



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Faculdade de Ciências da Saúde

Estudo da Associação dos Polimorfismos da GSTT1 e GSTM1 *null* em Nadadores de Elite Portugueses

Ana Filipa Rebordão dos Santos Dias

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutora Luiza Augusta Tereza Gil Breitenfeld Granadeiro
Co-orientador: Prof. Doutor Aldo Matos Costa

Covilhã, Outubro de 2011

Agradecimentos

Os meus agradecimentos dirigem-se a todas as pessoas que ao longo de todo o meu percurso académico, marcaram a minha vida, e se tornaram parte dela, dando-me todo o seu amor, apoio, compreensão, amizade. E por esta razão deixo aqui o meu muito obrigada. Agradeço especialmente,

aos meus orientadores, Professora Doutora Luiza Granadeiro e o Professor Doutor Aldo Costa, pela confiança que depositaram em mim, pelo tempo e paciência que me dedicaram, e pelo carinho com que sempre me trataram;

à Dra. Ana Ramalinho, especialmente pela amizade, paciência, carinho, disponibilidade, que sempre teve comigo;

aos meus colegas do laboratório do CICS, que sempre estiveram muito disponíveis para colaborar, encorajar, e me ajudaram a passar as inúmeras horas aqui vividas: Eduarda, uma amiga que me integrou muito bem no CICS, e que muitas e muitas vezes me aturou naqueles momentos de desespero que nos assombram a todos. Ao Márcio Rodrigues por ter tido paciência em me ouvir a falar horas sem parar; à Ana Rebelo, colega de trabalho e de Mestrado por todo o seu companheirismo e amizade; Ana Arquilino, Joana, e Márcio Geraldês, pessoas que ajudaram a tornar aquele laboratório muito mais animado;

ao Luís Parreira, à Ana Paula Pereira e ao Carlos Costa, por sempre se mostrarem muito disponíveis para colaborar com o ajuste dos horários no meu local de trabalho;

à Inês Farinha, Tânia e João, amigos de sempre, por toda a sua amizade, paciência, disponibilidade, e por me terem acompanhado sempre em todos os momentos da minha vida;

aos meus pais, avós e tias, pessoas que sempre me apoiaram, e fizeram de mim tudo o que sou hoje. Marcaram a minha vida de forma crucial e ajudando-me a tornar este dia possível.

Resumo

As S-Transferases da Glutathione (GST) são uma superfamília de enzimas multifuncionais ubiquitárias, que participam na destoxicação celular, na protecção das macromoléculas do ataque dos electrólitos reactivos, incluindo as espécies reactivas de oxigénio (ROS) e de agentes quimioterápicos.

De entre os mecanismos antioxidantes existentes no organismo, a GST é a enzima intracelular mais abundante, com múltiplas funções como agente anti-oxidante.

Neste estudo, analisou-se a associação dos polimorfismos da GSTT1 e GSTM1 null nas diferentes especialidades, num grupo de Nadadores de alta competição.

Para a realização deste trabalho, usou-se como população de estudo um grupo de Nadadores de Elite Portugueses, contendo 33 atletas de elite, dos quais 20 são do sexo masculino e 13 do sexo feminino. E um grupo controlo constituído por 52 indivíduos, representativos da população em geral. Este grupo é constituído por 38 indivíduos do género masculino e por 14 do género feminino.

O ADN genómico foi extraído de amostras de sangue, recolhido por punção capilar, e colocada num pedaço de papel de filtro, e a determinação genómica foi realizada por PCR. A análise estatística foi feita com base em *Odds ratios* (ORs) estimados com intervalos de confiança de 95%.

Pela análise por género conclui-se que a presença da proteína GSTT1 parece ser fundamental para todos os atletas independentemente do género.

Os resultados sugerem que a existência da proteína GSTT1 nos dímeros que integra, parece conferir propriedades específicas e vantajosas para as especialidades da natação.

Palavras-chave

GSTT1, GSTM1, Stress Oxidativo, ROS

Abstract

Glutathione S-Transferases are a superfamily of ubiquitous multifactorial enzymes, which play a key role in cellular detoxification, protecting macromolecules from attack by reactive electrophiles, including reactive oxygen species (ROS) and chemotherapeutic agents. GSTs are the most abundant intracellular enzymes, and have multiple roles as anti-oxidant enzymes. In this study, we analyzed the association of the GSTM1 and GSTT1 *null* polymorphisms, in a group of competitive swimmers of different specialities. We undertook a case-control study in a group of Portuguese competitive swimmers that included 33 athletes, 20 were male and 13 female. The control group had 52 individuals, 38 males and 14 female. Genomic DNA was extracted from blood samples, and genotyping analyses were performed by PCR methods. *Odds ratios* (ORs) and 95% confidence intervals were calculated using SPSS. We found that the presence of GSTT1 protein seems to be important for all athletes and is independent of their gender. The results suggest that the presence of GSTT1 protein in the dimmers that it can integrate seems to confer specific and advantageous characteristics in swimming specialities.

Keywords

GSTT1, GSTM1, Oxidative Stress, ROS

Índice

1.Introdução	1
1.1. Glutathione S-Transferase	1
1.1.1. Mecanismo de acção	1
1.1.2. Classificação das GSTs	2
1.1.3. Dímerização	3
1.1.4. Funções das GSTs	4
1.1.5. Distribuição e função fisiológica	4
1.1.6. Localização cromossómica - genótipos GSTM1 e GSTT1	6
1.1.7. Polimorfismos estudados	8
1.2. GST e o exercício físico	9
1.2.1. Stress oxidativo	9
1.2.2. Os factores que influenciam o desempenho dos atletas na nataçã desportiva	10
1.2.3. As GSTs e o Stress oxidativo	11
2. Objectivo Geral	12

2.1. Objectivos Especificos	12
3.Materiais e Métodos	13
3.1. População em estudo	13
3.2 . Lista de Reagentes	14
3.2.1. Lista de reagentes necessários para a extracção	14
3.2.2. Lista de reagentes necessários para a amplificação	14
3.2.3. Lista de reagentes necessários para electroforese em gel de agarose	14
3.3. Extracção de ADN	15
3.4. Amplificação de ADN das amostras por PCR - multiplex	15
3.5 - Determinação dos Genotipos	20
3.6 - Análise estatística	20
4.Resultados	21
4.1. Análise da comparação do grupo de nadadores de elite com o grupo controlo	22
5.Discussão e Conclusão	28
6.Bibliografia	30

Lista de Figuras

Figura 1- As GSTs catalizam a conjugação da glutathione (GSH), através do grupo sulfidril localizado no seu centro electrolíticos. (adaptado do artigo 3)	1
Figura 2 - Monómero da enzima Wild-type GST. Esta figura representa a subunidade 1 (branco) e a subunidade 2 (azul). O local de ligação H (verde) e o local G (vermelho) da subunidade 1. Resíduos da subunidade 2 ligados ao local G da subunidade 1 (laranja). (adaptado do artigo 6)	3
Figura 3 - Organização cromossómica dos genes da GSTM1 (adaptado do artigo 2)	6
Figura 4 - Organização cromossómica dos genes da GSTT1 (adaptado do artigo 2)	7
Figura 5 - Dupla cadeia de ADN (adaptado do artigo 26)	16
Figura 6 - Hibridação das cadeias de ADN (adaptado do artigo 26)	16
Figura 7 - Processo da extensão do ADN (adaptado do artigo 26)	17
Figura 8 - Produto final da PCR. (adaptado do artigo 26)	17
Figura 9 - Genótipos possíveis dos polimorfismos GSTM1 e GSTT1.	21

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Constituição da mistura para a amplificação, para cada um dos genes	18
Tabela 2: Programação do termociclador para a amplificação destes dois genes	19
Tabela 3 - distribuição dos genótipos da GSTM1 para casos e controlos	22
Tabela 4 - distribuição dos genótipos da GSTT1 para casos e controlos	22
Tabela 5 - distribuição das frequências dos genótipos da GSTM1 e da GSTT1, em casos e controlos	23
Tabela 6 - distribuição dos genótipos da GSTM1 para os 200m e controlos	23
Tabela 7 - distribuição dos genótipos da GSTM1 para os 400-1500m e controlos	24
Tabela 8 - distribuição dos genótipos da GSTT1 para os 200m e controlos	24
Tabela 9 - distribuição dos genótipos da GSTT1 para os 400-1500m e controlos	24
Tabela 10 - distribuição das frequências dos genótipos da GSTM1 e da GSTT1, na classe dos 200m e no grupo controlo	25
Tabela 11 - distribuição das frequências dos genótipos da GSTM1 e da GSTT1, na classe dos 400-1500m e no grupo controlo	25
Tabela 12 - distribuição dos genótipos da GSTM1 para casos (200m) e controlos nos diferentes géneros	26
Tabela 13 - distribuição dos genótipos da GSTM1 para casos (400-1500m) e controlos nos diferentes géneros	26
Tabela 14 - distribuição dos genótipos da GSTM1 para casos (200m) e controlos nos diferentes géneros	27
Tabela 15 - distribuição dos genótipos da GSTM1 para casos (400-1500m) e controlos nos diferentes géneros	27

Lista de Acrónimos

GST	Glutathiona S-transferase
GSTT1	Glutathiona S-transferase T1
GSTM1	Glutathiona S-transferase M1
ADN	Ácido desoxidoribonucleico
ROS	Espécies Reactivas de Oxigénio
GHS	Glutathiona reduzida
pb	Pares de bases
kb	Kilo - bases
DDCT	D-dopacrómio tautomerase
NP	Natação pura
m	metros
°C	Graus <i>Celsius</i>
dNTP	Desoxidonucleotidico trifosfato
PCR	Reacção em cadeia da Polimerase
Taq	Polimerase de ADN recombinante do organismo <i>Thermus acquaticus</i>
UV	Ultra violeta

1.Introdução

1.1. Glutathione S-Transferase

As S-Transferases da Glutathione (GST) são uma superfamília de enzimas multifuncionais ubíquias, que participam na detoxificação celular, na protecção das macromoléculas do ataque dos electrólitos reactivos, incluindo as espécies reactivas de oxigénio (ROS) e de agentes quimioterápicos.

1.1.1. Mecanismo de acção

As GSTs catalisam a conjugação do tripéptido glutathione (GSH), composto por aminoácidos de glutamina, cisteína e glicina, com uma ampla variedade de moléculas endógenas e exógenas que apresentam na sua estrutura grupos electrolíticos funcionais.

Esta reacção permite assim, a conversão destes produtos em produtos mais hidrossolúveis o que facilita a sua excreção e minimiza os seus efeitos tóxicos (figura 1) (1,2,3, 4, 5,6).

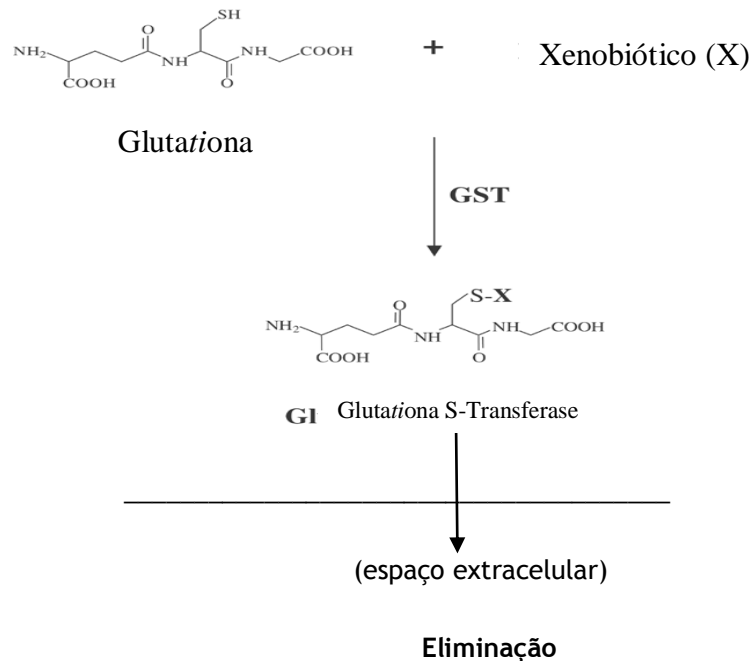


Figura 1: As GSTs catalisam a conjugação da glutathione (GSH), através do grupo sulfidril localizado no seu centro electrolíticos. (adaptado do artigo 20)

A glutathione (GSH) é um antioxidante hidrossolúvel, reconhecido como o tiol não proteico mais importante nos sistemas vivos. Tal como já foi referido trata-se de um tripéptido linear, constituído por três aminoácidos: ácido glutâmico, cisteína e glicina, sendo o grupo tiol da cisteína o local activo responsável pelas suas propriedades bioquímicas. Existe, na maioria das células estando, geralmente, em maior quantidade no fígado.

A glutathione é sintetizada no fígado em dois passos, catalisados pela γ -glutamyl-cisteina-sintetase e pela glutathione-sintetase. A GSH é distribuída, através da circulação sanguínea, para todos os tecidos. A degradação da GSH nos seus aminoácidos ocorre ao nível extracelular e, especialmente, ao nível renal, numa reacção catalisada pela γ -glutamyltranspeptidase e pela cisteinil-glicina-dipeptidase.

Os Xenobióticos são compostos químicos estranhos ao organismo ou ao sistema biológico. O termo é também aplicado a substâncias endógenas manipuladas, presentes em concentrações muito mais elevadas que o nível normal. São considerados xenobióticos os fármacos, aditivos alimentares, agentes poluentes como pesticidas, entres outros.

A GSH vai reagir com os xenobióticos, para formar compostos menos tóxicos e mais solúveis (6).

O efeito das GSTs depende assim, de uma combinação de acções com a glutamato cisteína ligase e a GSH sintetase, e por outro lado, das acções dos transportadores para remover os conjugados das GSH da célula.

A glutathione está também envolvida no metabolismo do ácido ascórbico, na manutenção da comunicação entre as células, na prevenção da oxidação dos grupos tiol presentes nas proteínas e no transporte do cobre intracelular e de produtos resultantes do metabolismo celular. A mitocôndria e o núcleo têm a sua própria reserva de GSH, de importância crucial na protecção destas estruturas contra a acção das espécies reactivas de oxigénio.

1.1.2. Classificação das GSTs

As GSTs podem ser classificadas segundo dois critérios, em relação à sua localização celular, e baseada na sequência homóloga e reactividade imunológica (5).

Em relação à localização celular podemos considerar que nos Seres Humanos, a superfamília das GSTs, subdivide-se em três grandes famílias de proteínas, denominadas de citosólicas ou solúveis, mitocondriais e as GSTs microsossomais (5).

As duas primeiras compreendem enzimas solúveis, enquanto que as do tipo microsossomal se encontram associadas à membrana. As GSTs microsossomais geralmente estão envolvidas no

metabolismo dos eicosanóides e da glutathione (GSH) e por esta razão são designadas pela sigla MAPEG (*membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism*) (5).

Em relação à sua sequência homóloga e reactividade imunológica, as GSTs citosólicas humanas foram agrupadas em sete famílias, designadas por GST α (A), μ (M), π (P), σ (S), θ (T), ω (O) e ζ (Z). As GSTs presumivelmente surgiram de um ancestral comum e a sua especificidade ao substrato e a sua diversidade têm sido objecto de estudo através da existência da duplicação dos genes, da recombinação génica, e de uma acumulação de mutações (2).

1.1.3. Dimerização

As GSTs são proteínas que formam homodímeros ou heterodímeros, e cada monómero está ligado a locais específicos para determinado substrato, locais esses que são o local G, de ligação para a glutathione (GSH), e o local H um local electrofilico e hidrofóbico (figura 2) (6).

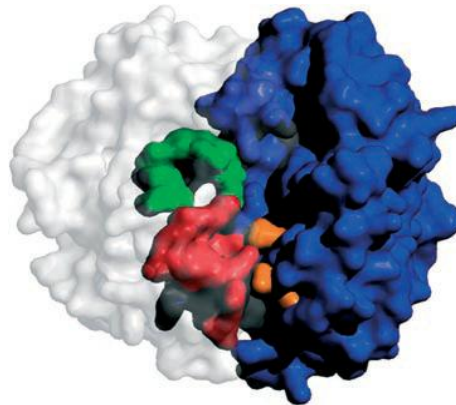


Figure 2 - . Monómero da enzima Wild-type GST. Esta figura representa a subunidade 1 (branco) e a subunidade 2 (azul). O local de ligação H (verde) e o local G (vermelho) da subunidade 1. Resíduos da subunidade 2 ligado ao local G da subunidade 1 (laranja) (adaptado do artigo 6).

O local G só está completo depois da dimerização, porque está localizado numa fenda entre o domínio N-terminal de uma subunidade e o domínio C-terminal de outra. Esta característica está presente em todas as classes da GST e mostra uma alta especificidade para a GSH (6).

Todas as espécies eucarióticas, possuem múltiplas isoenzimas da S-Transferase da Glutathione, contudo, existem diferenças relativamente aos níveis de expressão e na sua distribuição nos tecidos, o que vai influenciar a formação de heterodímeros. No fígado a GSTM1, encontra-se expressa, e verifica-se neste órgão a formação de heterodímeros entre a classe GSTM1, e outra classe como por exemplo a GSTT1 (7).

No músculo esquelético encontram-se quatro isoenzimas da GST, três das quais são da class M. As enzimas GSTM1 no músculo esquelético são constituídas por três subunidades distintas, N1, N2 e N3. Estas subunidades podem hibridar e formar heterodímeros, que são compostos quaternários, N1N2, N2N2 e N2N3.

Estes heterodímeros possuem diferentes actividades catalíticas, contudo sabe-se que o heterodímero N1N2 é o que possui maior actividade de entre todos os outros (8).

Ainda não se tem conhecimento da forma como se dá a formação de heterodímeros entre duas classes diferentes da S-Transferase da Glutathione, o que se sabe é que existe uma grande afinidade para diferentes classes se unirem e formarem um heterodímero (7).

1.1.4. Funções da GST

De entre os mecanismos antioxidantes existentes, a GST é a enzima intracelular mais abundante, com múltiplas funções como agente anti-oxidante. A glutathione reduzida (GSH) actua para eliminar as ROS e é responsável pela regeneração de outros anti-oxidantes.

A capacidade das células para manter os níveis de GSH é muito importante para manter a integridade e a função celular. Além disso, a GSH é um cofactor essencial para enzimas como a S-Transferase da Glutathione (9,10).

As GSTs estão associadas à regulação da inflamação através da modulação da sinalização das prostaglandinas e stress oxidativo, e através da regulação da fisiologia normal da célula (10).

1.1.5. Distribuição e Função Fisiológica

As GSTs, como já foi referido anteriormente, são um conjunto de enzimas ubiquoteiras, mas nem todas as suas subclasses, se encontram distribuídas uniformemente por todos os tecidos. Sabe-se que a GSTM1 e a GSTT1, se encontram expressas no fígado, enquanto que outras classes nem se expressam neste órgão (7).

Muitos autores associam estes dois polimorfismos da GST, como sendo um dos responsáveis pelo desenvolvimento de vários tumores, por se encontrarem expressos pulmão, pescoço, cabeça, mama, bexiga, fígado, rins, estômago, ovário, músculo esquelético, coração, veias, artérias e próstata. (1,7,8,9,11,20)

O pulmão, por exemplo, possui um conjunto de enzimas que são responsáveis pela defesa contra agentes anti-oxidantes, onde se incluem as GSTs. Esta enzima, no pulmão é responsável pela citoproteção, resultante dos produtos do stress oxidativo.

A GSTM1 encontra-se expressa no pulmão, estando esta envolvida na patogénese da asma, na defesa contra o stress oxidativo e no metabolismo dos xenobioticos. As deleções do gene GSTM1, o genótipo null, estão geralmente descritas como sendo responsáveis pelo aumento do risco de asma e a perda de função do pulmão.(9)

O risco do desenvolvimento de asma está relacionado com o genótipo null para a GSTM1, uma vez que os xenobióticos podem provocar a desgranulação dos eosinófilos e dos mastócitos, originando a formação de substâncias que vão provocar inflamação dos brônquios. As GSTs vão actuar nos brônquios transformando estes compostos em substâncias mais solúveis e ajudando na sua eliminação. O que permite afirmar que indivíduos com menos capacidade de detoxicação dos indutores da inflamação brônquica se encontram mais predispostos a desenvolver asma (12).

O GSTM1, cataliza a conjugação nucleofílica da glutatona a moléculas químicas, tanto endógenas como exógenas com grupos electrolíticos funcionais, como por exemplo os compostos poliaromáticos, que são responsáveis pela formação de aductos poliaromáticos que se encontram nas células mamárias.(1)

O gene GSTT1 tem a função de detoxificar pequenos hidrocarbonetos reactivos, como compostos activados de aminas heterocíclicas formadas a partir de carne cozinhada a altas temperaturas.

Para além dos substratos da GSTT1 acima referidos, destacam-se os carcinogénios ambientais encontrados na comida, ar ou medicamentos, como os PAHs, existentes nos produtos de combustão, dieta e fumo do tabaco (2,20).

1.1.6. Localização cromossómica - genótipos GSTM1 e GSTT1

A superfamília μ (M) encontra-se no cromossoma 1p13.3, cujo arranjo é 5' - GSTM4-GSTM2-GSTM1-GSTM5-GSTM3-3', como o esquematizado na figura 3.

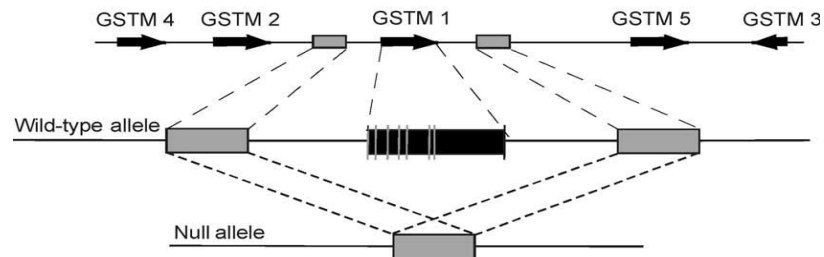


Figura 3- Organização cromossómica dos genes da GSTM1 (adaptado do artigo 2)

A deleção deste gene geralmente afecta ambos os alelos, resultando no genótipo null para a GSTM1, o que origina uma ausência total do produto funcional do gene, e respectivamente da sua actividade enzimática (1,20).

O gene GSTM1 faz parte do cluster classe μ do gene GST. O gene GSTM1, representado com a caixa negra, consiste em 8 exões, os quais têm entre 36 a 112 pb, enquanto que os intrões variam entre 87 a 2641 pb. O GSTM1 está “encaixado” numa região com extensas homologies e está flanqueado por 2 regiões idênticas com 4,2 Kb (caixas cinzentas). O alelo null da GSTM1 surge de uma recombinação homóloga de repetições de ambos os lados, as quais resultam numa deleção de 16 Kb contendo o gene GSTM1 completo (2).

Analisando o cluster do gene GSTM1, verifica-se que está flanqueado por duas regiões idênticas de 4,2 Kb (2).

A superfamília θ consiste em 2 genes, o GSTT1 e o GSTT2, que estão localizados no cromossoma 22q11.2, e separados por cerca de 50 Kb (figura 4).

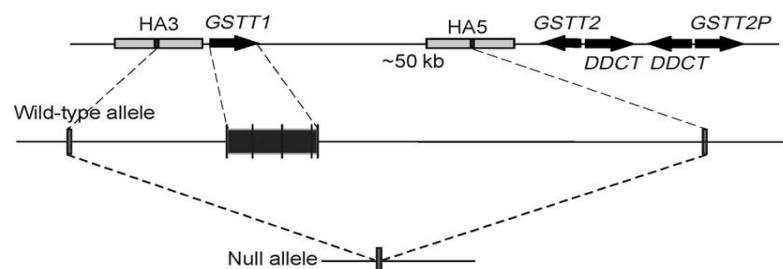


Figura 4- Organização cromossômica dos genes da GSTT1 (adaptado do artigo 2)

O gene GSTT1 faz parte do cluster classe Θ do gene GST. O gene GSTT1 e o GSTT2 estão separados por aproximadamente 50 Kb. O GSTT2 permanecer lado a lado com um gene a codificar o D - dopacrómio tautomerase (DDCT). O GSTT2 e os genes DDCT estando duplicados numa repetição invertida. O GSTT1 duplicado é um pseudogene (denominado por GSTT2P) devido a um processo de splicing anormal do exão/intrão 2, causando uma translação stop prematura. O gene GSTT1 (caixa preta) consiste em 5 exões que variam entre 205 a 2363 pb. O gene GSTT1 está encaixado numa região com extensas homologias e flanqueado por 2 regiões de 18 Kb. O alelo *null* da GSTT1 surge duma recombinação homóloga de repetições de ambos os lados de 403 pb, as quais resultam numa deleção de 54 Kb contendo o gene GSTT1 completo. O ponto da deleção não pode ser localizado precisamente devido à identidade da sequência entre as repetições de 403 pb (2).

Os genes GSTM1 e GSTT1 são os mais estudados dos sete genes desta família, devido à sua condição especial: a maioria dos polimorfismos de genes envolvidos no metabolismo de carcinogénios são SNPs (single nucleotide polimorfisms), sendo as deleções menos comuns e a deleção completa de um gene é rara. A deleção completa de um gene envolve a não codificação da respectiva proteína o que, no caso destes genes, pode estar associado à diminuição da capacidade de metabolização de carcinogénios e outros xenobióticos. (1,20)

A grande questão que surge é se uma actividade enzimática normal ou um aumento, pode proteger os tecidos mais susceptíveis de mutações somáticas do ADN, através da metabolização de carcinogénios electrofilicos. Ou em contraste, se deleções homólogas dos genes GSTM1 e GSTT1 vão diminuir a capacidade para eliminar metabolicamente compostos e, portanto, expor os indivíduos portadores de GSTM1 e GSTT1 *null* (-/-) a um aumento de risco de cancro, ou outras situações desfavoráveis para o individuo (1,2,11,13,20).

1.1.7. Polimorfismos estudados

Possivelmente os genótipos isoladamente ou em combinação, podem identificar sujeitos que têm défice na capacidade de protecção contra agentes tóxicos, e que por esta razão estão mais sujeitos a lesões no ADN, conferindo maior susceptibilidade a doenças genéticas, como por exemplo tumores e em situações que provocam o stress oxidativo.

A deleção do gene *GSTM1* afecta frequentemente ambos os alelos originando um genótipo *null*. Estudos verificaram que cerca de 53% da população Caucasiana tem genótipo *null* para a *GSTM1*(8,20), e é similar na população Asiática. Na população árabe o genótipo *null* para a *GSTM1* é de 56%, na população negra 46.7%, já na população Latino-Americana a percentagem de indivíduos com genótipo *null* é de cerca de 43%.

As altas frequências de genótipo *null* para a *GSTM1*, têm sido referidas em estudos feitos entre indivíduos do Pacífico Sul que têm uma origem negra em comum. Esta situação pode dever-se ao facto destas populações terem estado isoladas durante um longo período de tempo sob o efeito da endogamia e da força genética (20).

Cerca de 20% da população Caucasiana apresenta genótipo *null* para o gene *GSTT1*.(8,20) Este genótipo é mais frequente na população Asiática, 47 a 64%.

Genótipo *GSTT1 null*, apresenta uma distribuição semelhante entre as populações Árabe e Africana.

Em relação à frequência destes dois genótipos *null* presentes no mesmo indivíduo, a percentagem de Caucasianos com genótipos *GSTT1* e *GSTM1 null* é de 13.8%, na população Asiática é de 29%, 17% na população árabe, e 19% na população negra, o que confere um aumento no risco de desenvolvimento de diversas patologias, nomeadamente o cancro.

Estudos efectuados na população chinesa demonstram uma função protectora do genótipo *wild-type* do gene *GSTT1* em relação à diabetes mellitus. Por outro lado estudos efectuados na Turquia não conseguem relacionar o genótipo *null* para o *GSTT1* com a diabetes mellitus, mas encontraram uma relação entre o genótipo *null* para o *GSTM1* com esta doença (13).

No Chile e no Japão, estudos com o genótipo *null* para a *GSTM1*, demonstram que existe uma grande incidência deste genótipo em doentes com cancro na próstata, enquanto que em relação ao polimorfismo *null* da *GSTT1* não é possível encontrar relação com esta patologia. (11)

Um outro estudo efectuado na população Chinesa observa uma importante associação entre os níveis de stress oxidativo e a inflamação na aterosclerose, com a presença dos genótipos *GSTM1* e *GSTT1*, uma vez que estudos prévios mostraram que estes genótipos modificam o risco de aterosclerose. Isto porque, as GSTs têm a função de defender os organismos contra

agentes oxidativos, tóxicos, mutagénicos e carcinogénicos. Então estas duas classes da GST têm a função de evitar que se formem placas ateroscleróticas, uma vez que a proteína da GST vai catalizar a conjugação dos electrólitos à GSH, o que vai modular a lesão oxidativa ou a inflamação (4).

1.2. GST e o exercício físico

1.2.1. Stress oxidativo

O exercício físico conduz a um aumento do consumo de oxigénio, e por conseguinte, a produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS), e vai necessitar de recrutar os antioxidantes armazenados nos diferentes tecidos. Este aumento das ROS vai conduzir a um aumento do stress oxidativo caso o sistema antioxidante não seja capaz de equilibrar a sua acção (2,15,16,17,20).

O stress oxidativo resulta, então, de um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a capacidade do sistema antioxidante de combater os danos oxidativos.

As espécies reactivas de oxigénio, são essenciais para a sinalização normal das células, mas em altas concentrações originam modificações oxidativas nas macromoléculas causando lesões nos tecidos. Os anti-oxidantes de baixo peso molecular e as enzimas anti-oxidantes presentes nos tecidos podem limitar estas lesões colaterais, através da eliminação das ROS, o que resulta numa normalização do potencial redox.

Os aumentos transitórios das ROS pode sobrerregular as enzimas antioxidantes endógenas, mas a sua exposição regular a aumentos ligeiros nas ROS pode aumentar a capacidade do organismo para limitar as lesões oxidativas (18).

Estudos recentes têm demonstrado um aumento na formação de espécies reactivas de oxigénio após um esforço físico intenso. Esses eventos podem aumentar a susceptibilidade das células musculares a danos oxidativos como a peroxidação lipídica, ao desenvolvimento de processos inflamatórios e oxidação de proteínas, mecanismos esses que podem afectar proteínas estruturais e contrácteis, e contribuir para a diminuição da *performance* muscular.

Os programas actuais de treino alternam entre períodos de treino intenso com períodos de optimização da forma desportiva (taper), caracterizados por uma redução sistemática e progressiva da carga de treino. (46,48). Em ambos os períodos as variações no volume, na intensidade e na frequência do treino são programadas, com o intuito de otimizar o desempenho desportivo. Com efeito, em modalidades desportivas cíclicas de base aeróbia

significativa, a diminuição da funcionalidade muscular será altamente redutora para o desempenho do atleta em treino e em competição (19).

Inclui-se nesta categoria a Natação Pura Desportiva, uma modalidade desportiva individual, (apesar de existirem provas colectivas - estafetas) que integra eventos competitivos de diferentes distâncias e técnicas de nado. Esta modalidade tem como objectivo principal nadar cada distância, num determinado estilo ou estilos, no menor tempo possível, cumprindo a regulamentação vigente (20) Não obstante, a Natação pode ser considerada uma modalidade de “Resistência” devido a vários factores que a caracterizam tais como, a frequência das competições reconhecidas oficialmente, os métodos de treino implementados e as particularidades fisiológicas do nadador (20, 26).

1.2.2. Os factores que influenciam o desempenho na natação pura desportiva

A *performance* dos atletas de alto nível desportivo, geralmente depende de um fenótipo multi-factorial, influenciado por vários factores tais como físicos, biomecânicos, fisiológicos, metabólicos, psicológicos e características sociais (17).

De facto começou, por se acreditar que os altos níveis de *performance* dos atletas eram decorrentes de treinos e acompanhamento nutricional específicos, factores esses, essenciais para o desenvolvimento das características dos atletas de elite.

No entanto, os factores ambientais, por si só, mostraram-se, ao longo do tempo, insuficientes para caracterizar um fenótipo de *status* em *performance* física humana. A partir dessa constatação surgiu o interesse por um terceiro factor determinante desse complexo fenótipo para a aptidão física, isto é, a predisposição genética que, se não o mais importante, terá grandes implicações na caracterização do indivíduo como um atleta de destaque (21,22).

Diversos estudos recentes têm sido realizados no sentido de determinar os factores que mais e melhor predizem a *performance* em natação em particular. Tem-se verificado que esta está associada significativamente, quer a pressupostos bioenergéticos, quer a pressupostos biomecânicos.

Todavia, os pressupostos bioenergéticos, são dependentes do comportamento biomecânico e das “estratégias motoras” adoptadas pelo nadador. Desta forma, o perfil bioenergético deve ser entendido como elemento mediador do comportamento biomecânico (23).

As características antropométricas de cada atleta também influenciam a *performance* individual, por exemplo, o comprimento dos membros e a superfície corporal dos segmentos

corporais do nadador, revelam-se fundamentais para a maior eficácia dos movimentos propulsivos. Assim, neste exemplo, quanto maior for o comprimento dos segmentos corporais menor será o número de acções motoras necessárias para promover a mesma distância (24).

1.2.3. As GSTs e o Stress oxidativo

Os genes S-Transferase da Glutathione M1 e T1, são então os genes responsáveis pela destoxicação do organismo após o exercício físico, através da catálise das reacções de conjugação entre a GSH e compostos electrofilicos resultantes do stress oxidativo (17).

Alguns estudos demonstram mudanças nos biomarcadores de stress oxidativo causado por mudanças no volume e/ou intensidades do treino durante a temporada, e relacionam este aumento significativo com o período competitivo, comparado com a pré-temporada. Outros autores destacam ainda um significativo aumento no stress oxidativo associado à diminuição na eficiência do sistema de defesa antioxidante em períodos de alta intensidade durante a temporada.

Em contrapartida, períodos de menor intensidade de treino induziram diminuições nos parâmetros do stress oxidativo, inflamação e dano celular muscular. Esses autores ainda sugerem que marcadores do metabolismo oxidativo podem ser utilizados como parâmetros biológicos para monitorar a evolução do treino de atletas de nível competitivo.

Neste mesmo estudo os autores concluem que o treino intenso induz mudanças nos biomarcadores do stress oxidativo e nas respostas do sistema antioxidante e, em alguns casos, essas modulações são proporcionais à carga de treino e podem influenciar a *performance*.

Conclui-se ainda, neste estudo, que os antioxidantes podem desempenhar um importante papel na *performance*, pois estas substâncias funcionam como sistema de defesa do organismo atenuando as modificações oxidativas provocadas pelo treino intenso ou promovendo a reparação das lesões mais rapidamente (19).

Nas situações em que este mecanismo não funciona devidamente, em que não existe actividade das enzimas de destoxicação de fase II, ou seja, quando ocorre a deleção dos genes GSTM1 e GSTT1, vai ocorrer a retenção de produtos tóxicos no organismo, o que pode afectar não só o desempenho dos atletas, mas também a sua longevidade no desporto (22).

2. Objectivo Geral

O objectivo deste trabalho é:

- Estudo da associação dos polimorfismos da GSTT1 e GSTM1 *null* nas diferentes especialidades desportivas (eventos de curta e média/longa duração) em nadadores de elite portugueses.

2.1 - Objectivos Especificos

- Verificar as diferenças na distribuição dos genótipos da GSTM1 e da GSTT1 *null*, no grupo de nadadores de elite e comparar com um grupo representativo da população em geral, o grupo controlo;
- Analisar as diferenças existentes dentro de cada uma das especialidades desportivas dos nadadores de elite (eventos de curta e média/longa duração), relativamente à distribuição dos genótipos destes dos genes em estudo;
- E estudar a influência dos polimorfismos GSTM1 e GSTT1 *null* em cada género, para cada especialidade desportiva dos nadadores de elite.

3. Materiais e Métodos

3.1 - População em estudo

Para a realização deste estudo, usou-se como população em estudo os Nadadores de Elite Portugueses, tendo sido recrutados 33 atletas de elite, dos quais 20 são do sexo masculino e 13 do sexo feminino.

Os nadadores foram diferenciados de acordo com o género e com a sua especialidade desportiva no que se refere à distancia de prova; (i) nadadores especialistas em eventos de curta duração, inferiores a 200m; (ii) nadadores especialistas em eventos de média e longa duração - 400m a 1500m. Utilizamos como critério de inclusão dos nadadores em cada um destes grupos o evento competitivo no qual foi obtido o estatuto de alta competição, garantido pela Federação Portuguesa de Natação.

Na realidade, em eventos competitivos mais curtos (<200m) a força e a potência muscular são capacidades motoras que assumem uma maior preponderância na performance. Este grupo os atletas passará a maioria do tempo de competição em anaerobiose, o que faz com que haja maior probabilidade de ocorrer a produção de radicais livres, realçando a necessidade de existir um maior número de GSTs .

O grupo de atletas especializados nos 400 a 1500m, terão características muito parecidas de treino. Estes nadadores serão dotados de grande resistência física, não tendo tanta produção de radicais livres, logo não possuem tanta necessidade da actividade da GST.

O grupo controlo é constituído por 52 indivíduos, representativos da população em geral. Este grupo é constituído por 38 indivíduos do género masculino e por 14 do género feminino.

Todas as amostras foram recolhidas a partir de uma gota de sangue, obtido por uma picada no dedo da mão. A gota de sangue foi recolhida para um pedaço de papel de filtro, e foram conservadas no frigorifico a 4°C.

Antes do início da pesquisa, os todos os indivíduos estudados foram convidados a assinar um termo de consentimento livre e esclarecido, contendo todas as informações sobre o estudo, o seu significado e o possível uso dos resultados. A estes coube autorizar ou não o armazenamento dos dados e materiais colectados, que foram mantidos sob a guarda do pesquisador, no laboratório do Centro de Investigação em Ciências da Saúde (CICS) da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior.

3.2 . Lista de Reagentes

3.2.1. Lista de reagentes necessários para a extracção:

- Chelex (Bio-rad®, Munich, Germany)
- Água Milli Q

3.2.2. Lista de reagentes necessários para a amplificação:

- Água Milli Q
- Primers GSTM1, a e b (Sigma®)
- B - globulina, a e b (Sigma®)
- dNTPs (Sigma®)
- Buffer (Sigma®)
- MgCl₂ (Sigma®)
- Taq polimerase (Sigma®)

3.2.3. Lista de reagentes necessários para electroforese em gel de agarose:

- Agarose - SeaKem le agarose, Lonza®
- TAE (Sigma ®)
- Brometo de Etídio (Sigma®)

3.3. Extracção de ADN

A extracção de ADN foi realizada através do método do Chelex a 10%.

Foi cortado uma pequena porção de papel e foi adicionado a 100 µL de Chelex a 10% em água Milli Q. Foi incubado a 100°C durante 20 minutos e posteriormente centrifugado a 13000 rpm durante 3 minutos. O ADN está contido no sobrenadante.

O Chelex 100 é uma resina, que é um copolímero de estireno de divinilbenzeno que contém iões iminodiacetato, e que actua como quelante por ligação a iões metálicos. Apesar de ser classificada como uma resina de troca catiónica fraca, difere dos outros membros da sua classe pela sua elevada selectividade e afinidade para iões metálicos. O Chelex 100 actua por ligação aos contaminantes metálicos nas soluções de ADN sem alterar a concentração de iões não metálicos. (25)

3.4. Amplificação de ADN das amostras por PCR - multiplex

A técnica de PCR, Reacção em Cadeia da Polimerase, é uma técnica de Biologia Molecular que permite cópia *in vitro* do fragmento do ADN de forma extremamente rápida. Com a PCR, é possível amplificar quantidades mínimas de material genético, milhões de vezes em poucas horas, permitindo a detecção rápida e fiável dos marcadores genéticos de doenças infecciosas, cancro ou doenças genéticas.

A PCR está desenhada de acordo com o princípio natural de replicação de ADN. Este é um processo que decorre em três passos, que em conjunto se designam como um ciclo e que se repete um número específico de vezes.

Assim, um ciclo de PCR consiste nos seguintes passos:

1. Desnaturação
2. Hibridação ou “*annealing*”
3. Extensão

Este processo ocorre num termociclador, equipamento este que controla automaticamente durante determinados períodos de tempo, para um número apropriado de ciclos de PCR (geralmente 30 a 40 ciclos).

Para a execução da PCR é necessário fazer-se mistura contendo pequenas quantidades de ADN alvo, tampão, polimerase, *primers*, desoxinucleótidos constituintes do ADN e o cofactor Mg^{2+}

e esta mistura é submetida a vários ciclos de amplificação que consistem num primeiro passo na desnaturação do ADN pelo calor.

1º passo - Desnaturação

A temperatura elevada (90°C) desnatura a dupla cadeia de ADN em duas cadeias.

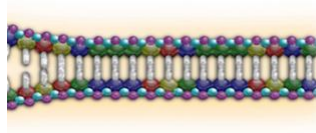


Figura 5 - Dupla cadeia de ADN (adaptado da referência bibliográfica 27)

2º passo - Hibridação ou Annealing

De seguida ocorre a hibridização dos *primers* por ligações de hidrogénio ao ADN em cadeia simples. Para permitir essa associação, a temperatura da reacção é diminuída (geralmente a temperaturas entre 50 e 65°C, durante 1 minuto).

Temperatura de *annealing* ou hibridização: normalmente encontra-se 65 °C, dependendo do comprimento dos *primers* e da sua sequência. A escolha criteriosa desta temperatura permite que estas sequências iniciadores se liguem à sequência alvo com elevada especificidade.

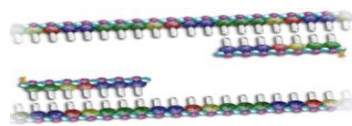


Figura 6 - Hibridação das cadeias de ADN (adaptado da referência bibliográfica 27)

3º passo - Extensão

Por último, ocorre a extensão dos *primers* através da síntese da cadeia complementar de cada cadeia molde, catalisada pela *ADN polimerase* (geralmente a 72°C durante 1 minuto). Este processo repete-se em vários passos produzindo ADN suficiente para que seja visualizado

após electroforese em gel de agarose e o tamanho estimado por comparação de padrões lineares de ADN.

A Taq polimerase é uma polimerase de ADN termo-estável recombinante do organismo *Thermus aquaticus*, que ao contrário das outras polimerases se mantém activa a temperaturas elevadas.

A extensão inicia-se sempre no extremo 3' do *primer*, criando uma cadeia dupla a partir de cada uma das cadeias simples. A Taq polimerase sintetiza exclusivamente na direcção 5' para 3'.

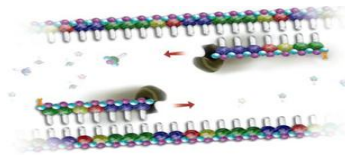


Figura 7 - Processo da extensão do ADN (adaptada da referência bibliográfica 27)

No final do primeiro ciclo da PCR, encontramos duas novas cadeias de ADN idênticas à original.

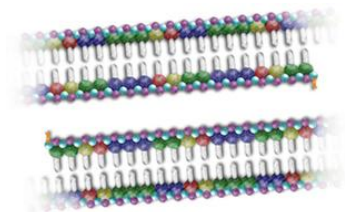


Figura 8 - Produto final da PCR. (adaptado da referência bibliográfica 27)

Na reacção de amplificação para além de se usar os *primers* correspondentes aos nossos polimorfismos em estudo, amplificou-se também um fragmento do gene da β - globulina, que é utilizada como controlo positivo. É então por esta razão que a reacção usada neste trabalho se denomina por PCR- *multiplex*, uma vez que, para cada gene se usam dois primers, um para cada um dos genes das GSTs e outro para o gene da β - globulina.

Os *primers* utilizados para cada um dos genes, e para o gene da β - globulina foram:

- para o polimorfismo **GSTM1** - 3´-GTTGGGCTCAAATATACGGTGG-5´ (reverse) e 5´-GAACTCCCTGAAAAGCTAAAG-3´ (forward);

- para o polimorfismo gene **GSTT1** - 3´-TCACCGGATCATGGCCAGCA-5´ (reverse) e 5´-TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC-3´ (forward);

- e para o gene da **β - globulina** - 3´-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-5 (reverse) e 5´-CAACTTCATCCACGTTCCACC- 3´ (forward).

Para a amplificação de cada gene, foi feita uma mistura (tabela 1) de 25µL.

Tabela 1 - Constituição da mistura para a amplificação, para cada um dos genes

GSTM1	GSTT1
Água Milli Q - 15.8 µL	Água Milli Q - 15.8 µL
Primer GSTM1a - 10 pmol (0.5µL)	Primer GSTT1a - 10 pmol (0.5µL)
Primer GSTM1b - 10 pmol (0.5µL)	Primer GSTT1b - 10 pmol (0.5µL)
Primer β - globulina a - 10 pmol (0.5µL)	Primer β - globulina a - 10 pmol (0.5µL)
Primer β - globulina b - 10 pmol (0.5µL)	Primer β - globulina b - 10 pmol (0.5µL)
dNTP - 100 nM (1µL)	dNTP - 100 nM (1µL)
Buffer - 2.5 µL	Buffer - 2.5 µL
MgCl ₂ - 1.5 mM (1.5µL)	MgCl ₂ - 1.5 mM (1.5µL)
ADN - 2 µL	ADN - 2 µL
Taq polimerase - 1 U (0,2µL)	Taq polimerase - 1 U (0,2µL)

A reacção foi programada no termociclador com a seguinte programação (tabela2):

Tabela 2: Programação do termociclador para a amplificação deste dois genes

Tempo	Temperatura
5 minutos	94°C
1 minuto	94°C
1 minuto	57°C
1 minuto	72°C
5 minutos	72°C
∞	4°C

} x 30

3.5 - Determinação dos genótipos

Os fragmentos de ADN foram separados por electroforese em gel de agarose a 1,5%, na presença de Brometo de etídio, e detectados por ultravioleta (UV). Os resultados foram analisados conforme presença ou ausência dos dois polimorfismos em estudo.

3.6 - Análise estatística

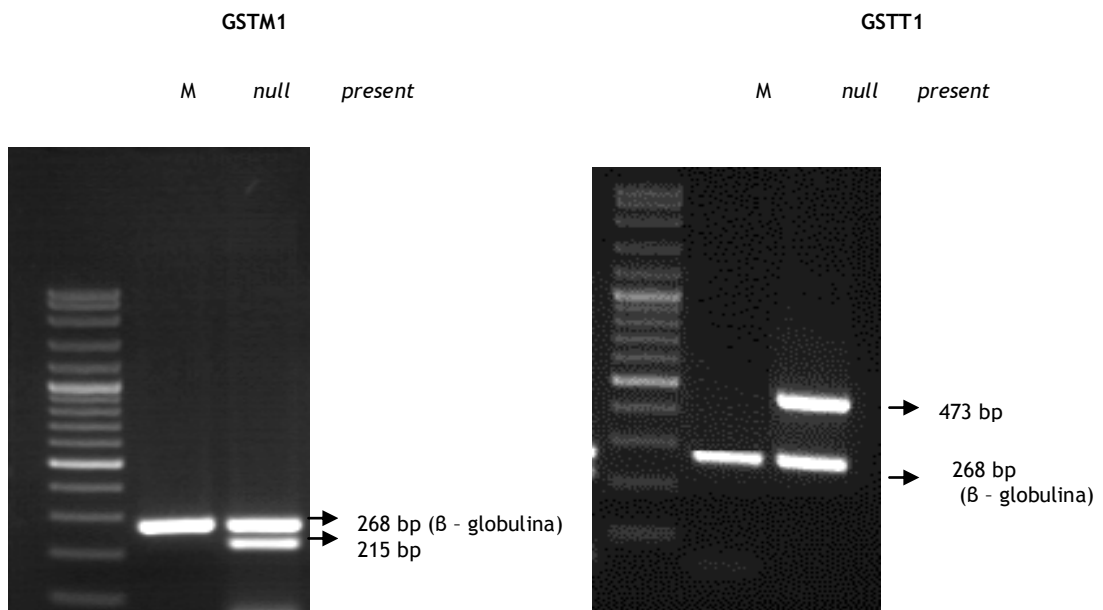
Os resultados foram agrupados e analisados estatisticamente, tendo sido considerado significativo um valor de $P \leq 0.05$.

A análise estatística foi realizada com o programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 17.0. Foi usado o teste de Qui-quadrado com calculo dos coeficientes de Pearson para estimar a correlação entre os polimorfismos GSTM1 e GSTT1 *null* em nadadores de elite portugueses. Os Odds Ratio foram estimados com um intervalo de confiança de 95%.

4. Resultados

Os resultados foram analisados a partir de electroforeses em gel de agarose a 1.5% e foram detectados por UV. Na figura 9 encontra-se uma imagem obtida por electroforese em gel de agarose, para cada um dos genótipos possíveis para ambos os polimorfismos estudados.

Figura 9 - genótipos possíveis os polimorfismos GSTM1 e GSTT1.



4.1. Análise da comparação do grupo de nadadores de elite com o grupo controlo

Na determinação dos genótipos GSTM1 e GSTT1 não nos é possível identificar se os participantes neste estudo são homozigóticos, *wild-type*, ou se são heterozigóticos. Contudo permite classificar como “*present*”, indivíduos com uma ou duas cópias dos genes em estudo, e indivíduos com deleções homozigóticas como “*null*”.

Os resultados obtidos para a distribuição dos genótipos da GSTM1 *null* para casos e controlos estão representados na tabela 3.

Tabela 3 - distribuição dos genótipos da GSTM1 *null* para casos e controlos

GSTM1	Controlos	Atletas	OR 95%	P
<i>present</i>	30 (57.7%)	10 (30%)		ref.
<i>null</i>	22 (42%)	24 (72%)	0.306 (0.122-0.767)	0.010

Na tabela 4 podemos observar os resultados da distribuição do genótipo da GSTT1 *null* para casos e controlos.

Tabela 4 - distribuição dos genótipos da GSTT1 *null* para casos e controlos

GSTT1	Controlos	Atletas	OR 95%	P
<i>present</i>	39 (75%)	25 (75.7%)		ref.
<i>null</i>	13 (25%)	8 (24%)	1.042 (0.378 - 2.871)	0.937

Na tabela 5 podemos observar a distribuição das frequências dos genótipos GSTM1 e GSTT1 *null* em casos e controlos.

Tabela 5 - distribuição das frequências dos genótipos da GSTM1 e da GSTT1 *null*, em casos e controlos

GSTM1	GSTT1	Controlos	Atletas	OR 95%	p
<i>present</i>	<i>present</i>	27 (51.9%)	9 (27%)		ref.
<i>null</i>	<i>present</i>	12 (22.8%)	15% (45%)	0.267 (0.091 - 0.778)	0.013
<i>present</i>	<i>null</i>	3 (6%)	2 (6%)	0.500 (0.072 - 3.485)	0.478
<i>null</i>	<i>null</i>	10 (19%)	7 (21%)	0.476 (0.140 - 1.622)	0.231

O grupo dos nadadores de elite foi dividido nas suas diferentes especialidades de competição, 200m e 400-1500m e relacionou-se cada uma delas com o grupo controlo.

Comparou-se a distribuição dos genótipos da GSTM1 *null*, para controlos e para a classe dos 200m (tabela 6) e posteriormente para a classe dos 400-1500m (tabela7). De seguida, procedeu-se da mesma forma mas para o polimorfismo GSTT1, verificando-se a distribuição dos genótipos deste gene no grupo controlo e para a classe dos 200m (tabela 8) e posteriormente para a classe dos 400-1500m (tabela 9).

Tabela 6 - distribuição dos genótipos da GSTM1 *null* para os 200m e controlos

GSTM1	Controlos	200m	OR 95%	P
<i>present</i>	30 (57.7%)	5 (15.2%)		ref.
<i>null</i>	22 (42%)	15 (45.5%)	4.091 (1.293 - 12.945)	0.013

Tabela 7 - distribuição dos genótipos da GSTM1 *null* para os 400-1500m e controles

GSTM1	Controlos	400-1500m	OR 95%	P
<i>present</i>	30 (57.7%)	5 (15.2%)		ref.
<i>null</i>	22 (42%)	8 (24.%)	0.458 (0.13 - 1.59)	0.213

Tabela 8 - distribuição dos genótipos da GSTT1 *null* para os 200m e controles

GSTT1	Controlos	200m	OR 95%	P
<i>present</i>	39 (75%)	16 (48.5%)		ref.
<i>null</i>	13 (25%)	4 (12.1%)	0.750 (0.21 - 2.65)	0.655

Tabela 9 - distribuição dos genótipos da GSTT1 *null* para os 400-1500m e controles

GSTT1	Controlos	400-1500m	OR 95%	P
<i>present</i>	39 (75%)	9 (39.4%)		ref.
<i>null</i>	13 (25%)	4 (12.1%)	0.751 (0.19 - 2.85)	0.672

Após a separação por classes do grupo de caso, e posterior análise, verificou-se a distribuição das frequências dos genótipos da GSTM1 e da GSTT1 *null*, na classe dos 200m e no grupo controlo (tabela 10).

Tabela 10 - a distribuição das frequências dos genótipos da GSTM1 e da GSTT1 *null*, na classe dos 200m e no grupo controlo

GSTM1	GSTT1	Controlos, n (%)	200m	OR 95%	p
<i>present</i>	<i>present</i>	27 (51.9%)	6 (18%)		ref.
<i>null</i>	<i>present</i>	12 (22.8%)	9 (27%)	0.296 (0.086 - 1.021)	0.048
<i>present</i>	<i>null</i>	3 (5.8%)	0 (0%)	0.818 (0.697 - 0.961)	0.418
<i>null</i>	<i>null</i>	10 (19%)	5 (15.1%)	0.444 (0.111 - 1.786)	0.247

Em seguida efectuou-se a análise da distribuição das frequências dos genótipos da GSTM1 e da GSTT1 *null*, na classe dos 400-1500m e no grupo controlo (tabela 11).

Tabela 11 - a distribuição das frequências dos genótipos da GSTM1 e da GSTT1 *null*, na classe dos 1500m e no grupo controlo

GSTM1	GSTT1	Controlos	400-1500m	OR 95%	p
<i>present</i>	<i>present</i>	27 (51.9%)	3 (9%)		ref.
<i>null</i>	<i>present</i>	12 (22.8%)	6 (18%)	0.222 (0.047 - 1.040)	0.045
<i>present</i>	<i>null</i>	3 (6%)	2 (6%)	0.167 (0.019 - 1.431)	0.076
<i>null</i>	<i>null</i>	10 (19%)	2 (6%)	0.556 (0.081 - 3.830)	0.547

Para estudar a influência dos polimorfismos por género analisou-se a distribuição dos génotipos da GSTM1 e GSTT1 *null* para casos, e controlos, nos diferentes géneros.

Para o genótipo GSTM1 *null*, a tabela 12 apresenta os resultados obtidos para os atletas especializados nos 200m e a tabela 13 apresenta os resultados obtidos para os atletas especializados nos 400-1500m.

Tabela 12 - distribuição dos genótipos da GSTM1 *null* para casos (200m) e controlos nos diferentes géneros

		GSTM1	Controlos	200m	OR 95%	p
M	{	<i>present</i>	22 (43%)	5 (15%)		ref.
		<i>null</i>	16 (30.7%)	8 (24%)	0.455 (0.125 - 1.651)	0.226
F	{	<i>present</i>	8 (15.4%)	1 (3%)	1.818 (0.183 - 18.038)	0.606
		<i>null</i>	6 (11.5%)	6 (18%)	0.227 (0.051 - 1.010)	0.044

Tabela 13 - distribuição dos genótipos da GSTM1 *null* para casos (400-1500m) e controlos nos diferentes géneros

		GSTM1	Controlos	400-1500m	OR 95%	p
M	{	<i>present</i>	22 (43%)	1 (3%)		ref.
		<i>null</i>	16 (30.7%)	6 (18%)	0.121 (0.013 - 1.108)	0.034
F	{	<i>present</i>	8 (15.4%)	4 (12%)	0.091 (0.009 - 0.940)	0.020
		<i>null</i>	6 (11.5%)	2 (6%)	0.136 (0.010 - 1.772)	0.089

Realizou-se o mesmo procedimento para o genótipo GSTT1 *null*. A tabela 14 apresenta os resultados obtidos para os atletas especializados nos 200m e a tabela 15 apresenta os resultados obtidos para os atletas especializados nos 1500m.

Tabela 14 - distribuição dos genótipos da GSTT1 para casos (200m) e controlos nos diferentes géneros

		GSTT1	Controlos	200m	OR 95%	p
M	{	<i>Present</i>	29 (55.8%)	9 (27%)		ref.
		<i>null</i>	9 (17%)	3 (9%)	0.931 (0.207 - 4.196)	0.926
F	{	<i>Present</i>	10 (19%)	6 (18%)	0.517 (0.147-1.821)	0.301
		<i>null</i>	4 (7.7%)	2 (6%)	0.621 (0.097 - 3.967)	0.621

Tabela 15 - distribuição dos genótipos da GSTT1 para casos (1500m) e controlos nos diferentes géneros

		GSTT1	Controlos	1500m	OR 95%	p
M	{	<i>Present</i>	29 (55.8%)	5 (15%)		ref.
		<i>null</i>	9 (17%)	2 (6%)	0.776 (0.128 - 4.705)	0.782
F	{	<i>Present</i>	10 (19%)	4 (12%)	0.431 (0.096 - 1.929)	0.263
		<i>null</i>	4 (7.7%)	2 (6%)	0.345 (0.049- 2.411)	0.268

(A letra M refere-se ao sexo masculino, e a letra F refere-se ao sexo feminino)

5. Discussão e Conclusão

Na análise da distribuição dos genótipos da GSTM1 em casos e controlos (tabela 3) verificou-se que existem mais atletas *null* do que no grupo indivíduos *null* no grupo de controlos. Em relação ao gene GSTT1 (tabela 4) o número de atletas *null* não é muito diferente do número de indivíduos *null* do grupo controlo. Na análise de todas as distribuições das frequências dos genótipos da GSTM1 e GSTT1 *null*, em casos e controlos (tabela 5) verifica-se que a combinação de genótipo GSTM1 *null* e GSTT1 *present* é estatisticamente significativo. Pode então começar por se concluir, comparando o grupo controlo com o grupo de atletas, sem subdivisão em especialidades, que existem mais atletas com genótipo GSTT1 *present* do que GSTM1 *null*.

Posteriormente, dividiu-se o grupo de atletas em duas especialidades que requerem características diferentes de força e resistência, nadadores especializados nos 200m e nos 400-1500m. Devido ao facto de a maioria do tempo de competição ser passado em anaerobiose, faz com que haja maior probabilidade de ocorrer a produção de radicais livres, realçando a necessidade de existir um maior número de GSTs.(20) Enquanto que, os nadadores especializados nos 400-1500m necessitam ter mais resistência do que força, logo não há tanta produção de radicais livres, o que faz com que as necessidades de GSTs, possam ser inferiores.

Esta divisão foi feita para analisar se existem diferenças na distribuição por frequência de genótipos nas diferentes especialidades, e se existe uma frequência aumentada de genótipos *null* da GSTM1 e da GSTT1 nas diferentes especialidades. Deste modo comparou-se a distribuição de genótipos *null* na GSTM1 em controlos e em atletas da classe dos 200m (tabela 6) da classe dos 1500m (tabela 7). Os resultados obtidos demonstraram que existe maior número de atletas de 200m com genótipo *null* na GSTM1 do que na população de controlo. Em relação ao grupo de atletas de 1500m, não se verificam diferenças estatisticamente significativas quando comparado com o grupo de controlos. Foi feita a mesma análise para o gene GSTT1, em que se comparou a distribuição da frequência de genótipos no grupo controlo, no grupo de nadadores da classe dos 200m (tabela 8) e no grupo de nadadores da classe dos 1500m (tabela 9) mas, relativamente a este gene, não se verificaram diferenças significativas na distribuição de genótipo *null* nos grupos estudados.

Ao analisar as associações dos genótipos estudados em cada uma das especialidades, 200m (tabela 10) e 1500m (tabela 11) verificou-se que existe diferença estatisticamente significativa para os atletas portadores dos genótipos GSTT1 *present* em simultâneo com GSTM1 *null*, quer pertençam à classe dos 200m ou dos 400-1500m, quando comparados com os indivíduos do grupo de controlo. Assim, pode concluir-se que a existência da proteína GSTT1

na ausência da proteína GSTM1 confere vantagem aos atletas, independentemente da sua especialidade e das exigências físicas específicas de cada especialidade.

Analisou-se ainda a distribuição por género (masculino e feminino) dos genótipos *null* da GSTM1 e da GSTT1 em atletas dos 200m (tabelas 12 e 14) e dos 1500m (tabelas 13 e 15), em comparação com o grupo de controlo. Desta análise de distribuição dos genótipos por género conclui-se que a presença da proteína GSTM1 parece ser relevante apenas para os atletas do género feminino da especialidade de 1500m uma vez que se constatou que existe uma incidência aumentada e estatisticamente significativa de atletas do sexo feminino que expressam a proteína GSTM1 na especialidade dos 1500m. Contudo, a presença da proteína GSTT1 parece ser fundamental para todos os atletas independentemente da especialidade e do género. Uma das hipóteses que se pode propor para explicar este resultado é que a existência da proteína GSTT1 nos dímeros que integra pode conferir propriedades específicas e vantajosas para a prática destas especialidades da natação.

6. Bibliografia

1. **Ramalhinho, A. C.; Moutinho, J.A.F.; Breitenfeld, L. (2001).** “Glutathione S-transferase M1, T1, and P1 genotypes and breast câncer risk: a study in a Portuguese population.” *Mol Cell Biochem.*
2. **Parl, F. F.; (2005).** “Glutathione S-transferase genotypes and cancer risk.” *Cancer Letters* 221: 123-129.
3. **Di Pietro, G.; Magno, L.A.V.; Rios-Santos, F. (2010).** “Glutathione S-transferases: an overview in cancer research.” *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol* 6(2): 153-165.
4. **Oliveira, E. A. S. (2008).** “Biodisponibilidade - Biotransformação.” *Apostila nº 3.*
5. **Huber, P.C.; Almeida, W.P.; Fátima, A. (2008).** “Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos.” *Química Nova*, volume 31.
6. **Dourado, D. F.A.R.; Fernandes, P. A.; Mannervik, B.; et al. (2008).** “Glutathione Transferase: New Model for Glutathione Activation.” *Chem. Eur. J.* , 14: 9591-9598.
7. **Pettigrew, N.E.; Colman, R.F. (2001).** “Heterodimers of Glutathione S-Transferase Can Form between Isoenzyme Classes pi and mu.” *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol 396, nº 2: 225-230.
8. **Hussey, A.J.; Kerr, L.A.; Cronshaw, A.D.; Harrison, D.J.; et al. (1991).** “Variation in the expression of Mu-class glutathione S-transferase isoenzymes from human skeletal muscle.” *Biochem* 273: 323-332.

9. **Talat Islam**, M.B.B.S.; **Berhane**, K.; **Rob McConnell**, M.D.; et al.(2009). “Glutathione-S-Transferase (GST)P1, GSTM1, Exercise, Ozone and Asthma Incidence in school children.” *Thorax*, 64(3):197-202.
10. **Polimanti**, R.; **Piacentini**, S.; **Lazzarin**, N.; et al. (2011). “ Glutathione S-transferase variants as risk factor for essential hypertension in Italian patients.” *Mol Cell Biochem*.
11. **Kwon**, D.D.; **Lee**, J.W.; **Han**, D.Y.; et al. (2011). “Relationship between the Glutathione S Transferase P1, M1, and T1 Genotypes and Prostate Cancer Risk in Korean Subjects.” *Korean J Urol*. 52(4): 247-252.
12. **Lima**, C. S.P; **Néri**, I.A.; **Lourenço**, G.J.; et al. (2010). “Glutathione S- transferase um 1 (GSTM1) and theta 1 (GSTT1) genetic polymorphisms and atopic asthma in children from Southeastern Brazil.” *Genet Mol Biol.*, 33(3): 438-441.
13. **Sultana**, S.; **Kolla**, V.; **Jeedigunta**, Y.; e tal. (2011). “Glutathione S-transferase M1 and T1 gene polymorphisms in South Indian stroke patients” *Journal of Medical Genetics and Genomics* vol.3 (4)pp. 65-70.
14. **Tang**, J.; **Wang**, M.;**Jia** E.; et al (2010). “ The common variant in the GSTM1 and GSTT1 genes is related to markers of oxidative stress and inflammation in patients with coronary artery disease: a case-only study” *Mol.Biol.Rep.*37: 405-410.
15. **Fearheller**, D.; **Diaz**, K.; **Strurgeon**, K.; et al (2011) “ Radical differences in the Time - course oxidative stress responses to acute exercise” *Journal Exerc.Physiol.Online* 14 (1): 49-59.
16. **Souza-Rabbo**, M.; **Silva**, L.;**Auzani**, J.; e tal. (2008) “Effects of a chronic exercise training protocolo n oxidative stress and right ventricular hypertrophy in

monocrotalina-treated rats” *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 35: 944 - 948.

17. **Akimoto, A., K.; Miranda-Vilela, A., L.; Alves, P.; et al** (March 2010) “ Evaluation of gene polymorphisms in exercise-induced oxidative stress and damage” *Free radical research*, 44 (3): 322 - 331.
18. **Traustadottir, T.; Davies, S.; Su, Yali; et al** (2011) “ Oxidative stress in older adults. Effects of physical fitness” *AGE*.
19. **Deminice, R.; Degiovanni, G.; Garlipp-Picchi, M.; et al** (2009) “ Evolução de biomarcadores de estresse oxidativo e relação com a performance competitiva em dois momentos da temporada de treinamento de natação” *Ciências do Exercício e do Esporte*: 277-281.
20. **Rosario, F.** (2007) “Análise da variabilidade de frequência cardíaca em nadadores de elevado rendimento competitivo numa época desportiva” *Universidade de Coimbra - Faculdade de ciências do Desporto e Educação Física*.
21. **Dias, R.; Pereira, A.; Negrão, C.; e tal** (2007) “ Polimorfismos genéticos determinantes da performance física em atletas de elite” *Rev Bras Med Esporte* Vol. 13, Nº 3.
22. **Vedyakov, A.; Tonevitskii, A.,** (2006) “ Analyses of a Series of Significant genetic polymorphisms in athletes” *Human Physiology*, 2006, vol. 32, nº2, pp. 204-208.
23. **Costa, M.; Bragada, J.; Mejias, E.; e tal** (2010) “ Modificações no perfil bioenergético e biomecânico de nadadores entre dois períodos “pré-taper”” *Acqua - revista portuguesa de natação* ISSN 1647-2837 Nº3 | Dezembro de 2010.

24. **Alves, R.** (2008) “ Variáveis determinantes do rendimento nas distâncias 200 e 800m crawl” Universidade do Porto - Faculdade de Desporto.

25. **Bio-Rad Laboratories**, 2000 Alfred Nobel Dr., Hercules, CA 94547 - LIT200 Rev B.

26. **Kow, Y.** (2010) “ Oxidative stress, DNA damage and human diseases” Division of Cancer Biology, department of Radiation Oncology, Emory University School of Medicine.

27. <http://www.roche.pt/portugal/index.cfm/produtos/equipamentos-de-diagnostico/products/molecular-diag/intro-pcr/>