADOS	31
5.1. PCR-SSCA DO EXON 1 DO GENE BCHE.	31
5.2. RESULTADOS DA ANÁLISE ESTATÍSTICA.	32
6. DISCUSSÃO	45
6.1 DADOS DA LITERATURA DE IMPORTÂNCIA PARA O ESTUDO.....	45
6.2 ANÁLISES DE ASSOCIAÇÃO	45
7. CONCLUSÃO.....	50
8. BIBLIOGRAFIA.....	51
APÊNDICE	64
ANEXO 1	65

LISTA DE FIGURAS, QUADROS E TABELAS

	Página
FIGURA 1: Desenho esquemático do gene BCHE, mostrando sua localização no cromossomo 3 humano (fonte: NCBI, acessado em 04/05/2006). Em detalhe os quatro exons e os três introns com os respectivos números de pares de bases que os compõem. A área escura (1722 pb) representa a região que codifica a proteína madura.....	05
QUADRO 1: Variantes descritas para o gene BCHE.....	08
QUADRO 2: Identificação clínica da Síndrome Metabólica.....	13
QUADRO 3: Outros tipos de diabetes melito.....	15
QUADRO 4: Valores de glicose plasmática (em mg/dL) para diagnóstico de diabetes melito e seus estágios pré-clínicos.....	16
QUADRO 5: Sequências dos iniciadores utilizados para amplificar o fragmento de DNA no qual se encontra o nucleotídeo -116 do exon 1.....	25
TABELA 1: Condições da corrida eletroforética em gel de poliacrilamida para a técnica de SSCA para o exon 1 do gene <i>BCHE</i>	26
QUADRO 6: Esquema para o cálculo de OR.....	29
FIGURA 2: Reprodução de uma placa de gel de poliacrilamida (10%) mostrando padrão de SSCA do exon 1 amplificado pelos iniciadores E1F e E1R. Na posição 1 está representada amostra de heterozigoto <i>-116G/-116A</i> e na posição 2 amostra de homozigoto <i>-116G/-116G</i>	31
FIGURA 3: Reprodução de uma placa de gel de poliacrilamida (10%) mostrando padrão de SSCA do exon 1 amplificado pelos iniciadores E1F e E1R. Na posição 1 está representada amostra de homozigoto <i>-116G/-116G</i> e na posição 2 amostra de homozigoto <i>-116A/-116A</i>	31
FIGURA 4: Reprodução de uma placa de gel de poliacrilamida (10%) mostrando padrão de SSCA do exon 1 amplificado pelos iniciadores E1F e E1R. Nas posições 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9 e 11 estão representadas amostras de homozigotos <i>-116G/-116G</i> e nas posições 2 e 5 amostras de são heterozigotas <i>-116G/-116A</i> ; na posição 10 está representada amostra de homozigoto <i>-116A/-116A</i>	32

TABELA 2: Frequências genóticas e alélicas das amostras de diabéticos do tipo 1 (DM1) e do grupo controle, referentes ao nucleotídeo -116 do exon 1 do gene <i>BCHE</i> , e comparações dessas frequências nas diferentes amostras.....	34
TABELA 3: Frequências de genótipos referentes aos nucleotídeos -116 do exon 1 e 1615 do exon 4 do gene <i>BCHE</i> , das amostras de diabéticos do tipo 1 (DM1) e do grupo controle, e comparações dessas frequências nas diferentes amostras.....	35
TABELA 4: Comparações entre as diferentes amostras, quanto às frequências genóticas, referentes aos nucleotídeos -116 do exon 1 e 1615 do exon 4 do gene <i>BCHE</i> , com base nos dados da tabela anterior.....	36
TABELA 5: Frequências haplotípicas das amostras de diabéticos do tipo 1 (DM1) e do grupo controle, referentes aos nucleotídeos -116 do exon 1 e 1615 do exon 4 do gene <i>BCHE</i> , e resultados das comparações dessas frequências nas diferentes amostras.....	37
TABELA 6: Comparações entre as frequências haplotípicas das amostras de diabéticos do tipo 1 (DM1) e do grupo controle, referentes aos nucleotídeos -116 do exon 1 e 1615 do exon 4 do gene <i>BCHE</i> , considerando-se o número absoluto de haplótipos, calculados com base nos dados da tabela anterior1.....	38
TABELA 7: Valores de “Odds ratio” e de Intervalo de Confiança (IC).....	39
TABELA 8: Médias (\pm DP) das variáveis classificadas pelos genótipos do exon 1 (<i>GG</i> e <i>GA + AA</i>).....	40
TABELA 9: Médias (\pm DP) das variáveis classificadas pelos genótipos dos exons 1 e 4.....	41
TABELA 10: Médias (\pm DP) das variáveis classificadas pela mediana da idade de aparecimento do diabetes melito do tipo 1.....	42

TABELA 11: Resultados de análise regressão múltipla escalonada, referente às amostras de diabéticos do tipo 1 (DM1), tendo como variável dependente a idade de aparecimento da doença e as seguintes independentes: genótipo do exon 1 ($GG = 1$ e $GA + AA = 2$), razão cintura quadril, glicose, insulina, índice de massa corporal, atividade da BChE, sexo, colesterol total e triglicérides..... **43**

TABELA 12: Resultados de análise regressão múltipla escalonada, referente às amostras de diabéticos do tipo 1 (DM1), tendo como variável dependente a idade de aparecimento da doença e as seguintes independentes: genótipos dos exons 1 e 4 ($GA/UK + GA/KK + AA/KK = 3$, $GG/UK + GG/KK = 2$ e $GG/UU = 1$), razão cintura quadril, glicose, insulina, índice de massa corporal, atividade da BChE, sexo, colesterol total, e triglicérides..... **44**

LISTA DE ABREVIACÕES

AAA:	arilacilamidase
AChE:	acetilcolinesterase
BChE:	butirilcolinesterase
BCHE:	gene da butirilcolinesterase
DM 1:	diabete melito do tipo 1
DM 2:	diabete melito do tipo 2
DP:	desvio padrão
EDTA:	ácido etilenodiaminotetraacético
EP:	erro padrão
HDL:	lipoproteína de alta densidade
HEMEPAR:	Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná
IA:	Idade de aparecimento da doença
IC:	Intervalo de confiança
IMC:	índice de massa corporal
Lada:	Diabete latente auto-imune do adulto
LDL:	lipoproteína de baixa densidade
ln:	logarítimo neperiano
nt:	nucleotídeo
OR:	Odds ratio
pb:	pares de bases
PCR:	reação em cadeia da polimerase
RCQ:	razão cintura quadril
SSCA:	Análise Conformacional da Fita Simples
TBE:	tris-ácido bórico-EDTA
VLDL:	lipoproteína de muito baixa densidade

RESUMO

A butirilcolinesterase (BChE) é codificada pelo gene BCHE que apresenta alelos polimórficos. O diabetes melito (DM) é uma síndrome de etiologia múltipla, decorrente da falta de insulina e/ou da incapacidade desta exercer adequadamente seus efeitos levando a vários distúrbios metabólicos. O objetivo desse estudo foi investigar possível associação dos alelos do sítio -116 do exon 1 do gene BCHE e o diabetes melito do tipo 1 (DM1), pela comparação da frequência dos alelos -116G e -116A (associado com atividade mais baixa da BChE) em euro-brasileiros (71 com DM1 e 71 doadores de sangue). Essas amostras foram genotipadas pela técnica de PCR-SSCA. Outras variáveis analisadas foram: idade de aparecimento da doença (IA), sexo, índice de massa corporal, razão cintura quadril, atividade da BChE, glicose, colesterol total, triglicérides, insulina e genótipos do exon 4 do gene BCHE. Os principais resultados foram: 1) A frequência do alelo -116A não difere entre as amostras de DM1 total e controle, 2) Ocorre aumento da frequência do alelo -116A em DM1 com IA \leq 12 anos (OR = 4,62) e de GA + AA (OR = 4,96) em relação ao DM1 com IA > 12 anos; 3) Considerando-se ambos os exons 1 e 4, também foi mostrado aumento estatisticamente significativo da frequência de GA/UK+GA/KK+AA/KK e do haplótipo AK em DM1 com IA \leq 12 anos em relação ao DM1 com IA > 12 anos (OR = 4,37 e OR = 4,19 respectivamente); 5) O grupo com IA \leq 12 anos mostrou média estatisticamente maior de concentração de glicose ($p = 0,011$) que o grupo com IA > 12 anos. Conclui-se que a presença do alelo -116A leva a um maior risco relativo do indivíduo apresentar DM1 em idade precoce. Um vez que o grupo de DM1 com IA precoce não diferiu daquele com IA > 12 anos quanto à media de atividade da BChE, sugere-se que -116A não seja o responsável pelo aparecimento precoce do DM1 e sim que se deva outra variação genética em desequilíbrio de ligação com -116A.

ABSTRACT

Butyrylcholinesterase (BChE) is coded by the BCHE gene that presents polymorphic alleles. Diabetes mellitus (DM) is a syndrome of multiple etiology due to the lack of insulin and/or the impossibility of insulin to function properly, leading to several metabolic disturbances. The aim of this study was to investigate the possible association of alleles of the -116 site of exon 1 of the BCHE gene and type 1 diabetes mellitus (DM1) by comparing the frequency of alleles -116G and -116A (the latter associated with lower BChE activity) in Euro-Brazilians (71 DM1 patients and 71 blood donor controls). These samples were genotyped by the PCR-SSCA technique. The other analyzed variables were: age of disease overt (AO), sex, body mass index, waist hip ratio, BChE activity, glucose, total cholesterol, triglycerides, insulin and genotypes of the exon 4 of the BCHE gene. The main results were: 1) The frequency of the -116A allele does not differ in the total DM1 and the control samples, 2) Increased frequency in DM1 with $AO \leq 12$ years of the -116A allele (OR = 4.62) and of the GA + AA genotype class (OR = 4.96) in relation to DM1 with $AO > 12$ years was verified; 3) Considering both exons 1 and 4, statistically significant increase in the frequency of GA/UK+GA/KK+AA/KK and of the AK haplotype in DM1 with $AO \leq 12$ years in relation to DM1 with $AO > 12$ years (OR = 4.37 and OR = 4.19, respectively) was also shown; 4) The group with $AO \leq 12$ years showed statistically higher mean of glucose concentration ($p = 0.011$) than the group with $AO > 12$ years. It is concluded that the presence of the -116A allele leads to a higher relative risk of an individual to manifest DM1 at an earlier age. Considering that the group with DM1 with earlier AO did not differ from that with $AO > 12$ years in relation to the mean of BChE activity, it is suggested that the -116A allele is not responsible for the overt of DM1 at an earlier age and that this condition is due to another genetic variation in linkage disequilibrium with the -116A allele.

1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

Este estudo comparou as freqüências das variantes do nucleotídeo -116 em diabéticos do tipo 1 com as encontradas em doadores de sangue de Curitiba, e verificou se as associações entre a idade precoce de aparecimento da doença se devem apenas à variação *A539T* ou essa variação junto com a *-116A*.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. NOMENCLATURA

A butirilcolinesterase é designada por BChE e o gene que a condiciona por *BCHE*. Além da enzima usual (U) existem diversas variantes da BChE, sendo as principais *A*, *F-1*, *F-2*, *SC*, *H*, *J*, *K*, designações estabelecidas na literatura. Entretanto, recentemente uma nova nomenclatura foi sugerida com base nas alterações que as mutações provocam nas seqüências de DNA e de proteínas (DEN DUNNEN e ANTONORAKIS, 2000).

Segundo DEN DUNNEN e ANTONARAKIS (2000), a nomenclatura deve ser acurada e não ambígua, mas flexível e a troca de nucleotídeo deve sempre estar incluída no relato original. Esses autores recomendam que:

- Deve-se evitar relatar mudanças ao nível do aminoácido sem incluir a descrição ao nível do nucleotídeo;
- Códon de término são designados por X;
- O código de uma letra do aminoácido é recomendado, código de três letras é aceitável;
- Mudanças de aminoácidos são descritas no formato, incluindo o código do aminoácido alterado; número do aminoácido; código do novo aminoácido;
- Deleções são designadas por “del” depois do número de aminoácido;
- Inserções são designadas por “ins” depois do número do aminoácido, seguidas pelos aminoácidos inseridos;
- Mudanças na matriz de leitura são indicadas por “fs”.

2.2. ESTERASES

As esterases compreendem uma ampla variedade de enzimas presentes nos vertebrados. De acordo com a União Internacional de Bioquímica, são enzimas capazes de realizar a hidrólise de ligações éster que em humanos, são classificadas em três grupos, conforme o substrato sobre o qual preferencialmente atuam. As arilesterases ou

esterases aromáticas hidrolisam ésteres aromáticos. As aliesterases apresentam maior afinidade por ésteres alifáticos; e as colinesterases são mais eficientes na hidrólise de ésteres de colina (SOMORIN E SKOREPA, 1978). As colinesterases são inibidas pela fisostigmina na concentração de 10^{-5} M, o que as diferencia das demais esterases (AUGUSTINSSON, 1963). As colinesterases de vertebrados são a butirilcolinesterase (EC 3.1.1.8) e a acetilcolinesterase (AChE; EC 3.1.1.7). A BChE difere da AChE, pois a última hidrolisa a acetilcolina em níveis fisiológicos, sendo inibida quando essa está em alta concentração, enquanto a BChE tem sua atividade aumentada nessa condição (ALLES E HAWES, 1940). A BChE hidrolisa ésteres de colina, mas é mais eficiente sobre a butirilcolina. A AChE, presente principalmente na membrana dos eritrócitos e junções neuromusculares, regula os níveis de acetilcolina, interrompendo a ação desta nas sinapses colinérgicas, através da sua hidrólise em colina e acetato.

2.3. ESTRUTURA E FORMAS MOLECULARES DA BChE

HARRIS e cols. (1962) encontraram quatro bandas com atividade da BChE humana em eletroforese de gel de amido, que foram chamadas de C_1 a C_4 em ordem decrescente de mobilidade. Estudos posteriores mostraram que C_1 corresponde ao monômero, C_3 ao dímero e C_4 ao tetrâmero (MUENSCHE e cols., 1976). A banda C_2 é resultado da ligação do monômero à albumina (MASSON, 1989).

HARRIS e cols. (1962), utilizando eletroforese bidimensional em papel e em gel de amido, observaram que alguns indivíduos exibiam uma banda adicional da BChE. A presença dessa banda adicional, chamada de C_5 , caracteriza o fenótipo CHE2 $C5+$ e a sua ausência, o fenótipo CHE2 $C5-$. Essa característica é controlada pelo gene *CHE2*, que apresenta dois alelos: *CHE2** $C5+$ e *CHE2** $C5-$. Indivíduos de fenótipo CHE2 $C5+$ representam cerca de 10% da população brasileira (CHAUTARD FREIRE-MAIA, 1991) e apresentam atividade enzimática da BChE cerca de 20% superior a de indivíduos CHE2 $C5-$. Admite-se que o loco *CHE2* codifica uma substância que se liga a BChE e forma o complexo C_5 (MASSON, 1991).

A forma predominante e de maior atividade da BChE no plasma é o tetrâmero, constituído por um dímero de dímeros de subunidades idênticas. As subunidades de

cada dímero estão unidas por uma ligação dissulfeto e os dímeros unem-se através de forças hidrofóbicas não covalentes. Cada monômero é uma cadeia de 574 resíduos de aminoácidos, com 9 cadeias de carboidratos ligadas a 9 asparaginas (LOCKRIDGE e cols., 1987). As cadeias de carboidratos parecem não interagir com moléculas do substrato, pois estariam distantes da entrada do sítio esterásico (MILLARD e BROOMFIELD, 1992) localizado no interior da molécula e ligado ao exterior por um túnel, cuja tríade catalítica seria formada por serina na posição 198, ácido glutâmico em 325 e histidina em 438 (SHAFFERMAN e cols., 1992). Detalhes da estrutura cristal da BChE são encontrados em NICOLET e cols., 2003).

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

2.4. O GENE *BCHE*: LOCALIZAÇÃO E ESTRUTURA

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

ARPAGAUS e cols. (1990), utilizando cDNA da butirilcolinesterase humana, isolaram clones de uma biblioteca genômica contendo o gene *BCHE* e, através da análise de mapas de restrição, puderam delinear sua estrutura. Esse gene é composto por 4 exons, formados por 2.445 pares de bases (pb). A região que codifica a proteína madura abrange grande parte do exon 2, todo o exon 3 e parte do exon 4, conforme mostrado na figura 1. O exon 2 também codifica a seqüência líder.

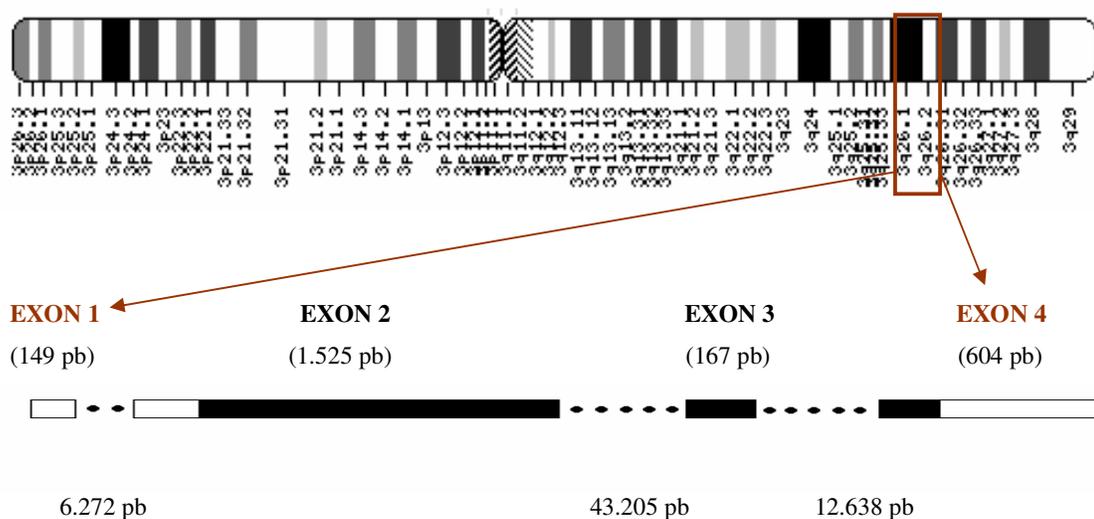


FIGURA 1: Desenho esquemático do gene *BCHE*, mostrando sua localização no cromossomo 3 humano (fonte: NCBI, acessado em 04/05/2006). Em detalhe os quatro exons e os três introns com os respectivos números de pares de bases que os compõem. A área escura (1722 pb) representa a região que codifica a proteína madura.

A BChE é formada por 574 resíduos de aminoácidos, sendo que proteína madura é codificada por apenas 1722 pb, os 723 pb não codificantes da enzima madura correspondem ao exon 1, à parte inicial do exon 2 e à parte final do exon 4. No exon 1, há dois potenciais sítios de início de tradução, correspondentes aos códons -69 e -47. O nucleotídeo (nt) +1 está contido no exon 2, além de um terceiro possível sítio de início de tradução no códon -28. O exon 2 contém 1.525 pares de bases da sequência codificadora correspondente a 83% da proteína madura (NCBI, acessado em 04/05/2006).

2.5. VARIABILIDADE GENÉTICA

Diversos alelos são responsáveis pela variabilidade da BChE. O uso da succinilcolina como relaxante muscular pré-operatório, na década de 50, possibilitou a descoberta da variabilidade da BChE. As técnicas clássicas de fenotipagem baseiam-se na quantificação da atividade enzimática sobre substratos como a benzoilcolina e alfa-naftil acetato sob o efeito de inibidores diferenciais como a dibucaína (KALOW e GENEST, 1957), o fluoreto de sódio (HARRIS e WHITTAKER, 1961), o DL-

propranolol (WHITTAKER e cols., 1981) e o Ro2-0683 (MORROW e MOTULKY, 1968). Posteriormente o aperfeiçoamento das técnicas de análise do DNA permitiu a determinação da base molecular de variantes conhecidas e a descoberta de novas mutações (Quadro 1).

KALOW e GENEST (1957) demonstraram, pela primeira vez, a existência de uma enzima qualitativamente diferente da “usual”, denominada “atípica”, essa variante não consegue hidrolisar a succinilcolina em doses fisiológicas o que causa nos pacientes paralisia muscular e apnéia prolongada. McGUIRE e cols. (1989) mostraram que esta diferença deve-se a uma mutação de ponto no nucleotídeo 209 (GAT para GGT). Os mesmos autores sugeriram que a substituição de um ácido aspártico por uma glicina geraria uma modificação no sítio aniônico da enzima, o que explicaria sua afinidade reduzida por ésteres de colina, que são positivamente carregados. A frequência do alelo “atípico”, *D70G*, foi estimada em cerca de 2% em populações caucasóides (WHITTAKER, 1986).

HARRIS e WHITTAKER (1961) utilizaram o fluoreto de sódio como inibidor diferencial e descreveram uma outra variante, chamada “resistente ao fluoreto”. A frequência desse alelo foi estimada em 0,49 % em nordestinos (SIMPSON E KALOW, 1965) e 0,51% e 0,61% em amostras da população de Curitiba, por ALCÂNTARA e cols. (1991) e FADEL-PICHETH (1991), respectivamente. Posteriormente, NOGUEIRA e cols. (1992) mostraram que esse fenótipo é heterogêneo e distinguiram duas mutações. A mutação F-1 é condicionada pelo alelo *T243M*, causado por uma mutação de ponto que altera a treonina 243 para metionina (ACG para ATG). A mutação F-2 é condicionada pelo alelo *G390V*, onde a mutação de ponto altera a glicina 390 para valina (GGT para GTT). MIKAMI (2005) estudou uma amostra da população de Curitiba através da análise do DNA e encontrou frequência de 0,28%, tanto para o alelo *T243M*, como para o alelo *G390V*.

A variante K (em homenagem a Werner Kalow), determinada pelo alelo *A539T*, foi descrita pela primeira vez por RUBINSTEIN e cols. (1978), que estudaram duas famílias na qual indivíduos heterozigotos para a variante “atípica” apresentavam inibição diminuída pela dibucaína e redução de 33% na atividade enzimática, quando comparada com a enzima usual. Essa redução deve-se ao número menor de moléculas circulantes, por degradação acelerada ou síntese diminuída da enzima.

ALTAMIRANO e cols. (2000), ao comparar a enzima usual com a determinada pela mutação K, 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, associado ao fenótipo K, pode ser causado por mutações na região regulatória ou promotora do gene BCHE.

A mutação *A539T* causa a substituição de uma alanina por treonina. Em cerca de 89% dos casos da mutação “atípica”, ela está em cis com a mutação *K* (BARTELS e cols., 1992a).

O alelo *A539T* é o mais freqüente entre os alelos não usuais do gene *BCHE*. As freqüências desse alelo, estimadas por SOUZA e cols. (1998), foram de 18,4% em euro-brasileiros (N = 190) e de 17,1% em miscigenados oriundos de europeus e africanos (N = 82), em amostras coletadas em Curitiba. Posteriormente, SOUZA (2001), ao ampliar a amostra de euro-brasileiros (N = 898), encontrou freqüência semelhante (17,8%).

LEPIENSKI e cols. (2006) estudaram a mutação *K* em um grupo de diabéticos do tipo 1 (N = 72) e concluíram que a freqüência dessa mutação no grupo de diabéticos não difere estatisticamente da encontrada no grupo controle (N = 886). Entretanto, um estudo mostrou que existe um aumento na freqüência do alelo *A539T* no grupo de diabéticos tipo 1 com aparecimento precoce da doença (≤ 12 anos), em relação ao grupo com aparecimento mais tardio (> 12 anos) e o grupo controle (LEPIENSKI e cols., 2006), o que levou a duas possíveis interpretações: 1) O alelo *K* não é um fator de risco para o DM1, somente predispõe para a manifestação precoce desta doença; 2) O DM1 é uma doença de etiologia heterogênea, e o alelo *K* está possivelmente associado apenas a um tipo específico de DM1 com idade de aparecimento precoce.

Na região não codificadora do gene *BCHE* no exon 1 existe uma variante do nucleotídeo -116 (TGC/TAC) com freqüência de 8% na população (BARTELS e cols., 1990). FURTADO (2005) estudou a variante -116A do exon 1 (G \rightarrow A), descrita por BARTELS e cols. (1990). Observou que cerca de 90% dos cromossomos com a mutação -116A também possuem a mutação *A539T*. O trabalho de FURTADO (2005) mostrou que a atividade mais baixa da BChE, antes atribuída à presença da mutação *A539T*, deve-se à presença conjunta de *A539T* e -116. Não há informação sobre o efeito isolado da -116A, uma vez que quase a totalidade dessa mutação está em cis com a mutação *K*.

Os fenótipos silenciosos são caracterizados por uma redução entre 90 a 100% na atividade enzimática. São muito raros na população em geral e mostram grande heterogeneidade genética. Vários alelos determinantes desta condição já foram descritos e são apresentados no Quadro 1, juntamente com outros alelos do gene *BCHE*.

QUADRO 1: Variantes descritas para o gene *BCHE*.

Alteração de nucleotídeo	Nome ^b	Referência
Exon 1		
-116; G → A		BARTELS e cols., 1990
Exon 2		
9 to 11; CATCAT → CAT	<i>I4del</i>	MAEKAWA e cols., 1997
16; ATT → TT	<i>I6fs</i>	BARTELS e cols., 1992b; PRIMO-PARMO e cols., 1996;
35; AAA → AGA	<i>K12R</i>	MIKAMI, 2005
45; GGG → GGC	<i>G15G</i>	MIKAMI, 2005
71; ACG → ATG	<i>T24M</i>	MAEKAWA e cols., 1997
82; TTT → ATT	<i>F28I</i>	YEN e cols., 2003
98; TAT → TGT	<i>Y33C</i>	PRIMO-PARMO e cols., 1996
109; CCT → TCT	<i>P37S</i>	PRIMO-PARMO e cols., 1996
208; GAT → CAT	<i>D70H</i>	BOEK e cols., 2002
209; GAT → GGT	<i>D70G (A)</i>	MCGUIRE e cols., 1989
223; GGC → CGC	<i>G75R</i>	SOUZA e cols., 2005b
270; GAA → GAC	<i>E90D</i>	SOUZA e cols., 2005b
286; AAT → TAT	<i>N96Y</i>	YEN e cols., 2003
297; ATT → ATG	<i>I99M</i>	SOUZA e cols., 2005b
298; CCA → TCA	<i>P100S</i>	MAEKAWA e cols., 1997; TAKAGI e cols., 1997; LU e cols., 1997
318; AAT → AAAT	<i>N106fs</i>	YEN e cols., 2003
344; GGT → GAT	<i>G115D</i>	PRIMO-PARMO e cols., 1997
351; GGT → GGAG	<i>G117fs</i>	NOGUEIRA e cols. 1990
355; CAA → TAA	<i>Q119X</i>	SUDO e cols., 1997
375; TTA → TTT	<i>L125F</i>	PRIMO-PARMO e cols., 1996
383; TAT → TGT	<i>Y128C</i>	HIDAKA e cols., 1997
		Continua →

Alteração de nucleotídeo	Nome^a	Referência
424; GTG → ATG	<i>V142M (H)</i>	JENSEN e cols., 1992
486; GCT → GCC	<i>A162A</i>	SOUZA e cols., 2005b
510; GAT → GAG	<i>D170E</i>	PRIMO-PARMO e cols., 1996
514; CAG → TAG	<i>Q172X</i>	GÄTKE e cols., 2001
551; GCC → GTC	<i>A184V (SC)</i>	GREENBERG e cols., 1995
592; AGT → GGT	<i>S198G</i>	PRIMO-PARMO e cols., 1996
596; GCA → GTA	<i>A199V</i>	SAKAMOTO e cols., 1998
601; GCA → ACA	<i>A201T</i>	PRIMO-PARMO e cols., 1996
607; TCA → CCA	<i>S203P</i>	HIDAKA e cols., 2001
728; ACG → ATG	<i>T243M (F-1)</i>	NOGUEIRA e cols., 1992
748; ACT → CCT	<i>T250P</i>	MAEKAWA e cols., 1995
765; GAG → GAC	<i>E255D</i>	PRIMO-PARMO e cols., 1996
800; AAA → AGA	<i>K267R</i>	MAEKAWA e cols., 1997
811; GAA → TAA	<i>E271X</i>	PRIMO-PARMO e cols., 1996
880; GTG → ATG	<i>V294M</i>	MIKAMI e cols., 2005
943; ACC → AACC	<i>T315fs</i>	HIDAKA e cols., 1992
943; ACC → TCC	<i>T315S</i>	LIU e cols., 2002
988; TTA → ATA	<i>L330I</i>	SUDO e cols., 1997
997; GGT → TGT	<i>G333C</i>	MIKAMI, 2005
1062 - 1076	<i>K355insALU</i>	MURATANI e cols., 1991
1093; GGA → CGA	<i>G365R</i>	HIDAKA e cols., 1992; HADA e cols., 1992
1156; CGT → TGT	<i>R386C</i>	YEN e cols., 2003
1169; GGT → GTT	<i>G390V (F-2)</i>	NOGUEIRA e cols., 1992
1200; TGC → TGA	<i>C400X</i>	HIDAKA e cols., 1997
1253; TTC → TCC	<i>F418S</i>	MAEKAWA e cols., 1995
1270; CGA → TGA	<i>R424X</i>	YEN e cols., 2003
1273; TCC → CCC	<i>S425P</i>	GNAT e cols., 1990
1294; GAA → TAA	<i>E432X</i>	LEVANO e cols., 2005
1303; GGA → AGA	<i>G435R</i>	DEY e cols., 1997
1336; TTT → GTT	<i>F446V</i>	DEY e cols., 1997

Continua →

Alteração de nucleotídeo	Nome^a	Referência
1351; GAA → TAA	<i>E451X</i>	DEY e cols., 1997
1378; GAG → AAG	<i>E460K</i>	YEN e cols., 2003
1393; AGA → TGA	<i>R465X</i>	MAEKAWA e cols., 1995
1408; CGC → TGG	<i>R470W</i>	MIKAMI, 2005
1411; TGG → CGG	<i>W471R</i>	PRIMO-PARMO e cols., 1996
Intron 2		
IVS – 8T → G		PRIMO-PARMO e cols., 1996
Exon 3		
1490; GAA → GTA	<i>E497V (J)</i>	BARTELS e cols., 1992a
1500; TAT → TAA	<i>Y500X</i>	BARTELS e cols., 1992b; PRIMO-PARMO e cols., 1996
1543; CGT → TGT	<i>R515C</i>	MAEKAWA e cols., 1995
1553; CAA → CTA	<i>Q518L</i>	PRIMO-PARMO e cols., 1996
Exon 4		
1615; GCA → ACA	<i>A539T (K)</i>	BARTELS e cols., 1992b
1914; A → G		BARTELS e cols., 1990

^a SOUZA e cols., 2005b (atualizado). ^b Nome comum entre parênteses.

2.6. FUNÇÃO DA BChE

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

Desde a verificação de uma correlação positiva entre a atividade da BChE e o teor de gordura subcutânea (BERRY e cols., 1954), vários trabalhos têm indicado algum envolvimento desta enzima com o metabolismo de lípidos. A atividade da BChE está aumentada em distúrbios como diabete melito (ANTOPOL e cols., 1937), obesidade (CUCUIANU e cols., 1968), hiperlipoproteinemia (CUCUIANU e cols., 1975) e positivamente correlacionada com os níveis de triglicéridos (MAGARIAN e DIETZ, 1987), VLDL e LDL (CHU e cols., 1978). Há evidências de que a BChE forma, por meio de uma ligação física, um complexo com VLDL e participa na origem da LDL

(KUTTY, 1980). Além disso, foi mostrado que indivíduos CHE2 C5+ têm, em média, menor peso que seus controles CHE2 C5- (CHAUTARD-FREIRE-MAIA e cols., 1991), e IMC menor que os CHE2 C5- (ALCÂNTARA e cols., 2001).

LAYER (1983), estudando cérebro de embriões de galinha, observou que tanto a BChE como a AChE são expressas bem antes da sinaptogênese e que existe uma relação espaço-temporal entre essas duas enzimas. Isto levou a propor um papel não colinérgico das duas enzimas e que a BChE regularia a expressão da AChE. Levando em conta a íntima associação da BChE com a proliferação celular no tubo neural de embriões de galinha, LAYER (1983) sugeriu uma função para a BChE no crescimento celular. O mesmo autor mostrou uma ação mitogênica da BChE purificada em células neurais *in vitro*, e sugeriu que inibidores da BChE afetam a proliferação celular. SOREQ e ZAKUT (1993) mostraram uma elevada atividade da BChE em sistemas proliferativos como o hematopoético e em tumores.

Além de hidrolisar ésteres de colina, a BChE apresenta atividade de aril acilamidase amino sensível (AAA), frente ao substrato o-nitroacetanilato (BALASUBRAMANIAN e BHANUMATHY, 1993). Os mesmos autores especulam a possibilidade da BChE degradar analgésicos endógenos, possivelmente existentes no organismo. Argumentam que o paracetamol e o fenacetin apresentam na sua estrutura a ponte acil-amida, semelhante àquela clivada pela AAA (atividade de aril acilamidase amino sensível) e que pacientes com enxaqueca apresentam excesso de tiramina, uma amina vasoativa comumente encontrada em alimentos, e uma das substâncias que estimulam a atividade de AAA da BChE. A similaridade nas seqüências de diferentes esterases, lipases, tireoglobulina, proteínas de adesão celular e colinesterases sugerem que as colinesterases podem exibir mais de uma atividade biológica com funções mais amplas (BALASUBRAMANIAN e BHANUMATHY, 1993).

MESULAM e cols. (2002) analisaram camundongos nulizigotos para a AChE (acetilcolinesterase) e verificaram que todos os componentes anatômicos principais das vias colinérgicas centrais se desenvolveram normalmente. Apesar de não ocorrer aumento compensatório na distribuição da BChE, foi detectada atividade da BChE em todas as áreas do cérebro que recebem inervação colinérgica, tanto nos camundongos nulizigotos para AChE quanto nos camundongos normais. Estes experimentos sugerem que a AChE não é necessária para o estabelecimento das vias colinérgicas e que a BChE

pode substituir a AChE exercendo uma função constitutiva de hidrólise da acetilcolina no cérebro normal.

2.7. DIABETE MELITO

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

As conseqüências do DM a longo prazo decorrem de alterações micro e macrovasculares que levam à disfunção, dano ou falência de vários órgãos. As complicações crônicas incluem a nefropatia, com possível evolução para insuficiência renal, a retinopatia, com a possibilidade de cegueira e/ou neuropatia, com risco de úlceras nos pés, amputações, artropatia de Charcot e manifestações de disfunção autonômica, incluindo disfunção sexual. Indivíduos com diabetes apresentam risco maior de doença vascular aterosclerótica, como doença coronariana, doença arterial periférica e doença vascular cerebral. Os sintomas decorrentes de hiperglicemia acentuada incluem perda inexplicável de peso, poliúria, polidipsia e infecções. Mesmo em indivíduos assintomáticos poderá haver hiperglicemia discreta, porém em grau suficiente para causar alterações funcionais ou morfológicas por um longo período antes que o diagnóstico seja estabelecido (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2003).

A Síndrome Metabólica (SM) pode estar presente até dez anos antes da detecção de alterações glicêmicas, o que caracteriza risco aumentado para diabetes e doença cardiovascular. Existem várias propostas na literatura internacional para definir SM (OMS – Organização Mundial da Saúde, EGIR – European Group for the Study of Insulin Resistance, NCEP – National Cholesterol Education Program e outros), como todas elas apresentam aspectos vulneráveis, nenhuma é ideal. Segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes a definição do NCEP-ATP III (National Cholesterol Education Program – Adult Treatment Panel III) parece ser a mais adequada, por considerar critérios como obesidade central, a valorização de cada uma das alterações lipídicas, por diagnosticar um maior número de indivíduos hipertensos e por dispensar exames laboratoriais mais complexos. Essa definição considera portador da SM o indivíduo que

apresentar três dos componentes apresentados no quadro 2 (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2005).

QUADRO 2: Identificação clínica da Síndrome Metabólica

Diferentes propostas para caracterização da síndrome metabólica	
Características	OMS, 1999
Hipertensão arterial	Uso de anti-hipertensivos ou PA \geq 140/90mmHg
Dislipidemia	TG \geq 150mg/dL HDL $<$ 35 mg/dL (H) e $<$ 39 mg/dL(M)
Obesidade	IMC \geq 30kg/m ² e/ou C/Q $>$ 0,9 (H) e $>$ 0,85 (M)
Tolerância à glicose	DM2 ou tolerância à glicose diminuída no TOTG ou resistência à insulina
Outras	Microalbuminúria (excreção de albumina em amostra noturna $>$ 20 mcg/min) ou razão albumina/creatinina \geq 30mg/g
Condições necessárias ao diagnóstico	DM2 ou tolerância à glicose diminuída Ou resistência à insulina e mais duas alterações

OMS: Organização Mundial da Saúde; NCEP_ATPIII: National Cholesterol Education Program – Adult Treatment Panel III; AACE: Associação Americana de Endocrinologistas Clínicos; PA: pressão arterial; TG: triglicérides; IMC: índice de massa corporal, ACE: American College of Endocrinology

Referência: Sociedade Brasileira de Diabetes 2005, revisão 2006.

A classificação atualmente recomendada incorpora o conceito de estágios clínicos do DM, desde a normalidade, passando para a tolerância à glicose diminuída e/ou glicemia de jejum alterada, até o DM propriamente dito. A nova classificação, baseada na etiologia do DM, elimina os termos diabete melito-insulino dependente (IDDM) e não-insulinodependente (NIDDM), esclarece que:

O DM do tipo 1 resulta primariamente da destruição das células beta pancreáticas e tem tendência à cetoacidose. Inclui casos decorrentes de doença auto-imune e aqueles nos quais a causa da destruição das células beta não é conhecida. Corresponde de 5% a 10% do total de casos de diabete. A forma rapidamente progressiva é comumente observada em crianças e adolescentes, porém pode ocorrer também em adultos. A forma lentamente progressiva ocorre geralmente em adultos e é referida como diabete latente auto-imune do adulto (Lada).

DM do tipo 2 resulta, em geral, de graus variáveis de resistência à insulina e deficiência relativa de secreção de insulina. A maioria dos pacientes tem excesso de peso e a cetoacidose ocorre apenas em situações especiais. Na maioria dos casos, o tipo 2 ocorre a partir dos 40 anos de idade, embora possa ocorrer mais cedo, mas raramente em adolescentes. Abrange 85% a 90% do total de casos de diabete, sendo que sua

incidência vem crescendo entre crianças e jovens, em associação ao aumento da incidência de obesidade, o que pode causar ou agravar a resistência à insulina também em adultos. Há, provavelmente, diversos mecanismos diferentes que podem resultar nesta forma de diabetes e é provável que o número de pessoas nesta categoria diminua no futuro, quando a identificação de defeitos genéticos e processos patogênicos específicos permitam uma diferenciação e uma classificação mais definitiva. Dessa forma, esses casos migrariam para a categoria “outros tipos de DM”, descrita mais adiante (quadro 2.3). Embora a etiologia específica do diabetes do tipo 2 não seja conhecida, por definição, não ocorre destruição auto-imune de células β -pancreáticas e tais pacientes não apresentam nenhuma das causas específicas da categoria “outros tipos”.

O DM gestacional é a diminuição da tolerância à glicose, de magnitude variável, diagnosticada pela primeira vez na gestação, podendo ou não persistir após o parto. Abrange os casos de DM e de tolerância à glicose diminuída detectados na gravidez.

A categoria “outros tipos de DM” (quadro 3) contém várias formas de diabetes decorrentes de defeitos genéticos associados com outras doenças ou com uso de fármacos diabetogênicos.

QUADRO 3: Outros tipos de diabetes melito.

Outros tipos de DM	Causas
Defeitos funcionais das células beta	Cromossomo 20, HNF4 α (MODY1) Cromossomo 7, glucoquinase (MODY2) Cromossomo 12, HNF1 α (MODY3) Cromossomo 13, IPF-1 (MODY4) Mutação 3243, DNA mitocondrial
Defeitos genéticos na ação da insulina	Resistência Tipo A à insulina Leprechaunismo Síndrome de Rabson-Mendenhall Diabetes Lipoatrófica
Doenças do pâncreas exócrino	<i>Fibrocalculous pancreatopathy</i> Pancreatites Trauma/ pancreatotomia Neoplasia Fibrose cística Hemocromatose
Endocrinopatias	Síndrome de Cushing's Acromegalia Feocromocitoma Glucagonoma Hipertireoidismo Somatostatina
Induzidos por fármacos ou agentes químicos	Corticosteróides Betabloqueadores Tiazídicos
Infecções	Rubéola congênita Citomegalovirus
Formas incomuns de diabetes imuno-mediado	Síndrome da insulina auto-imune (anticorpos para insulina) Receptor de anticorpos anti-insulina Síndrome "Stiff Man"
Outras síndromes genéticas	

Referência: Sociedade Brasileira de Diabetes 2003.

A evolução para o diabetes melito ocorre ao longo de um período de tempo variável, passando por estágios intermediários que recebem as denominações de glicemia de jejum alterada e tolerância à glicose diminuída. O primeiro representa evidência precoce de disfunção de célula beta; o segundo, na presença de glicemia de jejum normal, representa quadro de resistência insulínica. Na presença de ambos, haveria um quadro misto, com maior risco para progressão para diabetes e doença cardiovascular (Sociedade Brasileira de Diabetes 2003).

Os critérios diagnósticos dos estágios de glicemia de jejum alterada e tolerância à glicose diminuída estão contidos no Quadro 4. Baseiam-se nas novas recomendações e incluem valores de glicemia de jejum medidos no soro ou plasma, que pela praticidade constituem o procedimento básico empregado para fazer o diagnóstico de Diabetes melito (DM). No entanto, estudos recentes têm demonstrado a importância de se realizar ainda o teste de tolerância à glicose, quando a glicose plasmática de jejum for

$\geq 110\text{mg/dL}$ e $< 126\text{mg/dL}$, ou, a glicose plasmática for $< 110\text{mg/dL}$ e estiverem presentes dois ou mais fatores de risco para DM nos indivíduos com idade ≥ 45 anos. Qualquer dos estágios, pré-clínicos ou clínicos, pode caminhar em ambas as direções, progredindo para o estado diabético ou revertendo para a normalidade da tolerância à glicose.

Os procedimentos diagnósticos empregados são a medida da glicose no soro ou plasma após jejum de oito a 12 horas e o teste padronizado de tolerância à glicose (TTG), após administração de 75 gramas de glicose anidra (ou dose equivalente) por via oral, com medidas de glicose no soro ou plasma nos tempos 0 e 120 minutos após a ingestão.

QUADRO 4: Valores de glicose plasmática (em mg/dL) para diagnóstico de diabetes melito e seus estágios pré-clínicos.

CATEGORIA	JEJUM*	2h APÓS 75g DE GLICOSE	CASUAL**
Glicemia normal	< 110	< 140	
Tolerância à glicose diminuída	> 110 a < 126	≥ 140 a < 200	
Diabetes melito	≥ 126	≥ 200	≥ 200 (com sintomas clássicos) ***

* O jejum é definido como a falta de ingestão calórica por no mínimo oito horas.

** Glicemia plasmática casual é definida como aquela realizada a qualquer hora do dia, sem se observar o intervalo desde a última refeição.

*** Os sintomas clássicos de DM incluem poliúria, polidipsia e perda inexplicada de peso.

Nota: O diagnóstico de DM deve sempre ser confirmado pela repetição do teste em outro dia, a menos que haja hiperglicemia inequívoca com descompensação metabólica aguda ou sintomas óbvios de DM.

Os fatores de risco para o diabetes melito do tipo 2 incluem: idade ≥ 45 anos, história familiar de DM (pais, filhos e irmãos), excesso de peso ($\text{IMC} \geq 25 \text{ kg/m}^2$), sedentarismo, HDL – colesterol baixo ou triglicérides elevados, hipertensão arterial, DM gestacional prévio, macrossomia ou história de abortos de repetição ou mortalidade perinatal, uso de medicação hiperglicemiante, por exemplo: corticosteróides, tiazídicos, betabloqueadores (Sociedade Brasileira de Diabetes 2003).

Entre os anos de 1986 a 1989 o Ministério da Saúde, a Sociedade Brasileira de Diabetes e o CNPq uniram-se para realizar uma pesquisa quanto a prevalência do Diabetes no Brasil, essa estimou entre a população na faixa etária de 30 a 69 anos uma prevalência de 7,5 % na população brasileira, 50% desses indivíduos desconheciam o diagnóstico de DM. Hoje se estima que 2,5 milhões de pessoas sejam portadoras da

doença, que apresenta maior incidência nos estados de São Paulo e Rio Grande do Sul (Sociedade Brasileira de Diabetes 2003. www.diabete.org.br, acessado em 03/05/2006).

2.8. GENÉTICA DO DM1

O diabetes do tipo 1 apresenta uma associação com os genes do sistema HLA, estes são responsáveis por cerca de 44% do risco genético para essa doença. Os genes mais relacionados estão entre os da classe II, região D (*DRB*, *DQA* e *DQB*), especialmente os alelos *DRB1*0401*, *DRB1*0402*, *DRB1*0205*, *DRB1*0301* e *DRB1*1501*. Como muitos alelos na região HLA apresentam forte desequilíbrio de ligação, como por exemplo, os alelos no loco *DRB* com alelos em *DQB*, é muito provável que, no nível populacional, existam haplótipos de risco da região D do sistema HLA. Existem cerca de 20 locos, distribuídos em vários cromossomos (1, 2, 3, 5, 6, 10, 11, 14, 15, 16, 18 e 19), que mostraram ligação com o DM1 em estudos de rastreamento do genoma que utilizaram genes ou segmentos de DNA não codificadores, polimórficos, não necessariamente com alguma relação conhecida com a doença. No que se refere ao cromossomo 3 foi indicado o loco *IDDM9* (3Q21-q25; MEIN e cols., 1998 e CONCANNON e cols., 1998).

Muitos desses estudos concordaram com resultados prévios, obtidos por estudos familiares ou de associação, ou os reforçaram. A maior parte dos locos foi nomeada como IDDM (insulin-dependent diabete mellitus) e numerados de 1 a 18 por ordem de descoberta. Muitos desses locos estão fisicamente muito próximos, como os *IDDM7*, *IDDM12* e *IDDM14*, localizados em 2q31-35, uma região do cromossomo que contém o gene *CTLA4*, cuja relação com o DM1 foi confirmada por vários estudos de associação (FLOREZ e cols., 2003).

Outro fator de risco para o DM1, está localizado próximo ao sítio de início de transcrição do gene da insulina no cromossomo 11 (11p15,5), esta região polimórfica é chamada VNTR (variable number of tandem repeats) e regula a expressão do gene da insulina sugerindo uma importante participação dessa no processo de tolerância e iniciação do processo de ataque auto-imune na destruição das células beta (PUGLIESE e cols., 1997).

2.9. BUTIRILCOLINESTERASE E DIABETE MELITO

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

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

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

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

ABBOT e cols. (1993) encontraram valores elevados de atividade da BChE em pacientes diabéticos com hipertrigliceridemia. Os níveis de BChE e triglicérides mostraram-se positivamente correlacionados em crianças diabéticas e obesas (RANDELL e cols., 1996). A atividade da BChE correlaciona-se positivamente com os níveis de insulina e do peptídeo-C, no soro de indivíduos portadores de diabetes melito do tipo 2 (NISTOR e cols., 1998).

Ratos hiperglicêmicos mostraram níveis elevados de BChE no plasma e no fígado e apresentaram metabolismo alterado de VLDL (KUTTY e cols., 1981). Diabetes induzida por estreptozotocina, em ratos, resultou em aumento nos níveis de BChE,

triglicéridos, VLDL e glicerol. O controle deste estado com insulina provocou a normalização destes níveis (ANNAPURNA e cols., 1991).

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

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

Os resultados da análise de regressão múltipla escalonada confirmam a associação da variante *A539T* com a idade mais precoce de aparecimento do diabetes melito do tipo 1. LEPIENSKI (2004) observou também que a frequência da variante *A539T* nos diabéticos tipo 2 (17,12%) não difere estatisticamente das encontradas nos doadores de sangue (17,53%) e na amostra pareada por origem étnica (13,70%). As

comparações entre as distribuições de frequências genotípicas também não apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Dessa forma, não foi constatada a esperada associação entre a frequência da mutação *A539T* da BChE e o diabetes melito do tipo 2, de modo que os presentes dados não corroboram os encontrados por HASHIM e cols. (2001).

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

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Contribuir para o esclarecimento da função biológica da BChE, ainda não identificada, investigando possível associação dos alelos do sítio -116 do gene *BCHE* (-116A e -116G) com diabetes melito do tipo 1, pela comparação da frequência desses alelos em pacientes e na amostra de doadores de sangue de Curitiba.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1º) Comparar a distribuição das frequências das variantes do nucleotídeo -116 do gene *BCHE* em diabéticos do tipo 1 com as de doadores de sangue.

2º) Comparar a frequência dessas variantes no grupo de diabéticos com aparecimento precoce da doença (≤ 12 anos) e naqueles com aparecimento após 12 anos.

3º) Relacionar essas variantes, bem como a *A539T* do exon 4, com outras variáveis dos pacientes: idade de aparecimento da doença, sexo, dados antropométricos (índice de massa corporal – IMC, razão cintura/quadril – RCQ) e exames bioquímicos (atividade da BChE, glicose, colesterol, triglicérides e insulina).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

Este estudo é parte integrante do projeto “Variabilidade da Butirilcolinesterase no Diabetes Mellitus”, registrado no sistema Thales sob o número 2000007694, coordenado pela Dra. Vânia M. de Alcântara (Departamento de Patologia Médica)

Pacientes e doadores de sangue foram informados sobre sua participação na pesquisa e, concordando, assinaram Termo de Consentimento Livre e Informado (ANEXO 1). A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR), segundo protocolo CEP-HC; n° 327.037/2001-04.

4.1.1. Amostras de pacientes diabéticos do tipo 1.

A amostra inicial foi constituída por DNA genômico (estocado a -20°C) de 72 pacientes diabéticos do tipo 1 euro-brasileiros, com idade não superior a 40 anos, estes foram atendidos pelo serviço Ambulatorial de Diabetes do Hospital de Clínicas da UFPR, em Curitiba no estado do Paraná, onde são realizados atendimentos do Sistema Único de Saúde (SUS) da população do Município de Curitiba, Região Metropolitana de Curitiba e de outros municípios do estado do Paraná. Esse serviço forneceu os dados antropométricos: sexo, idade, índice de massa corporal (IMC), origem étnica, razão cintura quadril (RCQ), bem como a idade de aparecimento da doença dos pacientes, que foram utilizados nessa pesquisa.

As dosagens bioquímicas (glicose, triglicerídeos e insulina) foram realizadas pelo Laboratório de Bioquímica do Hospital de Clínicas da UFPR e pelo Laboratório de Pesquisa em Bioquímica Clínica da UFPR (atividade da BChE).

Das 72 amostras de DNA analisadas para o nucleotídeo -116 do gene *BCHE*, uma foi retirada por não haver êxito durante as tentativas de sua amplificação por PCR. Sendo assim, a amostra final incluiu 71 pacientes.

4.1.2. Amostra do grupo controle.

A amostra do grupo controle foi constituída por 71 doadores de sangue de Curitiba, euro-brasileiros, cujo sangue foi coletado no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (HEMEPAR). A escolha desses doadores foi feita a partir do pareamento com os dados dos indivíduos diabéticos do tipo 1, quanto à idade, sexo e etnia. A idade do grupo de diabéticos utilizada para pareá-los a seus controles, foi a do momento da coleta da amostra biológica e não a idade de aparecimento da doença.

4.2. MÉTODOS LABORATORIAIS

Tanto as amostras dos diabéticos do tipo 1 quanto as do grupo controle já haviam sido genotipadas para o nucleotídeo 1615 do exon 4 do gene *BCHE*, em estudos anteriores do Laboratório de Polimorfismo e Ligação, do Departamento de Genética da UFPR.

As variações do nucleotídeo -116 do exon 1 do gene *BCHE* foram investigadas pela técnica de reação em cadeia da polimerase e posterior análise conformacional da fita simples (PCR-SSCA). Cada indivíduo teve o exon 1 examinado, de acordo com método desenvolvido no Laboratório de Polimorfismos e Ligação da UFPR, que será exposto na seqüência.

4.2.1. Extração do DNA genômico das amostras de sangue periférico.

A extração do DNA de amostras de sangue periférico dos diabéticos e controles foi realizada em projetos anteriores realizados no Laboratório de Polimorfismos e Ligação da UFPR, segundo a técnica de LAHIRI e NURNBERGER (1991), com modificações. Foram coletados 10 mL de sangue em EDTA. O sangue foi centrifugado a 2500 rpm por 15 minutos e a camada contendo os leucócitos foi separada. O creme leucocitário com alguns mililitros de hemácias foi estocado a -20°C. Esse material foi descongelado, e o creme de leucócitos separado e ressuspenso em 10 mL de TKM1

(tris-HCl 1M pH 7,6 KCl 1M; MgCl₂ 1 M; EDTA 0,1M; água destilada para um volume final de 500 mL) e 125 µL de IGEPAL CA-630. Em seguida a mistura foi centrifugada a 2500 rpm por 20 minutos, desprezado o sobrenadante e completado o volume novamente para 10 mL com TKMI. A centrifugação e a ressuspensão em TKMI foram repetidas até que o precipitado ficasse bem claro. Finalmente ressuspendeu-se delicadamente o precipitado, e foram adicionados 800 µL de TKM2 (Tris-HCl 1M pH 7,6; KCl 1M; MgCl₂ 1M; EDTA 0,1M; NaCl 1M; água destilada para um volume final de 50 mL) e agitou-se bem. Adicionaram-se 50 µL de SDS (10%). As amostras foram incubadas em banho-maria a 55°C durante a noite toda. Após esse período, as amostras foram retiradas do banho-maria e adicionaram-se 300 µL de NaCl saturado (6M). Centrifugou-se a 12000 rpm por 20 minutos sendo o sobrenadante passado para um tubo de ensaio e adicionados dois volumes de etanol 100%, gelado, para um volume de sobrenadante. O tubo foi tampado e invertido várias vezes (delicadamente) até ocorrer a precipitação do DNA, que foi coletado utilizando-se uma micropipeta com ponteira de ponta cortada e colocado em tubo eppendorf®. Lavou-se o DNA obtido com etanol 70%, dispensando posteriormente o álcool. O tubo eppendorf foi colocado aberto na estufa a 37°C para que ocorresse a evaporação do álcool. Ressuspendeu-se o DNA em 200 µL de tampão TE e deixou-se em banho-maria a 55°C por 3 dias. Após três dias na geladeira, o DNA estava pronto para o uso e podia ser congelado.

4.2.2. Quantificação e diluição do DNA genômico das amostras de diabéticos do tipo 1.

As 72 amostras de DNA purificado de indivíduos diabéticos do tipo 1 foram submetidas à leitura da densidade ótica (D.O.) no equipamento Gene Quant II – Pharmacia Biotech RNA/DNA calculator, do Laboratório de Genética Molecular Humana do Departamento de Genética da UFPR.

Após a determinação da D.O. das amostras, as mesmas foram diluídas com tampão TE (0,5 mL de TRIS-HCl pH 8,0 - 1 M; 0,5mL de EDTA pH 8,0 - 0,1 M e 49 mL de água bidestilada ou MILI Q), de maneira a obter uma concentração final de aproximadamente 100µg/mL. Essa concentração permite melhor amplificação da

amostra durante a reação em cadeia da polimerase (PCR) e melhor separação das bandas no gel de poliacrilamida, com menor perda de material biológico e de consumo.

4.2.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR) do Exon 1.

O exon 1 foi amplificado utilizando os seguintes iniciadores (quadro 5).

QUADRO 5: Seqüências dos iniciadores utilizados para amplificar o fragmento de DNA no qual se encontra o nucleotídeo -116 do exon 1.

Nome e localização dos iniciadores	Seqüência	Referência
E1F – nt -268 a nt -149	CTG CTG CCA ACT CTC GCG AG	FURTADO (2005)
E1R – nt 8 a nt 27 da ext. 5' do intron 1	CGA AGG TGT AAA TTC AGA GC	FURTADO (2005)

As amplificações foram realizadas em 10 µL de volume total de reação, contendo 9 µL de PCR Supermix® (Invitrogen – 22 mM Tris-HCl pH 8,4; 55mM KCl; 1,65 mM MgCl₂; 220 µM dATP; 220 µM dTTP; 220 µM dCTP; 220 µM dGTP; 22U/mL Taq DNA polimerase), 1 µL de DNA (cerca de 150 ng) e 10 pmoles de cada iniciador. As PCRs foram realizadas em termociclador MJ Research PTC-100 ou Techgene Ftgene2D e utilizando o programa:

1) 80°C/min., temperatura inicial; 2) 94°C/min., temperatura de desnaturação; 3) 48°C/min. temperatura de hibridização; 4) 72°C/min., temperatura de extensão; 5) repetir por 35 vezes do passo 2 ao 4; 6) 72°C/10 min., extensão final.

4.2.4. Análise do DNA amplificado, pela Técnica de SSCA (Análise Conformacional da Fita Simples).

A técnica de SSCA (ORITA e cols., 1989) consiste na análise da fita simples do produto amplificado, normalmente por PCR, gerada por desnaturação do DNA. Esta técnica permite a detecção de alterações conformacionais do DNA que podem ser geradas por apenas uma mutação de ponto. As fitas simples com variações diferentes podem adquirir conformações tridimensionais diversas, podendo ser identificadas pela modificação da mobilidade eletroforética do DNA.

Após a amplificação, 10 μ L das amostras foram misturadas a 10 μ L de corante SSCA (4,75 mL de formamida, 0,0125 g de xilenocianol, 0,0125 g de azul de bromofenol, 125 μ L de EDTA – 0,4 M 16,7 μ L de NaOH 3 M e 108,3 μ L de água bidestilada), levadas ao termociclador por mais 5 minutos a 94°C, e em seguida submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida. Foram aplicadas no gel 10 μ L de amostra adicionada de corante, sendo a concentração do gel de 10%. O tempo de corrida foi dividido em uma pré-corrida de uma hora a 250 volts antes da aplicação das amostras, e 20 horas em corrente de 100 volts após aplicação das amostras no gel. A condição de preparo do gel a 10% está detalhada a seguir.

O gel foi preparado a partir de uma solução estoque de poliacrilamida 49:1 (49 g de acrilamida, 1 g de bisacrilamida, 5 mL de glicerol 100% e água bidestilada para um volume final de 100 mL). O tampão do gel foi preparado a partir de uma solução estoque TBE 5X (54 g de Tris, 27,5 g de ácido bórico, 20 mL de EDTA 0,5 M, pH 8,0 e água destilada), pH 8,2, diluído para 1X com água destilada. A mistura para o gel 10% foi preparada a partir de 24mL TBE 1X, 6 mL de solução estoque de acrilamida 49:1, acrescido de 250 μ L de persulfato de amônio 10% e 30 μ L de TEMED - N, N, N', N' – tetrametiletilenodiamina. Essa solução foi colocada entre duas placas de vidro com espaçadores de 0,8mm em cada lado da placa. Um pente espaçador foi colocado na posição superior da placa, onde foram realizadas as aplicações das amostras após a polimerização, que ocorreu por cerca de meia hora. O tampão utilizado na cuba eletroforética foi o TBE 1X, preparado como descrito acima.

As placas foram submetidas à eletroforese nas seguintes condições:

TABELA 1: Condições da corrida eletroforética em gel de poliacrilamida para a técnica de SSCA para o exon 1 do gene *BCHE*.

CONC. GEL (%)	PRÉ-CORRIDA ¹			CORRIDA ²		
	V (volts)	A (mA)	T (horas)	V (volts)	A (mA)	T (horas)
10	250	20 - 25	1	100	15 - 20	20

¹ Antes da aplicação das amostras. ² após aplicação das amostras. V = voltagem; A = amperagem e T = tempo de corrida eletroforética.

4.2.5. Coloração do gel de poliacrilamida a 10%.

A revelação do gel foi realizada em etapas (BUDOWLE e cols., 1991), durante as quais o gel foi mantido sob agitação. Após a eletroforese, o gel foi colocado em um recipiente e imerso em solução aquosa de ácido nítrico (1%) durante três minutos. O gel foi, então, lavado três vezes com água destilada e imerso em solução aquosa de nitrato de prata (0,2%) e levado ao forno de microondas por 20 segundos. Após três lavagens com água destilada, o gel foi imerso em 60 mL de solução reveladora (170 mL de solução aquosa de carbonato de sódio 2,96%, preparado a partir de 2,96 g de carbonato de sódio anidro para 100 mL de água destilada, e 92 µL de formaldeído) até que a solução ficasse escura. Após a retirada do líquido escurecido, o gel foi lavado três vezes com água destilada, acrescentou-se o restante da solução reveladora e o mesmo foi novamente levado ao forno de microondas por mais 20 segundos. Após o aquecimento o gel permaneceu imerso na solução reveladora até que as bandas de DNA ficassem visíveis.

O gel foi então lavado três vezes com água destilada e colocado em solução de ácido acético (10%) por cinco minutos. Passado esse tempo o gel foi lavado por três vezes com água destilada. Acrescentou-se então a solução aquosa de glicerol (5%), na qual o gel foi mantido por pelo menos dez minutos. O gel foi embebido em solução de metanol (30%) e glicerol (1%) e colocado sobre papel celofane (previamente embebido na mesma solução, e mantido esticado sobre uma superfície lisa, tomando-se cuidado para que não ocorresse a formação de bolhas de ar que prejudicam a secagem do gel). O gel foi coberto com uma folha de papel filtro e levado ao “scanner” onde foi realizada a cópia do mesmo, que foi arquivada eletronicamente. O gel é finalmente levado a uma prensa com papel filtro até que ocorra a secagem completa para posterior arquivo em pasta.

4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas permitiram investigar a possível associação das variações dos exons 1 e 4 com o DM1. Para realização das análises estatísticas, foram utilizados vários “softwares”, descritos a seguir.

4.3.1. STATISTICA for Windows (STATSOFT, Tulsa).

Esse programa foi utilizado para a geração de distribuições de frequências por meio das quais foram obtidas as frequências alélicas e genotípicas por contagem direta e também foi utilizado para o cálculo da mediana da idade de aparecimento do DM1, que foi utilizada na classificação dessa amostra em duas classes: ≤ 12 anos e > 12 anos.

A análise ANOVA/MANOVA foi utilizada para a comparação das médias das variáveis nas duas classes de diabéticos.

Foram feitas duas regressões múltiplas escalonadas, tendo como variável dependente a idade de aparecimento do DM1.

4.3.2. CLUMP (Sham e Curtis, 1995)

Esse programa foi utilizado para comparações das frequências alélicas e genotípicas, obtidas nos grupos de DM1 no grupo controle de doadores de sangue. Os grupos de DM1 também foram comparados quanto às frequências haplotípicas. O teste fornece resultado igual ao do χ^2 , sendo que não há necessidade de utilizar a correção de Yates, quando o esperado é menor que 5. Neste programa, o nível de significância é primeiramente obtido dos dados reais e, em seguida, um grande número de tabelas (1000, no presente estudo) com os mesmos totais marginais dos dados reais são geradas por simulação de Monte Carlo na base da hipótese nula de que casos e controles possuem a mesma distribuição de frequência. O valor da estatística dado por cada tabela é calculado e uma estimativa empírica do valor de P é a proporção de tabelas simuladas com uma estatística maior ou igual à obtida com os dados reais. A significância das análises realizadas se dá quando o valor de p é $\leq 0,05$.

4.3.3. ARLEQUIM 2.000 (Schneider et al., 2000)

O programa Arlequim 200 foi utilizado para comparar as distribuições das frequências genotípicas de cada um dos exons (1 e 4) com o esperado, segundo o equilíbrio de Hardy-Weinberg, de acordo com o teste de Guo e Thompson (1992).

Foram calculadas as frequências haplotípicas, e as estimativas de desequilíbrio de ligação (D e D').

4.3.4. ODDS RATIO

Nos resultados estatisticamente significativos, que indicaram associação, determinou-se o valor de risco (OR - *odds ratio*), de acordo com o método de Woolf (1955), $OR = (AxD)/(BxC)$ como mostra o quadro a seguir:

QUADRO 6: Esquema para o cálculo de OR.

FATOR	ESTUDO	CONTROLE	TOTAL
PRESENÇA	A	B	t
AUSÊNCIA	C	D	z
TOTAL	x	y	

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

E em algumas comparações, como em casos de genótipos conjuntos ou de haplótipos, o grupo de >12 anos de idade de aparecimento da doença foi contrastado com o controle e com o grupo de ≤12 anos de idade de aparecimento da doença. O valor de OR indica quantas vezes a mais (ou a menos) o grupo com o fator tem de apresentar determinada doença, ou, no caso do presente trabalho, de apresentá-la precoce ou tardiamente, quando contrastado com o grupo sem esse fator. O valor de OR correspondente a 1 significa que a probabilidade é a mesma para indivíduos que tem e que não tem o fator. Valores acima de 1 indicam que o fator está associado a uma maior probabilidade de se desenvolver a doença, e valores abaixo de 1 indicam uma menor

probabilidade. Dado o valor de OR, pode-se calcular o Erro Padrão (EP) para o log OR e, a partir deste o seu Intervalo de Confiança (I.C.), através da fórmula:

$$EP (\log OR) = \sqrt{\frac{1}{A} + \frac{1}{B} + \frac{1}{C} + \frac{1}{D}}$$

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

4.3.5. TESTE DE NEWMAN KEULS

O Teste de Newman Keuls é um método de comparação entre pares de médias e estima quanto essas médias são estatisticamente significativas entre si. As médias são comparadas duas a duas, por exemplo: a média de uma das variáveis é testada em relação a cada uma das médias das demais variáveis (Média 1 X média 2, média 1 X média 3, média 1 X média 4, e assim sucessivamente, dependendo do número de variáveis estudadas). Adota-se o nível de significância < 0,05.

5. RESULTADOS

5.1. PCR-SSCA DO EXON 1 DO GENE *BCHE*.

As figuras 2 e 3 mostram o padrão de bandas para os alelos *G* e *A*, referentes à posição -116 do exon 1, identificados pela técnica de PCR-SSCA.

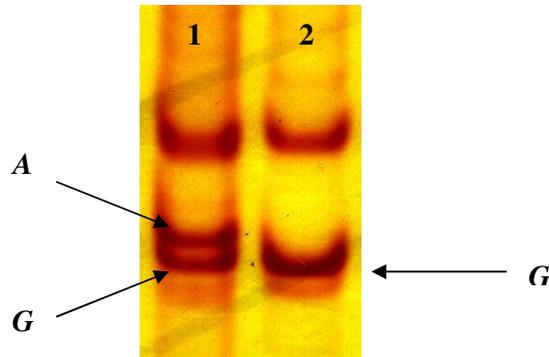


FIGURA 2: Reprodução de uma placa de gel de poliacrilamida (10%) mostrando padrão de SSCA do exon 1 amplificado pelos iniciadores E1F e E1R. Na posição 1 está representada amostra de heterozigoto *-116G/-116A* e na posição 2 amostra de homozigoto *-116G/-116G*.

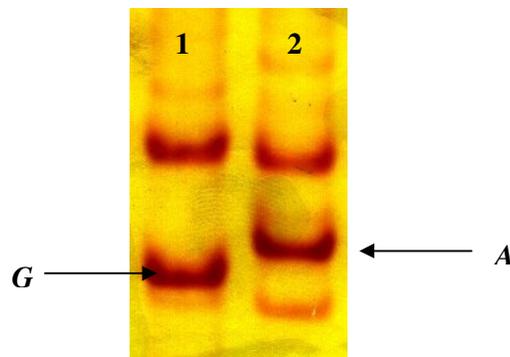


FIGURA 3: Reprodução de uma placa de gel de poliacrilamida (10%) mostrando padrão de SSCA do exon 1 amplificado pelos iniciadores E1F e E1R. Na posição 1 está representada amostra de homozigoto *-116G/-116G* e na posição 2 amostra de homozigoto *-116A/-116A*.

O DNA do exon 1 de 71 amostras de indivíduos portadores de DM1 e de 71 indivíduos do grupo controle foi genotipado utilizando-se a técnica de PCR-SSCA. Entre as amostras de portadores de DM1 foi detectado apenas um indivíduo homozigoto *-116A/-116A*.

Na figura 4 podem ser observadas as bandas referentes a cada genótipo identificado para o exon 1.

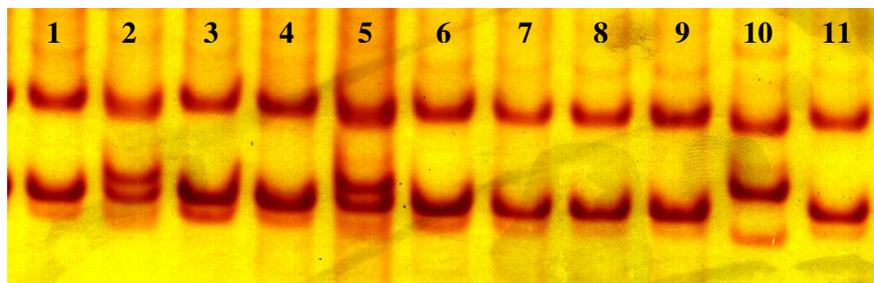


FIGURA 4: Reprodução de uma placa de gel de poliacrilamida (10%) mostrando padrão de SSCA do exon 1 amplificado pelos iniciadores E1F e E1R. Nas posições 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9 e 11 estão representadas amostras de homozigotos *-116G/-116G* e nas posições 2 e 5 amostras de são heterozigotas *-116G/-116A* ; na posição 10 está representada amostra de homozigoto *-116A/-116A*.

5.2. RESULTADOS DA ANÁLISE ESTATÍSTICA.

As frequências alélicas e genotípicas referentes aos resultados de PCR-SSCA do exon 1, bem como as comparações destas frequências nas diferentes amostras são mostradas na tabela 2. As distribuições genotípicas do exon 1 estão de acordo com o teorema de Hardy-Weinberg tanto na amostra de DM1 total, como na de controles. Nas comparações entre as frequências genotípicas e alélicas mostradas na tabela 2, houve diferença estatisticamente significativa apenas entre os grupos classificados pela idade de aparecimento (IA) da doença em DM1 ≤ 12 anos e DM1 > 12 anos, onde valor de p para a comparação quanto à frequência genotípica foi de 2,90% e quanto à frequência alélica foi de 1,90%.

As distribuições genotípicas do exon 4, determinadas em estudo anterior, por LEPIENSKI, 2004, também estão de acordo com o teorema de Hardy-Weinberg tanto

na amostra de DM1 total, como na de controles. A tabela 3 mostra os dados de frequências de genótipos referentes aos nucleotídeos que ocupam as posições -116 do exon 1 e 1615 do exon 4 do gene *BCHE* e resultados de comparações entre os grupos por meio do teste χ^2 , conforme obtido pelo programa CLUMP. Não houve diferença estatisticamente significativa em nenhuma delas. Porém, na comparação em que se considerou IA DM1 \leq 12 anos e IA DM1 $>$ 12, o valor de p ficou próximo ao nível da significância (6,20%).

Na tabela 4 foram reunidos os genótipos em classes, segundo dados da tabela 3: *GG/UU* e demais genótipos, *GG/UK* + *GG/KK* e demais genótipos e *GA/UK* + *GA/KK* + *AA/KK* e demais genótipos, conforme a ausência de ambas as variantes -116A e K, presença apenas de K e presença de ambas as variações respectivamente. Essas classes foram comparadas entre as diferentes amostras. Mostraram-se significativas as comparações entre IA DM1 $>$ 12 anos e controles quanto às distribuições de *GG/UU* e demais genótipos ($p = 4,30\%$); IA DM1 \leq 12 anos e IA DM1 $>$ 12 anos quanto à *GG/UU* e demais genótipos ($p = 1,10\%$) e IA DM1 \leq 12 anos e IA DM1 $>$ 12 anos quanto à *GA/UK* + *GA/KK* + *AA/KK* e demais genótipos ($p = 3,90\%$).

A tabela 5 contém as frequências haplotípicas das amostras de diabéticos, e do grupo controle referentes aos exons 1 e 4 do gene *BCHE*. Também nesta tabela podem-se observar as comparações entre os grupos quanto à distribuição dos haplótipos *AK*, *AU*, *GK* e *GU*. Foi verificada apenas uma diferença significativa ($p = 0,90\%$), que ocorreu entre os grupos IA DM1 \leq 12 anos e IA DM1 $>$ 12 anos.

Quando são comparadas as classes de frequências haplotípicas (tabela 6) entre as diferentes amostras, podem-se observar as seguintes diferenças estatisticamente significantes: 1) entre as amostras de IA DM1 \leq 12 anos e IA DM1 $>$ 12 anos ($p = 3,00\%$) quanto à distribuição de *AK* e demais haplótipos; 2) entre IA DM1 \leq 12 anos e IA DM1 $>$ 12 anos ($p = 0,50\%$) quanto à *GU* e demais haplótipos; 3) entre IA DM1 $>$ 12 anos e controles ($p = 3,20\%$) quanto a *GU* e demais haplótipos.

Foram obtidos os valores de OR e IC para as comparações entre os grupos que mostraram significância durante as análises estatísticas, que são apresentados na tabela 7.

TABELA 2: Frequências genotípicas e alélicas das amostras de diabéticos do tipo 1 (DM1) e do grupo controle, referentes ao nucleotídeo -116 do exon 1 do gene *BCHE*, e comparações dessas frequências nas diferentes amostras.

AMOSTRAS	N	GENÓTIPOS (%)						FREQUÊNCIA DO ALELO A ± ERRO PADRÃO (%)
		GG		GA		AA		
		N	(%)	N	(%)	N	(%)	
(a) DM1 TOTAL	71	56	78,9	14	19,7	1	1,4	11,3 (2,65)
(b) DM1 ≤ 12 ANOS	37	25	67,6	11	29,7	1	2,7	17,6 (4,42)
(c) DM1 > 12 ANOS	34	31	91,2	3	8,8	0	0,0	4,4 (2,49)
(d) CONTROLES	71	55	77,5	16	22,5	0	0,0	11,3 (2,65)

COMPARAÇÕES*	FREQUÊNCIA GENOTÍPICA		FREQUÊNCIA ALÉLICA	
	χ^2	p (%)	χ^2	p (%)
a x d	1,14	> 80	≈ 0,0	≈ 100
b x c	6,10	2,90	6,13	1,90
b x d	2,74	> 25	1,66	> 20
c x d	2,92	> 10	2,63	> 10

* Em vermelho resultado significativo.

TABELA 3: Dados de genótipos referentes aos nucleotídeos -116 do exon 1 e 1615 do exon 4 do gene *BCHE*, das amostras de diabéticos do tipo 1 (DM1) e do grupo controle, e comparações quanto às frequências genotípicas.

AMOSTRAS	N	FREQUÊNCIA GENOTÍPICA													
		<i>GG/UU</i>		<i>GG/UK</i>		<i>GG/KK</i>		<i>GA/UU</i>		<i>GA/UK</i>		<i>GA/KK</i>		<i>AA/KK</i>	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
(a) DM1 TOTAL	71	46	64,8	9	12,7	1	1,4	1	1,4	12	16,9	1	1,4	1	1,4
(b) DM1 ≤ 12 ANOS	37	18	48,7	6	16,2	1	2,7	1	2,7	9	24,3	1	2,7	1	2,7
(c) DM1 > 12 ANOS	34	28	82,4	3	8,8	0	0,0	0	0,0	3	8,8	0	0,0	0	0,0
(d) CONTROLES	71	44	62,0	10	14,1	1	1,4	1	1,4	13	18,3	2	2,8	0	0,0

COMPARAÇÕES*	FREQUÊNCIA GENOTÍPICA	
	χ^2	<i>p</i> (%)
a x d	1,47	> 99
b x c	10,07	6,20
b x d	3,62	80
c x d	5,18	> 40

* Em azul valor próximo do nível de significância.

TABELA 4: Comparações entre frequências genótípicas das amostras de diabéticos do tipo 1 (DM1) e do grupo controle, referentes aos nucleotídeos -116 do exon 1 e 1615 do exon 4 do gene *BCHE*, realizadas com base nos dados da tabela anterior.

COMPARAÇÕES	CLASSES GENÓTIICAS					
	<i>GG/UU</i> e DEMAIS GENÓTIPOS*		<i>GG/UK + GG/KK</i> e DEMAIS GENÓTIPOS*		<i>GA/UK + GA/KK + AA/KK</i> e DEMAIS GENÓTIPOS*	
	χ^2	<i>p</i> (%)	χ^2	<i>p</i> (%)	χ^2	<i>p</i> (%)
DM1 TOTAL X CONTROLES	0,12	> 85	0,06	≈ 100	0,04	≈ 100
DM1 ≤ 12 ANOS X CONTROLE	1,77	> 20	0,21	> 80	0,98	> 35
DM1 > 12 ANOS X CONTROLE	4,43	4,30	0,88	> 35	2,45	> 15
DM1 ≤ 12 ANOS X DM1 > 12 ANOS	8,82	1,10	1,49	> 30	4,89	3,90

* O genótipo *GA/UU* foi excluído.

TABELA 5: Frequências haplotípicas das amostras de diabéticos do tipo 1 (DM1) e do grupo controle, referentes aos nucleotídeos -116 do exon 1 e 1615 do exon 4 do gene *BCHE*, e resultado das comparações dessas frequências nas diferentes amostras.

AMOSTRAS	N	FREQUÊNCIA HAPLOTÍPICA ± ERRO PADRÃO (%)			
		<i>A K</i>	<i>A U</i>	<i>G K</i>	<i>G U</i>
(a) DM1 TOTAL	142	10,49 ± 2,73	0,76 ± 0,70	8,51 ± 2,31	80,21 ± 2,66
(b) DM1 ≤ 12 ANOS	74	16,01 ± 5,40	1,55 ± 1,01	12,36 ± 3,14	70,06 ± 6,12
(c) DM1 > 12 ANOS	68	4,41 ± 2,05	0,00 ± 0,00	4,41 ± 2,34	91,17 ± 38,8
(d) CONTROLES	142	10,47 ± 2,36	0,79 ± 0,76	9,94 ± 2,75	78,78 ± 4,48

COMPARAÇÕES	FREQUÊNCIA HAPLOTÍPICA	
	TESTE χ^2	<i>p</i> (%)
a x d	0,17	> 95
b x c	10,04	0,90
b x d	2,18	> 50
c x d	5,03	> 10

TABELA 6: Comparações entre as frequências haplotípicas das amostras de diabéticos do tipo 1 (DM1) e do grupo controle, referentes aos nucleotídeos -116 do exon 1 e 1615 do exon 4 do gene *BCHE*, considerando-se o número absoluto de haplótipos, calculados com base nos dados da tabela anterior¹.

DUAS CLASSES DE HAPLÓTIPOS ²	DM1 ≤ 12 ANOS X DM1 > 12 ANOS		DM1 ≤ 12 ANOS X CONTROLE		DM1 > 12 ANOS X CONTROLE	
	χ^2	<i>p</i> (%)	χ^2	<i>p</i> (%)	χ^2	<i>p</i> (%)
<i>AK</i> e DEMAIS	5,23	3,00	1,42	> 25	2,22	> 15
<i>GK</i> e DEMAIS	2,75	> 10	0,27	> 65	1,83	> 15
<i>GU</i> e DEMAIS	9,78	0,50	1,97	> 15	4,90	3,20

¹A comparação entre as frequências haplotípicas no total dos diabéticos tipo 1 (DM1) e no grupo controle não foram mostradas nesta tabela devido à grande semelhança entre elas, como pode ser observado no resultado da comparação **a x d** da tabela anterior ($p > 95\%$).

²O haplótipo *AU* não foi incluído na análise pois apenas 1 indivíduo em cada grupo de amostras o apresentou.

TABELA 7: Valores de “Odds ratio” e de Intervalo de Confiança (IC).

	FATOR	AMOSTRAS COMPARADAS		ODDS RATIO	IC (95%)
		ESTUDO	CONTROLE		
EXON 1	<i>-116A</i>	DM1 ≤ 12 ANOS	DM1 > 12 ANOS	4,62	1,25 – 17,00
	<i>GA + AA</i>	DM1 ≤ 12 ANOS	DM1 > 12 ANOS	4,96	1,26 – 19,53
EXONS 1 e 4	<i>GA/UK + GA/KK + AA/KK</i>	DM1 ≤ 12 ANOS	DM1 > 12 ANOS	4,37	1,10 – 17,36
		DM1 > 12 ANOS	CONTROLE	2,86	1,05 – 7,81
	<i>GG/UU</i>	DM1 > 12 ANOS ¹	DM1 ≤ 12 ANOS	4,93	1,65 – 14,68
HAPLÓTIPOS	<i>AK</i>	DM1 ≤ 12 ANOS	DM1 > 12 ANOS	4,19	1,13 – 15,58
		DM1 > 12 ANOS ¹	DM1 ≤ 12 ANOS	4,37	1,65 – 11,59
	<i>GU</i>	DM1 > 12 ANOS	CONTROLE	2,77	1,09 – 7,01

¹ Nestes casos, optou-se por colocar a amostra com maior frequência do fator como amostra estudo.

A análise dos dois grupos de genótipos (tabela 8), com relação às médias de todas as variáveis consideradas, não mostra diferença ($p > 30\%$) entre essas duas classes genóticas (*GG* e *GA+AA*), de acordo com a análise de variância feita pelo programa ANOVA/MANOVA. Porém, do ponto de vista da análise de variáveis individuais, a idade de aparecimento da doença foi significativamente menor no genótipo *GA+AA* ($p = 0,045$). Essa foi à única variável significativa para este tipo de análise, utilizando-se o teste de Newmann-Keuls.

TABELA 8: Médias (\pm DP) das variáveis classificadas pelos genótipos do exon 1 (*GG* e *GA + AA*) em pacientes com DM1.

VARIÁVEIS	<i>GG</i>	<i>GA + AA</i>
	(N = 50)	(N = 15)
	MÉDIA \pm DP	MÉDIA \pm DP
SEXO (masc = 1, fem =.0)	0,38 \pm 0,49	0,27 \pm 0,46
IDADE DE APARECIMENTO DA DOENÇA	14,33 \pm 7,88	9,93 \pm 4,79
ÍNDICE DE MASSA CORPORAL	22,85 \pm 3,36	23,45 \pm 4,02
RAZÃO CINTURA QUADRIL	0,81 \pm 0,06	0,83 \pm 0,06
GLICEMIA (mg/dL)	216,58 \pm 109,12	216,87 \pm 121,97
COLESTEROL TOTAL (mg/dL)	191,24 \pm 42,06	186,20 \pm 50,38
TRIGLICÉRIDES (ln)	4,38 \pm 0,56	4,44 \pm 0,49
INSULINA (ln)	2,78 \pm 0,80	2,90 \pm 0,93
ATIVIDADE DA BChE	5,15 \pm 1,24	4,77 \pm 0,88

DP = desvio padrão; ln = logarítmo neperiano.

A análise de variância (ANOVA MANOVA) considerando as 3 classes de genótipos (*GG/UU*, *GA+AA/UK+KK* e *GG/UK*) e todas as demais variáveis (9), não mostrou resultado significativo ($p = 0,08$). A única variável que se mostrou significativa, nas análises individuais, foi a atividade da BChE. A média da atividade foi diferente apenas na comparação entre os genótipos *GG/UU* e *GG/UK* ($p = 0,034$), de acordo com o teste de Newmann-Keuls. A variável triglicéride mostrou-se no limite da significância ($p = 0,054$), quando o genótipo *GG/UU* foi comparado com *GG/UK*.

TABELA 9: Médias (\pm DP) das variáveis classificadas pelos genótipos dos exons 1 e 4

VARIÁVEIS	GENÓTIPOS		
	<i>GG/UU</i> (N = 41)	<i>GG/UK</i> (N = 9)	<i>GA+AA/UK+KK</i> (N = 14)
	MÉDIA \pm DP	MÉDIA \pm DP	MÉDIA \pm DP
SEXO (masc = 1, fem = 0)	0,34 \pm 0,48	0,56 \pm 0,53	0,28 \pm 0,47
IDADE DE APARECIMENTO DA DOENÇA	14,97 \pm 8,13	11,39 \pm 6,23	9,93 \pm 4,97
ÍNDICE DE MASSA CORPORAL	22,86 \pm 3,56	22,80 \pm 2,36	23,71 \pm 4,03
RAZÃO CINTURA QUADRIL	0,81 \pm 0,06	0,82 \pm 0,07	0,84 \pm 0,06
GLICEMIA (mg/dL)	212,71 \pm 103,06	234,22 \pm 139,31	217,93 \pm 126,50
COLESTEROL TOTAL (mg/dL)	193,00 \pm 44,56	183,22 \pm 28,63	187,50 \pm 52,03
TRIGLICÉRIDES (ln)	4,45 \pm 0,58	4,06 \pm 0,34	4,46 \pm 0,50
INSULINA (ln)	2,76 \pm 0,78	2,87 \pm 0,97	2,95 \pm 0,94
ATIVIDADE DA BChE	5,34 \pm 1,26	4,27 \pm 0,62	4,74 \pm 0,91

DP = desvio padrão; ln = logarítmo neperiano.

Foram feitas duas análises de variância, que consideraram os dois grupos de DM1 classificados pela mediana da idade de aparecimento da doença, com os dados da tabela 10. Uma das análises considerou os exons 1 e 4 e a outra considerou apenas o exon 1 junto com as demais variáveis da tabela 10. A análise de variância (ANOVA MANOVA) considerando todas as variáveis com os exons 1 e 4 foi significativa ($p = 0,016$), bem como a que considerou as demais variáveis e apenas o exon 1 ($p = 0,042$). O Teste de Newmann-Keuls, usado para as variáveis individuais, foi estatisticamente significativo com relação à glicose ($p = 0,011$), aos genótipos quanto aos exons 1 e 4 ($p = 0,006$) e quanto aos genótipos em relação a apenas o exon 1 ($p = 0,022$).

TABELA 10: Médias (\pm DP) das variáveis classificadas pela mediana da idade de aparecimento do diabetes melito do tipo 1.

VARIÁVEIS	IDADE DE APARECIMENTO	
	≤ 12 anos (N = 33) MÉDIA \pm DP	> 12 anos (N = 31) MÉDIA \pm DP
SEXO (masc = 1, fem =.0)	0,27 \pm 0,45	0,45 \pm 0,50
ÍNDICE DE MASSA CORPORAL	22,62 \pm 2,40	23,49 \pm 4,37
RAZÃO CINTURA QUADRIL	0,81 \pm 0,07	0,83 \pm 0,06
GLICOSE (mg/dL)	250,82 \pm 128,21	180,74 \pm 78,96
COLESTEROL TOTAL (mg/dL)	183,42 \pm 41,95	197,87 \pm 45,59
TRIGLICÉRIDES (ln)	4,42 \pm 0,48	4,38 \pm 0,62
INSULINA (ln)	2,75 \pm 0,89	2,90 \pm 0,77
ATIVIDADE DA BChE (KU/L)	4,96 \pm 1,23	5,16 \pm 1,14
EXONS 1 E 4 (GGUU = 1, GGUK = 2, AG+AA/UK+KK = 3)	1,85 \pm 0,90	1,29 \pm 0,64
EXONS 1 (GG = 1 e GA+AA = 2)	1,33 \pm 0,48	1,10 \pm 0,30

DP = desvio padrão; ln = logarítmo neperiano

Na análise de regressão da tabela 11, apenas o genótipo do exon 1 foi correlacionado significativamente com a idade de aparecimento da doença. O próprio programa excluiu as variáveis atividade da BChE, sexo, colesterol total e ln triglicérides da análise, em vista de pouca correlação com a idade de aparecimento da doença.

TABELA 11: Resultados de análise regressão múltipla escalonada, referente às amostras de diabéticos do tipo 1 (DM1), tendo como variável dependente a idade de aparecimento da doença e as seguintes independentes: genótipo do exon 1 ($GG = 1$ e $GA + AA = 2$), razão cintura quadril, glicose, insulina, índice de massa corporal, atividade da BChE, sexo, colesterol total e triglicérides.

MÉDIA DA IDADE DE APARECIMENTO \pm DP = 13,37 \pm 7,54		a \pm EP = 7,53 \pm 13,07	
VARIÁVEIS INDEPENDENTES	BETA \pm EP	t	p
EXON 1	-0,27 \pm 0,12	-2,20	0,031
RAZÃO CINTURA QUADRIL	0,15 \pm 0,13	1,12	0,267
GLICOSE (mg/dL)	-0,27 \pm 0,14	-1,91	0,061
INSULINA (ln)	-0,24 \pm 0,14	-1,68	0,098
ÍNDICE DE MASSA CORPORAL	0,15 \pm 0,13	1,19	0,239

ANÁLISE DE VARIÂNCIA				
FONTES DE VARIAÇÃO	GL	Σ DOS QUADRADOS	F (p)	R ²
REGRESSÃO	5	676,46	2,70 (0,029)	0,19
RESÍDUO	58	2903,34		
TOTAL	63	3579,80		

EP = erro padrão; a = intercepto; DP = desvio padrão, ln = logarítmo neperiano.

Na análise de regressão da tabela 12, apenas o genótipo com relação aos exons 1 e 4 foi correlacionado significativamente com a idade de aparecimento da doença. O próprio programa excluiu as variáveis atividade da BChE, sexo, colesterol total e Ln triglicérides da análise.

TABELA 12: Resultados de análise regressão múltipla escalonada, referente às amostras de diabéticos do tipo 1 (DM1), tendo como variável dependente a idade de aparecimento da doença e as seguintes independentes: genótipos dos exons 1 e 4 ($GA/UK + GA/KK + AA/KK = 3$, $GG/UK + GG/KK = 2$ e $GG/UU = 1$), razão cintura quadril, glicose, insulina, índice de massa corporal, atividade da BChE, sexo, colesterol total, e triglicérides.

MÉDIA DA IDADE DE APARECIMENTO \pm DP = 13,37 \pm 7,54		a \pm EP = 4,28 \pm 12,99	
VARIÁVEIS INDEPENDENTES	BETA \pm EP	t	p
EXONS 1 e 4	-0,31 \pm 0,12	-2,55	0,014
RAZÃO CINTURA QUADRIL	0,16 \pm 0,13	1,23	0,223
GLICOSE (mg/Dl)	-0,25 \pm 0,14	-1,79	0,078
INSULINA (Ln)	-0,23 \pm 0,14	-1,61	0,114
ÍNDICE DE MASSA CORPORAL	0,15 \pm 0,13	1,18	0,242

ANÁLISE DE VARIÂNCIA				
FONTES DE VARIÇÃO	GL	Σ DOS QUADRADOS	F (p)	R ²
REGRESSÃO	5	749,66	3,07 (0,016)	0,21
RESÍDUO	58	2830,15		
TOTAL	63	3579,80		

EP = erro padrão; a = intercepto; DP = desvio padrão, Ln = logarítmo neperiano.

6. DISCUSSÃO

6.1 DADOS DA LITERATURA DE IMPORTÂNCIA PARA O ESTUDO

BARTELS e cols. (1990) descreveram a mutação *-116A* (TGC/TAC) do exon 1 do gene *BCHE* e encontraram frequência de 8% em amostra de 33 pessoas não consanguíneas estudadas. As alterações de bases que ocorrem nessa posição estão em desequilíbrio de ligação com as do nucleotídeo 1615 do exon 4. BARTELS e cols. (1990) observaram a presença da variante *-116A* sempre com a presença da variante *K* do nucleotídeo 1615, com dados de apenas uma família. FURTADO (2005), estudando 172 obesos e 156 não obesos não encontrou diferença significativa na frequência do alelo *-116 A*, nestes dois grupos: $8,72\% \pm 2,15\%$ e $8,33\% \pm 2,21\%$, respectivamente. Considerando o total das duas amostras ($N = 162$), o desequilíbrio de ligação entre as variações desses dois exons foi de 91% (D').

A presença da variante *K* foi associada a uma redução de cerca de 30% da atividade da BChE quando em homozigose (*KK*) em relação à enzima usual (RUBINSTEIN e cols., 1978). Entretanto, FURTADO (2005), ao classificar as pessoas quanto aos genótipos dos exons 1 e 4 e examinar as médias da atividade da BChE, verificou que a redução da atividade dessa enzima estava associada à presença de ambas as variações *-116A* do exon 1 e *K* do exon 4. Quando a variação *K* está presente sem a variação *-116A*, a baixa de atividade não ocorre. Isto sugere que é a variação *-116A* que está associada com a redução da atividade da BChE, mas seu efeito isolado ainda não pode ser avaliado, uma vez que, na quase totalidade dos casos, está em cis com a mutação *K* (ALTAMIRANO e cols., 2000).

Embora a mutação *-116A* não ocorra na região codificadora do peptídeo, ainda assim poderia ser responsável pela redução da atividade da BChE, afetando a transcrição ou tradução.

6.2 ANÁLISES DE ASSOCIAÇÃO

BARTELS e cols. (1990) e FURTADO (2005), encontraram frequências semelhantes para a variante *-116A*, em torno de 8%. A frequência do alelo *-116A* da

presente amostra de DM1 não difere estatisticamente daquela descrita por BARTELS e cols. (1990) nem da encontrada nos controles de FURTADO (2005): $\chi^2 = 0,677$, $p > 45\%$ e $\chi^2 = 0,729$, $p > 40\%$, respectivamente.

Quando se considera apenas o exon 1 (tabela 2), a frequência do alelo *A* do nucleotídeo -116 não difere entre a amostra de DM1 total (11,3%) e a amostra controle de doadores de sangue (11,3%). Quando a amostra de DM1 é classificada pela mediana da idade de aparecimento da doença (IA), pode-se observar aumento da frequência do alelo *A* (17,6%) e do genótipo *G/A* (29,7%), no grupo de DM1 com a IA da doença ≤ 12 anos (tabela 2) em relação ao grupo com essa idade > 12 anos (4,4% e 8,8%, respectivamente). Quando se observa a tabela 7, considerando-se os grupos com IA de DM1 ≤ 12 anos e > 12 anos, quanto à presença do alelo -116A e quanto à presença dos genótipos *GA+AA*, os valores de OR são 4,62 e 4,96, respectivamente, ou seja, o risco de uma pessoa que possui esse alelo ou genótipo é quase 5 vezes maior de apresentar o DM1 com idade precoce do que seria se fosse de genótipo *GG*.

Quando se consideram de forma conjunta os exons 1 e 4, quanto às distribuições dos 7 genótipos observados (tabela 3), não houve diferença estatisticamente significativa entre as amostras comparadas. Isto provavelmente ocorre em vista da divisão em 7 classes ter originado amostras de tamanho reduzido. Por isso, os genótipos foram agrupados em classes (tabela 4), o que permitiu revelar diferenças estatisticamente significativas quando foram comparadas as diferentes amostras: 1) DM1 ≤ 12 anos e DM1 > 12 anos quanto a *GA/UK+GA/KK+AA/KK* e demais genótipos (OR = 4,37); 2) DM1 > 12 anos e DM1 ≤ 12 anos quanto a *GG/UU* e demais genótipos (OR = 4,93); 3) DM1 > 12 anos e controles quanto a *GG/UU* e demais genótipos (OR = 2,86).

No caso da distribuição das frequências haplotípicas (tabela 5), a única diferença estatisticamente significativa apareceu quando foram comparados os grupos com IA de DM1 ≤ 12 anos e > 12 anos ($p = 0,009$). Algumas das comparações de haplótipos da tabela 6 foram estatisticamente significativas e resultaram em valores de *odds ratio* (tabela 7): 1) DM1 ≤ 12 anos e DM1 > 12 anos quanto a *AK* e demais haplótipos (OR= 4,19); DM1 > 12 anos e DM1 ≤ 12 anos quanto a *GU* e demais haplótipos (OR = 4,37); 3) DM1 > 12 anos e controles quanto a *GU* e demais haplótipos (OR = 2,77).

Esses dados mostram associação da variação -116A do exon 1, bem como do haplótipo *AK* e dos genótipos que possuem *AK*, com DM1 de IA ≤ 12 anos. Em vista

dessa associação, também se verifica uma frequência mais elevada do alelo *-116G*, do haplótipo *GU* e do genótipo *GG/UU* na categoria de DM1 com IA > 12 anos.

Em trabalho com esses mesmos pacientes, genotipados apenas para o exon 4, LEPIENSKI e cols. (2006) mostraram associação positiva do alelo *K* com a IA de DM1 \leq 12 anos. Esses autores concluíram que esse alelo, ou outra variante em desequilíbrio de ligação com ele, poderia predispor ao aparecimento precoce do DM1. Esses autores também explicam que a ausência de diferença na frequência desse alelo entre DM1 e controles poderia ser explicada por duas situações: 1) o alelo *K* 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.

Os dados do presente trabalho reforçam a hipótese de que a variante *K* ou outra, em desequilíbrio de ligação com ela, seja responsável pelo aparecimento precoce do DM1. Entretanto, não parece que as variações dos exons 1 e 4 estejam associadas com a própria causa de DM1, num tipo de DM1 específico de aparecimento precoce. Estariam associadas apenas ao aparecimento precoce de DM1 em geral, sem estarem implicadas na própria causa do diabetes mellito. Se estivessem associadas com um tipo específico de DM1, seria esperado que as frequências de *-116A* e de *K* estivessem mais altas em pacientes do que na população geral e as frequências dessas variações na amostra de doentes com IA > 12 anos não estivesse diminuída, com relação à de aparecimento da doença em idade \leq 12 anos.

As análises de regressão múltipla escalonada mostraram que a presença do alelo *-116A* está correlacionada de forma estatisticamente significativa com a diminuição da média da IA do DM1 ($p = 0,031$; tabela 11). Quando a análise é feita com os genótipos quanto aos exons 1 e 4 (tabela 12), a significância aumenta ($p = 0,014$). Isto acontece em vista de que os indivíduos com a variação *K* e sem a variação *-116A* (código 2) são considerados separadamente daqueles que são homocigotos usuais (código 1). Os casos considerados com a variação *-116A* possuem também a variação *K* (código 3). Os resultados dessa última análise de regressão mostram a tendência da idade de aparecimento da doença diminuir no seguinte sentido: do homocigoto usual (*GGUU*) para *GGUK* e deste para os casos com ambas as variações *-116A* e *K*. Nesse contexto, pode se observar a tabela 9, cuja análise de variância não mostra diferença das médias de idade de aparecimento da doença nos 3 genótipos considerados, mas mostra claramente a tendência a que nos referimos. Uma das metodologias é usada para separar

os grupos (ANOVA/MANOVA), quando são diferentes, e a outra (Regressão) indica correlações e tendências quando são consideradas as distribuições das características. Além disso, deve se notar que duas das classes ficaram pouco representadas nessa análise de variância. Por outro lado, quando apenas o exon 1 foi considerado na análise de variância (tabela 8), os dois grupos de genótipos mostraram diferença estatisticamente significativa nas médias de aparecimento da doença ($p = 0,045$). Esses dados da análise de regressão múltipla reforçam os achados anteriores de associação da variação *-116A* e *K* com a idade precoce de aparecimento do DM1.

A análise de variância de comparação entre os dois grupos de pacientes (tabela 10), além da significância mostrada quanto aos genótipos considerados do gene *BCHE*, mostra que a diferença entre as médias de concentração de glicose é significativa ($p = 0,011$). Entretanto, na análise de regressão múltipla (tabela 12), essa variável mostrou-se apenas muito próxima do limite de significância ($p = 0,078$). É possível que a concentração média maior de glicose no grupo com idade de aparecimento ≤ 12 anos do que naquele > 12 anos, possa ser interpretada com sugestão de uma maior gravidade do quadro clínico no grupo com idade precoce de aparecimento da doença.

FURTADO (2005) mostrou que os indivíduos portadores da variante *K* apresentam menor atividade da BChE, como já havia sido descrito por outros autores. Porém, em seu estudo, quando levou em conta o genótipo na posição do nucleotídeo -116, essa diminuição mostrou ser dependente da mutação *-116A* e não da mutação *K*. Isto foi verificado, pois nos heterozigotos *UK* que são homozigotos *GG* quanto ao nucleotídeo -116 essa diminuição não ocorreu. Entretanto, no presente estudo, quando se consideram os genótipos do exon 1 (tabela 8) não se verificou diferença estatisticamente significativa nas médias da atividade da BChE entre eles, apesar de estar no sentido esperado (5,15 KU/L em *GG* e 4,77 KU/L em *GA+AA*). É possível que nossa amostra seja de tamanho muito pequeno para que essa diferença pudesse ser estatisticamente significativa.

No trabalho de LEPIENSKI e cols. (2006), é considerado que a atividade baixa da BChE poderia ser levada em conta no aumento de risco de DM1 precoce, uma vez que já houve relato da atividade mais baixa da BChE estar associada com disfunção auto-imune em mulheres grávidas (MAHMOUD e cols., 2003). Entretanto, pode-se observar na tabela 10 que os dois grupos de DM1 ($IA \leq 12$ anos e > 12 anos) não diferem com relação às médias da atividade da BChE ($4,96 \pm 1,23$ KU/L e $5,16 \pm 1,14$ KU/L, respectivamente).

O valor de *odds ratio* de LEPIENSKI e cols. (2006) encontrado foi de 2,1 (1,1-4,0) para os indivíduos com a variante *K* em relação ao homozigoto usual, no sentido de ser acometido de DM1 precoce. Na tabela 7, observa-se que o *odds ratio* é igual a 4,4 (1,1-17,4) para os portadores de ambas as mutações *-116A* e *K* quanto a desenvolverem o DM1 precoce. Na tabela 6, pode-se observar que as distribuições dos haplótipos *GK* e outros não diferiram nas três amostras. Esses dados, quando vistos em conjunto, nos indicam que a presença de *AK* é de maior risco do que a presença de apenas *K*.

Considerando em conjunto os resultados do presente trabalho, com relação aos *odds ratio* e aos dados de atividade da BChE, nos parece difícil considerar as variações dos exons 1 e 4 como responsáveis por maior risco de DM1 precoce. Parece-nos mais provável que os dados do presente trabalho estejam indicando a presença de uma variação em outro gene, responsável pelo aparecimento precoce do DM1, e que esta variação estaria em acoplamento com as variações *-116A* e *K*, num caso de desequilíbrio de ligação. Como o haplótipo *GK* não mostrou aumento de frequência no DM1 com IA ≤ 12 anos, é possível que essa suposta variação não ocorra, ou ocorra com frequência muito baixa, neste tipo de haplótipo. Isto sugere que ela esteja mais próxima do exon 1 do que do exon 4 do gene *BCHE*, estando a montante desse gene. Como um loco de susceptibilidade ao DM1, o *IDDM9* (MEIN e cols., 1998) foi localizado no cromossomo 3 (3q21-q25), é provável que a associação verificada seja devida a gene ainda não identificado, presente no loco *IDDM9*.

7. CONCLUSÃO

1) Os alelos e genótipos referentes ao nucleotídeo que ocupa a posição -116 do exon 1 do gene *BCHE* estão igualmente distribuídos no grupo com DM1 e no grupo controle estudados.

2) A variante *-116A* é distribuída com frequência diferente nos grupos de diabéticos classificados de acordo com a mediana da idade de aparecimento da doença em ≤ 12 anos e > 12 anos, mostrando-se com frequência significativamente maior no grupo com manifestação da doença em idade ≤ 12 anos.

3) O risco relativo (*odds ratio*) de um indivíduo apresentar DM1 precocemente (idade ≤ 12 anos) é cerca de 5 vezes maior quando possui o alelo *-116A*, tanto em heterozigose como em homozigose.

4) Na análise conjunta dos exons 1 e 4, o valor de *odds ratio* de apresentação de DM1 com idade em ≤ 12 anos é cerca de 4 vezes maior, quando a pessoa possui os genótipos com ambas as variações *-116A* e *K*, em heterozigose ou homozigose.

5) Apesar da variação *-116A* estar associada à redução na atividade da butirilcolinesterase, não foi detectada diferença nas médias de atividade enzimática entre os grupos de DM1, classificados de acordo com a idade de aparecimento da doença (≤ 12 anos e > 12 anos).

6) Em vista do exposto no item 5, os dados do presente trabalho parecem indicar a presença de variação em outro gene, que seria responsável pelo aparecimento do DM1 em idade ≤ 12 anos. Esta variação estaria em acoplamento com as variações *-116A* e *K*, num caso de desequilíbrio de ligação. Como o haplótipo *-116G K* não mostrou aumento de frequência no DM1 em pacientes com idade de aparecimento da doença ≤ 12 anos, sugere-se que essa suposta variação esteja mais próxima do exon 1 do que do exon 4 do gene *BCHE*, estando a montante desse gene.

8. BIBLIOGRAFIA

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

ALCÂNTARA, V. M.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A. e CULPI, L. CHE1 UF serum cholinesterase phenotype in Whites and Non-Whites from Southern Brazil as determined by a new method. *Human Heredity*, v. 41, p. 103-106, 1991.

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

ALCÂNTARA V.M.; RODRIGUES, L.C.; OLIVEIRA, L.C.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Association of the *CHE2* locus with body mass index and butyrylcholinesterase activity. **Hum. Biol.**, no prelo 2001.

ALLES, G.A.; HAWES, R.C. Cholinesterase in the blood of men. **J. Biol. Chem.**, v. 133, p. 375-390, 1940.

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

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

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

ARPAGAUS, M.; KOTT, M.; VATSIS, K.P.; BARTELS, C.F.; LA DU, B.N.; LOCKRIDGE, O. Structure of the gene for human butyrylcholinesterase. Evidence for a single copy. **Biochemistry**, v. 29, p. 124-131, 1990.

AUGUSTINSSON, K.B. Cholinesterase and anticholinesterase agents. In: Handbook of experimental pharmacology. Koelle, G.B. (org). Berlin e Nova York, **Springer-Verlab**, pp. 89-128, 1963.

BALASUBRAMANIAN, A.S.; BHANUMATHY, C.D. Noncholinergic functions of cholinesterases. **FASEB J.**, v. 7, p. 1354-1358, 1993.

BARTELS, C.F.; VAN DER SPEK, A.F.L.; LA DU, B.N. Two polymorphisms in the noncoding region of the BCHE gene. **Nuclie Acids Res.**, v. 18, p. 6171, 1990.

BARTELS, C.F.; JENSEN, F.S.; LOCKRIDGE, O.; VAN DER SPEK, A.F.L.; RUBINSTEIN, H.M.; LUBRANO, T.; LA DU, B.N. DNA mutation associated with the human butyrylcholinesterase K-variant and its linkage to the atypical variant mutation and other polymorphic sites. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 50, p. 1086-1103, 1992a.

BARTELS, C.F.; JAMES, K.; LA DU, B.N.; DNA mutations associated with the human butyrylcholinesterase J-variant. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 50, p. 1104-1114, 1992b.

BOECK, A. T.; FRY, D.L.; SASTRE, A. e LOCKRIDGE, O. Naturally occurring mutation, Asp70His, in human butyrylcholinesterase. **Ann. Clin. Biochem.**, v. 39, p. 154-156, 2002.

BERRY, W.T.C.; COWIN, P.J.; DAVIES, D.R. A relationship between body fat and plasma pseudo-cholinesterase. **Br. J. Nutr.**, v. 8, p. 79-82, 1954.

BUDOWLE, B.; CHKRABORTY. R.; GIUSTI, A. M. EISENBERG, A. J.; ALLEN, R. C. Analysis of the VNTR locus DIS80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 48, p. 137-144, 1991.

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

CHU, M.I.; FONTAINE, P.; KUTTY, K.M.; MURPHY, D.; REDHEENDRIAN, R. Cholinesterase in serum and low density lipoprotein of hyperlipidemic patients. **Clin. Chim. Acta**, v. 85, p. 55-59, 1978.

CONCANNON, P.; GOGOLIN-EWENS, K.J.; HINDS, D. A.; WAPELHORST, B.; MORRISON, V.A.; STIRLING, B.; MITRA, M. FARMER, J.; WILLIAMS, S.R.; COX, N.J.; BELL, G.I.; RISCH, N.; SPIELMAN, R. S. A second-generation screen of the human genome for susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus. **Nature Genetics**. v. 19, p. 292- 296, 1998.

CUCUIANU, M.; POPESCU, T.A.; OPINCARU, A.; HARAGUS, St. Serum pseudocholinesterase and ceruloplasmin in various types of hyperlipoproteinemia. **Clin. Chim. Acta**, v. 59, p. 19-27, 1975.

CUCUIANU, M.; POPESCU, T.A.; HARAGUS, St. Pseudocholinesterase in obese and hyperlipemic subjects. **Clin. Chem. Acta**, v. 22, p. 151-155, 1968.

DEN DUNNEN, J. T.; ANTONARAKIS, S. E. Mutation nomenclature extension and suggestions to describe complex mutations: a discussion. **Hum. Mutation**, New York, v. 15, p. 7-12, 2000.

DEY, D. C.; KANNO, T.; SUDO, K. e MAEKAWA, M. Genetic analysis of 6 patients with no detectable butyrylcholinesterase activity-three novel silent genes and heterogeneities of mutations in *BCHE* gene in Japan. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 61 (suppl), p. 2307, 1997.

FADEL-PICHETH, C.M.T. Variabilidade do loco *BCHE* da butirilcolinesterase e peso do adulto em amostra de Curitiba. Curitiba, 1991. 117 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

FLOREZ, J. C.; HIRSCHHORN, J.; ALTSHULER, D. The Inherited Basis of Diabetes Mellitus: Implications for the genetic Analysis of Complex Traits. **Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.**, v. 4, p. 257-291, 2003.

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

GATKE, M. R.; OSTERGAARD, D.; BUNDGAARD, J. R.; VARIN, F. e VIBY-MOGENSEN, J. Response to mivacurium in a patient compound heterozygous for novel and a known silent mutation in the butyrylcholinesterase gene genotyping by sequencing. **Anesthesiology**, v. 95, p. 600-606, 2001.

GNATT, A.; PRODY, C. A.; ZAMIR, T.; LIEMAN-HURWITZ, J.; ZAKUT, H. e SOREQ, H. Expression of alternatively terminated unusual human butyrylcholinesterase messenger-RNA transcripts, mapping to chromosome 3q26-ter, in nervous-system tumors. **Cancer Res.** V. 50, p. 1983-1987, 1990.

GREENBERG, C. P.; PRIMO-PARMO, S. L.; PANTUCK, E. J. e LA DU, B. N. Prolonged response to succinylcholine: a new variant of plasma cholinesterase that is identified as normal by traditional phenotypic methods. **Anesth. Analg.**, v. 81, p. 419-421, 1995.

GAUGHAN, G.; PARK, H.; PRIDDLE, J.; CRAIG, I.; CRAIG, S. Refinement of the localization of human butyrylcholinesterase to chromosome 3q26.1-q26.2 using a PCR-derived probe. **Genomics**, v. 11, p. 455-458, 1991.

GUO, S.; THOMPSON, E.; Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics**, v. 48, p. 361- 372, 1992.

HADA, T.; MURATANI, K.; OHUE, T.; IMANISHI, H.; MORIWAKI, Y.; ITO, M.; AMURO, Y.; HIGASHINO, K. A variant serum cholinesterase and a confirmed point mutation at Gly-365 to Arg found in a patient with liver cirrhosis. **Internal Medicine.** v. 31, p. 357-362, 1992.

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

HARRIS, H.; WHITTAKER, M. Differential inhibition of human serum cholinesterase with fluoride: recognition of two new phenotypes. **Nature**, v.191, p 496-498, 1961.

HASHIM, Y.; SHEPHERD, D.; WILTSHIRE, S.; HOLMAN, R.R.; LEVY, J.C.; CLARK, A.; CULL, C.A. Butyrylcholinesterase K variant on chromosome 3 q is associated with Type II diabetes in white Caucasian subjects. **Diabetologia**, v. 44, p. 2227-2230, 2001.

HIDAKA, K.; IUCHI, I.; YAMASAKI, T.; OHHARA, M.; SHODA, T.; PRIMO-PARMO, S.L. e LA DU, B. N. Identification of two different genetic mutation associated with silent phenotypes for human serum cholinesterase in Japanese. **Rinsho Byori**, v. 40, p. 535-540, 1992.

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

HIDAKA, K.; WATANABE, Y.; TOMITA, M.; UEDA, N.; HIGASHI, M.; MINATOGAWA, Y. e IUCHI, I. Gene analysis of genomic DNA from stored serum by polymerase chain reaction: identification of three missense mutations in patients with cholinesterasemia and ABO genotyping, **Clin. Chim. Acta**, v.303, p. 61-67, 2001.

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

JUUL, P. Human plasma cholinesterase isoenzymes. **Clin. Chem. Acta**. V. 19, p 205-213, 1968.

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

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

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

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

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

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

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

LEPIENSKI, L.M.; SOUZA, R.L.R.; CHAUTARD-FREIRE MAIA, E.A.; e cols. Variant K of butyrylcholinesterase and risk of early-onset type 1 diabetes mellitus in Euro-Brazilians. **J. Diabetes, Obesity and Metabolism.**, v.559, 2006.

LEVANO, S.; GINZ, H.; SIEGEMUND, M.; FILIPOVIC, M.; VORONKOV, E., URWYLER, A. e GIRARD; T. Genotyping the butyrylcholinesterase in patients with

prolonged neuromuscular block after succinylcholine. **Anesthesiology**, v. 102, p. 531-535, 2005.

LIU, W.; CHENG, J.; IWASAKI, A.; IMANISHI, H. e HADA, T. Novel mutation and multiple mutations found in the human butyrylcholinesterase gene. **Clin. Chim. Acta**, v. 326, p. 193-199, 2002.

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

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

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

MAEKAWA, M.; SUDO, K.; KANNO, T.; KOTANI, K.; DEY, D.D.; ISHIKAWA, J. e IZUME, M. Genetic mutations of butyrylcholine esterase identified from phenotypic abnormalities in Japan. **Clin. Chem.**, v. 43, p. 924-9, 1997.

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

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

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

MASSON, P. Molecular heterogeneity of human cholinesterase. In: MASSOULIÉ J. e cols. Cholinesterase: Structure, Function, Mechanisms, Genetics and Cell Biology. Washington DC: **American Chemical Society**, 1991.

MCGUIRE, M.C.; NOGUEIRA, C.P.; BARTELS, C.F.; LIGHTSTONE, A.H.; HAJRA, A.; VAN DER SPEK, A.F.L.; LOCKRIDGE, O.; LA DU, B.N. Identification of the structural mutation responsible for the dibucaine-resistant (atypical) variant form of human cholinesterase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 86, p. 953-957, 1989.

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

MESULAM, M. M.; GUILLOZER, A.; SHAW, P.; LEVEY, A.; DUYSSEN, E. G.; e LOCKRIDGE, O. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. **Neuroscience**, v. 110, p. 627-639, 2002.

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

MILLARD, C.B.; BROOMFIELD, C.A. A computer model of glycosylated human butyrylcholinesterase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 189, p. 1280-1286, 1992.

MORROW, A. C.; MOTULSKY, A. G. Rapid screening method for the common atypical pseudocholinesterase variant, **J. Lab. Clin. Med.**, v. 71, p. 350-356, 1968.

MUENSCH, H.; GOEDDE, H-W.; YOSHIDA, A. Human serum cholinesterase subunits and number of active sites of the major component. **Eur. J. Biochem.**, v. 70, p. 217-223, 1976.

MURATANI, K.; HADA, T.; YAMAMOTO, Y.; KANEKO, T.; SHIGETO, Y.; OHUE, T.; FURUYAMA, J. e HIGASHINO, K. Inactivation of the cholinesterase gene by alu insertion: possible mechanism for human gene transposition. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, p. 11315-11319, 1991.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI).
Disponível em:

http://www.ncbi.nlm.gov/entrez/viewer.Fcgi?val=NC_000003&from=166973395&to=167037952&strand=2&dopt=gb. Acessado em 04/05/2006.

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

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

NOGUEIRA, C.P.; MCGUIRE, M.C., GRAESER, C.; BARTELS, C.F., ARPAGAUS, M.; VAN DER SPEK, A.F.L.; LIGHTSTONE, H.; LOCKRIDGE, O.; LA DU, B.N. Identification of a frameshift mutation responsible for the silent phenotype of human serum cholinesterase, GLY 117 (GGT → GGAG). **Am. J. Hum. Genet.**, v. 40, p. 934-940, 1990.

NOGUEIRA, C.P.; MCGUIRE, M.C.; BARTELS, C.F.; LIGHTSTONE, H.; VAN DER SPEK, A.F.; LOCKRIDGE, O.; LA DU, B.N. Identification of two different point mutations associated with the fluoride-resistant phenotype for human butyrylcholinesterase. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 51, p. 821-828, 1992.

ORITA, M.; IWAHANA, H.; KANAZAWA, H.; HAYASHI, K.; SEKIYA, T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 86, p. 2766-2770, 1989.

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

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

PRIMO-PARMO, S.L.; LIGHTSTONE, H. e LA DU B. N. Characterization of an unstable variant (BCHE115D) of human butyrylcholinesterase. **Pharmacogenetics**, v. 7, p. 27-34, 1997.

PUGLIESE, A.; ZELLER, M.; FERNANDEZ, A. I.; ZALCBERG, L. J.; BARTHETT, R. J. The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlated with allelic variation at the INS VNTR-IDDM2 susceptibility locus for type 1 diabetes. **Nat. Genet.**, v. 15, p. 293-297, 1997.

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

ROBSON, E.B.; HARRIS, H. Further data on the incidence and genetics of the serum cholinesterase phenotype C5+. **Ann. Hum. Genet.**, v. 29, p. 403-408, 1966.

RUBINSTEIN, H.M.; DIETZ, A.A.; LUBRANO, T. E₁^K, another quantitative variant at cholinesterase locus 1. **J. Med. Genet.**, v. 15, p. 27-29, 1978.

SAKAMOTO, N.; HIDAKA, K.; FUJUSAWA, T.; MAEDA, M. e IUCHI, I. Identification of a point mutation associated with a silent phenotype of human serum butyrylcholinesterase- a case of a familial cholinesterasemia. **Clin. Chim. Acta.**, v. 274, p. 159-66, 1998.

SCHNEIDER, S., ROESSLI, D. EXCOFFIER, L. **ARLEQUIM**: a software for population genetic data analysis, version 2000. Genetics and Biometry Laboratories, Dept of Anthropology, University of Genève, Genève, 2000.

SHAFFERMAN, A.; KRONMAN, C.; FLASHNER, Y.; LEITNER, M.; GROSFELD, H.; ORDENTLICH, A.; GOZES, Y.; COHEN, S.; ARIEL, N.; BARAK, D.; HAREL, M.; SILMAN, I.; SUSSMAN, J.L.; VELAN, B. Mutagenesis of human acetylcholinesterase. Identification of residues involved in catalytic activity and in polypeptide folding. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 17640-17648, 1992.

SHAM, P. C.; CURTIS, D. An extended transmission disequilibrium test (TDT) for multi-allele marker loci. **Ann Hum Genet** 59, p. 323-336, 1995.

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

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diagnóstico e Classificação do Diabetes Mellito e Tratamento do Diabetes Mellito do Tipo 2. Disponível em: <<http://www.diabetes.org.br/>> 2003. Acesso em : 08/06/2004.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Atualização Brasileira sobre Diabetes Disponível em: <<http://www.diabetes.org.br/>> , 2005. Acesso em : 04/05/2006.

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

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

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

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

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

SOUZA, R.L.R.; FADEL-PICHETH, ALLEBRANDT, K. V.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Possible Influence of *BCHE* Locus of Butyrylcholinesterase on Stature and Body Mass Index. **Am. J. of Physical Anthropology**, v. 126, p. 329-334, 2005a.

SOUZA, R.L.R.; MIKAMI, L. R.; MAEGAWA, R. O. B. and CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Four new mutations in the *BCHE* gene of butyrylcholinesterase in a Brazilian blood donor sample. **Mol. Gent. Metab.**, v.84, 9. 349-353, 2005b.

SUDO, K.; MAEKAWA, M.; AKIZUKI, S.; MAGARA, T.; OGASAWARA, H. and TANAKA, T. Human butyrylcholinesterase L3301 mutation belongs to a fluoride-resistant gene, by expression in human fetal kidney cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 240, p. 372-375, 1997.

TAKAGI, T.; NARAHARA, A.; TAKAYANA, H.; SHIMODA, R.; NAGAMINE, T.; MORI, M. A new point mutation in cholinesterase: relationship between multiple mutation sites and enzyme activity. **Int. Hepatol. Commun.** v. 6, p. 288-293, 1997.

TULSA, M. L., Statistica for Windows - STATSOFT Inc. versão 5.5, OK, USA, 2000.

YANG, F.; LUM, J.B.; MACGILL, J.R.; MOORE, C.M.; NAYLOR, S.L.; VAN BRAGT, P.H.; BALDWIN, W.D.; BOWMAN, B.H. Human transferrin: cDNA characterization and chromosomal localization. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, USA, v. pl 2752-56, 1984.

YEN, T.; NIGHTINGALE, B. N., BURNSS, J. C.; SULLIVAN, D. R. and STEWART, P. M. Butyrylcholinesterase (BCHE) Genotyping for Post-Succinylcholine Apnea in an Australian Population. **Clin Chem.**, v. 49, p. 1297-1308, 2003.

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

WHITTAKER, M. Cholinesterase. New York, Karger, **Basel**, v. 11, 1986. p. 1-126.

APÊNDICE

Resultado da genotipagem do exon 1 referente ao nucleotídeo -116 em diabéticos do tipo 1 e grupo controle (doadores de sangue).

Nº amostra (DM1)	Variante -116	Nº amostra Controle	Variante -116	Nº amostra (DM1)	Variante -116	Nº amostra Controle	Variante -116
107	GG	2	GA	41	GG	315	GA
348	GG	3	GG	39	GG	316	GG
330	GA	4	GG	127	GG	334	GG
81	GG	5	GA	385	GG	347	GA
238	GG	9	GG	93	GG	351	GG
51	GG	12	GG	78	AA	373	GG
17	GG	13	GG	130	GA	377	GA
104	GG	15	GG	90	GG	388	GG
153	GG	19	GG	144	GG	390	GA
166	GG	20	GG	67	GG	418	GA
247	GG	24	GG	26	GG	419	GA
340	GG	28	GA	110	GA	420	GG
40	GG	30	GG	50	GG	439	GG
236	GG	37	GG	79	GG	444	GG
392	GG	47	GG	11	GG	451	GG
28	GG	64	GA	66	GG	475	GG
65	GG	72	GA	398	GA	479	GA
131	GG	73	GG	208	GG	485	GG
209	GG	79	GG	132	GA	490	GG
159	GG	80	GG	125	GG	509	GG
397	XXXXX	86	GG	329	GA	535	GG
249	GG	97	GA	70	GG	539	GG
89	GA	131	GG	387	GA	582	GG
248	GG	157	GG	30	GG	588	GG
339	GA	166	GG	43	GG	620	GG
119	GG	173	GG	145	GA	644	GG
386	GG	195	GG	359	GA	652	GG
195	GG	206	GG	361	GG	677	GG
158	GG	215	GG	160	GG	688	GA
63	GG	219	GG	325	GG	762	GG
161	GG	221	GG	256	GG	846	GG
133	GA	237	GA	324	GG	891	GG
323	GA	256	GG	55	GG	910	GA
91	GG	265	GG	103	GG	920	GG
155	GG	285	GG	61	GG	979	GG
164	GA	313	GG	92	GG	992	GG

 Indivíduo excluído da amostra, devido a não amplificação de sua amostra de DNA

ANEXO 1**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E INFORMADO**

- a) Você está sendo convidado a participar de um estudo intitulado. “Variabilidade da butirilcolinesterase no diabetes mellitus”. É através das pesquisas clínicas que ocorrem os avanços na medicina, e sua participação é de fundamental importância.
- b) O objetivo desta pesquisa é dar indicações da possível função biológica da enzima butirilcolinesterase no organismo humano.
- c) Como em qualquer tratamento você poderá experimentar alguns desconfortos, principalmente relacionados à coleta de sangue.
- d) Estão garantidas todas as informações que você queira, antes e depois do estudo.
- e) A sua participação neste estudo é voluntária. Você tem a liberdade de recusar participar do estudo, ou se aceitar a participar, retirar seu consentimento a qualquer momento. Este fato não implicará na interrupção de seu atendimento, que está assegurado.
- f) As informações relacionadas ao estudo poderão ser inspecionadas pelos médicos e bioquímicos 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 seja mantida.
- g) Todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa (exames, medicamentos, etc)... Não são da responsabilidade do paciente.
- h) Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer valor em dinheiro. Você terá a garantia de que qualquer problema decorrente do estudo será tratado no próprio H.C.
- i) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

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 com o meu médico. 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 paciente Data Prof. Vânia M. Alcântara

Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

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

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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