Avaliação dos níveis da citocina pró-inflamatória Fator de Necrose Tumoral-α em pacientes com diabetes tipo 2 e sua relação com variações genéticas de enzimas antioxidantes e obesidade

Evaluation of Proinflammatory Cytokine Tumor Necrosis Factor-α in Obese vs Non-obese Patients with Diabetes Type 2 and its relationship to CAT-C262T genetic variation

Natália Marrane Delucca[1], Mariana Farias Rodrigues[1], Daniel Cláudio de Oliveira Gomes[2], Caio Loureiro Salgado[2], Melissa de Freitas Cordeiro-Silva[1].

1. **Centro Universitário Salesiano (UNISALES), Vitória/ES, Brasil.**
2. **Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Vitória/ES, Brasil**

RESUMO

Introdução: Diabetes tipo 2 (DM2) é um distúrbio multifatorial caracterizado pelo aumento de estresse oxidativo. Tanto o estresse oxidativo quanto a obesidade contribuem para um estado inflamatório da doença, principalmente pelo aumento da citocina TNF-a. Sabendo-se que a genética individual pode contribuir para o estresse oxidativo, o estudo avaliou o impacto das variações genéticas de enzimas antioxidantes C262T no gene CAT e polimorfismos nulos dos genes GSTM1 e GSTT1 nos níveis de TNF-α em diabéticos tipo 2, assim como, avaliou se as variantes genéticas atuariam sinergicamente com a obesidade aumentando os níveis da citocina em pacientes diabéticos da Grande Vitória/ES, Brasil.

Métodos: O polimorfismo no gene CAT foi avaliado pela técnica PCR/RFLP e nos genes GSTM1 e GSTT1 por PCR multiplex, em 56 pacientes, sendo 28 obesos e 28 não obesos. Níveis de TNF-α foram medidos pela técnica de ELISA sanduíche.

Resultados: Na análise sobre a contribuição de genótipos polimórficos para o aumento dos níveis de TNF-α, sem considerar a presença ou não de obesidade, não observou-se associação, assim como, não foi demonstrado um aumento significante da citocina plasmática quando avaliado o sinergismo entre a obesidade e a genética individual do paciente para os polimorfismos das enzimas antioxidantes avaliadas.

Conclusão: Níveis de TNF-α não se elevam em diabéticos tipo 2 na presença dos

polimorfismos nos genes CAT, GSTM1 e GSTT1, e a obesidade não atua no aumento dessa citocina na população estudada, separadamente ou em conjunto com a genética individual de variantes nos genes CAT, GSTM1 e GSTT1.

Palavras-Chave: Diabetes; Estresse Oxidativo; Obesidade; Catalase; Glutathione S-Transferase M1; Glutathione S-Transferase T1; Citocina; Fator de Necrose Tumoral Alpha.

ABSTRACT

Introduction: Type 2 diabetes (DM2) is a multifactorial disorder due to increased oxidative stress. Both oxidative stress and obesity contribute to an inflammatory state of the disease, mainly by increasing the cytokine TNF-α. As individual genetics can contribute to oxidative stress, the study assessed the impact of genetic variations of antioxidant enzymes C262T CAT, GSTM1 and GSTT1 gene polymorphisms and levels of TNF-α in type 2 diabetics, as well as, evaluated whether the genetic variants would act synergistically with obesity increasing the levels of cytokine in diabetic patients from Grande Vitória / ES, Brazil.

Methods: The CAT gene polymorphism was evaluated by the PCR / RFLP technique and GSTM1 and GSTT1 polymorphism by multiplex PCR, in 56 patients, 28 obese and 28 non-obese. TNF-α levels were measured using the sandwich ELISA technique.

Results: Analysis of the contribution of polymorphic genotypes to the increase of TNF-α levels, without considering the presence or not of obesity, no association was observed, as well, a significant increase in plasma cytokine was not demonstrated when evaluating the synergism between obesity and patient's individual genetics for the polymorphisms of the antioxidant enzymes evaluated.

Conclusion: TNF-α levels do not increase in type 2 diabetics in the presence of CAT, GSTM1 and GSTT1 genes polymorphisms, and obesity does not act to increase TNF-α levels in the studied population, either separately or together with individual genetics of CAT, GSTM1 and GSTT1 polymorphisms.

Keywords: Diabetes; Oxidative Stress; Obesity; Catalase; Glutathione S-Transferase M1; Glutathione S-Transferase T1; Citokyne; Tumor Necrosis Factor Alpha.

INTRODUÇÃO

O Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) é uma afecção multifatorial relacionada a fatores genéticos e ambientais, caracterizada por uma produção insuficiente de insulina ou resistência a ação desse hormônio, 90 a 95% dos casos de diabetes no mundo corresponde ao tipo 2 da doença[1], sendo que no Brasil a prevalência abrange 7,5% da população[2], e no Espírito Santo acomete aproximadamente 10% da população[3].

O estresse oxidativo compreende um importante fenômeno para a manifestação e prognóstico da DM2 caracterizado por um estado de desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a sua remoção através da defesa antioxidante, seja ela endógena ou exógena[4]. Esse estado disfuncional interfere na homeostase, ativando vias de sinalizações pró-inflamatórias que promovem um quadro de disfunção de células beta-pancreáticas e hiperglicemia, além de elevar o risco vascular [5].

O Fator de Necrose Tumoral alpha (TNF-α) é uma das principais citocinas que promovem a inflamação no corpo humano, e está fortemente envolvida no desenvolvimento da resistência insulínica e patogênese da DM2. Essa citocina tem uma relação direta com a obesidade, já que TNF-α assim como outras adipocinas são liberadas pelo tecido adiposo caracterizando a obesidade como uma doença inflamatória[6]. A elevação do nível de massa gorda e, consequentemente de TNF-α, pode acarretar o estado de resistência insulínica mediada por inflamação levando a hiperglicemia[7].

Com isso torna-se evidente que a obesidade associada ao estresse oxidativo acentua o desenvolvimento do quadro inflamatório[8], contribuindo para o surgimento da DM2 e de suas complicações, principalmente os problemas cardiovasculares, que são responsáveis por 75% de óbitos dos pacientes portadores do DM2[9].

Polimorfismos em genes antioxidantes podem contribuir para a patogênese e avanço da DM2 por aumentar o estresse oxidativo, uma vez que essas variações podem afetar as atividades catalíticas dessas enzimas que atuariam bloqueando o efeito danoso dos radicais livres[10]. As Glutationas S-transferases (GSTs) são enzimas metabólicas responsáveis pela detoxificação de produtos endógenos e exógenos. Dois genes pertencentes à família das GSTs, o GSTM1 e o GSTT1, apresentam polimorfismos de deleção sendo que pessoas homozigotas para o polimorfismo (genótipo nulo) tanto no gene GSTM1 quanto no gene GSTT1 não possuem a respectiva enzima funcional[11-12]**.** A catalase também é uma enzima antioxidante que atua

catalisando a decomposição de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio e também na oxidação de compostos hidrogenados[13]. O polimorfismo C262T no gene Catalase (CAT) tem sido associado com baixa atividade enzimática e aumento nos níveis de radicais livres[14]**.** A disfunção, ausência ou diminuição de enzimas antioxidantes podem ser responsáveis pelo estresse oxidativo, sendo assim, mutações nos genes codificadores poderiam atuar como fator prognóstico da DM2 por contribuir com o aumento do estresse oxidativo e, consequentemente, com a ação inflamatória e risco vascular[10].

O presente estudo teve o propósito de avaliar se polimorfismos em genes antioxidantes (GSTM1, GSTT1 e CAT) influenciam no aumento dos níveis de TNF-α em diabéticos tipo 2 residentes na Grande Vitória/ES. Também investigou se a obesidade associada a genótipos polimórficos atua sinergicamente aumentando os níveis de TNF-α plasmáticos na DM2.

MÉTODOS

GRUPO AMOSTRAL

O estudo incluiu indivíduos diagnosticados com Diabetes tipo 2 obesos e não obesos, atendidos entre março de 2017 a setembro de 2019, na Associação de Diabéticos de Vila Velha/ES, no Centro Integrado de Atenção à Saúde da Católica (CIASC) e na Unidade de Saúde Dr Bolivar de Abreu, Forte São João, Vitória/ES, Brasil.

O grupo foi composto por 56 pacientes, sendo 28 obesos e 28 não obesos, classificados de acordo com o Índice de Massa Corporal (Kg/m^2). Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Universitário Salesiano – UniSales, sob o número do parecer: 2.353.462. Todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

ANÁLISE MOLECULAR

Após a coleta de sangue periférico, o plasma foi removido do tubo contendo ativador de coágulo, transferido para tubo criogênico e armazenado em freezer -80°C para análise imunológica. A extração de DNA, para a análise genética, foi realizada a partir de 1ml do sangue coletado em tubo EDTA. O DNA foi extraído de leucócitos do sangue periférico. A extração do DNA foi realizada pelo método orgânico utilizando-se Fenol/Clorofórmio. Os polimorfismos dos genes GSTM1 e GSTT1 foram investigados através da técnica de PCR multiplex como descrito por Bid e colaboradores (2010)[15], utilizando um fragmento de 340pb do

gene CYP1A1 como controle interno de amplificação. O polimorfismo no gene CAT foi detectado pela técnica de PCR-RFLP como descrito por Suzen e colaboradores (2010)[16]. As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), a enzima de restrição utilizada na técnica PCR-RFLP e o tamanho dos produtos obtidos encontram-se na Tabela 1.

Os fragmentos obtidos foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 2%.

ANÁLISE IMUNOLÓGICA

Dosagem de TNF-α

A análise imunológica foi realizada em parceria com o departamento de Imunologia e Patologia da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). As dosagens de TNF-α foram realizadas pela técnica de ELISA sanduíche, utilizando pares de anticorpos monoclonais de captura e de revelação biotinilados da eBioscience®, seguindo a recomendação do fabricante. Em síntese, placas de 96 poços de alta absorção (Costar®) foram sensibilizadas com o anticorpo de captura (18 horas/25°C). Posteriormente, as placas foram lavadas com PBS/Tween 20 (0,05%) e as amostras de plasma foram adicionadas a elas e incubadas por 2 horas/25°C. As placas foram lavadas novamente e incubadas com o anticorpo biotinilado por 1 hora/25°C. As placas foram lavadas, seguido de adição e incubação com estreptoavidina marcada com peroxidase (eBioscience®) por 30 min/25°C. As amostras se revelaram com adição de solução tampão citrato de fosfato com 5% de ABTS e 0,005% de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 30 vol e a reação interrompida com dodecil sulfato de sódio (Gibco®) 1%. A absorbância foi determinada sob comprimento de onda de 405 nm. (SpectraMax, Molecular Devices).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

As comparações das variáveis contínuas entre os grupos foram realizadas por meio do teste de Wilcoxon-Mann-Whitney. As comparações entre os grupos em variáveis categóricas foram realizadas utilizando o teste exato de Fisher ou o teste do qui-quadrado. Foi considerado significante P-valor <0.05.

RESULTADOS

Análise genética

As análises imunológicas e genéticas foram realizadas em amostras de 58 indivíduos diabéticos tipo 2 da população da Grande Vitória/ES, sendo 28 obesos e 28 não obesos. Os grupos não foram diferentes (p>0,05) em relação ao gênero e idades.

Em relação ao polimorfismo do gene GSTM1 as frequências do genótipo selvagem (GSTM1+) e genótipo nulo (GSTM1-) no grupo amostral foram de 55.4 e 44.6%, respectivamente. Já as frequências do genótipo selvagem (GSTT1+) e genótipo nulo (GSTT1-) para o gene GSTT1 foram de 82.1 e 17.9%, respectivamente. Em relação ao polimorfismo C262T no gene CAT a frequência do genótipo homozigoto normal (CC) foi de 73.2%, o heterozigoto (CT) foi de 25% e o homozigoto polimórfico (TT) de 1.8%. As frequências alélicas do polimorfismo C262T-CAT no grupo amostral foram de 85.7% para o alelo normal (C) e 14.3% para o alelo variante (T). Não houve diferenças significativas das frequências genotípicas e alélicas no grupo

Análise imunológica

Não se observou diferenças estatisticamente significantes entre os níveis de TNF-α plasmático dos pacientes de acordo com seus genótipos, tanto quando analisados separadamente quanto quando analisados em combinado, como mostrado nas Tabelas 3 e 4 (genótipos combinados que não constam na tabela 4 não foram avaliados por não apresentarmos quantidade mínima para análise estatística).

Na avaliação da influência da obesidade nos níveis da citocina, não se observou diferença entre os níveis de TNF-α nos grupos de pacientes obesos e não obesos tanto na análise separada quanto na análise incluindo a mesma constituição genética entre os grupos (Tabela 5).

A tabela 6 mostra a avaliação do papel dos polimorfismos juntamente com a obesidade nos níveis de TNF-α em diabéticos tipo 2, demonstrando que não houve relação entre esses parâmetros (p>0.05).

DISCUSSÃO

A doença DM2 é acompanhada por um aumento do estresse oxidativo, que é considerado um mecanismo subjacente para inflamação e disfunção endotelial[17]. Espécies reativas de Oxigênio (EROs) induzem a ativação de algumas vias moleculares importantes como a de produção de produtos finais da glicação avançada (AGEs [do inglês, Advanced Glycation

End-products]). Um dos mecanismos de ação dos AGEs é a modificação de proteínas ou lipídeos sanguíneos que se ligam a receptores específicos levando a produção de citocinas inflamatórias que contribuem com as complicações vasculares da doença[18].

Um dos fatores responsáveis pelo estresse oxidativo é a genética individual. Variações em genes codificadores de enzimas antioxidantes podem acarretar em defesa antioxidante prejudicada aumentando o estresse oxidativo. Estudos mostram que os níveis de atividade de enzimas antioxidantes estão diminuídos em diabéticos tipo 2 comparados a indivíduos saudáveis[19].

O presente estudo investigou se o polimorfismo C262T no gene CAT e os polimorfismos de deleção dos genes GSTM1 e GSTT1 poderiam estar relacionados com o aumento de TNF-α, uma vez que a deficiência das atividades enzimáticas causadas pelas variações genéticas poderia contribuir para o estresse oxidativo induzindo a produção de citocinas inflamatórias crônica nos pacientes. Entretanto, nosso estudo não observou tal relação (Tabelas 3 e 4). Esse foi o primeiro estudo que avaliou variações genéticas antioxidantes e níveis de citocinas TNF-α em diabéticos tipo 2.

Assim como o aumento nos níveis de TNF-α já foi observado na DM2[20], também já foram relatados em indivíduos obesos[21-22]. O presente estudo avaliou o papel da obesidade na quantidade de TNF-α em diabéticos. A análise ocorreu de forma geral (sem ponderar o genótipo do paciente) e também considerando a genética individual, excluindo a possibilidade de variações nos níveis devido ao genótipo do indivíduo e não somente pela obesidade, entretanto não observamos diferença entre os grupos (Tabela 5). Rajkovic e colaboradores (2014) [23] observaram altos níveis de TNF-α em diabéticos obesos, sobrepesos e também em magros embora tenha observado que os níveis nos obesos e sobrepesos eram mais altos em comparação com os pacientes magros. O mesmo estudo também mostrou que diabéticos magros possuíam níveis mais elevados em relação aos magros sem diabetes, corroborando a relação entre diabetes e citocina TNF-α, independente de obesidade**.** Nilson (1998)[24] também relatou altas concentrações de TNF-α em diabéticos tipo 2 obesos e magros. Em 2012, Olson e colaboradores[25]confirmaram que o aumento de TNF-α na DM2 foi associado à resistência insulínica independentemente da adiposidade. Entretanto alguns estudos apontam um aumento significante dos níveis TNF-α em pacientes obesos, mas não em magros[26].

Polimorfismos em genes codificadores de enzimas antioxidantes podem levar a um aumento dos níveis de radicais livres uma vez que as variações genéticas podem diminuir a atividade da enzima ou até mesmo impedir a sua produção. A enzima catalase catalisa a decomposição do peróxido de Hidrogênio em água e oxigênio e a deficiência dessa enzima já foi associada à DM2[27-28]. O polimorfismo funcional 262C/T no éxon 9 do gene CAT já foi associado ao desenvolvimento de DM2 e suas complicações[29-30]. A Gluationa S-transferase (GST) é uma família de genes responsáveis pela remoção de produtos reativos ao oxigênio e de xenobióticos capazes de trazer toxidade ao organismo. Os genes GSTM1 e GSTT1 fazem parte dessa família e quando encontrados sobre polimorfismo de deleção, são associados a disfunção das células B-pancreáticas e deficiência na produção de insulina[31].

O estresse oxidativo está envolvido nos processos patológicos de doenças como a obesidade e DM2[32], estudos mostram que a obesidade, assim como alterações genéticas de enzimas antioxidantes podem aumentar os níveis de radicais livres[33,] contribuindo para um aumento dos níveis inflamatórios[34] que poderiam aumentar o risco de eventos vasculares, entretanto, o presente estudo não revelou associação sinérgica entre as variações dos genes CAT, GSTM1 e GSTT1 e obesidade nos níveis da citocina pró-inflamatória no grupo estudado (Tabela 6).

Concluímos que os polimorfismos C262T no gene Catalase e os genótipos nulos nos genes GSTM1 e GSTT1 não influenciam no aumento dos níveis da citocina pró inflamatória TNF-α em diabéticos tipo 2 residentes na Grande Vitória, e que a obesidade não atua sinergicamente com a genética antioxidante individual no aumento dos níveis da citocina pró-inflamatória em diabéticos tipo 2 do grupo amostral avaliado.

REFÊRENCIAS

1. São Paulo. Sociedade Brasileira de Diabetes. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes. In: São Paulo. Organização José Egídio Paulo de Oliveira, Renan Magalhães Montenegro Junior, Sérgio Vencio. São Paulo; 2017. Disponível em: https://www.diabetes.org.br/profissionais/images/2017/diretrizes/diretrizes-sbd-2017-2018.pdf
2. Flor LS, Campos MR. Prevalência de diabetes mellitus e fatores associados na população adulta brasileira: evidências de um inquérito de base populacional. Revista Brasileira de Epidemiologia. 2017; 20; 16-29. PubMed PMID: 28513791
3. VIGITEL B. Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. SVS/Ministério da Saúde e NUPENS/Universidade de São Paulo. Brasília: Ministério da Saúde, 2015.

4. Fridlyand LE, Philipson LH. Oxidative reactive species in cell injury: Mechanism in diabetes mellitus and therapeutic approaches. Annals of the New York Academy of Sciences. 2006; 1066: 136-151. PubMed PMID: 16533924.
5. Giacco, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. Circ Res. 2010 October 29; 107(9): 1058–1070. PubMed PMID: 21030723.
6. Souza CT, & do Nascimento AE. Exercícios físicos de resistência, hipertrofia e força muscular reduzem igualmente adiposidade, inflamação e resistência à insulina em camundongos obesos por dieta hiperlipídica. 2019.
7. Silveira AC, Garcez MG. Prevenção da obesidade e de doenças do adulto na infância. Editora Vozes Limitada. 2017. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo; 2017.
8. Duncan BB, Duncan MS, Schmidt MI. Inflamação subclínica, obesidade, diabetes e doenças relacionadas. Revista HCPA. 2005; 25(3): 5-16.
9. Azevedo S, Victor EG, Oliveira DC. Diabetes mellitus e aterosclerose: noções básicas da fisiopatologia para o clínico geral. Rev Bras Clin Med. 2010; 8(6): 520-6.
10. Berra CM, Menck CF, Di Mascio P. Oxidative stress, genome lesions and signaling pathways in cell cycle control. Quimica Nova. 2006; 29(6): 1340-1344.
11. Mo Z, Gao Y, Cao Y, Gao F, Jian L. An updating metaanalysis of the GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphisms and prostate cancer: a HuGE review Prostate. 2009; 69(6): 662–688. PubMed PMID: 19143011
12. Rafiee L, Saadat I, & Saadat M. Polimorfismos genéticos da glutationa S-transferase (GSTM1, GSTT1 e GSTO2) em três populações iranianas. Molecular biology reports. 2010; 37 (1), 155-158.
13. Glorieux C, Calderon PB. Catalase, uma enzima notável: visando a enzima antioxidante mais antiga para encontrar uma nova abordagem de tratamento do câncer. Biological chemistry. 2017; 398 (10): 1095-1108.
14. Minghua J, Tang J, Zhao J, Xu B, Qin J, Lu J. Polymorphisms in genes involved in drug detoxification and clinical outcomes of anthracycline-based neoadjuvant chemotherapy in Chinese Han breast cancer patients. Cancer Biology and Therapy. 2012; 13(5): 264–271. PubMed PMID: 22310978
15. Bid HK, Konwar R, Saxena M, Chaudhari P, Agrawal CG, Banerjee M. Association of glutathione S-transferase (GSTM1, T1 and P1) gene polymorphisms with type 2 diabetes mellitus in north Indian population. J Postgrad Med. 2010;56: 176–181. PubMed PMID: 20739761
16. Suzen S, Gucyener E, Sakalli O, et al. CAT C-262T and GPX1 Pro198Leu polymorphisms in a Turkish population. Mol Biol Rep. 2010; 37(1):87–92. PubMed PMID:19424819.
17. Golbidi S, Ebadi SA, Laher I. Antioxidants in the treatment of diabetes. Curr Diabetes Rev. 2011 Mar; 7(2): 106-25. PubMed PMID: 21294707.
18. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications. A unifying mecanism. Diabetes. 2005; 54(6): 1615-25. PubMed PMID:15919781.
19. Verma S, Sagar N, Vats P, Shukla KN, Abbas M, Banerjee M. Antioxidant enzyme levels as markers for type 2 diabetes mellitus. Int. J. Bioassays. 2013; 2: 685–690.

20. Calles-Escandon J, Cipolla M. Diabetes and endothelial dysfunction: a clinical perspective. Endocr Rev 2001; 2: 36–52. PubMed PMID:11159815.
21. Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. J Clin Invest. 2005 May; 115(5): 1111-9. PubMed PMID: 15864338.
22. Dandona P, Weinstock R, Thusu K, Abdel-Rahman E, Aljada A, Wadden T. Tumor Necrosis Factor-Alpha in Sera of Obese Patients: Fall With Weight Loss. J Clin Endocrinol Metab. 1998; 83(8): 2907-10. PubMed PMID: 9709967.
23. Rajkovic N, Zamaklar M, Lalic K, et al. Relationship between obesity, adipocytokines and inflammatory markers in type 2 diabetes: Relevance for cardiovascular risk prevention. Int J Environ Res Public Health. 2014; 1: 4049–65. PubMed PMID: 24736687.
24. Nilsson J, Jovinge S, Niemann A, Reneland R, Lithell H. Relationship between plasma tumor necrosis factor α and insulin sensitivity in elderly men with non-insulin-dependent diabetes mellitus. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 1998; 18: 1199–1202.
25. Olson CN, Callas WP, Hanley AJG, et al. Circulating levels od TNF are associated with impaired glucose tolerance, icreased insulin reistance, and ethinicity: The insulin resistance atherosclerosis study. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2012; 97: 1032–1040. PubMed PMID: 22238388.
26. Katsuki A, Sumida Y, Murashima S, et al. Serum levels of tumor necrosis factor-α are increased in obese patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. J. Clin. Endocrinol. Metab. 1998; 83: 859–862. PubMed PMID: 9506740.
27. 27.Goth L, Lenkey A, Bigler WN. Blood catalase deficiency and diabetes in Hungary. Diabetes Care. 2001; 24: 1839–1840. PubMed PMID: 11574451.
28. Goth L. Catalase deficiency and type 2 diabetes. Diabetes Care. 2008; 24: 93. PubMed PMID: 19033415.
29. Dos Santos KG, Canani LH, Gross JL, Tschiedel B, Souto KE, Roisenberg I. The catalase −262C/T promoter polymorphism and diabetic complications in Caucasians with type 2 diabetes. Dis. Markers. 2006; 22: 355–359. PubMed PMID: 17264407.
30. Tarnai I, Csordas M, Sukei E, Shemirani AH, Kalpar M, Goth L. Effect of C111T polymorphism in exon 9 of the catalasegene on blood catalase activity in different types of diabetes mellitus. Free Radic. Res. 2007; 41: 806–811. PubMed PMID: 17577741.
31. da Silva Pinheiro D, Rocha Filho CR, Mundim CA, Ulhoa CJ, Ghendini P, & Reis S. Avaliação do Polimorfismo de Deleção de GSTM1 na Susceptibilidade ao Diabetes Mellitus Tipo 2. Revista EVS-Revista de Ciências Ambientais e Saúde. 2012; 39(3): 331-336.
32. Rodrigues MS, Pieri BL, Silveira GB, et al. Redução do estresse oxidativo melhora a sinalização da insulina em tecido cardíaco de camundongos obesos. Einstein. São Paulo. 2020;18. PubMed PMID: 32215468.
33. Chielle EO, Fortuna PC, & Maziero JS. Association between the glutathione S-transferase P1 (GSTP1) Ile105Val gene polymorphism in obese and overweight patients over 60 years. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial. 2016; 52(4): 211-216.

34. Gaspar, Diana IM. Caracterização de fatores de risco para a doença cardiovascular, em pré-diabéticos e diabéticos, numa amostra populacional da Cova da Beira. Dissertação. Universidade da Beira Interior. 2013.

Tabela 1 – Sequências dos *primers*, enzima de restrição e tamanhos dos produtos obtidos.

GENE	*PRIMER* 5' - 3'	ENZIMA DE RESTRIÇÃO	PRODUTO GERADO (pb)
GSTM1	F: GAACTCCCTGA AAAGCTAAAGC R: GTTGGGCTCAAAT ATACGGTGG	N.A.	215pb
GSTT1	F: TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC R: TCACCGGATCATGGCCAGCA	N.A.	480pb
CYP1A1	F: TAGGAGTCTTGTCTCATGCCT R: CAGTGAAGAGGTGTAGCCGCT	N.A.	340pb
CAT	F: AGAGCCTCGCCCCGCCGGACCG R: TAAGAGCTGAGAAAGCATAGCT	SmaI	Alelo normal: 155pb e 30pb Alelo variante: 185pb

N.A.: Não se aplica; pb: pares de bases

Tabela 2 – Distribuição genotípica e alélica no grupo amostral dos polimorfismos genéticos.

Genótipos	Total		*P - Value*
	N.	(%)	
GSTM1			
GSTM1 selvagem	31	(55.4)	0.5913
GSTM1 nulo	25	(44.6)	
GSTT1			
GSTT1 selvagem	46	(82.1)	>0,9999
GSTT1 nulo	10	(17.9)	
CAT C>T			
CC	41	(73.2)	0.5992
CT	14	(25)	
TT	1	(1.8)	
CC	41	(73.2)	>0,9999
CT+TT	15	(26.8)	
ALELO (CAT C262T)			
C	96	(85.70)	0.7880
T	16	(14.3)	

Tabela 3 – Níveis de TNF-α (apresentados como médias em unidades pg/mL) de acordo com os genótipos, separadamente.

Genótipos	CAT	GSTM1	GSTT1
Selvagem	0,09237	0,09031	0,09959
Variante	0,1109*	0,1006	0,06866

P-Value	0,4493	0,8476	0,3223

*: Genótipo variante CAT = CT + TT

Tabela 4 – Níveis de TNF-α (apresentados como médias em unidades pg/mL) de acordo com os genótipos combinados.

Genótipo Selvagem	**TNF-α**	***Genótipo Variante***	**TNF-α**	***P- Value***
M1+/T1+/CC	0,09856	M1+/T1+/CT	0,113	0,4325
M1+/T1+/CC	0,09856	M1-/T1+/CC	0,0965	0,7207
M1+/T1+/CC	0,09856	M1-/T1+/CT	0,08825	0,6868
M1+/T1+/CC	0,09856	M1/T1+/TT+/CT	0,1109	0,2929
M1+/T1+/CC	0,09856	M1+/T1-/CC	0,07794	0,9368
M1+/T1+/CC	0,09856	M1+/T1-/CT	0,04804	0,3794
M1+/T1+/CC	0,09856	M1-/T1-/CC	0,03876	0,2538
M1+/T1+/CC	0,09856	M1-/T1-/CT	0,1419	0,2767
M1+/T1+/CC	0,09856	UMA VARIANTE	0,0965	0,5674
M1+/T1+/CC	0,09856	DUAS VARIANTES	0,06557	0,4275
M1+/T1+/CC	0,09856	TRÊS VARIANTES	0,1419	0,2767

Tabela 5 – Níveis de TNF-α em pacientes obesos e não obesos de acordo com seus genótipos

Genótipos	**Obesos**		**Não obesos**		***P-Value***
	N.	**(TNF-α)**	**N.**	**(TNF-α)**	
Todos	28	0,08309	28	0,1192	0,4712
GSTM1 +	14	0,08928	14	0,1192	0,8833
GSTM1 -	14	0,06557	11	0,1192	0,3948
GSTT1+	23	0,09031	23	0,1192	0,8319
GSTT1-	5	0,01814	5	0,1212	0,1667
CAT CC	20	0,08928	21	0,1047	0,7715
CAT CT	7	0,06557	7	0,1212	0,1282
M1+/T1+/CC	8	0,09443	13	0,1047	0,7100

M1+/T1+/CT	4	0,07588	2	0,1718	0,5333
M1-/T1+/CC	8	0,07897	6	0,1181	0,7816
M1-/T1+/CT	2	0,03876	2	0,1151	0,3333

Tabela 6 - Níveis de TNF-α em pacientes obesos de acordo com seus genótipos

Genótipo Selvagem	**TNF-α**	***Genótipo Variante***	**TNF-α**	***P- Value***
GSTM1+	0,08928	GSTM1-	0,06557	0,8653
GSTT1+	0,09031	GSTT1-	0,01814	0,1103
CC	0,08928	CT + TT	0,07175	0,8911
M1+/T1+/CC	0,09443	M1+/T1+/CT	0,07588	0,7152
M1+/T1+/CC	0,09443	M1-/T1+/CC	0,07897	0,8561
M1+/T1+/CC	0,09443	M1-/T1+/CT/TT	0,06557	0,7758
M1+/T1+/CC	0,09443	M1-/T1-/CC	0,01814	0,3758