



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CAMPUS MINISTRO REIS VELLOSO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

YHASMINE DELLES OLIVEIRA GARCIA

**ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS GENES *GSTM1* E *GSTT1* COM A
SUSCEPTIBILIDADE AO DIABETES *MELLITUS* TIPO 2.**

**PARNAÍBA-PI
2017**

YHASMINE DELLES OLIVEIRA GARCIA

**ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS GENES *GSTM1* E *GSTT1* COM A
SUSCEPTIBILIDADE AO DIABETES *MELLITUS* TIPO 2.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro Reis Velloso, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas.

Área de Concentração: Medicina
Investigativa e Marcadores Epidemiológicos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. France Keiko N
Yoshioka

PARNAÍBA - PI
2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade Federal do Piauí

Biblioteca Setorial Prof. Cândido Athayde – Campus Ministro Reis Velloso

Serviço de Processamento Técnico

G216a Garcia, Yhasmine Delles Oliveira.

Associação de polimorfismos nos genes *GSTM1* e *GSTT1* com a susceptibilidade ao diabetes *Mellitus* tipo 2. [manuscrito] / Yhasmine Delles Oliveira Garcia. – 2017. 50 f. : il.

Impresso por computador (*printout*).

Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) – Universidade Federal do Piauí, 2017.

Orientação: Prof^a. Dr^a. France Keiko N. Yoshioka.

Área de concentração: Medicina Investigativa e Marcadores Epidemiológicos.

1. Diabetes. 2. Diabetes *Mellitus* tipo 2. 3. Polimorfismos Genéticos. 4. Glutathionas-transferase. 5. Biomedicina. I. Título.

CDD: 616.462

CDD: 610

YHASMINE DELLES OLIVEIRA GARCIA

**ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS GENES *GSTM1* E *GSTT1* COM A
SUSCEPTIBILIDADE AO DIABETES *MELLITUS* TIPO 2.**

APROVADA EM ___/___/___

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. France Keiko Nascimento Yoshioka
Universidade Federal do Piauí – *Campus* Ministro Reis Velloso
(Presidente)

Prof^a. Dr^a. Cintia Martins Perinotto
Universidade Federal do Piauí - *Campus* Ministro Reis Velloso
(Membro)

Prof^a. Dr^a. Renata Canalle
Universidade Federal do Piauí - *Campus* Ministro Reis Velloso
(Membro)

DEDICATÓRIA

Dedico todo este trabalho a Deus e minha família!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu Deus, por mais esta vitória; pela misericórdia, amor e bênçãos.

À minha orientadora, Dra. France Keiko Nascimento Yoshioka, pela confiança, e oportunidade de fazer parte do GEHMED desde 2013, que me abriu as portas para realizar tantos sonhos. Obrigada pelas orientações. Meu carinho e admiração serão eternos.

Ao meu pai e minha mãe, agradeço pelo amor e apoio incondicional. Dedico mais esta conquista à vocês.

À minha irmã Láyla agradeço a convivência durante o final do mestrado. Ter você comigo me trouxe a paz e a alegria de me sentir em casa.

À minha irmã Louyse, peço desculpas pela distância. Meu amor por você é infinito, nunca duvide.

Aos meus avós Cinete, Salvina e Juvenal sou grata pela fé e orgulho depositados em mim.

Ao meu noivo Manoel, pela ajuda, amor e apoio em todos os momentos.

A todos os meus amigos de Teresina e às amigadas que fiz em Parnaíba, que sempre torceram por mim. Agradeço pelos momentos de distrações e carinho. Desculpem-me pela ausência..., amo vocês!

O fato de ter vocês em minha vida, com certeza me faz ter forças para eu ir em busca do meu crescimento profissional. Sem vocês tudo teria sido mais difícil.

Agradeço aos amigos do laboratório Abdias, Tâmisa, Vanessa, Hianny, Hygor, Bruna e Jessiane por todos os momentos exaustivos e principalmente alegres e repletos de companheirismo e confiança, ao Victor Marinho por me orientar na análise estatística. Sentirei muitas saudades e lembrarei de vocês com muito carinho. Aos mestres, por repassarem seus conhecimentos e valores.

Aos servidores da UFPI de Parnaíba, por contribuírem com o crescimento da nossa instituição.

Agradeço a CAPES pela concessão da bolsa durante o período a realização deste mestrado.

Por fim, a todos que direta ou indiretamente colaboraram para este trabalho, o meu muito obrigado!

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Diabetes <i>Mellitus</i> - Aspectos Gerais.....	3
2.2 Gene <i>GST</i> e os Polimorfismos de Deleção <i>GSTM1 nulo</i> e <i>GSTT1 nulo</i>	8
3. OBJETIVOS	12
3.1. Objetivo Geral.....	12
3.2. Objetivos Específicos.....	12
4. MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1. Aspectos Éticos.....	13
4.2. Seleção dos Participantes do Estudo e Variáveis Estudada.....	13
4.3. Extração, Quantificação e Armazenamento do DNA.....	14
4.4. Desenho dos Primers.....	14
4.5. Amplificação e Análise das Regiões Polimórficas.....	15
4.6. Análise Estatística.....	18
5. RESULTADOS	19
6. DISCUSSÃO	27
7. CONCLUSÃO	34
8. REFERÊNCIAS	35
ANEXO – Parecer do Comitê de Ética da UFPI	43
APENDICE I Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	47
APENDICE II – Formulário de Coleta de Dados	49

RESUMO

O Diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) é uma doença complexa caracterizada por hiperglicemia crônica associada às complicações metabólicas decorrentes da adoção de estilos de vida pouco saudáveis, sobretudo a obesidade. A base etiológica do DM2 é determinada pela interação de fatores genéticos e ambientais. Dentre os fatores genéticos, vários polimorfismos em diversos genes são associados por aumentar o risco ou elevar a predisposição para o desenvolvimento do DM2. Nesse contexto, polimorfismos nos genes das Glutathionas-s-transferases (*GSTM1* e *GSTT1*), responsáveis pela codificação de enzimas envolvidas na proteção contra o estresse oxidativo, também podem contribuir na susceptibilidade ao DM2, visto que defeitos na defesa antioxidante desempenham um papel importante na etiologia e nas complicações diabéticas. Diversos estudos têm demonstrado uma associação entre os genótipos *GSTM1 nulo* e *GSTT1 nulo* com um aumento na susceptibilidade ao DM2. Assim, este estudo caso-controle visou associar os polimorfismos de deleção de *GSTM1* e *GSTT1* com a susceptibilidade ao DM2 na população de Parnaíba - PI. Um total de 380 portadores do DM2 e 282 indivíduos saudáveis foram incluídos neste estudo. Os polimorfismos de deleção *GSTT1* e *GSTM1* foram genotipados por PCR multiplex. Dos 662 indivíduos avaliados, 80,8% pertenceram ao gênero feminino, sendo 46,6% com idade média de 65 anos. Os resultados da distribuição dos genótipos entre os grupos mostraram que a frequência de *GSTM1 nulo* foi 30,96% no caso e 33,05% no grupo controle. Já a frequência de *GSTT1 nulo* foi de 19,85% nos casos e 20,76% nos controles. Não houve diferença significativa na distribuição dos genótipos entre os grupos, nem susceptibilidade associada aos polimorfismos de deleção *GSTM1 nulo* ($X^2= 0,29$, $p= 0,64$; OR= 0,90; IC= 0,64-1,28; $p=0,65$) e *GSTT1 nulo* ($X^2= 0,077$; $p= 0,78$; OR= 0,94; IC= 0,63-1,41; $p=0,86$) com o DM2. Os genótipos de risco combinados, (*GSTM1 nulo/ GSTT1 nulo*) foram pouco frequentes em ambos os grupos (12,29% e 12,43%) e não foram associados com a susceptibilidade ao diabetes em relação aos dois genótipos presentes (OR = 0,96; IC = 0,58-1,60; $p = 1,00$). No entanto, a combinação dos genótipos (*GSTM1 presente/ GSTT1 presente*) foi predominante em ambos os grupos (58,09% e 61,65%), com maior proporção no grupo caso ($p<0,004$). Os indivíduos com DM2, portadores do genótipo *GSTM1 nulo*, apresentaram níveis mais elevados de glicemia em jejum ($p= 0,002$) do que os indivíduos com o genótipo *GSTT1 nulo* ($p< 0,001$). Além disso, esse último grupo também apresentou maiores níveis de hemoglobina glicada ($p= 0,045$) e HDL-colesterol ($p= 0,038$). Estes resultados sugerem que, embora os genótipos nulos de *GSTM1* e *GSTT1* não estejam associados com a chance de desenvolver DM2, podem produzir efeitos relevantes nos parâmetros clínicos contribuindo para um melhor entendimento da etiologia e complicações dessa patologia.

Palavras-Chave: Diabetes *mellitus* tipo 2. Polimorfismos genéticos. Glutathionas-s-transferase.

ABSTRACT

Diabetes mellitus type 2 (DM2) is a complex disease characterized by chronic hyperglycemia associated with metabolic complications due to the adoption of unhealthy lifestyles, especially obesity. The etiology of DM2 is determined by the interaction of genetic and environmental factors. Among the genetic factors, several polymorphisms in some genes are associated by increasing the risk or raising the predisposition for DM2. In *this context, polymorphisms in the glutathione-s-transferase genes (GSTM1 and GSTT1)*, responsible for the encoding of enzymes involved in protection against oxidative stress, may also contribute to the susceptibility to DM2, since defects in antioxidant defense play an important role in etiology and diabetic complications. Several studies have demonstrated an association between null *GSTM1* genotypes and null *GSTT1* with an increased susceptibility to DM2. Thus, this case-control study aims to associate *GSTM1* and *GSTT1* deletion polymorphisms with susceptibility to diabetes in the population of Parnaíba - PI. A total of 380 DM2 patients and 282 non-DM2 subjects were included in this study. The *GSTT1* and *GSTM1* deletion polymorphisms were genotyped by multiplex PCR. A total of 662 individuals evaluated, 80,8% were female and 46,6% with a median age of 65 years. The results of the distribution of the genotypes between the groups showed that the frequency of null *GSTM1* was 30,96% in the case groups and 33,05% in the control group, whereas the frequency of null *GSTT1* was 19,85% in the cases and 20,76% in controls. There was no significant difference in the distribution of genotypes between groups, nor in relation to the risk associated with null *GSTM1* deletion polymorphisms ($X^2 = 0,29$; $p = 0,64$; OR = 0,90, CI = 0,64-1,28; $p = 0,65$) and null *GSTT1* ($X^2 = 0,077$; $p = 0,78$; OR = 0,94; CI = 0,63-1,41; $p = 0,86$) with DM2. The combined risk genotypes (null *GSTM1* / null *GSTT1*) were uncommon in both groups (12, 29% and 12, 43%) and were not associated with diabetes risk in relation to the two genotypes present (OR = 0,96; CI = 0,58-1,60; $p = 1,00$). However, the combination of genotypes (present *GSTM1* / *GSTT1* present) were more predominant in both groups (58,09% and 61,65%) with higher proportion in the case group ($p < 0,004$). Diabetic subjects with null *GSTM1* genotype presented higher levels of fasting glycemia ($p = 0,002$), whereas individuals with null *GSTT1* genotype had higher fasting glycemia ($p < 0,001$), glycated hemoglobin ($p = 0,045$) and HDL-cholesterol ($p < 0,05$). These results suggest that although the null genotypes of *GSTM1* and *GSTT1* are not associated with the risk they produce relevant effects in the clinical parameters contributing to the a etiology and complication of DM2.

Key words: Diabetes Mellitus type 2. Genetic polymorphisms. Glutathione-S-transferase.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ADA:** Associação Americana de Diabetes;
- AGEs:** Advanced Glycation end Products (Produtos de Glicação Avançada);
- CYP1A1:** Gene do citocromo p450, família 1, subfamília A, membro 1;
- dbSNP:** banco de dados de SNPs;
- DM:** Diabetes *mellitus*;
- DM1:** Diabetes *mellitus* tipo 1;
- DM2:** Diabetes *mellitus* tipo 2;
- DNTP:** Desoxinucleotídeo Trifosfato;
- EDTA:** ácido etilenodiamino tetra-acético;
- EO:** Estresse Oxidativo;
- ESF:** Estratégia de Saúde da Família;
- GSH:** Glutathiona conjugada;
- GSTM1:** Isoforma M1 da família Glutathiona S-Transferase;
- GSTs:** Glutathiona S-Transferase;
- GSTT1:** Isoforma T1 da família Glutathiona S-transferase;
- GWAS:** *Genome-wide* Association Study (Estudo de Associação Ampla do Genoma)
- HAS:** Hipertensão Arterial Sistêmica
- HbA1c:** Hemoglobina Glicada;
- HDL:** High-Density Lipoprotein Cholesterol (Lipoproteína de Alta Densidade)
- HIPERDIA:** Programa do Sistema Único de Saúde oferecido a Hipertensos e Diabéticos
- IC95%** Intervalo de Confiança 95%;
- IDF:** Federação Internacional de Diabetes;
- IL-6:** Interleucina 6;
- IMC:** Índice de Massa Corporal;
- Kb:** Kilobase;
- kg/m²:** quilograma por metro quadrado;
- LDL:** Low-Density Lipoprotein Cholesterol (Lipoproteína de Baixa Densidade)
- NCP:** Risk Factor Collaboration (Colaboração do Fator De Risco);
- NO:** Óxido Nítrico
- OR:** *Odds ratio* (chance);
- OH:** Hidroxila

Pb: Pares de base;

PCR-multiplex: Reação em Cadeia da Polimerase Multiplex;

PCR Reação de Polimerase em Cadeia;

RI: Resistência à insulina;

RL: Radicais livres;

ROS: Espécies Reativas de Oxigênio;

SBD: Sociedade Brasileira de Diabetes;

SNP: Single Nucleotide Polymorphism (Polimorfismo de Nucleotídeo Único);

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral alfa;

TOTG: Teste de Tolerância Oral de Glicose;

UBS: Unidade Básica de Saúde;

UFPI: Universidade Federal do Piauí;

USA: Estados Unidos da América;

VIGITEL: Vigilância de Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico;

VLDL: *Very-Low-Density Lipoprotein Cholesterol* (Lipoproteína de Muito Baixa Densidade);

WHO: World Health Organization;

X²= Qui-Quadrado;

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Protocolo de reação da PCR-multiplex.....	15
TABELA 2: Sequência dos <i>primers</i> utilizados para a amplificação das regiões polimórficas estudadas e o tamanho do produto de PCR.....	16
TABELA 3: Programa de ciclagem da PCR-multiplex.....	16
TABELA 4: Variáveis bioquímicas dos casos e controles.....	19
TABELA 5: Frequência e Combinações genóticas de <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> com análise de risco com DM2.....	21
TABELA 6: Efeito das Variáveis sob a Probabilidade de <i>GSTM1 nulo</i> e <i>GSTT1 nulo</i>	22
TABELA 7: Análise da Associação entre os genótipos presente e nulo de <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> com Variáveis Biológicas e Antropométricas em Pacientes com DM2.....	23
TABELA 8: Associação entre os Polimorfismos nulos das GSTs e a Hipertensão...24	
TABELA 9: Trabalhos Publicados entre 2007 e 2015 que Avaliaram a Associação entre os Polimorfismos <i>GSTM1 nulo</i> e <i>GSTT1 nulo</i> e suas Associações com o DM2.....	25

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Resumo dos fatores etiológicos do DM2.....	6
FIGURA 2: Deleção do gene que codifica a enzima GSTM1 no cromossomo 1p13.3 por recombinação homóloga.....	9
FIGURA 3: Deleção do gene que codifica a enzima GSTT1 no cromossomo 22q11.2.....	10
FIGURA 4. Genotipagem em eletroforese em gel de agarose a 2%.....	17

1. INTRODUÇÃO

O Diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) é uma das principais causas de morbimortalidade entre indivíduos adultos, representando um importante problema de saúde pública mundial (ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE DIABETES, 2016; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015). Tal patologia configura-se hoje como uma epidemia e corresponde à mais comum das doenças metabólica, caracterizada por um estado de hiperglicemia crônica devido aos defeitos na ação ou na secreção de insulina (GROSS et al., 2002).

A etiologia do DM2 deve-se a interações entre fatores ambientais e genéticos (DAGOGO-JACK et al., 2012). Dentre os fatores ambientais, a obesidade é um dos principais fatores relacionados à resistência à insulina (RI) e ao estresse oxidativo (EO), contribuindo tanto na etiologia como nas complicações do DM2 (TANGVARASITTICHAJ et al., 2015). A influência genética ainda encontra-se em processo de elucidação. Dentre os estudos genéticos mais prevalentes estão as associações de Polimorfismo de Nucleotídeo Único (SNPs - *single nucleotide polymorphism*) com o risco de desenvolver DM2 (LYSSENKO et al., 2013; DORIA et al., 2008). Além disso, polimorfismos de deleção nos genes das Glutathionas s-transferase (*GSTM1* e *GSTT1*), responsáveis por proteger as células contra o EO oriundo da hiperglicemia e obesidade, também são vistos como um importante fator de susceptibilidade ao diabetes, já que o genótipo nulo desses polimorfismos (*GSTM1 nulo* e *GSTT1 nulo*) promove ausência da atividade enzimática antioxidante, tornando as células mais susceptíveis aos danos do EO e contribuindo para as complicações diabéticas (MONROY et al., 2013; PINHEIRO et al., 2013). Em adição, as células β pancreáticas expressam baixos níveis de mecanismos de defesa antioxidante. Portanto, indivíduos portadores do genótipo nulo de *GSTM1* ou *GSTT1* predis põem essas células, responsáveis por sintetizar e secretar insulina, a um maior dano oxidativo conduzindo ao DM2. Portanto, os genes polimórficos relacionados à defesa antioxidante podem auxiliar no estabelecimento de marcadores de susceptibilidade ao diabetes.

Segundo a literatura, a associação dos polimorfismos de deleção das GSTs com o diabetes, sofre divergências entre os estudos quanto à associação do risco ao DM2, visto que alguns encontraram associações significativas para ambos os polimorfismos (GONUL *et al.*, 2012; MOASSER *et al.*, 2012; RAMPRASATH *et al.*, 2011; AMER *et al.*, 2011), para somente um dos polimorfismos (BID *et al.*, 2010; YALIN *et al.*, 2007), ou até mesmo nenhuma associação (AFRAND *et al.*, 2015; DATTA *et al.*, 2010)..

Na população de Parnaíba (PI), ainda não existem estudos relacionados com os polimorfismos de deleção *GSTM1* e *GSTT1* em portadores com DM2. Assim, o desenvolvimento do presente estudo justifica-se pela importância fisiológica exercida pelas glutatonas quando em pacientes com esta patologia e, principalmente, pelo fato da frequência da deleção desses genes se mostrar diferente em diversas populações.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DIABETES MELLITUS – ASPECTOS GERAIS.

O Diabetes *Mellitus* (DM) corresponde a mais comum das doenças metabólicas caracterizada por um estado de hiperglicemia crônica que pode vir acompanhado por alterações no metabolismo dos carboidratos, lipídeos e proteínas (ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE DIABETES, 2013; GROSS et al., 2002). Tal patologia, configura-se hoje como uma epidemia mundial, e representa um grande desafio para os sistemas de saúde pública de todo o mundo, devido aos elevados custos médicos e socioeconômicos que resultam de complicações associadas a doença e aos crescentes índices de prevalência e incidência (RAZA, et al., 2015; DADBINOUPUR et al., 2013; PINHEIRO et al., 2013).

No ano de 2015, o DM causou aproximadamente 5 milhões de mortes no mundo, equivalente a uma morte a cada seis segundos, além de ter sido responsável por 12% das despesas em saúde (IDF, 2015). De acordo com a Federação Internacional de Diabetes (2015), existem pelo menos 415 milhões de adultos com idades entre 20-79 anos portadores de DM no mundo e, segundo estimativas, esse número deverá alcançar 642 milhões até o ano de 2040. A proporção de pessoas com DM vem aumentando na maioria dos países, sendo que 77% dos adultos com a patologia vivem em países de média e baixa renda (WHO, 2016). Em 2016, segundo a pesquisa realizada pelo grupo NCD - *Risk Factor Collaboration*, os casos de DM quadruplicaram, passando de 108 milhões em 1980 para 422 milhões em 2014 (NCD, 2016). Tal acontecimento deve-se principalmente ao crescimento e envelhecimento populacional, maior urbanização, estilo de vida, obesidade, sedentarismo e maior sobrevivência do paciente diabético (YATES et al., 2016; SBD, 2015).

No Brasil, existem mais de 14,3 milhões de portadores da doença, representando 8,7% da população nacional, tornando-se o quarto país com maior número de casos (NCD, 2016; IDF, 2015). De acordo com o estudo de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL) o DM é mais comum em mulheres do que em homens e cerca de 80%

dos brasileiros com DM estão acima do peso (BRASIL, 2014). Em 2012, o número de pessoas com sobrepeso superou a metade da população, chegando a 51% em apenas quatro anos (BRASIL, 2014). Segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes – SBD, (2015) metade da população brasileira desconhece seu diagnóstico e 25% dos portadores da doença não fazem uso de nenhum tipo de tratamento. No Piauí não existem dados de incidência e prevalência de DM2 atualizados, no entanto, a SBD, orienta usar a prevalência de 7,6% sob a população entre 30 e 69 anos no estado (BRASIL, 2005).

O DM é classificado em quatro categorias: Diabetes *Mellitus* Tipo 1 (DM1), que resulta na destruição autoimune das células β pancreáticas (tipo 1A) ou de causa desconhecida (tipo 1B); Diabetes *Mellitus* Tipo 2 (DM2), relacionada a graus variados de diminuição da secreção e resistência à insulina; Diabetes Gestacional, definida como qualquer grau de intolerância à glicose com início durante a gravidez, podendo ou não persistir após o parto; e outros tipos de diabetes, que correspondem a formas menos comuns da doença que resultam de defeitos genéticos da função das células β pancreáticas, doenças do pâncreas exócrino, endocrinopatias, induzidas por drogas e infecções (ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE DIABETES, 2016). Independente da classificação, a principal característica do DM é a incapacidade de manter a homeostase glicêmica, uma vez que, os níveis glicêmicos apresentam-se acima dos valores aceitáveis (GROSS et al., 2002).

De acordo com critérios definidos pelo Ministério da Saúde, (2016) o diagnóstico do DM é estabelecido quando os valores de glicemia em jejum e/ou após duas horas de administração de 75g de glicose (teste oral de tolerância à glicose – TOTG) encontram-se ≥ 126 mg/dL e 200 mg/dL, respectivamente; quando a hemoglobina glicada (HbA1c) é $\geq 6,5\%$, ou quando a medida da glicose plasmática casual é ≥ 200 mg /dL em presença de sintomas típicos do diabetes, como poliúria, polidipsia, polifagia e turvação visual (ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE DIABETES, 2016; BRASIL, 2006).

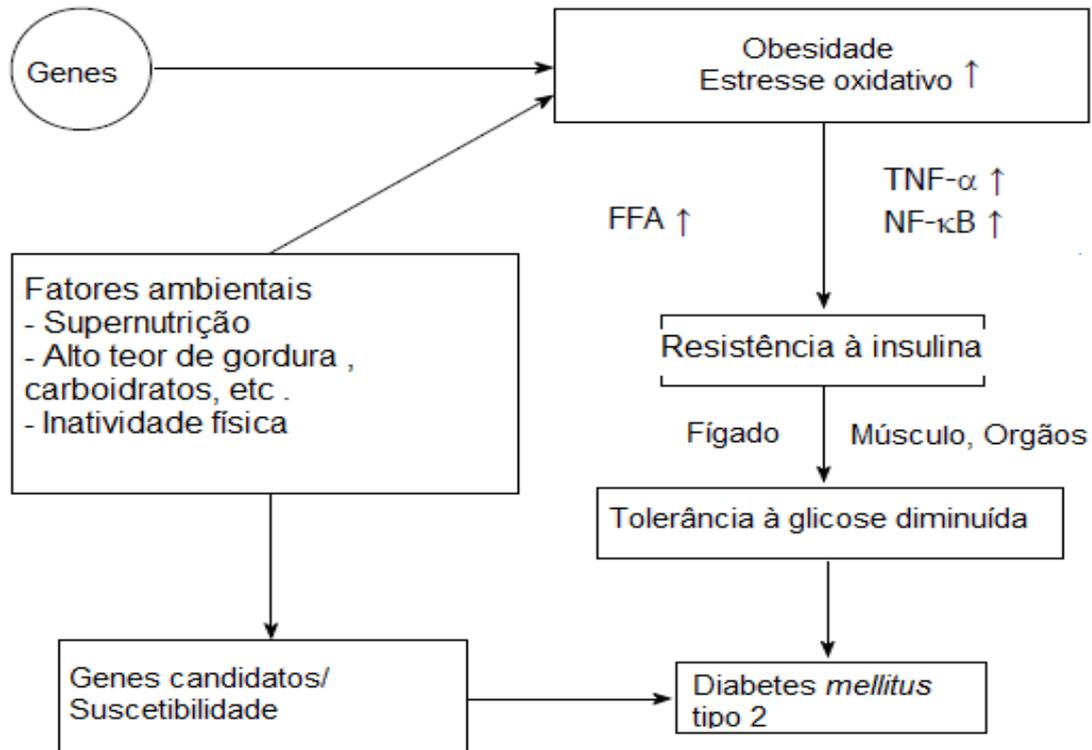
O DM2 é a forma mais comum do diabetes, abrangendo 90% dos casos na população, e trata-se de uma doença complexa, heterogênea e poligênica, caracterizada pela diminuição da secreção de insulina, resistência à insulina (RI), produção excessiva de glicose hepática e metabolismo anormal de gordura

(AHLQVIST et al., 2011). Apresenta intensa associação com a obesidade e estilo de vida, sendo predominante em indivíduos com mais de 40 anos, podendo também aparecer em indivíduos mais jovens (WHO, 2016; ABBAS et al., 2013; ZIMMET et al., 2001).

As principais complicações do DM2 incluem a retinopatia, nefropatia, neuropatia diabética, cardiopatia isquêmica, doenças vasculares periféricas e cerebrovasculares (STEIN et al, 2014; SINGH et al., 2014). A hiperglicemia crônica é o fator determinante dessas complicações micro e macrovasculares, sendo a formação endógena dos produtos de glicação avançada (AGEs - *Advanced Glycation end Products*), principal mecanismo responsável pelos danos celulares e teciduais observados nessa doença, podendo ser reconhecido como uma via comum pelo qual a obesidade e a hipertensão arterial atuam no desenvolvimento do diabetes e suas complicações (SBD, 2016; TANGVARASITTICHAJ et al., 2015).

As interações entre os fatores ambientais e genéticos constituem a base etiológica do DM2 (DAGOGO-JACK et al., 2012). Os fatores identificados como de risco para o surgimento desse agravo são: história familiar de diabetes, obesidade, sedentarismo, tabagismo, consumo de álcool, hipertensão arterial, baixos níveis de HDL-colesterol e elevados níveis de triglicerídeos (SBD, 2014; OLOKOBA et al., 2012). Dentre esses, a obesidade é um dos fatores de maior contribuição no desenvolvimento do DM2, pois o acúmulo de tecido adiposo gera resistência à insulina, devido à grande liberação de ácidos graxos livres para a circulação prejudicando o metabolismo glicolipídico no fígado e reduzindo a captação de glicose pela musculatura esquelética (FRANÇA, 2013; CURTI et al., 2011; HOTAMISLIGIL et al., 2003, BODEN et al., 2002). Além disso, o tecido adiposo libera várias moléculas, denominadas adipocitocinas, como TNF- α , IL-6, resistina, leptina, ativador da inibição do plasminogênio tipo 1 e a adiponectina, algumas das quais atuam estimulando a formação de um quadro periférico de resistência à insulina e de EO (Figura 1) (TANGVARASITTICHAJ et al., 2015; JUNG et al., 2014).

FIGURA 1: Resumo dos fatores etiológicos do DM2



Fonte: Adaptado de TANGVARASITTICHAJ et al., 2015

Em relação aos fatores genéticos, o DM2 é considerado uma doença poligênica e heterogênea, ou seja, vários genes estão envolvidos e diferentes combinações de genes desempenham um papel para o desenvolvimento da doença (DORIA et al., 2008).

Neste sentido, o objetivo da maioria dos estudos genéticos envolvendo DM2 é identificar genes que estão associados à suscetibilidade da doença e suas complicações (GROOP et al., 2008). A importância da contribuição genética se apoia em diversos fatores, entre os quais estão a história familiar, um elevado grau de concordância entre gêmeos monozigóticos no DM2, comparados ao dizigóticos e uma grande variação na prevalência do DM2 em diferentes grupos étnicos (REIS et al., 2002). Esses estudos sugerem uma herdabilidade de 30% a 70% evidenciando a importância que os fatores genéticos têm no desencadeamento da patologia (LYSSENKO et al., 2013).

As variações genéticas existentes na sequência do DNA humano compreendem polimorfismos de sequência e os de tamanho (LANDER et al., 2001). Os polimorfismos de sequência surgem da substituição estável de apenas uma base nitrogenada na molécula de DNA com frequência maior que 1% na população (CUSTODIO, 2011). Esses polimorfismos, também conhecidos por SNPs (do inglês, *Single Nucleotide Polymorphism*) são considerados a forma mais frequente de variação (ABBAS et al., 2013). Já os polimorfismos de tamanho são gerados pela inserção ou deleção de um ou mais nucleotídeos na sequência do DNA (LANDER et al., 2001).

Nas últimas décadas foi possível a identificação de numerosas variantes genéticas associadas ao DM2 (WOLFS et al., 2009). Apesar dos SNPs associados com a doença responderem por apenas uma pequena fração da doença em geral, a identificação desses polimorfismos tem papel fundamental na compreensão do risco de desenvolver o DM2 (CHEN et al., 2013; LEE et al., 2008).

Por meio de um estudo de associação ampla do genoma (GWAS – do inglês *Genome-wide Association Study*), vários loci de susceptibilidade ao DM2 foram identificados, a exemplo dos genes *PPAR γ* , *KCNJ11*, *CAPN10*, *TCF7L2*, *SLC30A8*, *HHEX*, *CDKAL1*, *CDKN2A* e *CDKN2B*, *IGF2BP2* e *FTO* (ABBAS et al., 2013; CHEN et al., 2013; PALMER et al., 2012). Tais genes estão envolvidos na via de produção de insulina e secreção ou na sensibilidade à insulina (NG et al., 2008).

Polimorfismos de tamanho nos genes responsáveis pelas enzimas envolvidas na detoxificação de espécies reativas de oxigênio (ROS) também estão relacionados com o desenvolvimento do DM2, a exemplo dos genes das glutationas-s-transferases (GSTs), estando estes associados com o EO gerado durante a patogênese do DM2 (PINHEIRO et al., 2013).

A identificação dos componentes genéticos do DM2 é a mais importante área de pesquisa do diabetes porque a elucidação dos genes do diabetes irá influenciar e direcionar a um entendimento da doença, suas complicações, tratamento, cura e prevenção (ABBAS et al., 2013).

2.2 GENE GST E OS POLIMORFISMOS DE DELEÇÃO *GSTM1* nulo e *GSTT1* nulo

As Glutationas s-transferases (GSTs) constituem uma superfamília gênica de enzimas de fase II do processo de detoxificação metabólica, conhecidas por atuarem no corpo neutralizando os radicais livres (RL) (DADBINOPOUR et al., 2013). Elas catalisam a conjugação das glutations (GSH) com vários compostos tóxicos endógenos e exógenos, formando produtos menos reativos e mais hidrossolúveis, o que facilita sua excreção pelo corpo protegendo os tecidos contra os danos oxidativos (STOIAN et al., 2015; TEIXEIRA et al., 2013; HAYES et al., 2005).

A família das GST é multigênica e encontra-se dividida em oito subfamílias alfa, mu, kappa, omega, pi, sigma, theta e zeta codificadas pelos genes *GSTA*, *GSTM*, *GSTK*, *GSTO*, *SGPC*, *GSTs*, *GSTT* e *GSTZ*, respectivamente (AMER et al., 2011). Muitos desses genes são polimórficos e, por conseguinte, têm sido associados com um aumento ou uma diminuição da susceptibilidade a várias doenças (STOIAN et al., 2015; ANDONOVA et al., 2010).

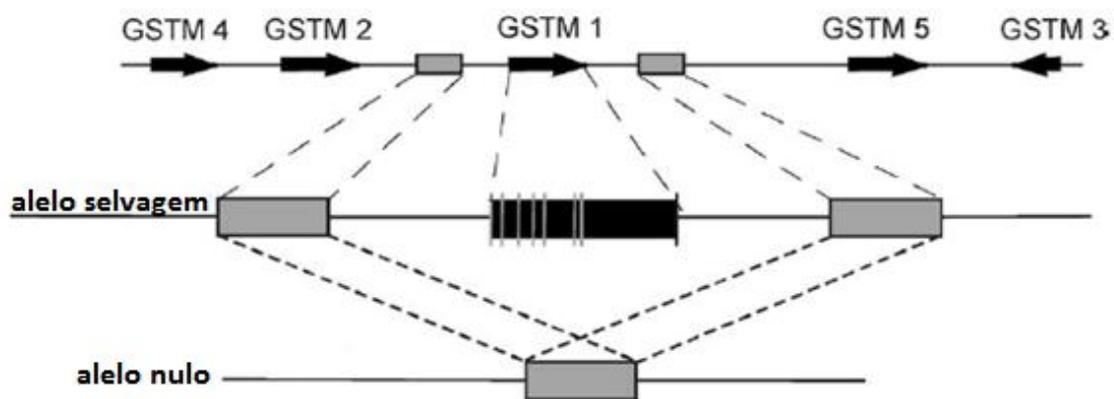
Dentre os genes desta superfamília, destacam-se *GSTM1* e *GSTT1*, devido à grande quantidade de estudos associando seus polimorfismos com a susceptibilidade a diferentes tipos de câncer (SONG et al., 2016; PEDDIREDDY et al., 2016; CAO et al., 2015; SÁ et al., 2014). No entanto, a associação destes polimorfismos sobre o diabetes ainda é pouco estudada (ZHANG et al., 2013; WANG et al., 2006).

O *GST* da subfamília mu (*GSTM*) é codificado por cinco genes dispostos em tandem (5' *GSTM4*-*GSTM2*-*GSTM1*-*GSTM5*-*GSTM3* 3'), formando um agrupamento de genes de 100 kb no cromossomo 1p13.3 (Figura 2) (TEIXEIRA et al., 2013; PARL et al., 2005). O *GSTM* é altamente polimórfico, possuindo três variantes alélicas *GSTM1* nulo, *GSTM1A* e *GSTM1B* (SÁ et al., 2014). O *GSTM1* nulo apresenta uma deleção total, resultando em genótipo nulo, caracterizando indivíduos que não expressam essa proteína, ou seja, sem atividade enzimática (NASR et al., 2015). Os genótipos *GSTM1* positivos, nomeadamente *GSTM1A* e *GSTM1B*, diferem por uma base, e a eficácia catalítica das enzimas codificadas por esses alelos são semelhantes (PARL et al., 2005). Contudo, ausência desse gene pode causar um acúmulo de metabolitos reativos no corpo, aumentando a interação com

macromoléculas celulares e contribuindo para os danos celulares que levam ao DM2 (STOIAN et al., 2015; BID et al., 2010).

O gene *GSTM1* é flanqueado por duas regiões de 4,2 kb quase idênticas. O *GSTM1* nulo origina-se a partir de recombinação homóloga entre as duas regiões de repetição que resulta na eliminação 16 Kb contendo o gene *GSTM1* na sua totalidade (Figura 2). O *GSTM1* é precisamente retirado, deixando os genes adjacentes *GSTM2* e *GSTM5* intacto (PARL et al., 2005).

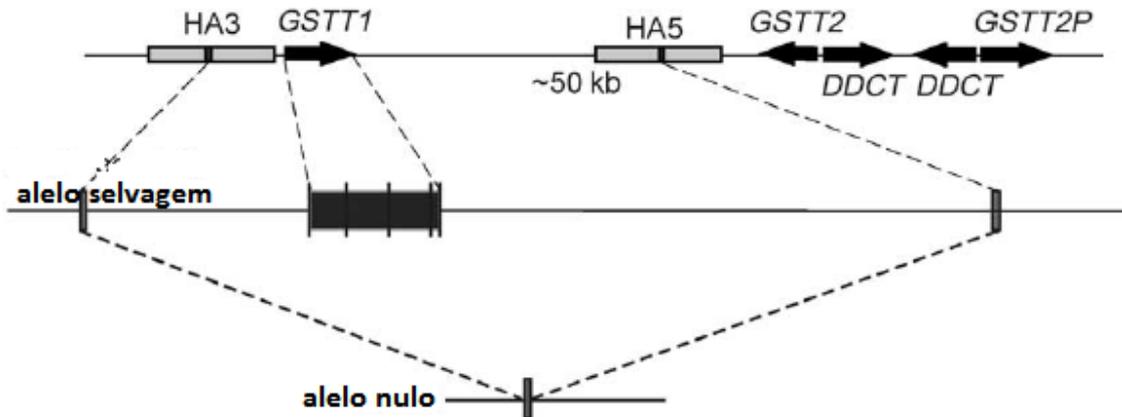
FIGURA 2: Deleção do gene que codifica a enzima GSTM1 no cromossomo 1p13.3 por recombinação homóloga.



Fonte: Adaptado de PARL et al., 2005

O *GST* da subfamília teta (*GSTT*), consiste em dois genes, o *GSTT1* e o *GSTT2*, localizados no cromossomo 22q11.2, e separados por 50 kb. Assim como o *GSTM1*, o *GSTT1* apresenta um polimorfismo caracterizado por deleção total do gene, resultando em genótipo homozigoto nulo (*GSTT1 nulo*), que leva à ausência de atividade enzimática (STOIAN et al., 2015; REIS, 2011). O alelo nulo *GSTT1 nulo* surge por recombinação homóloga das regiões HA3 e HA5, possuem 403pb idênticos com mais de 90% de homologia, resultando em uma deleção de 54 kb, contendo todo o gene *GSTT1* (Figura 3) (TEIXEIRA et al., 2013; PARL et al., 2005).

FIGURA 3: Deleção do gene que codifica a enzima GSTT1 no cromossomo 22q11.2.



Fonte: Adaptado de PARL et al., 2005.

A ausência de uma ou mais formas de *GST* torna a célula mais susceptível ao EO que leva à disfunção celular, tornando relevante a influência do polimorfismo de deleção de *GSTM1* e *GSTT1* no risco a doenças (WANG et al., 2006; BID et al., 2010).

O EO é definido como um desequilíbrio entre a capacidade de ação dos antioxidantes e as espécies reativas de oxigênio (ROS), que quando liberadas em excesso, promovem alterações como peroxidação lipídica, fragmentação de DNA e oxidação de diversas moléculas, levando a apoptose (POLJSK et al., 2013).

Estudos confirmam que o EO está presente na disfunção da ação e secreção de insulina, assim como no desenvolvimento de complicações diabéticas (TANGVARASITTICHAJ et al., 2015; HAYASHI et al., 2008). No entanto, esse estresse não é a principal causa do diabetes, mas sim uma consequência do excesso de nutrientes, visto que o EO é uma resposta natural ao excesso de glicose e/ou de lipídeos (PEREIRA et al., 2003).

Na patogênese do DM2, o quadro de hiperglicemia crônica provoca uma superprodução de ROS por diversos mecanismos, incluindo reações de: (1) auto-oxidação da glicose, (2) via do polioli e (3) não enzimáticas de glicosilação de proteínas, levando à formação de AGEs (TANGVARASITTICHAJ et al., 2015; KANETO et al., 2005). Tais mecanismos estão interligados e associados aos danos oxidativos relacionados às complicações clínicas do diabetes, como a retinopatia, nefropatia, neuropatia e doença cardiovascular (TANGVARASITTICHAJ et al., 2015).

Em adição, as células β pancreáticas em particular são mais sensíveis aos efeitos citotóxicos em função de expressarem baixos níveis de enzimas antioxidantes, portanto a função dessas células pode estar comprometida pelo excesso de dano oxidativo, nos portadores do alelo nulo para um das GSTs (MONROY et al., 2013; PINHEIRO et al., 2013).

Vale ressaltar que o tecido adiposo é a principal fonte de EO em indivíduos obesos e/ou portadores do DM2, visto que o quadro pro-inflamatório provocado pelos adipócitos promove aumento da produção de peróxido de hidrogênio, baixos níveis de glutathione, catalase e superóxido dismutase (PITOCCO et al., 2013).

Em análises epidemiológicas observa-se que a presença dos genótipos *GSTM1+/GSTT1+* promovem proteção ao DM2, enquanto que os mesmos genótipos nulos são considerados fatores de risco para o desenvolvimento de DM2 (ANDREASSI et al., 2009; YALIN et al., 2007; HORI et al., 2007; YANG et al., 2004).

Estes polimorfismos apresentam uma frequência na população que varia de acordo com a etnia (MOASSER et al., 2012; BID et al., 2010). A frequência da deleção do *GSTM1* é mais alta em caucasianos (38%-67%), americanos (35,00-62,00%), japoneses (41,00-51,00%) e menor nos africanos (23- 41%) (HAMDY et al., 2003). Já a frequência da deleção do *GSTT1 nulo* varia de 16% a 38% da população em geral, com frequência mais elevada em asiáticos (60%) e africanos (40%) do que em caucasianos (20%) (STOIAN et al., 2015; MONTERO et al., 2007; ZHENG et al., 2002). No Brasil, a frequência do polimorfismo *GSTM1 nulo* varia de 20% a 55% na população enquanto a frequência do *GSTT1 nulo* varia de 12% a 29,2% (PINHEIRO et al., 2013; COLOMBO et al., 2004; ROSSINI et al., 2002; ARRUDA et al., 1998).

A associação dos polimorfismos nulos de GST com a susceptibilidade ao DM2 foi documentada somente no centro-oeste brasileiro, onde a frequência de *GSTM1 nulo* e *GSTT1 nulo* foram de 41,7% e 29,2%, respectivamente, com uma maior susceptibilidade em manifestar o DM2 em portadores da deleção do *GSTT1* (PINHEIRO et al., 2013).

O presente estudo é o primeiro a ser realizado no nordeste brasileiro e visa contribuir com o conhecimento existente sobre os efeitos dos polimorfismos *GSTM1 nulo* e *GSTT1 nulo* com a susceptibilidade ao DM2.

3. OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a associação dos polimorfismos *GSTM1 nulo* e *GSTT1 nulo* com a suscetibilidade ao desenvolvimento do DM2 em uma população piauiense.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer as frequências genotípicas dos polimorfismos *GSTM1 nulo* e *GSTT1 nulo* na população estudada;
- Comparar os genótipos dos polimorfismos entre as populações caso e controle;
- Analisar os genótipos dos polimorfismos obtidos com as variáveis: glicemia em jejum, hemoglobina glicada, colesterol total e frações, triglicerídeos, IMC, hipertensão e fumo;
- Verificar a influência da deleção de *GSTM1 nulo* e *GSTT1 nulo* sob as alterações nas variáveis biológicas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ASPECTOS ÉTICOS

Atendendo as diretrizes da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde sobre pesquisa envolvendo seres humano, todos os pacientes foram informados da pesquisa e ao concordarem em participar assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (Apêndice I), previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Piauí, sob o número do parecer: 853.547 e CAAE: 17931913.5.0000.5214 (Anexo I).

4.2 SELEÇÃO DOS PARTICIPANTES DO ESTUDO E VARIÁVEIS ESTUDADAS

O presente estudo foi do tipo caso-controle, onde os indivíduos foram pareados por sexo e idade. O grupo amostral deste trabalho compreendeu 662 amostras divididas em 380 indivíduos casos e 282 controles.

Vale ressaltar que, desse grupo amostral, 100 indivíduos casos e 100 indivíduos controles já foram analisados para os polimorfismos rs7903146 e rs12255372 do gene *TCF7L2* (Barros et al., 2014), pelo grupo de pesquisa Genética Humana e Médica - GeHMed do Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Universidade federal do Piauí, Parnaíba-PI. Porém, para a ampliação e melhor caracterização desse grupo populacional, frente ao estudo de outras variações polimórficas, a continuidade desse estudo fez-se necessária.

O recrutamento dos indivíduos do grupo caso foi realizado nas Unidades Básicas de Saúde (UBS) de Parnaíba, Piauí, Brasil, por meio do Programa de Estratégia de Saúde da Família (ESF) - HIPERDIA, onde os voluntários estavam à procura de consulta médica. As amostras do grupo controle foram obtidas durante a realização de exames de rotina em laboratórios particulares de Parnaíba, assim como nas próprias UBS. Desses pacientes também foram coletados dados laboratoriais como, glicemia em jejum, perfil lipídico (colesterol total, HDL, LDL, VLDL e triglicerídeos) e dados antropométricos obtidos por meio de entrevistas e consulta aos prontuários fornecidos pelo ESF (Apêndice II).

Os critérios de inclusão do grupo caso foi o diagnóstico de DM2 confirmado por exames laboratoriais segundo os critérios da Organização Mundial da Saúde (níveis de glicose plasmática aleatória ≥ 200 mg/dL e/ou níveis de glicose plasmática em jejum ≥ 126 mg/dL) sem distinção de cor e classe social. Para o grupo controle os critérios foram glicemia em jejum < 100 mg/dL sem histórico familiar de diabetes. Foram excluídos do estudo portadores de DM1, indivíduos saudáveis que não se enquadravam nos critérios de sexo e idade e pessoas que por qualquer razão tinham a sua autodeterminação reduzida, sobre o consentimento de participar da pesquisa.

As amostras de sangue periférico para as análises foram colhidas por meio de punção venosa a vácuo, em tubos contendo EDTA acondicionadas e encaminhadas em caixas térmicas para o Laboratório de Genética e Biologia Molecular da UFPI, *Campus* Ministro Reis Velloso, para serem processadas e analisadas.

4.3 EXTRAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E ARMAZENAMENTO DO DNA

As amostras de sangue foram submetidas à extração de DNA com o kit *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega Inc., EUA), de acordo com as especificações do fabricante.

A fim de verificar a integridade do DNA, foram realizadas eletroforeses em gel de agarose a 2%, corado com GelRed™ (Biotium, EUA). A pureza e qualidade das amostras foram determinadas ao submeter 1 μ L de cada amostra à espectrofotometria, por meio do espectrofotômetro BioSpec-nano (Shimadzu, Japão) e analisadas em comprimento de onda de 260 e 280 nm. Uma vez confirmada a qualidade das amostras, as mesmas foram armazenadas em freezer (-20°C) no Laboratório de Genética e Biologia Molecular, UFPI, *Campus* Ministro Reis Velloso.

4.4 DESENHOS DOS PRIMERS

Para a realização da construção dos *primers*, as informações que dizem respeito aos polimorfismos *GSTM1 nulo* e *GSTT1 nulo* foram acessadas do banco de dados de SNP (dbSNP) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>, utilizando como ferramenta de entrada/busca os números de acesso, rs412543 e rs4630 respectivamente. A sequência genômica que flanqueia o polimorfismo foi obtida a

partir do banco de dados do *Ensembl*, com o objetivo de evitar a construção dos *primers* em outras regiões e/ou sobre outros polimorfismos com elevada frequência. Neste, a página gerada foi configurada de forma a exibir todas as variantes existentes na sequência flanqueadora (400 pb antes e depois do polimorfismo em questão).

Tendo a sequência de interesse, os *primers* foram construídos utilizando o programa *Gene Runner* versão 5.1.06 (*Hasting Software, Inc.*), de modo a evitar a construção de oligonucleotídeos complementares, formadores de estruturas em forma de *hairpin*, *loops* e dímeros. Por fim, as sequências de oligonucleotídeos foram blastadas no BLAST/BLAST ferramenta do *Ensembl*, com o objetivo de conhecer as sequências do DNA que os mesmos anelariam, preferencialmente (ALTSCHUL et al., 1997).

4.5 AMPLIFICAÇÃO E ANÁLISE DAS REGIÕES POLIMÓRFICAS

A análise das variantes polimórficas dos genes *GSTM1*, *GSTT1* (a presença ou ausência do alelo) foi realizada pela reação em cadeia da polimerase multiplex (PCR-multiplex), utilizando-se como controle positivo à amplificação do gene *CYP1A1*. A PCR-multiplex foi realizada em um volume total de 25 µL, com as concentrações descritas na (Tabela 1).

TABELA 1 - Volumes e concentrações dos reagentes utilizados na PCR-multiplex.

Reagentes	Volume
H ₂ O estéril	9,2 µL
Tampão	2,5 µL
DNTPs (200 mM)	5,0 µL
<i>Primer forward - GSTT1, GSTT1 e CYP1A1</i> (0,4 mM)	1,0 µL
<i>Primer reverse - GSTT1, GSTT1 e CYP1A1</i> (0,4 mM)	1,0 µL
MgCl ₂ (1,5 mM)	1,0 µL
Taq DNA polimerase (1,5 U)	0,25 µL
DNA genômico	1,0 µL
TOTAL	25 µL

Vale ressaltar que em todas as reações de PCR-multiplex foram utilizados controles negativos (branco), no qual todos os reagentes estavam presentes, com exceção do DNA, a fim de detectar uma possível contaminação no experimento decorrente do manuseio inadequado do material ou até mesmo problemas nos reagentes.

A Tabela 2 apresenta os *primers* utilizados e o tamanho do produto de amplificação de cada um (*amplicon*). Depois de misturados, os reagentes foram submetidos a diferentes ciclos de temperatura gerados em termociclador (*AmpliTherm Thermal Cycler, Madison, WI, USA*). Os parâmetros adotados para a amplificação das regiões polimórficas estudadas estão resumidos na (Tabela 3).

TABELA 2: Sequência dos *primers* utilizados para a amplificação das regiões polimórficas estudadas e o tamanho do produto de PCR

<i>Primer</i>	Sequencia (5'- 3')	<i>Amplicon</i>
<i>GSTM1nulo – F</i>	GAA CTC CCT GAAAAG CTAAAG C	219pb
<i>GSTM1nulo – R</i>	GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTC G	
<i>GSTT1nulo – F</i>	TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC	459pb
<i>GSTT1nulo – R</i>	TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA	
<i>CYP1A1-F</i>	CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC	312pb
<i>CYP1A1-R</i>	GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC	

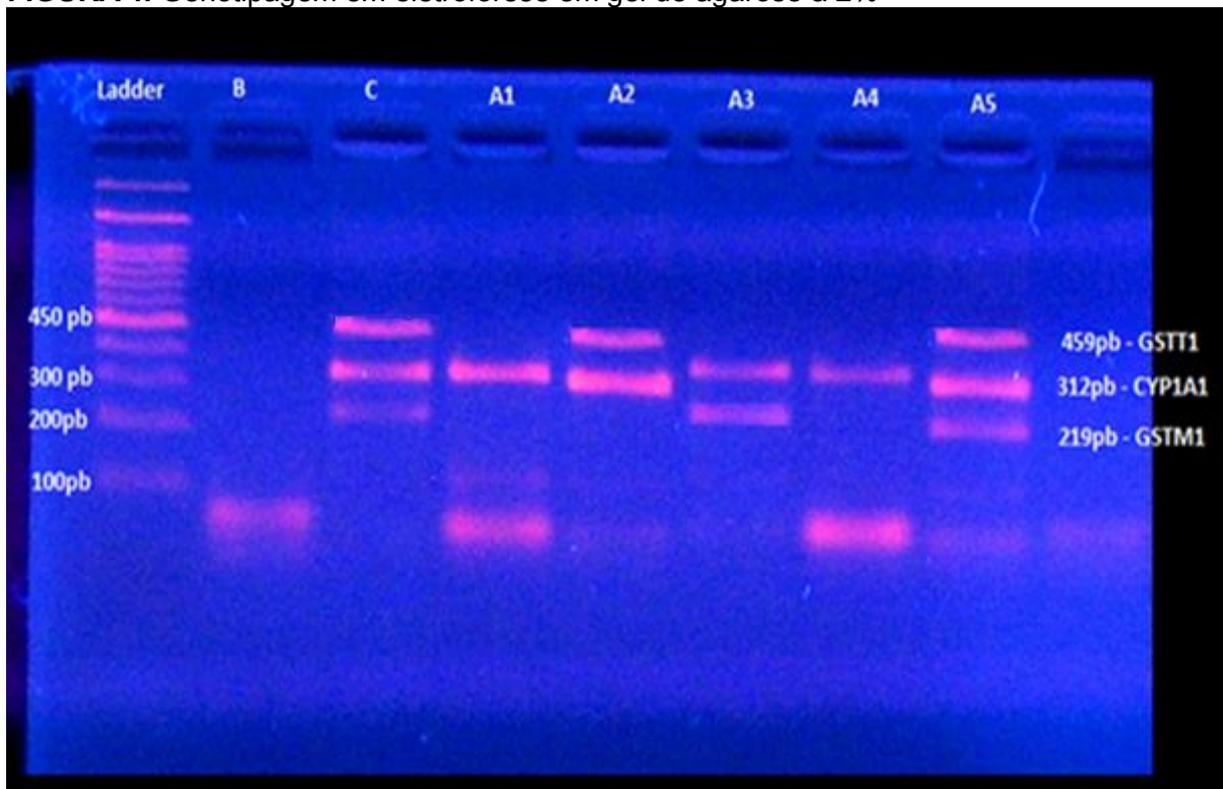
TABELA 3: Programa de ciclagem da PCR-multiplex

Étapas	Tempo / Temperatura
Desnaturação inicial	94°C / 5 min
Desnaturação	94°C / 1 min
Anelamento	56°C / 1 min (35 ciclos)
Extensão	72°C / 3 min
Extensão final	72°C / 10 min

Após o término da PCR, para averiguar o produto da amplificação bem como excluir a possibilidade de contaminação, os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2%. Tal procedimento foi realizado em cuba horizontal utilizando uma tensão de 110 V, corrente de 185 mA e potência de 50W por 1 hora. Os fragmentos amplificados foram visualizados com o auxílio do agente intercalante, GelRed™, no transiluminador (Loccus Biotecnologia, Brasil) com fonte ultravioleta (Figura 4).

Indivíduos com pelo menos um alelo funcional para *GSTM1* ou *GSTT1* que revelaram bandas nos pesos moleculares esperados em qualquer intensidade foram agrupados, respectivamente em *GSTM1* presente e *GSTT1* presente. Os genótipos suprimidos que não revelaram bandas, resultado na forma inativa das enzimas foram denominados *GSTM1 nulo* e *GSTT1 nulos* de acordo com a literatura (LANDI et al., 2000), como visualizados na Figura 4.

FIGURA 4. Genotipagem em eletroforese em gel de agarose a 2%



Genotipagem em eletroforese em gel de agarose a 2%. Ladder ou marcador de peso molecular; (B), controle negativo da PCR; (C), controle positivo para *GSTT1* e *GSTM1*; (A1 e A4), amostras com a deleção das duas GST; (A2), amostra com a deleção do *GSTM1*; (A3), amostra com deleção de *GSTT1*; (A5) amostra com a presença das GST. Ademais, observa-se o número de pares de bases (pb) para *GSTT1* (459pb), *CYP1A1* (312pb) e de para *GSTM1* (219pb).

4.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As frequências genóticas foram determinadas por simples contagem e comparadas entre os grupos pelo teste Qui-Quadrado (χ^2). O cálculo de “*Odds Ratio*”, com intervalo de confiança 95%, foi utilizado para avaliar o genótipo com a susceptibilidade ao DM2.

A regressão logística, com fatores relacionados à distribuição por idade, sexo, glicemia em jejum, Hb1Ac, perfil lipídico, IMC, fumo e hipertensão foi realizada para avaliar a influência dessas variáveis em relação aos polimorfismos sob a chance de desenvolver o DM2.

A distribuição das variáveis biológicas e antropométricas entre os grupos foram avaliadas por meio do teste *Kolmogorov-Smimov* e comparadas utilizando o χ^2 , ou teste *t* de *Student* para amostras independentes ou teste de *Mann-Whitney* para as variáveis não-paramétricas. Para todos os testes foi considerado um nível de significância de 5%. As análises dos dados foram realizadas pelo programa IBM SPSS *Estatistic* 20 (IBM, 2011) e BioEstat 5.0 *software* (Instituto Mamirauá, Brasil).

5 RESULTADOS

As características biológicas e antropométricas avaliadas na população estão descritas na (Tabela 4). O grupo caso foi constituído por 380 indivíduos, sendo 278 do sexo feminino e 102 do sexo masculino, onde a média de idade foi de 63,20 anos. O grupo controle foi composto por 282 indivíduos, composto por 193 voluntários do sexo feminino e 89 do sexo masculino, o qual apresentou média de idade de 63,43 anos.

As diferenças de idade e sexo entre os grupos não foram significativas, o que indica homogeneidade da amostra, confirmando que os sujeitos incluídos foram combinados.

TABELA 4 – Variáveis bioquímicas dos casos e controles.

Variáveis	Casos	Controles	<i>p</i>
Sexo (F/M) ^b	278/102	193/89	0,18
Idade (anos) ^c	63,20 ± 12,61	63,43 ± 12,25	0,81
Glicemia jejum (mg/dL) ^a	136,39 ± 69,71	96,93 ± 25,12	<0,001
Hemoglobina glicada (%) ^a	7,27% ± 2,03	6,64% ± 1,14	<0,0001
Colesterol Total (mg/dL) ^a	206,17 ± 25,79	205,18 ± 25,12	0,42
LDL (mg/dL) ^c	126,96 ± 35,33	124,82 ± 30,75	0,88
HDL (mg/dL) ^a	45,03 ± 2,57	45,00 ± 1,14	0,92
VLDL mg/dL) ^a	32,07 ± 9,16	31,73 ± 6,96	<0,0001
Triglicérides (mg/dL) ^a	181,80 ± 83,05	168,00 ± 49,50	<0,0001
IMC ^a	25,14 ± 3,12	24,87 ± 2,72	0,001
Hipertensão ^b	335	97	<0,0001
Fumo ^b	31	29	0,007

^aAnálise estatística por teste U Mann-Whitney; ^bTeste Qui-Quadrado; ^cTeste T Amostras Independentes. Os dados estão expressos como média ou mediana^a e (desvio padrão). Significância estatística ($p < 0,05$). IBM SPSS Estatistic 20.

A distribuição das variáveis biológicas e antropométricas foram avaliadas por

meio do teste de *Kolmogorov-Sminov*, onde apenas a idade, por apresentar distribuição normal, foi calculada pelo teste *t* para amostras independentes para determinar a frequência da idade entre os grupos. Em relação as outras variáveis, as frequências foram comparadas pelo teste U de *Mann-Whitney* para amostras não-paramétricas ou χ^2 para amostras dicotômicas.

As variáveis, glicemia em jejum, VLDL, triglicerídeos, hemoglobina glicada, IMC e hipertensão, apresentaram médias estatisticamente maiores no grupo de casos do que o grupo controle ($p < 0,05$). No entanto, não houve diferença significativa entre as médias de colesterol total, LDL, HDL e fumo entre os grupos ($p > 0,05$).

A genotipagem dos polimorfismos *GSTM1 nulo* e *GSTT1 nulo* foram realizadas utilizando a técnica de PCR multiplex e os resultados foram visualizados utilizando a eletroforese em gel de agarose a 2% (Figura 4). Devido à metodologia apresentar apenas um genótipo presente ou ausente, os heterozigotos não puderam ser distinguidos, portanto, não foi possível determinar se esses genótipos estavam em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*. Na busca de alcançar o equilíbrio procurou-se adicionar um maior número de sujeitos de forma randomizada na pesquisa.

Em relação aos genótipos nulos de risco, o *GSTM1 nulo* aparece em maior frequência do que o *GSTT1 nulo* tanto no grupo caso ($p = 0,004$) como no grupo controle ($p = 0,002$). Os resultados da distribuição dos genótipos entre os grupos mostraram que a frequência de *GSTM1 nulo* foi 30,96% nos grupos caso e 33,05% controle, já a frequência de *GSTT1 nulo* foi de 19,85% nos pacientes diabéticos e 20,76 % no grupo controle. Não houve diferença significativa na distribuição de genótipos nulos e presentes entre os grupos caso e controle para *GSTM1 nulo* ($\chi^2 = 0,29$; $p = 0,64$) e *GSTT1 nulo* ($\chi^2 = 0,077$; $p = 0,78$) (Tabela 5).

Na análise de chance associada aos polimorfismos de deleção, foi observado que não houve associação significativa entre os genótipos com a susceptibilidade ao DM2, *GSTM1 nulo* (OR= 0,90; IC= 0,64-1,28; $p = 0,65$) e *GSTT1 nulo* (OR= 0,94; IC= 0,63-1,41; $p = 0,86$).

A combinação dos dois genótipos de risco, *GSTM1 nulo* ou *GSTT1 nulo*, foi pouco frequente em ambas as populações (12,29% e 12,43%) e não foram associados com uma chance aumentada ao DM2 em relação aos dois genótipos presentes (OR = 0,96; IC = 0,58-1,60; $p = 1,00$). No entanto, a combinação genótipo duplo presente foi mais predominante nos dois grupos (61,65% e 58,09%), respectivamente, e aplicando o teste χ^2 verificou-se uma frequência significativamente maior no grupo caso ($p < 0,004$).

TABELA 5: Frequência e combinações genotípicas de *GSTM1* e *GSTT1* com análise de chance com DM2.

Genótipo	Caso n (%)	Controle n (%)	χ^2	p	OR (IC – 95%)	p
<i>GSTM1</i>						
Presente (+)	261(69,04)	158 (66,95)	-	-	1 (referência)	-
Nulo (-)	117 (30,96)	78 (33,05)	0,29	0,58	0,90 (0,64-1,28)	0,65
<i>GSTT1</i>						
Presente (+)	303 (80,15)	187 (79,24)	-	-	1 (referência)	-
Nulo (-)	75 (19,85)	49 (20,76)	0,077	0,78	0,94 (0,63-1,41)	0,86
Total	378	236				
<i>GSTM1/GSTT1</i>						
(+ / +)	233 (61,65)	139 (58,90)	8,02	0,004	1 (referência)	-
(+ / -)	28 (7,40)	20 (8,47)	0,17	0,67	0,83(0,45- 1,53)	0,67
(- / +)	70 (18,52)	48 (20,34)	0,28	0,59	0,87(0,56-1,31)	0,59
(- / -)	47 (12,43)	29 (12,29)	0,017	0,89	0,96(0,58-1,60)	1,00
Total	378	236				

Análise estatística por Teste Qui-Quadrado; OR- *Odds Ratio* e intervalo de confiança.

*Diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). Bioestat 5.0

A regressão logística foi então executada para determinar se os genótipos *GSTM1 nulo* e *GSTT1 nulo* podem ser previstos por meio das variáveis biológicas e antropométricas. De todas as variáveis analisadas, somente o fumo apresentou uma susceptibilidade aumentada ao DM2 quando na detecção do genótipo *GSTT1 nulo*,

conforme a (tabela 6). A regressão logística para *GSTM1* não mostrou nenhuma variável preditora estatisticamente significativa, não associando nenhuma das variáveis ao genótipo nulo.

TABELA 6: Efeito das variáveis sob a probabilidade de *GSTM1* nulo e *GSTT1* nulo.

Variáveis	<i>GSTM1</i> nulo		<i>GSTT1</i> nulo	
	<i>P</i>	OR (IC 95%)	<i>p</i>	OR (IC 95%)
Sexo	0,95	0,97 (0,37-2,53)	0,13	0,39 (0,11- 1,32)
Glicemia	0,17	0,99 (0,99-1,01)	0,11	0,99 (0,99-1,00)
Hemoglobina glicada	0,17	1,07 (0,96-1,19)	0,43	1,05 (0,93-1,18)
Colesterol Total	0,43	1,00 (0,99-1,01)	0,99	1,00 (0,99-1,00)
HDL	0,85	0,99 (0,91-1,07)	0,80	1,01 (0,99-1,11)
LDL	0,95	1,00 (0,99-1,00)	0,83	1,00 (0,99-1,00)
VLDL	0,76	1,00 (0,99-1,00)	0,83	1,00 (0,99-1,00)
Triglicerídeos	0,20	1,00 (0,99-1,00)	0,22	1,00 (0,99-1,00)
IMC	0,80	1,00 (0,95-1,06)	0,76	1,01 (0,94-1,08)
Hipertensão	0,16	1,97 (0,75-5,21)	0,13	0,40 (0,12-1,31)
Fumo	0,71	1,19 (0,44-3,21)	0,05	2,92 (0,98-8,72)

Diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). IBM SPSS Estatistic 20.

A influência da deleção de *GSTM1* e *GSTT1* sobre alterações biológicas e antropométricas foram analisadas entre os indivíduos com genótipo nulo e genótipo presente. Para *GSTM1* somente a média da glicemia em jejum foi significativamente maior em indivíduos com genótipo *nulo* ($p = 0,002$). Com relação ao gene *GSTT1*, para o polimorfismo nulo às diferenças foram significativas para as variáveis: glicemia em jejum, hemoglobina glicada e HDL ($p < 0,05$) (Tabela 7).

TABELA 7: Análise da associação entre os genótipos presente e nulo *GSTM1* e *GSTT1* com variáveis biológicas e antropométricas em pacientes com DM2.

Variáveis N=374	<i>GSTM1</i> nulo	<i>GSTM1</i> presente	<i>p</i>
Sexo (F/M) ^b	81/34	193/65	0,37
Glicemia ^a	163,50 ± 75,57	143,00 ± 82,46	0,002
Hb1Ac ^a	8,20 ± 2,35	8,10 ± 2,65	0,19
IMC ^a	26,50 ± 3,66	26,00 ± 4,62	0,48
Triglicerídeo ^a	173,50 ± 101,36	176 ± 103,53	0,70
Colesterol ^a	206,90 ± 56,63	212,00 ± 52,75	0,46
HDL ^a	46,00 ± 7,43	45,35 ± 8,61	0,55
LDL ^a	120,90 ± 47,01	127,90 ± 49,58	0,54
VLDL ^a	33,60 ± 9,66	33,80 ± 14,39	0,64
Hipertensão ^b	103	96	0,95
Fumo ^b	12	8	0,46

Variáveis N=374	<i>GSTT1</i> nulo	<i>GSTT1</i> presente	<i>p</i>
Sexo (F/M) ^b	51/25	224/75	0,16
Glicemia ^a	155,00 ± 75,0	145,00 ± 81,97	<0,001
Hb1Ac ^a	8,30 ± 2,47	8,10 ± 2,58	0,045
IMC ^a	24,44 ± 4,20	26,24 ± 4,30	0,53
Triglicerídeo ^a	174,30 ± 82,62	174,00 ± 107,13	0,54
Colesterol ^a	210,76 ± 51,34	208,10 ± 54,64	0,61
HDL ^a	47,78 ± 9,34	44,04 ± 8,12	0,038
LDL ^a	120,60 ± 44,55	125,50 ± 49,92	0,23
VLDL ^a	34,80 ± 12,27	34,19 ± 17,44	0,79
Hipertensão ^b	61	268	0,07
Fumo ^b	26	23	0,40

^aAnálise estatística por teste U *Mann-Whitney*; ^bTeste Qui-Quadrado; Os dados estão expressos como mediana ou média e (desvio padrão). Significativa estatística (*p* < 0,05). IBM SPSS Estatistic 20.

Devido a grande frequência de portadores do DM2 com hipertensão, verificou-se que os indivíduos portadores de DM2, com os genótipos *GSTM1 nulo*, *GSTT1 nulo* ou a combinação *GSTM1 nulo/GSTT1 nulo* apresentam uma chance maior para desenvolver a hipertensão ($p < 0,05$) (Tabela 8).

TABELA 8: Associação entre os polimorfismos nulos das GSTs e a hipertensão

Genótipo	Hipertensão	Ausência de Hipertensão	<i>p</i>	OR	<i>p</i>
<i>GSTM1 nulo</i>					
Caso	101	17	0,007	11,88 (2,01-70,0)	0,005
Controle	2	4			
<i>GSTT1 nulo</i>					
Caso	62	14	0,028	13,2 (1,28 -137,4)	0,03
Controle	1	3			
<i>GSTM1 nulo /GSTT1 nulo</i>					
Caso	40	7	0,001	9,52 (3,00 – 30,0)	0,0001
Controle	9	15			

OR- Odds Ratio e intervalo de confiança. Diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). Bioestat 5.0.

Os mais relevantes estudos com metodologia caso-controle sobre os polimorfismos *GSTM1 nulo*, *GSTT1 nulo* e sua relação ao DM2 publicados de 2007 a 2015 estão sumarizados na Tabela 9. Controvérsias entre as frequências dos polimorfismos nulos e a susceptibilidade em manifestar o diabetes são relatadas, porém, os estudos com maior representatividade populacional apontam para o aumento na chance de desenvolvimento do DM2, para indivíduos com o polimorfismo nulo.

TABELA 9: Trabalhos publicados entre 2007 e 2015 que avaliaram a associação entre os polimorfismos *GSTM1 nulo* e *GSTT1 nulo* e suas associações com o DM2.

País	Nº caso/ Controle	Frequência		OR	Referencia
		<i>GSTM1</i> Caso controle	<i>GSTT1</i> Caso controle		
I. América					
Brasil (Nordeste)	384/262	30,96% 33,05%	19,85% 20,76%	-	Presente estudo
Brasil (Centro- Oeste)	120/147	41,7% 43,5%	29,2% 12,2%	<i>GSTT1</i> -) $p = 0,0004$ OR= 3,2	PINHEIRO et al., 2013
II. Ásia					
Índia	512/270	42,3% 20,7%	31,5% 17,8%	(<i>GSTM1</i> -) $p < 0,0001$ OR=2,92 (<i>GSTT1</i> -) $p < 0,0001$ OR=3,11	RAMPRASATH et al., 2011
India	100/100	54,0% 36,5%	17,0% 14,0%	(<i>GSTM1</i> -) $p = 0,004$, OR =2,042	BID et al., 2010
Irã	-	33,05% 27,5%-	46% 72%	-	AFRAND et al., 2015
Irã	404/201	57,7% 48,8%	24,9% 27,1%	(<i>GSTM1</i> -) $p = 0,03$ OR=1,43 (-/-) $p = 0,02$ OR=1,88	MOASSER et al., 2012
Japão	469	-	-	(<i>GSTT1</i> -) $p < 0,05$ OR: 2,85	HORI et al., 2007

Continuação.

TABELA 9: Trabalhos publicados entre 2007 e 2015 que avaliaram a associação entre os polimorfismos *GSTM1 nulo* e *GSTT1 nulo* e suas associações com o DM2.

III. África

Egito	100/100	62% 47%	35% 21%	(-/-) $p=0,009$ OR=3,17	AMER et al., 2011
--------------	---------	------------	------------	-------------------------------	--------------------------

IV. Europa

Romênia	106/124	-	-	(-/-) $p=0.002$, OR=0.313-	POROJAN et al., 2015
Turquia	127/127	37,0% 69,3%	23,6% 29,9%	(GSTM1-) $p<0,0001$ OR=3,84	GONUL et al., 2012
Turquia	98/98	-	-	(GSTM1-) $p<0,05$ OR=3,7	YALIN et al., 2007

OR: Odds Ratio, não calculado pelo presente estudo. Significativa estatística ($p < 0,05$).

-: ausência de associação com a chance de desenvolver DM2; (-/-) Genótipo *GSTM1 nulo* /*GSTT1 nulo*.

6 DISCUSSÃO

Em estudos epidemiológicos observa-se que a presença dos genótipos *GSTM1+/GSTT1+* promovem proteção ao DM2, enquanto que os mesmos genótipos nulos são considerados fatores de risco para o desenvolvimento do DM2 (ANDREASSI et al., 2009; YALIN et al., 2007; HORI et al., 2007; YANG et al., 2004). No presente estudo, os polimorfismos do gene GSTs, o *GSTM1 nulo* e *GSTT1 nulo* e sua associação com a susceptibilidade ao DM2 foram investigados, através da análise de variáveis biológicas em pacientes com DM2 e em controles saudáveis.

A frequência de *GSTM1 nulo* varia de 30% a 50% em diferentes etnias (STOIAN et al., 2015; POROJAN et al., 2015; MOASSER et al., 2012; ROTH et al., 2000). Os alelos nulos do gene *GSTM1* foram encontrados em 30,96% dos indivíduos do grupo caso e 33,05% no grupo controle (Tabela 5). Ao comparar os resultados do presente estudo em diferentes populações (Tabela 9), a frequência do *GSTM1 nulo* nos casos (30,96%) mostra-se próximo aos resultados da Turquia (37%) e a um outro estudo feito também no Brasil (41%), porém menor que as frequências encontradas na Índia (54%), Iran (57,7%) e Egito (62,00%) (PINHEIRO et al., 2013; GONUL et al., 2012; MOASSER et al., 2012; AMER et al., 2011; BID et al., 2010). A frequência do *GSTM1 nulo* não apresentou diferenças significativas entre os grupos caso (30,96%) e controle (33,05%), assim como não houve associação com a chance ao DM2 ($\chi^2 = 0,29$; $p = 0,58$, OR = 0,90; IC = 0,64-1,28; $p = 0,65$) (Tabela 5). Deste modo, os resultados nos sugerem que o polimorfismo no gene *GSTM1* não exerce papel na susceptibilidade ao DM2 no Brasil, corroborando com os estudos de Pinheiro (2013), de Porojan (2015) na população da Romênia e de Wang (2006) na China, onde não foram encontradas diferenças significativas em relação a frequência entre pacientes com DM2 e controles, nem em relação a chance aumentada ao DM2 associada ao genótipo *GSTM1 nulo*. No entanto, Ramprasath, (2011) obteve resultados controversos, onde a chance para o desenvolvimento do DM2 foi duas vezes maior em indivíduos com o genótipo nulo de *GSTM1* na população do sul da Índia (OR = 2,925; IC = 2,078 - 4,119; $p = 0,0001$).

A frequência do *GSTT1 nulo* varia entre 16% a 38% na população (STOIAN et

al., 2015; MONTERO et al., 2007; ZHENG et al., 2002). A frequência desse polimorfismo foi de (19,85%) no grupo caso e (20,76%) no grupo controle. Com relação a Tabela 9, a frequência de *GSTT1 nulo* foi semelhante à população da Índia (17%), porém, foi menor do que a da Turquia (23,6%), Brasil (29%) e Egito (35%) (PINHEIRO et al., 2013; GONUL et al., 2012; MOASSER et al., 2012; AMER et al., 2011; BID et al., 2010). Para o *GSTT1 nulo* também não houve diferença significativa entre os grupos, com ausência de associação para a susceptibilidade ao DM2 ($\chi^2= 0,07$, $p= 0,78$, OR= 0,94, IC= 0,63-1,41, $p= 0,86$) (Tabela 5). Os achados do presente estudo foram semelhantes aos de Stoian (2015), onde nenhum efeito significativo sobre a chance de aparecimento do DM2 em relação ao polimorfismo *GSTT1 nulo* foi encontrado (OR = 1,82, IC= 0,32-2,08 $p= 0,67$,). Corrobora também com os estudos realizados por Gönül (2012) e Yalin (2007) em pacientes turcos. Porém, no Brasil e na Índia o genótipo *GSTT1 nulo* foi associado com um aumento de três vezes em desenvolver o DM2 (OR= 3,114, IC= 2,176 - 4,456, $p= 0,0001$) (PINHEIRO et al., 2013; RAMPRASATH et al., 2011).

Diversos estudos analisam ainda a interação gene-gene ou efeito sinérgico de cada genótipo. A presença dos genótipos combinados *GSTM1* e *GSTT1 (+/+)* geralmente exercem um papel cooperativo na proteção contra o desenvolvimento de DM2 e estão mais frequentes na população (AMER et al., 2011; HORI et al., 2007 WANG et al., 2006). Também foi observado no presente estudo uma elevada frequência do genótipo duplo no grupo caso (61,65%) e no grupo controle (58,90%), ($\chi^2= 8,02$; $p= 0,004$), no entanto a associação com proteção ao DM2 não foi observada.

Segundo a meta-análise conduzida por Zhang, et al. (2013) a combinação dos genótipos *GSTM1 nulo/GSTT1 nulo (-/-)* têm sido consistentemente considerada um fator de risco para o desenvolvimento do DM2. Países como a Romênia, Turquia, Iran, Japão e Egito apresentaram associação do genótipo duplo nulo com a susceptibilidade aumentada ao DM2 (POROJAN et al 2015; GONUL et al., 2012; MOASSER et al. 2012; AMER et al., 2011; HORI et al., 2007; YALIN et al., 2007) (Tabela 9). No entanto, não foi observada nenhuma associação das combinações dos genótipos (-/-) com essa susceptibilidade no presente estudo ($\chi^2=0,017$; $p= 0,89$; OR=0,96; IC= 0,58-1,60; $p= 1,00$), corroborando com estudos realizados no Brasil e

na Índia, onde também não se observou associação dos genótipos duplo nulo com o DM2 (PINHEIRO et al., 2013; RAMPRASATH et al., 2011; BID et al., 2010) (Tabela 5).

As combinações de *GSTM1* e *GSTT1* contendo apenas uma das isoformas deletadas (-/+ ou +/-) também são associadas ao DM2 em algumas populações (BID et al., 2010; YALIN et al., 2007). No entanto, não foi observada nenhuma associação desses genótipos no presente estudo (Tabela 5).

Tais contradições podem estar demonstrando a diversidade étnica e heterogeneidade fenotípica entre essas populações, ou ainda ser consequência da interação de outros genes (QIU et al., 2014).

Considerando a etiologia multifatorial do DM2, a chance de desenvolver DM2 também foi avaliada a partir de variáveis que influenciam fortemente a heterogeneidade dos indivíduos. De acordo com o Ministério da Saúde, (2016) a idade, obesidade, sedentarismo, histórico familiar, hipertensão arterial, colesterol HDL<35mg/dL, triglicerídeos>150mg/dL e o tabagismo, representam fatores indicativos de risco para o desenvolvimento do DM2. Dentre as variáveis analisadas somente o tabagismo (OR= 2,96; IC=0,98-8,72; p= 0,054) para indivíduos portadores do genótipo *GSTT1* nulo foram associados com uma chance aumentada de apresentar o DM2 (Tabela 6).

Com relação ao tabagismo, diversas são as razões pelos quais o fumo promove um maior risco para o desenvolvimento do DM2 (CHANG et al., 2012). A fumaça do cigarro possui substâncias tóxicas que aumentam os níveis de ROS e diminuem as defesas antioxidantes, promovendo o EO, além disso, o fumo eleva os níveis de cortisol, promove a obesidade central e aumenta a concentração de marcadores inflamatórios (SBD, 2014; TORRES, 2009). A nicotina ainda, se liga a receptores nicotínicos das células pancreáticas reduzindo diretamente a secreção de insulina (SBD, 2014). Dentre as substâncias presentes no tabaco, os xenobióticos são metabolizados por um complexo enzimático composto por enzimas ativadoras da fase I e detoxificadoras da fase II (RODRIGUES, 2016). Os genes *GSTM1* e *GSTT1* codificam enzimas de fase II, cujas funções principais residem na desintoxicação dessas substâncias que são altamente reativas e com capacidade de

formar ligações covalentes com o DNA, desencadeando mutações (RODRIGUES, 2016). Deste modo, apesar dessa variável ter sido coletada a partir da autodeclaração dos participantes, os resultados corroboram com estudos no Japão, onde o fumo também foi associado a uma chance 5 vezes maior de ter DM2 para o genótipo *GSTT1 nulo* ($p < 0,05$; OR= 5,91; IC= 1,96-17,88) (HORI et al., 2007).

A idade está associada com o DM2 e com o aumento do EO (SBD, 2017; ANDRIOLLO-SANCHEZ et al., 2005). O envelhecimento caracteriza-se por alterações na produção de ATP na mitocôndria e de radicais livres derivados do oxigênio (ENGERS et al, 2011). Isso leva a um acúmulo de lesões oxidativas, tanto no DNA como nas proteínas (ENGERS et al, 2011; ANDRIOLLO-SANCHEZ et al., 2005). Além disso, muitos dos mecanismos antioxidantes, incluindo as enzimas antioxidantes (GSTs), declinam com o avançar da idade (KASPER et al., 2017). Na Eslovênia a idade foi associada a uma chance aumentada tanto para DM2 como para a hipertensão devido ao genótipo *GSTT1 nulo* ($p = 0,01$; OR= 1,03; IC= 1,01 - 1,05) (PETROVIC et al., 2014), no entanto, não observamos associações entre a idade e os polimorfismos *GSTM1 nulo* e *GSTT1 nulo*.

A variável sexo, não apresentou diferenças significativas entre os dois grupos, nem associação dos genótipos de *GSTM1 nulo* e *GSTT1 nulo* com o DM2. Uma das possíveis explicações seria a localização cromossômica distinta dos genes avaliados, não associando diretamente com a predisposição ao sexo (WANG et al., 2012; REN et al., 2009). Contudo, vale ressaltar a elevada frequência do gênero feminino no estudo (80,8%), com média de idade de 65 anos. A incidência e prevalência do DM2 entre os sexos dependem de fatores como a obesidade, a idade avançada, que refletem em taxas mais elevadas nas mulheres (KAUTZKY-WILLER et al., 2016). Atualmente a prevalência do DM2 predomina em homens na meia-idade (FAERCH et al., 2014). No Brasil, segundo Bertoldi (2013), as mulheres apresentam uma maior frequência porque são mais cuidadosas com a saúde, o que reflete no maior diagnóstico e utilização de cuidados médicos do que os homens. De acordo com uma pesquisa, os homens pouco frequentam o serviço de saúde, por questões de incompatibilidade de horário, medo de detectar doença grave e a falta de especialidades no SUS para atender às peculiaridades masculinas (VIEIRA et al., 2013).

Na análise de efeito dos genótipos nulos sob as variáveis laboratoriais, os indivíduos com DM2, portadores do genótipo *GSTM1 nulo* apresentaram aumento significativo no nível de glicemia em jejum quando comparados com a presença do genótipo. No entanto, indivíduos também com DM2, mas portadores do genótipo *GSTT1 nulo* apresentaram alterações significativamente mais elevadas nas variáveis, glicemia em jejum, hemoglobina glicada e HDL (Tabela 7). Para o genótipo *GSTT1 nulo*, resultados semelhantes foram encontrados nos estudos de Afrand, (2015) e Ramprasath, (2011) para níveis elevados de glicemia e HDL-colesterol e no estudo de Porojan, (2015) para hemoglobina glicada. Isso nos permite deduzir que o genótipo *GSTT1 nulo* pode ter relevância no curso clínico de pacientes portadores do DM2, uma vez que a glicemia em jejum e a hemoglobina glicada são pontos focais para monitoramento da doença e prevenção das complicações do DM2. Assim, como observado nos estudos de Pinheiro et al. (2013) e Amer et al. (2011), os quais verificaram a existência de uma associação do *GSTM1* com os níveis glicêmicos mais elevados em populações brasileiras e egípcias, pode-se sugerir que o *GSTM1 nulo* pode ser um marcador útil na identificação de indivíduos com alto risco de diabetes nessas populações.

Outra variável que merece ressalva é a hipertensão, visto que de 328 indivíduos com DM2, 267 apresentaram quadro hipertensivo, correspondendo a 81,40% dos casos. A Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) e sua associação com o DM2 é muito frequente e geralmente está relacionada com um pior prognóstico para os pacientes (SILVA et al., 2011). A hiperglicemia provoca diversas alterações patológicas no coração, artérias e nervos, sendo o endotélio mais afetado devido ao intenso fluxo de glicose (ROCHA et al., 2006). No endotélio, a hiperglicemia estimula o EO por fosforilação oxidativa, auto-oxidação da glicose, NADPH oxidase, lipo-oxigenase, citocromo P450, mono-oxigenases e óxido nítrico sintase endotelial (SILVA et al., 2011). A HAS é um distúrbio complexo multifatorial caracterizada pela disfunção endotelial associado a baixa biodisponibilidade ou sinalização alterada de óxido nítrico (NO), que é o principal responsável pela manutenção do tônus vascular (SCHULZ et al., 2011). O EO desempenha um papel importante na fisiopatologia da HAS associado ao aumento da produção de pró oxidantes, como o peróxido de hidrogênio, superóxido, a redução da síntese de óxido nítrico e a diminuição da capacidade antioxidante (SINHA et al., 2015). Na HAS o EO resulta principalmente

da superprodução do ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) estimulado pela angiotensina II, que inibe a atividade do NO em devido a reação para formar peroxinitrito ($ONOO^-$), uma espécie reativa de nitrogênio capaz de produzir hidroxila (OH), uma ROS altamente lesiva devido a incapacidade da neutralização por enzimas antioxidantes (SCHULZ et al., 2011; SILVA et al., 2011; BESSA et al., 2009).

A atividade de GSTs no tecido vascular representa um dos principais mecanismos de defesa celular contra a lesão oxidativa (HUSSAIN et al., 2012). As análises de associação dos polimorfismos nulos das GST com a hipertensão em indivíduos portadores do DM2 foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$). A hipertensão em indivíduos com DM2 apresentou susceptibilidade elevada tanto para o genótipo *GSTM1 nulo* (OR= 11,8; IC= 2,01 – 70,0 $p = 0,005$) como o *GSTT1 nulo* (OR= 13,2; IC= 1,28 – 137,41 $p < 0,0001$) (Tabela 8). Na Eslovênia, o genótipo *GSTM1 nulo* (OR=1,7; $p = 0,002$) e *GSTT1 nulo* (OR=1,5; $p = 0,01$) também foram considerados fatores de risco para hipertensão, indicando que os genes das GSTs podem estar implicados na etiologia da hipertensão em portadores com DM2 (PETROVIC et al., 2014).

Em relação às discrepâncias entre os resultados obtidos, as diferenças entre os grupos étnicos são um problema na avaliação das associações dos genótipos nulos das GSTs em uma dada doença (LI et al., 2015). A origem étnica brasileira é bastante heterogênea, constituída de imigrantes da Europa, África e Ásia, além da população indígena nativa (LOPES et al., 2013). No Piauí, essa heterogeneidade não é diferente, pois considerando o processo de colonização do território piauiense, a população do Estado tem sua constituição ancestral formada por europeus (60%), seguida de africanos (21,5%) e indígenas (18,5%) (LOPES et al., 2013). De acordo com Arruda et al, (1998), no Brasil o *GSTM1 nulo* apresentou maior prevalência entre os brancos 55%, seguida dos afrodescendentes 33% e 20% entre os indígenas. Para o genótipo *GSTT1 nulo* foi encontrada uma distribuição semelhante dentre europeus e africanos (18,5% e 19%, respectivamente), com menor prevalência entre os indígenas (11%).

Por fim, com o desenvolvimento do presente estudo constata-se que muitas pessoas que se autodeclaravam não portadoras para o diabetes apresentavam valores elevados de glicemia em jejum, perfil lipídico e IMC. Dessa forma,

corroborando com os achados do Vigitel (2014), verifica-se que, no Brasil, o número de indivíduos com diabetes, pode ser maior do que o contabilizado. De acordo com Pititto et al (2015), cerca de 41% da população brasileira é negligente com sua saúde. Segundo também o Vigitel (2016), a obesidade cresceu (60%) em dez anos com frequência semelhante entre os sexos. Em contrapartida aumentou a prática de atividade física, o consumo de hortaliças e diminuiu o consumo regular de refrigerante ou suco artificial. Mesmo assim, o reflexo dos maus hábitos e estilo de vida, aumentou o número de brasileiros diagnosticados com diabetes em 61,8% em 2016, com maior frequência nas mulheres, corroborando com os achados do presente estudo (BRASIL, 2016). Diante desse contexto, e não esquecendo o quanto a genética do indivíduo o torna susceptível à patologia, conhecer o perfil genético de uma população miscigenada, poderá facilitar a aplicação de estratégias de saúde que visem o bem-estar desse grupo populacional.

7 CONCLUSÃO

Não houve evidências de associação dos genótipos *GSTM1 nulo*, *GSTT1 nulo* e da combinação *GSTM1 nulo/GSTT1 nulo* com a susceptibilidade ao DM2. No entanto, os polimorfismos nulos das GSTs podem ser considerados potenciais marcadores genéticos para monitoramento da doença para prevenir complicações do DM2, visto que o *GSTM1 nulo* associou-se a níveis maiores de glicemia em jejum e o *GSTT1 nulo* teve correlação com níveis mais elevados de glicemia em jejum, hemoglobina glicada e HDL-colesterol em pacientes com DM2, permitindo inferir a contribuição dos polimorfismos para o estado hiperglicêmico, fator responsável pelas complicações desta patologia.

8. REFERENCIAS

AFRAND, M et al. Evaluation of glutathione S-transferase T1 deletion polymorphism on type 2 diabetes mellitus risk in Zoroastrian females in Yazd, Iran. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 19, n.1, p. 124-128, 2015.

AHLQVIST, E., AHLUWALIA, T. S., GROOP, L. Genetics of Type 2 Diabetes. **Clinical Chemistry**, v. 57, n. 2, p. 241–254, 2011.

ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* v. 25, n. 17, p. 3389 – 402, 1997.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION [ADA]. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, v. 36, s. 1, p. 67-74, 2013.

AMER, M. A. et al. Influence of glutathione S-transferase polymorphisms on type-2 diabetes mellitus risk. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, n. 4, p. 3722 – 3730, 2011.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**. v. 33, n.1, p. 62 - 69, 2010.

ANDONOVA, I. E. et. al. No evidence for glutathione S-transferases GSTA2, GSTM2, GSTO1, GSTO2, and GSTZ1 in breast cancer risk. **Breast Cancer Res Treat**, v. 121, n. 2, p. 497 – 502, 2010.

ANDREASSI, M. G. et. al. Metabolic syndrome, diabetes and atherosclerosis: influence of gene-environment interaction. **Mutation Research**, v. 667, p. 35 - 43, 2009.

ANDRIOLLO-SANCHEZ, M. et al. Age-related oxidative stress and antioxidant parameters in middle-aged and older European subjects: the ZENITH study. **European Journal of Clinical Nutrition**. n. 59, p. 58 - 62, 2005.

ARRUDA, V. R., GRIGNOLLI, C. E., GONÇALVES, M. S. Prevalence of homozygosity for the deleted alleles of glutathione S-transferase mu (GSTM1) and theta (GSTT1) among distinct ethnic groups from Brazil: relevance to environmental carcinogenesis. **Clin Genet**, v. 54, p. 210 - 214, 1998.

BARROS, C. M. A. R. et al. Association of the rs7903146 and rs12255372 polymorphisms in the TCF7L2 gene with type 2 diabetes in a population from northeastern Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, p. 7889-7898, 2014.

BERTOLDI, A. D., KANAVOS, P. et. al. Epidemiology, management, complications and costs associated with type 2 diabetes in Brazil: a comprehensive literature review. **Globalization and Health**. v. 9, p. 62, 2013.

BESSA, S. S., HAMDY, S. M. The role of glutathione S- transferase M1 and T1 gene polymorphisms and oxidative stress-related parameters in Egyptian patients with

essential hypertension **Eur J Intern Med**, v. 20, n. 6, p. 625-30, 2009.

BID, H.K.; KONWAR, R.; SAXENA, M.; CHAUDHARIM P.; et al. Association of glutathione S-transferase (GSTM1, T1 and P1) gene polymorphisms with type 2 diabetes mellitus in north Indian population, **Journal of Postgraduate Medicine**, v. 56, n.3, p. 176 - 181, 2010.

BODEN, G., SHULMAN, G. I. Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and β -cell dysfunction. **European Journal of Clinical Investigation.**; v. 32, n.3, p. 14–23, 2002.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Diabetes Mellitus: Cadernos de Atenção Básica** / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. – Brasília, p. 64, 2006.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema Nacional de Vigilância em Saúde: **relatório de situação: Piauí / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde.** – Brasília, p. 20, 2005.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Vigitel Brasil 2014: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. **Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa.** – Brasília, p.152, 2014.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Vigitel Brasil 2016, Hábitos dos brasileiros impactam no crescimento da obesidade e aumenta prevalência de diabetes e hipertensão. Apresentação, 2016. **Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde.** Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/maio/12/Lancamento-resultados-2016.pdf>> Acessado em: 12/05/2016,

CAO, D. L. et. Al. Association of glutathione S-transferase T1 and M1 polymorphisms with prostate cancer susceptibility in populations of Asian descent: a meta-analysis. **Oncotarget**, v. 6, n. 34, p. 35843-50, 2015.

CHANG, S. A. Smoking and Type 2 Diabetes. **Diabetes Metabolism Journal**, v. 36, n. 6, p. 399 – 403, 2012.

CHEN, J., MENG, Y., ZHOU, J. et al. Identifying Candidate Genes for Type 2 Diabetes Mellitus and Obesity through Gene Expression Profiling in Multiple Tissues or Cells. **Journal of Diabetes Research**, v. 2013, p. 9, 2013.

COLOMBO, J; ROSSIT, A. R. B; CAETANO, A. et al. *GSTT1*, *GSTM1* and *CYP2E1* genetic polymorphisms in gastric cancer and chronic gastritis in a Brazilian population. **World J Gastroenterol** v. 10, p. 1240-1245, 2004.

CURTI, M. L. R. et. al. Studies of Gene Variants Related to Inflammation, Oxidative Stress, Dyslipidemia, and Obesity: Implications for a Nutrigenetic Approach. **Journal of Obesity**. v. 2011; 497401, 2011.

DADBINOUPUR, A. et al. Investigating *GSTT1* and *GSTM1* null genotype as the risk factor of diabetes type 2 retinopathy. **Journal of Diabetes and Metabolic Disorders**. v.12, p. 48, 2013.

DATTA, S. K. et al; KUMAR, V.; PATHAK, R.; TRIPATHI, A. K.; AHMED, R. S.; KALRA, O. P.; BANERJEE, B. D. Association of glutathione s –transferase M1 and T1 gene polymorphism with oxidative stress in diabetic and nondiabetic chronic kidney disease. **Ren. Fail.** v. 32, p. 1189–95, 2010.

DEDOUSSIS, G. V. Z., KALIORA, A. C., PANAGIOTAKOS, D. B. Genes, Diet and Type 2 Diabetes Mellitus: A Review. **The Review of Diabetic Studies**, v. 4, n.1, p. 13-24, 2007.

DORIA, A., PATTI, M. E., KAHN, C. R. The Emerging Genetic Architecture of Type 2 Diabetes. **Cell metabolism**, v. 8, n. 3, p.186-200, 2008.

ENGERS, V. K., BEHLING, C. S. FRIZZO, M. N. A Influência do Estresse Oxidativo no Processo de Envelhecimento Celular. **Revista Contexto & Saúde**, v. 10, n. 20, p. 93 – 102, 2011.

FÆRCH, K. Gender and T2DM. **Rev. Diapedia**, n. 10, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.14496/dia.3104972816.10>. Acesso em: 10. Abr 2017.

FEDERATION, I. D. **IDF DIABETES ATLAS Seventh Edition 2015**.

FRANÇA, B. K. et al. Lipid peroxidation and obesity: Methods to measure the oxidative stress of the obese patient's plasma. **J Port Gastrenterol** v. 20, n. 5, p. 199 – 206, 2013.

GÖNÜL, N. et al. The role of *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, and *OGG1* polymorphisms in type 2 diabetes mellitus risk: a case-control study in a Turkish population. **Gene**, v. 505, n. 1, p. 121–127, 2012.

GROOP, L., LYSSSENKO, V. Genes and type 2 diabetes mellitus. **Curr Diab Rep**, v. 8, n. 3, p. 192 – 197, 2008.

GROSS, J. L. et al. Diabetes Mellito: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia Bras Endocrinol Metab**, v. 46, n. 1, p. 16–26, 2002.

HAMDY, S. I. Genotype and allele frequencies of *TPMT*, *NAT2*, *GST*, *SULT1A1* and *MDR-1* in the Egyptian population. **J Clin Pharmacol**, v. 55, p. 560–569, 2003.

HAYASHI, T. et al. Regulation of Oxidative Stress and Cardioprotection in Diabetes Mellitus **Current Cardiology Reviews**, v. 4, p. 251-258, 2008.

HAYES, J. D., FLANAGAN, J. U., JOWSEY, I. R. Glutathione transferases. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 45, p. 51 - 88, 2005.

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.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammatory pathways and insulin action. **International Journal of Obesity**, v.27, n. 3, p. 53–55, 2003.

HUSSAIN, K., SALAH, N., HUSSAIN, S., HUSSAIN, S. Investigate the Role of Glutathione S Transferase (GST) Polymorphism in Development of Hypertension in UAE Population. **Iranian Red Crescent Medical Journal**, v.14, n. 8, p. 479 – 482, 2012.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. IDF Diabetes Atlas, **International Diabetes Federation**, 7 ed, Brussels, Belgium, 2015.

JUNG, U. J., CHOI, M. S. Obesity and Its Metabolic Complications: The Role of Adipokines and the Relationship between Obesity, Inflammation, Insulin Resistance, Dyslipidemia and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 4, p. 6184–6223, 2014.

KAHN, S. E., HULL, R. L., UTZSCHNEIDER, K. M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, v. 444, n. 7121 p. 840-846. 2006.

KANETO, H. et al. Oxidative stress and dysfunction of pancreatic beta cells. **American Journal of Therapeutic**. v. 12, n. 6, p. 529-533, 2005.

KASPER, D, L., FAUCI, D. L. L. et al. Medicina Interna de Harrison, 19.ed, editora AMGH , vol. 2 , Porto Alegre, 2017.

KAUTZKY-WILLER, A., HARREITER, J., PACINI, G. Sex and Gender Differences in Risk, Pathophysiology and Complications of Type 2 Diabetes Mellitus. **Endocr. Rev**, v. 37, n. 3, p. 278 - 316, 2016.

KHARROUBI, A. T., DARWISH, H. M. Diabetes mellitus: The epidemic of the century. **World Journal of Diabetes**. v. 6, n. 6, p. 850-867, 2015.

KOPELMAN, P. G. Obesity as a medical problem. **Nature**. v. 404, n. 6778, p. 635–643, 2000.

LANDER, E.S. et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, v. 409, n. 6822, p. 860-921, Feb, 2001.

LEE, Y. H. et. al. Association between polymorphisms in SLC30A8, HHEX, CDKN2A/B, IGF2BP2, FTO, WFS1, CDKAL1, KCNQ1 and type 2 diabetes in the Korean population. **J Hum Genet**. v. 53, n. 11-12, p. 991-998, 2008.

LI, Y., Li, S., ZHANG, Q. Association of GSTs polymorphisms with risk of gestational diabetes mellitus **Int J Clin Exp Pathol**, v. 8, n. 11, p. 15191 - 15197. 2015.

LOPES, T. R. et al. Population data of the 46 insertion-deletion (INDEL) loci in population in Piauí State, Northeastern Brazil. **Forensic Science International. Genetics**, v. 9, n. 1, p.13 – 15, 2013.

LYSSENKO, V., LAAKSO, M. Genetic Screening for the Risk of Type 2 Diabetes. **Diabetes Care**, v. 36, n. 2, p120-126, 2013.

MEYER, K. D. et al. Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3' UTRs and near stop codons. **Cell**, v. 149, n. 7, p. 1635 –1646, 2012.

MOASSER, E. et al. Study of the association between glutathione S-transferase (GSTM1, GSTT1, GSTP1) polymorphisms with type II diabetes mellitus in southern of Iran. **Mol Biol Rep**. v. 39, n. 12, p. 10187-10192, 2012.

MONROY, M. L. L. V., MEJÍA, C. F. **Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants**, Dr. Jose Antonio Morales-Gonzalez (Ed.), InTech, 2013.

MONTERO, R., ARAUJO, A. et al. Genotype frequencies of polymorphic GSTM1, GSTT1, and cytochrome P450 CYP1A1 in Mexicans. **Hum Biol**, v. 79, n. 3, p. 299-312, 2007.

NASR, A. S. et al. Glutathione S transferase (GSTP 1, GSTM 1, and GSTT 1) gene polymorphisms in Egyptian patients with acute myeloid leucemia. **Indian Journal of Cancer**, v. 52, n. 4, p. 490 - 495, 2015.

NCD RISK FACTOR COLLABORATION. Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants. **Lancet**, v. 387, p. 1513-1530, 2016.

OLOKOBA, A. B., OBATERU, O. A., OLOKOBA, L. B. Type2 Diabetes Mellitus: A Review of Current. **Oman Med Journal**, v. 27, n. 4, p. 269 - 273, 2012.

PALMER, N. D. et al. A Genome-Wide Association Search for Type 2 Diabetes Genes in African Americans. **PLoS ONE**. v. 7, p. 1, 2012.

PARL, F. F. Glutathione S-transferase genotypes and cancer risk. **Cancer Letters**, v. 221, p. 123 – 129, 2005.

PEDDIREDDY, V. et al. Association of CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 gene polymorphisms with risk of non-small cell lung cancer in Andhra Pradesh region of South India. **Eur J Med Res**, v. 17, p. 18 – 21, 2016.

PEREIRA, L. O. et al. Obesidade: hábitos nutricionais, sedentarismo e resistência à insulina. **Arq. Bras Endocrinol Metab**, v. 47, n. 2, p. 111-127, 2003.

PETROVIC, D. et al. GSTM1-null and GSTT1-null genotypes are associated with essential arterial hypertension in patients with type 2 diabetes. **Clinical Biochemistry**. v. 47, n. 7–8, p. 574 – 577, 2014.

PINHEIRO, D. S. **Avaliação do polimorfismo de deleção de GSTT1 e GSTM1 na susceptibilidade ao diabetes mellitus tipo 2**. 2013. 87 f. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.

PINHEIRO, D. S. et al. Evaluation of Glutathione S-Transferase GSTM1 and GSTT1 Deletion Polymorphisms on Type-2 Diabetes Mellitus Risk. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, 2013.

PITITTO, A. B., DIAS, M. L., MORAES, A. C. F. Type 2 diabetes in Brazil: epidemiology and management. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, v. 8, p. 17-28, 2015.

PITOCCO, D. et. al. Oxidative Stress in Diabetes: Implications for Vascular and Other Complications. **Int. J. Mol. Sciences**. v.14, p. 21525 - 21550, 2013.

POLJSAK, B. ŠUPUT, D. MILISAV, I. "Achieving the Balance between ROS and Antioxidants: When to Use the Synthetic Antioxidants". **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, p. 11, 2013.

POROJAN M. D. et al. Combined Glutathione S Transferase M1/T1 Null Genotypes Is Associated With Type 2 Diabetes. **Clujul Medical**, V. 88, n. 2, 2015.

QIU, L., NA, R., XU, R. et al. Quantitative assessment of the effect of KCNJ11 gene polymorphism on the risk of type 2 diabetes. **PLoS One**, v. 9, p. 1–9, 2014.

RAMPRASATH, T. et al. Potential risk modifications of GSTT1, GSTM1 and GSTP1 (glutathione-S-transferases) variants and their association to CAD in patients with type-2 diabetes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 407, n. 1, p. 49-53, 2011.

RAZA, S., ABBAS, S. et. al. Association of Glutathione-S-Transferase (*GSTM1* and *GSTT1*) and FTO Gene Polymorphisms with Type 2 Diabetes Mellitus Cases in Northern India. **Balkan Journal of Medical Genetic**, v. 17, n. 1, p. 47 – 54, 2014.

REIS, A. A. S. et. al. The Implications of Genetic Polymorphism of Gst Gene in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus, **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 9, n. 2, p. 92-100, 2011.

REIS, A. F.; VELHO, G. Bases Genéticas do Diabetes Mellitus Tipo 2. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 46, n. 4, 2002.

REN, W. B, FAN, Z. L et al. Study on the genetic polymorphisms of human GSTT1 and GSTM1 in healthy population of HeBei province. **Journal of Brain and Nervous Diseases**. v.2, 2009.

ROCHA, F. D. et al. Diabetes mellitus e estresse oxidativo: produtos naturais como alvo de novos modelos terapêuticos. **Ver Bras Farm**, v. 87, n. 2, p. 49-54, 2006

RODRIGUES, D. A. **Análise do Polimorfismo do Gene GSTM1 em Pacientes com Aterosclerose**. 2016. 66 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Goiânia, 2016.

ROSEN, E. D. E., SPIEGELMAN, B. M. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 847-853, 2006.

ROSSINI, A. et al. 2002. Frequencies of *GSTM1*, *GSTT1*, and *GSTP1* polymorphisms in a Brazilian population. **Genetics and Molecular Research**. v.1, n. 3, p. 233-240, 2002.

ROTH, M. J. et al. Association between GSTM1*0 and squamous dysplasia of the esophagus in the high risk region of Linxian, China. **Cancer Lett.** v. 156, p. 73-81, 2000.

SÁ, R. A. et. al. Human glutathione S-transferase polymorphisms associated with prostate cancer in the Brazilian population. **Int Braz J Urol**, v. 40, p. 463 – 473, 2014.

SBD SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **O tabagismo aumenta o risco de diabetes?**. Disponível em: <http://www.diabetes.org.br/publico/colunistas/20-dr-augusto-pimazoni-netto/614-o-tabagismo-aumenta-o-risco-de-diabetes>. Acesso em: 08. abr 2017.

SCOTT, L. J., MOHLKE, K. L., BONNYCASTLE, L. L., ET AL. A Genome-Wide Association Study of Type 2 Diabetes in Finns Detects Multiple Susceptibility Variants. **Science**, v. 316, n. 5829, p. 1341-1345, 2007.

SILVA, T. A., VASCONCELOS, S. M. L. O Controle da Glicemia como um fator atenuante do estresse oxidativos da hipertensão arterial. **Rev. Bras Hipertens**, v. 18, n. 3, p. 113-115, 2011.

SINHA, H. DABLA, P. K. Oxidative stress and antioxidants in hypertension-a current review. **Curr Hypertens Rev.** v. 11, n. 2, p. 132-142, 2015;

SINGH, V. P., BALI, A., SINGH, N., JAGGI, A. S. Advanced Glycation End Products and Diabetic Complications. **Korean J Physiol Pharmacol**, v. 18, n. 1, p. 1–14, 2014.

SONG, Z. et. al. Association of glutathione S-transferase T1, M1, and P1 polymorphisms in the breast cancer risk: a meta-analysis. **Ther Clin Risk Manag**, v. 12, n.12, p. 763 – 769, 2016.

STEIN, S. A. et al. Genetic Counseling for Diabetes Mellitus. **Current Genetic Medicine Reports.** v. 2, n. 2, p. 56-67, 2014.

STOIAN, A. et al. Influence of GSTM1, GSTT1, and GSTP1 Polymorphisms on Type 2 Diabetes Mellitus and Diabetic Sensorimotor Peripheral Neuropathy Risk. **Disease Markers**, v.2015, 2015.

TANGVARASITTICHAJ, S. Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. **World Journal of Diabetes.** v. 6, n. 3, p. 456-480, 2015

TEIXEIRA, R, L, F. et. al. **Tuberculosis - Current Issues in Diagnosis and Management**, Dr. Bassam Mahboub. Ed. InTech, 2013.

TORRES, L. H. L. **Efeitos da Inalação da Fumaça do Cigarro no Estresse Oxidativo do Sistema Nervoso Central de Camundongos Jovens.** 2009. 120p. Dissertação (Mestrado em Análises clínicas e toxicológicas) – Universidade de São Paulo. São Paulo, 2009.

VALENTE, M. A. S. et al. Nutrigenômica/nutrigenética na elucidação das doenças crônicas. **HU Revista**, v. 40, n. 3, p. 239-248, 2014.

VIEIRA, K. L. D. et al . Atendimento da população masculina em unidade básica saúde da família: motivos para a (não) procura. **Esc. Anna Nery**, v. 17, n. 1, p. 120-127, Mar, 2013.

WANG, G., ZHANG, L. L. Q. Genetic polymorphisms of GSTT1, GSTM1, and NQO1 genes and diabetes mellitus risk in Chinese population. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 341, p. 310 - 313, 2006.

WHO WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Diabetes**. Disponível em: <http://www.who.int/diabetes/en/>. Acesso em: 29. out 2016.

WHO WORLD HEALTH ORGANIZATION. **factsheets**. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>. Acesso em: 29. out 2015.

WOLFS, M. G. et al. Type 2 Diabetes Mellitus: New Genetic Insights will Lead to New Therapeutics. **Current Genomics**, v.10, n. 2, p. 110–118, 2009.

YALIN, S. et. al. Glutathione S-transferase gene polymorphisms in Turkish patients with diabetes mellitus. **Cell Biochem Funct**. v. 25, p. 509-13, 2007.

YANG, Y.; KAO, M.T.; CHANG, C.C.; et al. Glutathione S-transferase T1 deletion is a risk factor for developing end stage renal disease in diabetic patients. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 14, p. 855-859, 2004.

YATES, K., KHUNTI, K., Epidemiology: The diabetes mellitus tsunami: worse than the 'Spanish flu' pandemic?. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 12, p. 377–378, 2016.

ZEGGINI, E. et al. Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes. **Science**, v. 316, p. 1336–1341, 2007.

ZHANG, J., LIU, H. et. al. Null genotypes of GSTM1 and GSTT1 contribute to increased risk of diabetes mellitus: a meta-analysis. **Gene**, v. 518, p. 405 – 411, 2013.

ZHENG, T. et al. Cigarette smoking, glutathione-S-transferase M1 and T1 genetic polymorphisms and breast cancer risk (United States). **Cancer Causes Control**, v. 13, p. 637- 645, 2002.

ZIMMET, P., ALBERTIK. G. M. M., SHAW, J. Review article Global and societal implications of the diabetes epidemic. **Nature**, v. 414, p. 782 - 787, 2001.

ANEXO I



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudos genéticos em pacientes diabéticos no Estado do Piauí

Pesquisador: France Keiko Nascimento Yoshioka

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 3

CAAE: 17931913.5.0000.5214

Instituição Proponente: Universidade Federal do Piauí - UFPI

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 853.547

Data da Relatoria: 26/11/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma pesquisa com metodologia de biologia molecular em pacientes diabéticos tipo 2 na população piauiense e o estudo aqui proposto visa avaliar a associação entre polimorfismos de risco genético associados a Diabetes Mellitus tipo 2 na cidade de Parnaíba-PI.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Analisar, por meio de estudos caso-controle, a associação de vários polimorfismos genéticos com a Diabetes Mellitus do tipo 2, no Estado do Piauí.

Objetivo Secundário: Avaliar a associação entre os polimorfismos rs1801282 e rs3856806 do gene PPAR γ em indivíduos diabéticos e em não-diabéticos; Avaliar a associação entre os polimorfismos rs4402960 e rs1470579 do gene IGF2BP2 em indivíduos diabéticos e em não-diabéticos; Avaliar a associação entre o polimorfismo rs5219 do gene KCNJ11 e o rs757110 do gene ABCC8 em indivíduos diabéticos e em não-diabéticos; Avaliar a associação entre o polimorfismo rs1111875 do gene HHEX em indivíduos diabéticos e em não-diabéticos; Avaliar a associação entre o polimorfismo rs13266634 do gene SLC30A8 em indivíduos

diabéticos e em não-diabéticos Avaliar a associação entre o polimorfismo rs9939609 do gene FTO em indivíduos diabéticos e em não-diabéticos; Comparar os genótipos entre as populações caso e controle, na intenção de identificar associações destes genótipos na suscetibilidade a Diabetes

Endereço: Campus Universitário Ministro Petronio Portella - Pró-Reitoria de Pesquisa
Bairro: Ininga **CEP:** 64.049-550
UF: PI **Município:** TERESINA
Telefone: (86)3237-2332 **Fax:** (86)3237-2332 **E-mail:** cep.ufpi@ufpi.edu.br



Continuação do Parecer: 853.547

Mellitus tipo 2; Comparar os genótipos obtidos na população de pacientes com variáveis como idade, IMC, perfil lipídico (colesterol total, HDL e Triglicerídeos), hemoglobina glicada, tratamento medicamentoso, atividade física, hipertensão arterial, uso do tabaco, álcool e insulina, na intenção de identificar associações com essas variáveis; Traçar o perfil epidemiológico dos diabéticos do município de Parnaíba-PI, gerando informações para profissionais e gestores das secretarias municipais, estaduais e Ministério da Saúde, bem como identificar os possíveis fatores intervenientes relacionados à Diabetes Mellitus tipo 2.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O projeto aqui proposto se baseia em procedimentos experimentais bem estabelecidos e, uma vez que os pesquisadores envolvidos dominam as técnicas descritas na metodologia, não se espera maiores dificuldades no cumprimento das ações laboratoriais planejadas. O número amostral total de 400 indivíduos, caso-controle, pode fazer com que as coletas se estendam mais que o previsto. Mas, precavendo-se contra esta ocorrência, já

temos o consentimento da secretaria de saúde do município para adentrarmos em todos os programas de saúde da família do município, com o auxílio dos agentes de saúde. Por fim, nosso Grupo realizará reuniões científicas quinzenais que, a partir da aprovação desta proposta, serão utilizadas para avaliação do desenvolvimento do projeto em questão, visando o diagnóstico e intervenção precoces das deficiências instaladas.

Benefícios:

A Diabetes Mellitus é hoje uma epidemia mundial, tornando-se um grande desafio para a saúde pública no mundo. O aumento exponencial da população idosa, urbanização crescente, modificações dos hábitos e estilos de vida pouco saudáveis como sedentarismo, dieta inadequada e obesidade, são os grandes responsáveis pelo aumento da incidência e prevalência da diabetes no mundo. As consequências da diabetes tipo 2

(DT2) são devastadoras, com problemas graves de saúde, social e econômico, além disso as taxas de mortalidade mundial é de 9%. Indivíduos idosos e diabéticos têm taxas mais elevadas de morte prematura, além disso a prevalência de diabetes é influenciada pela idade, acometendo 1,7% dos indivíduos entre 30 e 39 anos de idade; 3,9% entre 40 e 49.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo se propõe a avaliar a associação entre polimorfismos de risco genético associados a Diabetes Mellitus tipo 2 no Estado do Piauí. Para isso serão recrutados 400 diabéticos

Endereço: Campus Universitário Ministro Petronio Portella - Pró-Reitoria de Pesquisa
 Bairro: Ininga CEP: 64.049-550
 UF: PI Município: TERESINA
 Telefone: (86)3237-2332 Fax: (86)3237-2332 E-mail: cep.ufpi@ufpi.edu.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PIAÚÍ - UFPI



Continuação do Parecer: 853.547

diagnosticados com DT2, segundo os critérios da OMS e 400 indivíduos não diabéticos (controle). De ambos os grupos, serão coletados sangue periférico para a extração do DNA e dados laboratoriais (HbA1c, glicemia em jejum, colesterol HDL, colesterol total e triglicerídeos), bem como o grau de obesidade, dado pelo índice de massa corpórea (IMC, a frequência de atividade física realizada rotineiramente (classificado em quatro níveis: 1- sedentário, 2- atividade leve, 3- atividade moderada e 4- atividade intensa), presença de hábitos como tabagismo, consumo de álcool, além disso a presença de comorbidades como diabetes e hipertensão, de cada participante do estudo. Os polimorfismos serão amplificados e genotipados pela técnica PCR-RFLP e estatisticamente analisados quanto ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, quiquadrado e teste exato de Fisher, por meio do programa Bioestat, sob significância de $p < 0,05$. As análises de desequilíbrio de ligação, as frequências haplotípicas e a correção para múltiplos testes por 1.000 permutações aleatórias serão obtidas por meio do programa Haploview 4.2. Diante disso, espera-se identificar polimorfismos associadas à DT2 e que estejam em desequilíbrio de ligação com outro polimorfismo associado com a doença na população mundial, na tentativa de identificar marcadores que possam ser utilizados no diagnóstico precoce e prognóstico em uma população piauiense acometida por essa síndrome.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram apresentados.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sanadas as pendências o projeto encontra-se apto para aprovação.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Sr.(a) Pesquisador(a),

em cumprimento ao previsto na Resolução 466/12, o CEP-UFPI aguarda o envio dos relatórios parciais e final da pesquisa, elaborados pelo pesquisador, bem como informações sobre sua eventual interrupção e sobre ocorrência de eventos adversos.

Ainda, para assegurar o direito do participante e preservar o pesquisador, revela-se importante

Endereço: Campus Universitário Ministro Petronio Portella - Pró-Reitoria de Pesquisa
Bairro: Ininga CEP: 64.049-550
UF: PI Município: TERESINA
Telefone: (86)3237-2332 Fax: (86)3237-2332 E-mail: cep.ufpi@ufpi.edu.br



Continuação do Parecer: 853.547

alertar que o TCLE e o Termo de Assentimento deverão ser rubricados em todas as suas folhas, tanto pelo participante quanto pelo(s) pesquisador(es), devendo ser assinados na última folha.

TERESINA, 31 de Outubro de 2014

Assinado por:
Adrianna de Alencar Setubal Santos
(Coordenador)

Endereço: Campus Universitário Ministro Petronio Portella - Pró-Reitoria de Pesquisa
Bairro: Ininga **CEP:** 64.040-550
UF: PI **Município:** TERESINA
Telefone: (86)3237-2332 **Fax:** (86)3237-2332 **E-mail:** cep.ufpi@ufpi.edu.br

APÊNDICE I



Ministério da Educação
Universidade Federal do Piauí – UFPI
Campus Ministro Reis Velloso

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título do projeto:

Estudos genéticos em pacientes portadores do Diabetes *Mellitus* do Tipo 2 em uma população piauiense.

Pesquisadora responsável:

Profª Drª France Keiko Nascimento Yoshioka
Universidade Federal do Piauí – *Campus* Ministro Reis Velloso
Av. São Sebastião, 2819 – CEP 64204-035
Telefones: (86) 3323-5297/ 98826-1104

Esclarecimentos

Diabetes Mellitus é considerada uma das principais síndromes heterogênea de evolução crônica que acometem o homem moderno em qualquer idade, condição social e localização geográfica, e o diabetes do tipo 2 (DM2) é a principal exteriorização desta síndrome, constituindo mais de 90% dos casos.

O estudo aqui proposto visa analisar variações polimórficas de genes sabidamente associados ao DM2, na tentativa de identificar marcadores que possam ser utilizados no diagnóstico precoce e prognóstico em uma população fortemente acometida por essa síndrome, a população piauiense.

Para os exames genéticos será necessária uma amostra de 4mL de sangue periférico, obtida com uma seringa e agulha descartáveis. A coleta será realizada por um profissional capacitado, contudo o risco da coleta ser difícil é previsto, seja pela veia ser de difícil acesso ou por ser de pequeno calibre. Além da coleta de sangue, o indivíduo terá seus dados e algumas informações clínicas colhidas em uma ficha cadastral. Qualquer voluntário estará suscetível aos seguintes riscos: dificuldade na coleta de sangue e constrangimento ao responder algumas perguntas da ficha cadastral. Esses inconvenientes serão minimizados pela desistência em participar do estudo e garantia de atendimento médico e psicológico, caso haja algum dano a sua integridade física e mental.

Os resultados desse estudo serão úteis para avaliarmos quais condições relacionadas ao DM2 são encontradas na população do Piauí. Por se tratar de um estudo populacional, não há benefício direto para o participante. Somente no final do estudo poderemos concluir se a presença de alguma variação em determinado gene possa ter alguma influência no desenvolvimento do diabetes.

Você terá a garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida relativa aos procedimentos, riscos, benefícios e de outras situações relacionadas com a pesquisa, com os responsáveis pela pesquisa.

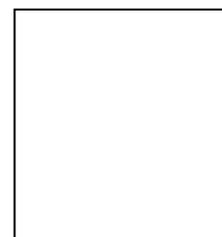
Se você concordar em participar do estudo, seu nome e identidade serão mantidos em sigilo. A menos que requerido por lei ou por sua solicitação, somente o pesquisador, a equipe do estudo, representantes do Comitê de Ética terão acesso a suas informações para verificar as informações do estudo. A realização desse projeto não terá custos e ficará garantida a manutenção de sigilo, por parte dos pesquisadores, sobre a identificação dos voluntários que decidirem colaborar com esse projeto de pesquisa.

Consentimento da participação da pessoa como voluntário

Eu, _____, CPF nº, _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo “Estudos genéticos em pacientes portadores do Diabetes Mellitus do Tipo 2 em uma população piauiense, como sujeito. Fui esclarecido sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Entendi todas as explicações que me foram fornecidas de forma clara e simples, inclusive permitindo que eu realizasse todas as perguntas e fizesse todas as observações que eu achei pertinentes para entender o que ocorrerá comigo neste estudo, não me ficando dúvidas sobre os procedimentos a que serei submetido. Ficaram claros para mim quais os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

Parnaíba (PI), _____ / _____ / _____

Assinatura do voluntário ou responsável



Impressão digital

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste sujeito de pesquisa ou representante legal para a participação neste estudo.

Parnaíba, _____ / _____ / _____

Profª Drª France Keiko Nascimento Yoshioka
Pesquisadora responsável

APENDICE II

FORMULÁRIO DE COLETA DE DADOS

1. Nome do pesquisador

--

2. Data e hora do preenchimento

Data:	Hora:
-------	-------

3. Dados do voluntário

Nome:	
Data de nascimento:	Local de nascimento:
Endereço:	
Telefone:	

4. Gênero

Masculino	
Feminino	

5. Data de nascimento

--	--	--

6. Estatura (cm)

--

7. Peso (Kg)

--

8. IMC

--

9. Circunferência abdominal (cm)

--

10. Cor (autodeclaração)

Branco	
Negro	
Pardo	
Amarelo	

11. Faz uso de alguma Estatina (medicação para colesterol)

Sim		Não	
-----	--	-----	--

12. Se sim, qual a dose?

13. Medida da Pressão arterial (mmHg)

14. É hipertenso?

Sim		Não	
-----	--	-----	--

15. Há quanto tempo é hipertenso?

16. Qual medicamento utiliza para o controle da pressão arterial?

17. Histórico de problemas vasculares? Relato de angina (dor no peito) ou infarto agudo do miocárdio?

18. Possui doença renal (Nefropatia)? Alguma queixa ou diagnóstico de doença renal?

19. Possui problemas visuais (Retinopatia)? Foi diagnosticado com glaucoma, catarata ou algum outro distúrbio visual?

20. Possui problemas neurais (Neuropatia)? Relato de redução da sensibilidade superficial, sensação de formigamento, alguma dormência, dor ou cansaço nos pés ou pernas?

21. Há quanto tempo é portador de Diabetes:

22. Qual medicação é utilizada para o diabetes (controle glicêmico) e a dose?

23. Utiliza insulina? Quantas unidades/dia?

Sim		Não	
-----	--	-----	--

24. É fumante? (Opcional)

Sim		Não	
-----	--	-----	--

25. É dependente de bebida alcoólica? (Opcional)

Sim		Não	
-----	--	-----	--

26. Dados bioquímicos atuais

Colesterol total (mg/dL)	
HDL (mg/dL)	
LDL (mg/dL)	
VLDL (mg/dL)	
Triglicerídeos (mg/dL)	
Glicemia em jejum (mg/dL)	
Hemoglobina glicada (%)	
Creatinina	
Ureia	