

AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO DE DELEÇÃO DE GSTM1 NA SUSCEPTIBILIDADE AO DIABETES MELLITUS TIPO 2*

DENISE DA SILVA PINHEIRO, CÉSAR RAMOS ROCHA
FILHOA, CLÁUDIA APARECIDA MUNDIM, CIRANO JOSÉ
ULHOA, PAULO CÉSAR GHENDINI, ÂNGELA ADAMSKI
SILVA REIS

Resumo: *no diabetes mellitus tipo 2, há evidências de que a ausência de uma ou mais formas de GST estejam associadas à diminuição da produção de insulina e disfunção das células — de Langerhans. Este estudo caso-controle visou analisar a associação entre o polimorfismo de deleção dos genes GSTM1 e GSTT1 com a susceptibilidade a DM2. A análise do perfil genotípico de 120 pacientes e 147 controles permitiu inferir que não há associação da deleção de GSTM1 com a susceptibilidade a DM2, porém a deleção de GSTT1 pode levar a um risco aumentado para o desenvolvimento da doença na população analisada.*

Palavras-chave: *Diabetes mellitus. Susceptibilidade genética. Polimorfismo. GSTM1 e GSTT1.*

Diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é uma doença multifatorial caracterizada por hiperglicemia crônica associada a complicações metabólicas, clínicas e sociais, decorrentes do envelhecimento precoce da população, da urbanização crescente e da adoção de estilos de vida pouco saudáveis como o sedentarismo, dieta inadequada e, sobretudo a obesidade (LERARIO *et al.*, 2008). Além do estilo de vida e da exposição ambiental, a susceptibilidade genética é um fator importante no desenvolvimento de DM2.

Vários polimorfismos de genes responsáveis pela codificação de enzimas envolvidas na biotransformação de xenobióticos podem estar associados com DM2. A Glutathione S-Transferase (GST) atua na detoxificação de xenobióticos tóxicos e produtos reativos de processos intracelulares responsáveis pelo stress oxidativo. Há evidências de que a ausência de uma ou mais formas de GST estejam associadas à diminuição da produção de insulina e disfunção das células β de Langerhans (WANG *et al.*, 2010; ROBERTSON *et al.*, 2003).

Têm sido conduzidos vários estudos quanto ao papel do polimorfismo do sistema GST em diversas patologias, com destaque para o câncer, no entanto poucos estudos avaliaram a influência deste polimorfismo no DM2 (AMER *et al.*, 2011). O polimorfismo de deleção de GSTT1 e GSTM1, que está relacionado à ausência de atividade enzimática para estas isoformas (LONDON *et al.*, 2000), têm apresentado uma correlação positiva com DM2 em estudos realizados em vários outros países (WANG *et al.*, 2006; HORI *et al.*, 2007; AMER *et al.*, 2011).

Este estudo caso-controle visou analisar a associação entre o polimorfismo de deleção dos genes *GSTM1* e *GSTT1* com a susceptibilidade a DM2 a fim de contribuir com o conhecimento sobre as bases genéticas da doença na população brasileira.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

O grupo caso foi composto de 120 pacientes com DM2 diagnosticados e acompanhados pelo Serviço de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, que foram comparados a um grupo controle de 147 indivíduos saudáveis. Foram obtidas amostras de sangue dos pacientes e controles. Em ambos os grupos foram determinados glicemia de jejum e hemoglobina glicada (A1C). Os grupos foram pareados por idade e sexo. O presente trabalho foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal de Goiás e todos os indivíduos envolvidos assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Genotipagem dos genes GSTT1 e GSTM1

Foi realizada extração de DNA das amostras utilizando kit comercial próprio para amostras de sangue. Para a análise do polimorfismo de *GSTM1* e *GSTT1* foram utilizadas as técnicas de PCR convencional e em tempo real por SYBR Green multiplex, sendo utilizada a amplificação de gene endógeno (RH92600) como controle interno da reação (Figuras 1 e 2).

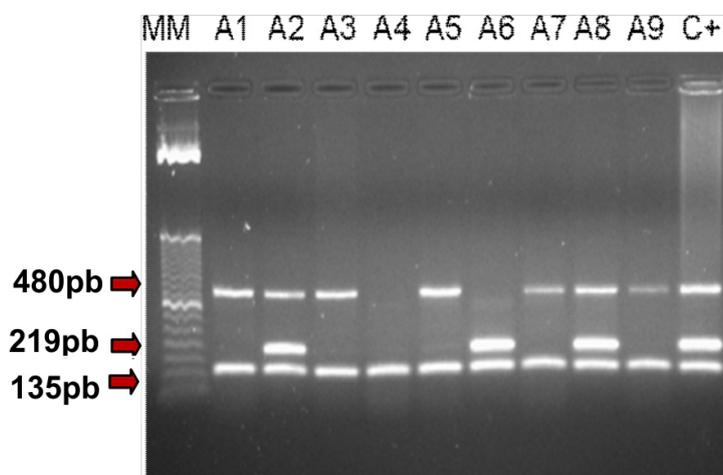


Figura 1: Gel de agarose 1,5% mostrando os genótipos para GSTT1 (480pb) e GSTM1 (219pb).

Legenda: MM: Macador 50pb, A1 a A9: amostras, C (+): controle positivo.

Nota: Foi utilizado primer RH92600 (banda de 135 pb) como controle endógeno da reação

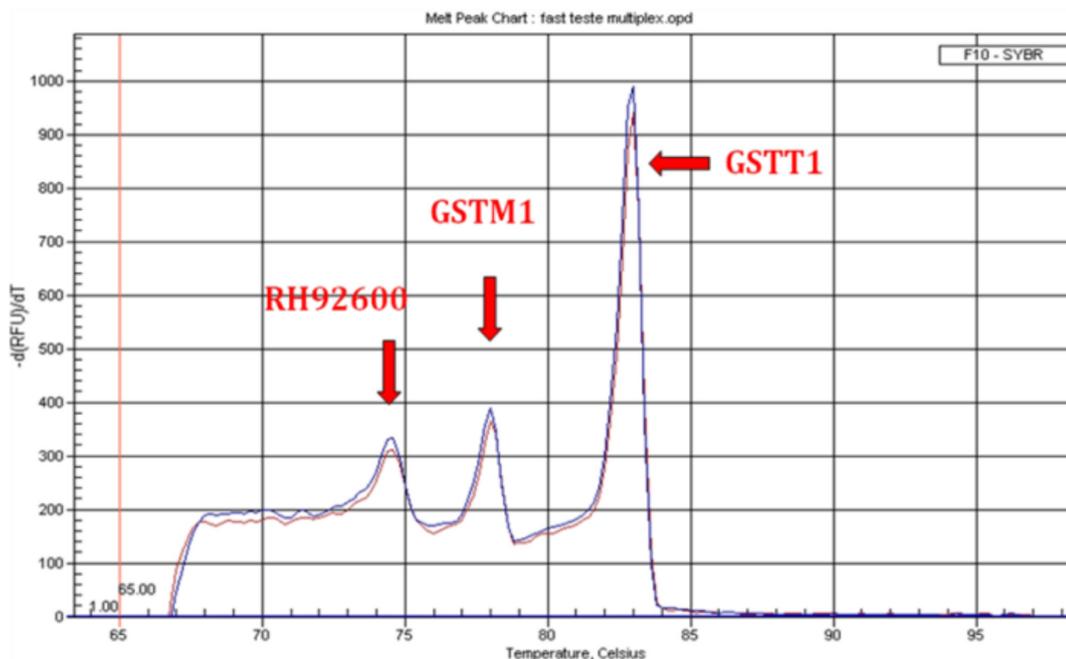


Figura 2: Curva de melting da qPCR multiplex (SYBR Green) - GSTM1 (77.5 °C), GSTT1 (82.5 °C) e RH 92600 (74 °C)

Análise Estatística

Foi empregado o software IBM SPSS Statistics 20. O teste do Qui-quadrado foi utilizado para comparar as frequências genotípicas, tendo sido aplicado o teste exato de Fisher quando necessário; o cálculo de *Odds ratio* foi utilizado para avaliar o genótipo de risco e susceptibilidade ao DM2. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Variáveis Clínicas

As características mais relevantes da população estudada são mostradas na tabela 1. A média de idade nos pacientes do grupo caso foi de 62,05 anos com tempo médio acometimento pela doença de 14,3 anos, sendo o valor médio de glicemia de jejum e Hemoglobina glicada (A1C), 186,2 mg/dL e 9,1%, respectivamente. O grupo controle apresentou média de idade de 54,5 anos e valores dentro da normalidade para as variáveis clínicas analisadas. Análises estatísticas relacionadas à distribuição por sexo, idade e hábito de fumar entre os grupos caso e controle não apresentaram diferenças significativas, indicando que os grupos comparados são homogêneos (dados não mostrados).

Tabela 1: Características da população estudada

Variáveis	Pacientes	Controles
Número	120	147
Idade (anos)	54,5 ± 11,58	62,5 ± 11,87
Sexo (%)		
Masculino	47,5	44,2
Feminino	52,5	55,8
IMC	27,3 ± 5,65	28,7 ± 5,55
Glicemia de Jejum (mg/dL)	186,2 ± 78,08	87,5 ± 8,75
Hemoglobina Glicada (%)	9,1 ± 2,7	5,6 ± 2,1
Fumantes (%)	12,9	9,4

Nota: Dados são reportados como média ± desvio padrão.

Distribuição de genótipos GSTT1 e GSTM1

Nos pacientes diabéticos, a frequência de GSTT1 nulo e GSTM1 nulo foram de 29,2% e 41,7%, respectivamente, enquanto nos controles as frequências de GSTT1 nulo e GSTM1 nulo foram 12,2 e 43,5, respectivamente (Tabela 2), o que se aproxima das frequências reportadas em países europeus (caucasianos).

Tabela 2: Distribuição dos genótipos para GSTT1 e GSTM1 na população estudada

Genótipo	Caso	Controle	X ²	GL	Valor P
	n (%)	n (%)			
<i>GSTM1</i>					
Presente	70 (58,3)	83 (56,5)	0,095	1	0,7585
Nulo	50 (41,7)	64 (43,5)			
<i>GSTT1</i>					
Presente	85 (70,8)	129 (87,8)	11,891	1	0,0006 *
Nulo	35 (29,2)	18 (12,2)			
Total	120 (100)	147 (100)			

Nota: Análise pelo teste do Qui-quadrado.

Legenda: *Diferença significativa entre os grupos.

Associação do polimorfismo de GSTT1 e GSTM1 com DM2

A distribuição da frequência genotípica para *GSTM1* entre grupo caso e grupo controle não apresentou diferenças significativas ($p = 0,758$). Para a análise de *GSTT1* observou-se que a proporção de genótipo GSTT1 nulo nos pacientes diabéticos foi significativamente maior do que nos controles ($p < 0,01$) (Tabela 2). A análise de risco por *Odds Ratio* (OR) sugere que o genótipo de risco (nulo) para *GSTT1* ($p < 0,01$) está relacionado a uma maior predisposição ao DM2 (Tabela 3), sendo que o genótipo pre-

sente confere uma redução de 0,34 vezes no risco de desenvolver a doença em relação ao genótipo nulo.

Tabela 3: Relação entre os genótipos GSTT1 e GSTM1 e o risco a DM2

Genótipo	Casos		Controle		OR (IC 95%)	p
	GR ^a	GNR ^b	GR ^a	GNR ^b		
<i>GSTM1</i>	50	70	64	83	0,93 (0,5687-1,5089)	0,8548
<i>GSTT1</i>	35	85	18	129	0,34 (0,1803-0,6369)	0,0010*

Nota: Análise por *Odds Ratio*.

Legenda: ^a Genótipo considerado de risco, ^b Genótipo não considerado de risco. *Diferença significativa entre os grupos.

CONCLUSÃO

O DM2 é uma doença multifatorial, que se desenvolve pela interação entre exposição a fatores ambientais de risco e susceptibilidade genética, de forma que os polimorfismos genéticos podem influenciar no risco para o desenvolvimento desta patologia. Os resultados sugerem que o polimorfismo de deleção do gene GSTT1 pode desempenhar um papel importante na patogênese do DM2, corroborando com estudos descritos na literatura. A análise da associação de outras variáveis clínicas, como perfil lipídico e níveis pressóricos, com o polimorfismo estudado permitirá inferir se a ausência de GSTT1 e GSTM1 pode contribuir para complicações relacionadas ao DM2, tais como, dislipidemia, nefropatia e hipertensão arterial sistêmica.

EVALUATION OF DELETION POLYMORPHISM OF GSTM1 and GSTT1 IN SUSCEPTIBILITY TO TYPE 2 DIABETES MELLITUS

Abstract: in type 2 diabetes mellitus, there is evidence that the absence of one or more forms of GST may be associated to decreased insulin production and β -cell dysfunction. This case-control study aimed to analyze the association between the deletion polymorphism of GSTM1 and GSTT1 genes with susceptibility to DM2. The analysis of genotypic profile of 120 patients and 147 controls allowed to infer that there is no association with the deletion of GSTM1 susceptibility to DM2, but the deletion of GSTT1 can lead to an increased risk for the development of disease in the population analyzed.

Keywords: *Diabetes mellitus. Genetic susceptibility. Polymorphism. GSTM1 e GSTT1.*

Referências

- AMER, M. A. *et al.* Influence of glutathione S-transferase polymorphisms on type-2 diabetes mellitus risk. *Genet. Mol. Res.*, v. 10, n. 4, p. 3722-30, 2011.
- HORI, M. *et al.* Combined glutathione S-transferase T1 and M1 positive genotypes afford protection against type 2 diabetes in Japanese. *Pharmacogenomics*, v. 8, p. 1307-1314, 2007.
- LERRARIO, A. C. *et al.* Avaliação da prevalência do Diabetes e da hiperglicemia de estresse no infarto agudo do miocárdio. *Arq. Bras. Endocrinol. Met.*, v. 52, n. 3, p. 465-472, 2008.
- LONDON, S. J. *et al.* Isothiocyanates, glutathione S-transferase M1 and T1 polymor-

phisms, and lung-cancer risk: a prospective study of men in Shanghai, China. *Lancet*, v. 356, p. 724-729, 2000.

REIS, A. F., VELHO, G. Bases genéticas do diabetes mellitus tipo 2. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.*, v. 46, p. 426-32, 2002.

ROBERTSON, R. P. *et al.* Glucose toxicity in [beta]-cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. *Diabetes*, v. 52, p. 581-587, 2003.

WANG, G. *et al.* Genetic polymorphisms of GSTT1, GSTM1, and NQO1 genes and diabetes mellitus risk in Chinese population. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 341, p. 310-313, 2006.

* Recebido em: 12.07.2012.

Aprovado em: 22.07.2012.

Apoio: Fapeg, Programa de Pós-Graduação em Biologia do ICB/UFG.

DENISE DA SILVA PINHEIRO

Mestranda em Biologia pela Universidade Federal de Goiás (UFG), graduada em Biomedicina pela UFG, Biomédica do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFG. E-mail: facasealuz@hotmail.com

CÉSAR RAMOS ROCHA FILHO

Graduando em Biotecnologia pela UFG.

CLÁUDIA APARECIDA MUNDIM

Médica Assistente do Serviço de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da UFG, Especialista em Clínica Médica pela UFG, graduada em Medicina pela UFG. E-mail: clmundim@gmail.com.

CIRANO JOSÉ ULHOA

Doutor em Genética e Bioquímica de Microorganismos (Nottingham University). Graduado em Ciências Biológicas pela UNB. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBBM) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFG. E-mail: ulhoa@icb.ufg.br

PAULO CÉSAR GHENDINI

Doutor em Farmacologia pela UNIFESP. Graduado em Farmácia e Bioquímica. Departamento de Ciências Fisiológicas do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFG. E-mail: pcghedini@gmail.com

ÂNGELA ADAMSKI SILVA REIS

Doutora em Biologia Celular e Molecular pela UFG, graduada em Ciências Biomédicas pela Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-GO). Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBBM) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFG. E-mail: angeladamski@gmail.com