

**VARIANTES POLIMÓRFICAS NO GENE GLUTATIONA S TRANSFERASE E
DIABETES MELLITUS TIPO 2**

Fabio Eduardo Gonçalves Ribeiro (Bolsista FUNADESP/UNOPAR), e-mail: fabioeduardoribeiro@outlook.com. Layse Morotti (Colaboradora), e-mail: lah_moroti@yahoo.com.br. Regina Célia Poli-Frederico (Orientadora), e-mail: regina.frederico@unopar.br.

Universidade Norte do Paraná (UNOPAR) | Mestrado em Ciências da Reabilitação
UEL/UNOPAR

Área: Educação Física.**Introdução**

Em termos mundiais, cerca de 240 milhões de indivíduos apresentam DM2, com uma projeção de 366 milhões para o ano de 2030, dos quais dois terços serão habitantes de países em desenvolvimento. Infelizmente, cerca de metade das pessoas com DM2 desconhecem que são portadores desta condição e não podem, dessa forma, prevenir suas complicações. No Brasil, o número estimado de portadores de DM2 é de aproximadamente 16 milhões de pessoas. (SILVA *et al.*, 2012). A glutathione S transferase (GST) está relacionada à suscetibilidade ao Diabetes mellitus (DM), devido a perda de sua atividade enzimática. Esta enzima, está associada à mecanismos antioxidantes protetores do organismo; ou seja, participam do sistema de defesa celular que combate o estresse oxidativo, detoxificando o organismo através da eliminação de radicais livres e intermediários reativos de oxigênio. Crescentes evidências indicam que o estresse oxidativo é aumentado no diabetes devido ao excesso de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e diminuição da eficiência das defesas antioxidantes e caso o gene esteja mutado, a oxidação é mantida, a enzima codificada poderá ter perda de função e não realizará a metabolização correta (BID *et al.*, 2010). Com os genes GST sendo polimórficos existe a possibilidade de que modificações específicas na atividade do metabolismo de cada enzima levem ao indivíduo o risco de estresse oxidativo nas células beta pancreáticas, devido a intermediários tóxicos ao DNA. (WANG *et al.*, 2010). Para ampliar o nosso conhecimento, o presente estudo objetivou analisar a relação entre polimorfismos nos genes GSTM1 e GSTT1 em pacientes com DM2.

Material e Métodos*Procedimentos Éticos*

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNOPAR (protocolo no. PP0070/09). Após serem esclarecidos sobre a finalidade do trabalho, os participantes da pesquisa já assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Delineamento e População do Estudo

A amostragem do presente estudo foi constituída por amostras de sangue periférico de 161 pacientes com idade ≥ 60 anos, participantes do projeto EELO (Estudo sobre o Envelhecimento e Longevidade) da Universidade Norte do Paraná (UNOPAR), fisicamente independentes, de acordo com a classificação pelo Estado Funcional Spirduso (níveis 3 e 4) (SPIRDUSO, 2005), oriundos de 38 unidades básicas de saúde da área urbana, estratificados aleatoriamente, considerando o gênero e as cinco regiões da cidade de Londrina. Estes foram diagnosticados através de exames laboratoriais de glicemia e hemoglobina glicada.

Procedimentos

O DNA foi extraído de leucócitos de sangue periférico através do método padrão salting out (MILLER *et al.*, 1988). Posteriormente a genotipagem para o polimorfismo de deleção dos genes GSTM1 e GSTT1 foi feita através de técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) descrito por Abdel-Rahman *et al.* (2011) utilizando a sequência de primers: GSTM1: F 5'-GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC-3' e R 5'-GTTGGGCTCAAATATACGGTGG-3' e GSTT1: F5'-TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC-3' e R 5'-TCACGGGATCATGGCCAGCA-3'.

A PCR foi realizada com o volume final de 15 μ L contendo: 100ng de DNA da amostra, tampão de reação 1X (Tris-HCL 20mM pH8,4; KCl 50mM), 2mM MgCl₂, 2mM de cada dNTP, 10pMol de cada primer, 1U de AmpliTaq Gold DNA polimerase, água ultrapura estéril. Controle negativo da reação (água ultrapura estéril) e positivo (gene CYP1A1) formando uma fração não polimórfica de 312pb. As condições de amplificação usadas foram: 94 °C/5 minutos para pré-desnaturação, 30 ciclos de 94°C/5 minutos; 59 °C/ 1 minuto e 72°C/1 minuto e, 72 °C/7 minutos para extensão final. Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em (gel de agarose (2%) e corados com (Sybr Safe). As frações de 215pb e 480pb foram notadas para os indivíduos GSTM1 e GSTT1 positivo, respectivamente. A não amplificação das variantes, com controle interno (312pb), indicou genótipos nulos para cada variante ou ambas.

Análise estatística

Os dados referentes a caracterização da amostra são apresentados em média e desvio padrão ou por frequência relativa. Foi utilizado o teste do qui quadrado para a identificação de associação entre a frequência dos genótipos e o Diabetes mellitus 2. A significância estatística foi considerada quando $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

A amostra foi constituída por 161 idosos com média de idade de 67,4 anos (DP= 6,1) divididos em três grupos: não diabéticos (n=70), pré-diabéticos (n=50) e diabéticos tipo 2 (n=41). De acordo com o Quadro 1, dos 161 indivíduos avaliados, 75,2% pertenciam ao gênero feminino. Foi constatada maior proporção de genótipos nulos para o gene GSTM1 nulos (50,3%) e de genótipos normais para o gene GSTT1 (62,1%) na população investigada.

Quadro 1 – Caracterização das variáveis da população de estudo.

Características	N	%
Gênero		
Masculino	40	24,8
Feminino	121	75,2
Total	161	100,0
Diabetes Mellitus tipo 2		
Sem diabetes	70	43,5

Pré diabéticos	50	31,1
Diabéticos	41	25,5
Total	161	100
Genótipo <i>GSTM1</i>		
Presente (+)	80	49,7
Nulo (-)	81	50,3
Total	161	100
Genótipo <i>GSTT1</i>		
Presente (+)	100	62,1
Nulo (-)	61	37,9
Total	78	100
Idade (Média±Desvio Padrão)	67,4 anos ± 6,1	

Fonte: Dados da pesquisa.

Quando foi realizado a categorização por gênero, não foi encontrada nenhuma associação significativa ($p > 0,05$) entre os gêneros feminino e masculino e os genótipos avaliados em idosos com DM2 (Quadros 2 e 3).

Quadro 2 – Distribuição das frequências genótípicas dos genes *GSTM1* e *GSTT1* para o gênero feminino e a relação com DM2 na população idosa avaliada

Características	Sem diabetes N (%)	Pré – diabético N (%)	Diabético N (%)	χ^2	Valor de p
Genótipo <i>GSTM1</i>					
Presente (+)	24(47,1)	22(55,0)	13(43,3)		
Nulo (-)	27(52,9)	18(45,0)	17(56,7)	0,596	1,036
Total	51(100)	40(100)	30(100)		
Genótipo <i>GSTT1</i>					
Presente (+)	33(64,7)	24(60,0)	14(46,7)		
Nulo (-)	18(35,3)	16(40,0)	16(53,3)	0,276	2,578
Total	51(100)	40(100)	30(100)		

Fonte: Dados da pesquisa.

Quadro 3 – Distribuição das frequências genótípicas dos genes *GSTM1* e *GSTT1* para o gênero masculino e a relação com DM2 na população idosa avaliada

Características	Sem diabetes N (%)	Pré – diabético N (%)	Diabético N (%)	χ^2	Valor de p
Genótipo <i>GSTM1</i>					
Presente (+)	7(36,8)	8(80,0)	6(54,5)		
Nulo (-)	12(63,2)	2(20,0)	5(45,4)	0,085	4,919
Total	19(100)	10(100)	11(100)		
Genótipo <i>GSTT1</i>					
Presente (+)	13(68,4)	8(80,0)	8(72,7)		
Nulo (-)	6(31,6)	2(20,0)	3(27,3)	0,802	0,441
Total	19(100)	10(100)	11(100)		

Fonte: Dados da pesquisa.

As células β pancreáticas são muito sensíveis ao esforço citotóxico em função de expressarem poucas enzimas antioxidantes apresentando maior risco de dano oxidativo do que outros tecidos. No Diabetes mellitus do tipo 2 observa-se que o stress oxidativo contribui na diminuição da produção de insulina e destruição das células β pancreáticas. (WANG *et al.*, 2010). Acredita-se que o stress oxidativo aumentado é um dos principais fatores na etiologia e complicações do DM2, devido ao esforço oxidativo estar aumentado nestes pacientes pela superprodução da

espécie reativa do oxigênio (ROs) e conseqüentemente, eficiência diminuída de defesas antioxidantes (BID *et al.*, 2010).

Vale ressaltar que muitos estudos sobre o polimorfismo nos genes que codificam as enzimas Glutathione S-transferases (GST) já foram realizados em diversas doenças, inclusive DM2, porém este é o primeiro relato em relação ao DM2 em uma população idosa.

Os resultados do presente estudo mostraram que a amostra composta por 161 indivíduos apresentou maior proporção de indivíduos do gênero feminino (75,2%) e os resultados da nossa investigação mostraram uma não associação do polimorfismo tanto no gene GSTM1 quanto no gene GSTT1 em pessoas idosas com DM2. A frequência de genótipo nulo neste estudo foi de 50,3% para o gene GSTM1, já para o gene GSTT1 a frequência foi de 37,9%. Para tais genótipos não foi encontrada nenhuma associação significativa com DM2, porém nos estudos de Bid *et al.* (2010) e Reis *et al.* (2011) o genótipo nulo de GSTM1 pode aumentar o risco de ter DM2, ou seja, os indivíduos tornam-se incapazes de detoxificar os produtos do estresse oxidativo. O mesmo ocorre com as pesquisas de Amer *et al.* (2011), Reis *et al.* (2011) e Wang *et al.* (2006) em relação ao genótipo nulo para GSTT1.

Relatos em literatura mostram que a presença dos genótipos GSTM1+/GSTT1+ promovem proteção ao DM2, enquanto que os mesmos genótipos nulos são considerados fatores de risco independente para o desenvolvimento de DM2 (ANDREAZZI *et al.*, 2009). Entretanto os resultados do presente estudo não corroboram estes achados. Tais resultados contraditórios obtidos no presente estudo podem ter sido resultado do pequeno número amostral e/ou da interação entre diferentes fatores genéticos e ambientais, evidenciando análises futuras com outros genes de classes de GST diferentes e um n amostral maior.

Conclusão

A partir destes estudos podemos concluir que: Não houve nenhuma associação significativa ($p > 0,05$) entre os polimorfismos nos genes GSTM1 e GSTT1 e a DM2 em ambos os gêneros em idosos.

Agradecimentos

FUNADESP

Referências

BID, H.K. *et al.* Association of glutathione S-transferase (GSTM1, T1 and P1) gene polymorphisms with type 2 diabetes mellitus in north Indian population. *J. Postg. Med.*, v.56, n.3, p.176-181,2010.

GANONG, W.F. *et al.* *Fisiologia médica*. Rio de Janeiro: AMGH, 2010.

GUYTON, A.C. *et al.* *Fisiologia humana*. Rio de Janeiro: Guanabara, 2005.

HALL, J.E. *et al.* *Tratado de fisiologia médica*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

OLIVEIRA, G.C. *et al.* *Functional capacity in patients with diabetes mellitus in Matinhos city, Paraná*. Rio de Janeiro, Brasil. 2012.

REIS, A.A.S. et al. The Implications of Genetic polymorphism of GST Gene in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes mellitus. *Rev. Universid. Vale Rio Verde*, v.9, n.2, p.92-100, 2011.

ROCHA, A.P. Polimorfismos genéticos: implicações na patogênese do carcinoma medular de tireóide. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*,v.51. n.5, 2007, 51/5.

SILVA, V.C. et al. Fisioterapia e neuropatias periféricas em portadores de diabetes melito ii: produção bibliográfica entre 1966 e 2011. *Rev. Fisioter. S Fun. F*, 2012.

VOGEL, F.; MOTULSKY, A.G. *Genética médica: problemas e abordagens*. Rio de Janeiro: Guanabara, 2013.

WANG, G. ZHANG, L. LI, Q. Genetic polymorphisms of GSTM1, GSTT1 and NQO1 genes and Diabetes risk in chinese population. *Bioch. Biophys. Res. Comm.*, v.341, p.310-313, 2006.