

**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE
CAMPINAS**

BC/ 43003

IB/ 81576

INSTITUTO DE BIOLOGIA





UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

ISABEL ROSA CABRAL

POLIMORFISMOS DE GENES RELACIONADOS AO METABOLISMO DE
XENOBIÓTICOS E A SUSCETIBILIDADE À CIRROSE ALCOÓLICA

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo (a) candidato (a)
Isabel Rosa Cabral
e aprovada pela Comissão Julgadora
05/09/2000

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de
Doutor em Genética e Biologia
Molecular na área de Genética
Humana e Médica

Orientadora: Profa. Dra. Christine Hackel
Co-orientadora: Profa. Dr. Nivea Dulce Tedeschi Conforti-Froes

Campinas
Setembro/2000



UNIDADE	IB/81576	
N.º CHAMADA:	T/unicamp	
	C112p	
V.	Ex. II	
TOMBO BC/	43003	
PROC.	16.2.F.8.100	
C	<input type="checkbox"/>	D <input type="checkbox"/>
PREC.	R\$ 11,00	
DATA	C 4/12/00	
N.º CPD		

147001-0

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

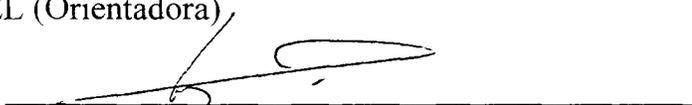
C112p Cabral, Isabel Rosa
 Polimorfismos de genes relacionados ao metabolismo de xenobióticos e a suscetibilidade à cirrose alcoólica / Isabel Rosa Cabral. - - Campinas, SP [s.n.], 2000.
 145f: illus.

Orientadora: Christine Hackel
 Co-Orientadora: Nívea Dulce Tedeschi Conforti-Froes
 Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
 Instituto de Biologia.

1.Fumo - Vício. 2.Fígado – Doenças. 3.Alcoolismo. I. Hackel, Christine. II. Conforti-Froes, Nívea Dulce. III. Universidade Estadual de Campinas.Instituto de Biologia. III. Título.

DATA DA DEFESA: 05/09/2000.

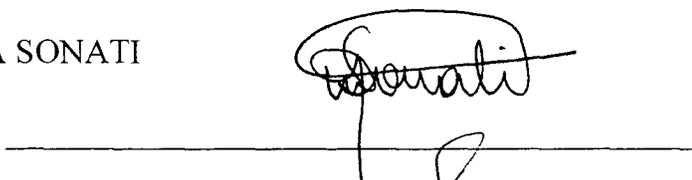
Profa. Dra. CHRISTINE HACKEL (Orientadora)



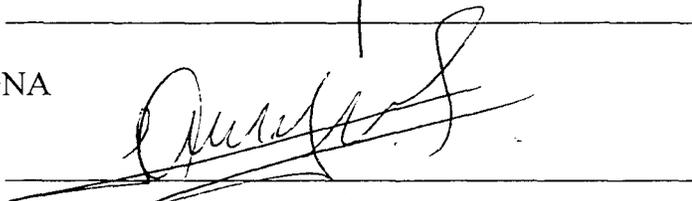
Profa. Dra. RITA DE CÁSSIA MARTINS ALVES DA SILVA



Profa. Dra. MARIA DE FÁTIMA SONATI



Prof. Dr. LUIZ ALBERTO MAGNA



Prof. Dr. WILSON ARAÚJO DA SILVA JÚNIOR



Prof. Dr. MOZART DE AZEVEDO MARINS

Profa. Dra. CARMEN SÍLVIA BERTUZZO

Dedico este trabalho a todos os abusadores de álcool que voluntariamente participaram deste trabalho. Portadores de uma doença (ou um distúrbio de personalidade?) e vítimas de uma sociedade que os estimula ao início do hábito para depois ignorá-los.

*À meu querido Arno
e
à Leila, nosso rebento.*

AGRADECIMENTOS

Ao concluir mais esta etapa da minha formação acadêmica quero registrar minha gratidão à algumas pessoas que atuaram de modo fundamental para a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Christine Hackel, orientadora exemplar, agradeço pela confiança, disponibilidade e colaboração em todas as etapas do curso de pós-graduação, principalmente na execução do projeto de pesquisa. Seu apoio também foi fundamental para atividades além da Academia, quando me deu tranqüilidade para obter êxito em dois grandes momentos: a conquista do meu emprego de Professora na UFPa e a amamentação da Leila.

À Profa. Dra. Nívea D.T. Conforti Froes (IBILCE/UNESP), acreditando na minha capacidade, deu-me a oportunidade de realizar este projeto. Agradeço ainda por inúmeras outras importantes colaborações para a minha formação acadêmica e pessoal.

À doutoranda Andréa Regina Baptista Rossit (IBILCE/UNESP), pela confiança, solidariedade, companheirismo e outros tantos adjetivos que podem denotar o nosso trabalho cooperativo. Dividimos amostras, angústias, aflições, êxitos e muitos momentos felizes. Assim, do dia-a-dia, surgiu uma profunda amizade e cumplicidade.

À Dra. Rita de Cássia M. Alves da Silva (FAMERP), pela receptividade no Serviço de Gastreenterologia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, pela colaboração na execução deste trabalho e, pelas valiosíssimas sugestões na análise prévia deste trabalho.

Aos professores Dra. Maria de Fátima Sonati e Dr. Luiz Alberto Magna (UNICAMP), pela gentileza em auxiliar-me analisando a primeira versão desta Tese.

Aos médicos e psicólogos que atendem no Serviço de Gastreenterologia da Faculdade de Medicina de S. José do Rio Preto, pela acolhida e solidariedade em dividir informações.

À Dra. Elza Cotrin Soares e Dr. Jazon de Almeida, pela colaboração na triagem dos portadores de cirrose no Hospital das Clínicas da UNICAMP.

À psicóloga Ângela Stockler e demais profissionais da equipe do CRIAD (Centro de Referência e Informação em Alcoolismo e Drogadição, Prefeitura Municipal de Campinas), dedicados ao atendimento de dependentes químicos, com carinho e profissionalismo.

Ao Prof. Dr. Sidney Ragazzi do Departamento de Estatística (IMECC, UNICAMP) e sua orientada Liane Kana Satake pela análise estatística, base das conclusões deste.

À Lya Bueno de Carvalho, pelo imensurável apoio na obtenção das amostras objeto deste estudo e à Dra. Andréa Borduchi C. de Salles (Hemocentro de São José do Rio Preto), pela colaboração na obtenção da amostra controle deste estudo.

Pela cordialidade e eficiência com que deram sua contribuição para este estudo, quero agradecer:

- à Arlete Aparecida A. Camacho, biomédica do Laboratório Especializado de Gastrenterologia do Hospital de Base de S. José do Rio Preto;
- aos profissionais da saúde das enfermarias de Gastrenterologia e da Unidade de Transplante de Fígado do Hospital de Base de São José do Rio Preto;
- às funcionárias do ambulatório de Gastrenterologia e da sala de coleta do Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Medicina de S. José do Rio Preto;
- aos funcionários da sala de coleta do Hemocentro da UNICAMP;
- à Ana Lúcia Nunes Dominguez, enfermeira do Gastrocentro, UNICAMP.

Ao Arno Hamel, pela paciente revisão e pertinentes alterações que muito contribuíram para a elaboração da versão final deste trabalho.

Aos companheiros do Laboratório de Genética Humana do CBMEG/UNICAMP, pela convivência salutar e descontraída. Especialmente quero agradecer à Daniela Cabral e Marcela Araújo pela minha iniciação na Genética Molecular e disponibilidade em discutir detalhes técnicos. À Daniela, mais uma vez, pelo auxílio nas intermináveis aplicações de géis para 100 amostras.

À Madalena Rosa, técnica de excelente nível do Laboratório de Genética Humana do CBMEG/UNICAMP, executando suas tarefas (e outras tantas) com humor e amor. Acolheu-me no laboratório, ensinou-me os primeiros passos e sempre me auxiliou nas intensas jornadas de extração de DNA. Agradeço pelos ensinamentos, apoio técnico e carinho.

Às professoras Dra. Edi Lúcia Sartorato e Dra. Maricilda Palandi de Mello pela receptividade no Laboratório de Genética Humana (CBMEG/UNICAMP), permitindo-me desfrutar de seus conhecimentos em Genética Molecular.

Aos meus amigos do Laboratório de Citogenética Humana da Universidade Federal do Pará, que estão comigo desde a minha Iniciação Científica: à técnica Maria da Glória Santos e aos Professores Dr. José Alexandre Rodrigues de Lemos, MS Marcelo Oliveira Bahia, Dr. Rommel Mario Rodriguez Burbano, pelo carinho e solicitude.

Ao Departamento de Genética da Universidade Federal do Pará, por me disponibilizar para a realização deste curso.

À FAEP/UNICAMP, FAPESP e CAPES (PICD/UFPa) pelo apoio financeiro.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus pais, **João e Fátima Cabral** que estimularam a formação acadêmica dos seus filhos, por vezes abdicando da convivência com os mesmos, por acreditarem na educação como o caminho para uma vida digna.

Ao **Arno**, companheiro de todas as horas e principal vítima da intensa dedicação ao Curso de Pós-graduação. Seu estímulo ao meu crescimento e sua admiração são como alavanca para a minha vida acadêmica.

À **Conce**, irmã que eu redescobri como grande amiga, agradeço pela convivência suave, cumplicidade e, principalmente, pelo apoio no dia-a-dia que possibilitou executar a múltipla jornada do dia-a-dia das mulheres (mãe, dona-de-casa, estudante e mulher, quando possível).

Às minhas meninas, **Fernanda e Carolina**, que estiveram comigo por quase toda esta etapa de formação e forneceram uma outra ótica para os meus dias, tornando-os menos áridos e menos acadêmicos.

À **Fátima, Luciano e Letícia Almeida**, harmoniosa família que esteve comigo no Mestrado e no Doutorado. Hospedaram-me com carinho nas inúmeras idas à São José do Rio Preto para coletar amostras e as nossas longas e amáveis conversas amenizaram a arduidade dessas viagens.

À Profa. Dra. **Marúcia Amorim** (UFPa), minha amiga e mentora, cujos ensinamentos na Iniciação Científica nortearam a minha conduta durante os cursos de pós-graduação.

À **Sula** pelo carinho que dedicou à minha filha na minha ausência durante a elaboração deste texto.

Aos demais membros da minha família, meus **irmãos, sobrinhos e vovozinha**, pelo imenso carinho e fonte do estímulo para continuar. Os sete anos de separação física, para a execução do curso de Mestrado e Doutorado, me ensinaram o quão presa estou à minha família e à minha cidade, para as quais irei retornar e retribuir o apoio recebido.

À todos vocês, a minha eterna gratidão.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS	xv
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	xvii
RESUMO	xxi
ABSTRACT	xxii
I- INTRODUÇÃO	1
I.1- Cirrose Hepática Alcoólica	3
I.1.1-Dados epidemiológicos sobre a cirrose hepática alcoólica .	4
I.2- O Metabolismo do Álcool e a sua Hepatotoxicidade	5
I.2.1-Interação do metabolismo do álcool com outros compostos	9
I.3- Suscetibilidade à Cirrose Alcoólica	10
I.4- Polimorfismos Genéticos	12
I.4.1- <i>CYP2D6</i>	15
I.4.2- <i>CYP2E1</i>	18
I.4.3- <i>GST</i>	20
I.5- Polimorfismos de Genes do Biometabolismo e as Hepatopatias .	21
II- OBJETIVOS	23
III- CASUÍSTICA	25
IV- METODOLOGIA	27
IV.1- Genotipagem dos Genes <i>GSTM1/GSTT1</i>	27
IV.2- PCR do Gene <i>CYP2E1</i> e Análise de RFLP <i>Pst</i> I	29
IV.3- PCR do Gene <i>CYP2E1</i> e Análise de RFLP <i>Dra</i> I	29
IV.4- PCR do Gene <i>CYP2D6</i> e Análise de RFLP <i>ScrFI</i> e <i>DraIII</i>	30
IV.5- Análise Estatística	33
V- RESULTADOS	35
V.1- Variáveis Ambientais	40
V.1.1-Infecção por HBV e HCV	40
V.1.2-Tabagismo	41
V.1.3-Etilismo	42

V.2-	Variáveis Genéticas e sua Relação com as Variáveis Ambientais	51
	Ambientais	51
	V.2.1- <i>GST</i>	51
	V.2.2- <i>CYP2D6</i>	60
	V.2.3- <i>CYP2E1</i>	65
VI-	DISCUSSÃO	71
	VI.1- Polimorfismos em Genes do Biometabolismo Segundo Etnia	72
	VI.2- <i>GSTT1</i> e <i>GSTM1</i>	75
	VI.2.1- <i>GSTT1</i> e <i>GSTM1</i> nulos na população brasileira	75
	VI.2.2- <i>GSTT1</i> e <i>GSTM1</i> nulos e a cirrose alcoólica	77
	VI.3- <i>CYP2D6</i>	82
	VI.3.1- <i>CYP2D6</i> *3, <i>CYP2D6</i> *4 e <i>CYP2D6</i> *5 na população brasileira	82
	VI.3.1- <i>CYP2D6</i> *3, <i>CYP2D6</i> *4 e <i>CYP2D6</i> *5 em etilistas cirróticos	84
	VI.4- <i>CYP2E1</i>	87
	VI.4.1-Alelos <i>CYP2E1</i> *c2 e <i>CYP2E1</i> *C na população brasileira	87
	VI.3.2-Alelos <i>CYP2E1</i> *c2 e <i>CYP2E1</i> *C em etilistas cirróticos	89
VII-	CONCLUSÕES	93
VIII-	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
	ANEXOS	116

LISTA DE SIGLAS

AA	aminoácido
ADH	álcool desidrogenase
ALDH	aldeído desidrogenase
BSA	soro albumina bovina
CRIAD	Centro de Referência e Informações sobre Alcoolismo e Drogadição
Ct	amostra de indivíduos controles
CYP	citocromo P450
CYP2D6	citocromo P4502D6
CYP2E1	citocromo P4502E1
DMSO	dimetil sulfóxido
dNTP	nucleotídio trifosfatado
EDTA	ácido etileno di-amino tetra-acético
EC	amostra de indivíduos etilistas cirróticos
ENC	amostra de indivíduos etilistas não-cirróticos
FA	fosfatase alcalina
FAMERP	Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto
GGT	gama-glutamiltransferase
GSH	glutatião reduzido
GST	glutatião-S-transferases
GSTM1	glutatião-S-transferases, classe mu (μ)
GSTT1	glutatião-S-transferases, classe teta (θ)
HBV	vírus B de hepatite humana (do inglês hepatitis B virus)
HCV	vírus C de hepatite humana (do inglês hepatitis C virus)
IARC	International Agency for Research on Cancer
MEOS	sistema de oxidação microsomal do etanol
MgCl ₂	cloreto de magnésio
NAD	dinucleotídio de adenina nicotinamida
NADH	dinucleotídio de adenina nicotinamida reduzido

NADP	dinucleotídio fosfatado de adenina nicotinamida
NADPH	dinucleotídio fosfatado de adenina nicotinamida reduzido
NAT	N-acetiltransferases
NNK	nitrosamina, 4-(metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1-butanona
OR	Odds Ratio
pb	pares de bases (nucleotídios)
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês Polymerase Chain Reaction)
RFLP	Polimorfismo no Tamanho do Fragmento de Restrição (do inglês Restriction Fragment Length Polymorphism)
TBE	Tampão Tris HCl + ácido bórico + EDTA
UNESP	Universidade Estadual Paulista
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

- FIGURA 1:** Principais vias de oxidação do etanol nos hepatócitos: ADH e CYP2E1. 7
- FIGURA 2:** Oxidação do etanol no hepatócito, ressaltando-se alguns metabólitos gerados, os quais estão associados a efeitos tóxicos do metabolismo oxidativo do etanol: o excesso de NADH mediado pela ADH, a geração de compostos polares (eletrofílicos) pela CYP2E1 e a produção do acetaldeído, principal produto tóxico do referido metabolismo. 7
- FIGURA 3:** Esquema da amplificação parcial do gene *CYP2D6*, para pesquisa simultânea dos alelos *CYP2D6*3* e *CYP2D6*4*, localizando-se os sítios de restrição para as enzimas *DraIII* e *ScrFI*. 31
- FIGURA 4:** Esquema de digestão do gene *CYP2D6* para pesquisa simultânea dos alelos *CYP2D6*3*, *CYP2D6*4* e **5*, apresentando-se os possíveis genótipos. 32
- FIGURA 5:** Distribuição dos indivíduos etilistas cirróticos (EC), etilistas não-cirróticos (ENC) e controles (Ct), segundo a idade. 39
- FIGURA 6:** Fotografia de gel sob luz UV, apresentando-se os genótipos observados para *GSTT1* e *M1* após PCR para identificação de seus alelos nulos. 52
- FIGURA 7:** Negativo de gel fotografado sob luz UV, apresentando os genótipos observados para o gene *CYP2D6* após pesquisa dos alelos *CYP2D6*3*, *CYP2D6*4* e *CYP2D6*5*. 62
- FIGURA 8:** Fotografia de gel sob luz UV, apresentando os genótipos observados para o gene *CYP2E1* após digestão com a enzima *PstI*. 67
- FIGURA 9:** Fotografia de gel sob luz UV, apresentando os genótipos observados para o gene *CYP2E1* após digestão com a enzima *DraI*. 67
- FIGURA 10:** Frequências de câncer (Ca) de pulmão e cabeça+pescoço descritas para a população do sudeste brasileiro e distribuição dos integrantes das amostras EC+ENC segundo idade (Fonte: BRASIL, 2000). 80

FIGURA 11: Frequência dos alelos de <i>CYP2D6</i> identificados em três populações brasileiras comparada com o observado para populações europeias e norte-americanas.	86
FIGURA 12: Esquema ilustrativo da possível interação entre variáveis ambientais (álcool e cigarro) e genéticas (<i>GSTT1</i> , <i>GSTM1</i> e <i>CYP2E1</i>) na etiologia da cirrose alcoólica.	92
Tabela 1: Nomenclatura de alelos <i>CYP2D6</i> , mutação original e seu efeito sobre o metabolismo	17
Tabela 2: Principais características dos alelos <i>CYP2E1</i> *c1 e <i>CYP2E1</i> *D. ...	19
Tabela 3: Classificação das amostras de etilistas cirróticos (EC), etilistas não cirróticos (ENC) e controles (Ct), segundo sexo, idade e hábitos de etilismo e tabagismo.	38
Tabela 4: Descrição das amostras de etilistas cirróticos (EC), etilistas não-cirróticos (ENC) e controles (Ct), segundo a idade	39
Tabela 5: Estatística descritiva da amostra de etilistas cirróticos com sorologia positiva (soro +) ou negativa (soro -) para os vírus HBV ou HCV, segundo as variáveis idade, tabagismo, etilismo e tempo para desenvolvimento da cirrose. São destacados o tamanho dos sub-grupos e o resultado da análise de variância (ANOVA)	44
Tabela 6: Estatística descritiva da amostra de etilistas cirróticos (EC) para variáveis referentes à idade, tabagismo, etilismo e tempo para desenvolvimento da cirrose.	45
Tabela 7: Estatística descritiva da amostra de etilistas não-cirróticos (ENC) para variáveis referentes à idade e consumos de tabaco e álcool.	46
Tabela 8: Estatística descritiva da amostra controle (Ct) para variáveis referentes à idade e consumos de tabaco e álcool.	47
Tabela 9: Estatística descritiva das amostras de etilistas cirróticos (EC), etilistas não-cirróticos (ENC) e controles (Ct) segundo a variável idade e outras referentes ao hábito do tabagismo, considerando-se apenas os indivíduos fumantes. São destacados o tamanho amostral (n) e a análise de variância (ANOVA) ...	48

Tabela 10: Estatística descritiva das amostras de etilistas cirróticos (EC), etilistas não-cirróticos (ENC) e controles (Ct) segundo a variável idade e outras referentes ao hábito de etilismo. São destacados o tamanho amostral (n) e a análise de variância (ANOVA).	49
Tabela 11: Valores de média (\bar{X}) e respectivo desvio padrão (s) observados para variáveis referentes à idade e consumo de tabaco e álcool em uma amostra de etilistas cirróticos (EC), etilistas não-cirróticos (ENC) e controles (Ct).	50
Tabela 12: Frequências relativas (%) de genótipos nulos para os genes <i>GSTT1</i> e <i>GSTM1</i> e suas possíveis combinações, observadas em indivíduos portadores de cirrose alcoólica (EC), etilistas não-cirróticos (ENC) e controles (Ct).	52
Tabela 13: Frequências relativas (%) de genótipos <i>GSTT1</i> e <i>GSTM1</i> nulos e suas combinações em uma amostra de etilistas cirróticos (EC), segundo algumas variáveis ambientais.	56
Tabela 14: Frequências relativas (%) de genótipos <i>GSTT1</i> e <i>GSTM1</i> nulos e suas combinações em uma amostra de etilistas não-cirróticos (ENC), segundo idade, tabagismo e etilismo.. . . .	57
Tabela 15: Frequências relativas (%) de genótipos <i>GSTT1</i> e <i>GSTM1</i> nulos e suas combinações em uma amostra controle (Ct), segundo idade, tabagismo e etilismo.. . . .	58
Tabela 16: Frequências relativas de alguns dfenótipos observados para os genes <i>GSTT1</i> e <i>GSTM1</i> nas amostras de etilistas cirróticos (EC), etilistas não-cirróticos (ENC) e controles (Ct), segundo o hábito do tabagismo.	59
Tabela 17: Frequências (%) dos genótipos <i>CYP2D6</i> observados nas amostras de etilistas cirróticos (EC), não-cirróticos (ENC) e controles (Ct). São também apresentadas as frequências de metabolizadores fracos (PM) e metabolizadores intensos (EM). . . .	63
Tabela 18: Frequências (%) de indivíduos portadores de diferentes alelos do gene <i>CYP2D6</i> e respectiva frequência alélica (FA) observadas em etilistas cirróticos (EC), etilistas não-cirróticos (ENC) e controles (Ct).	64

- Tabela 19:** Freqüências (%) dos genótipos observados para o polimorfismo CYP2E1/*Pst*I em amostras de etilistas cirróticos (EC), etilistas não-cirróticos (ENC) e controles (Ct), apresentando-se a freqüência alélica para o CYP2E1*c2 (FA). . . . 68
- Tabela 20:** Freqüências (%) dos genótipos observados para o polimorfismo CYP2E1/*Dra*I em amostras de etilistas cirróticos (EC), etilistas não-cirróticos (ENC) e controles (Ct), apresentando-se a freqüência alélica para o CYP2E1*C (FA). . . . 68
- Tabela 21:** Proporção das combinações genótípicas observadas para os polimorfismos CYP2E1/*Pst*I (alelos c1 e c2) e CYP2E1/*Dra*I (alelos D e C). 69
- Tabela 22:** Relação entre os polimorfismos GSTT1, GSTM1, CYP2E1/*Pst*I e CYP2E1/*Dra*I em amostras de etilistas cirróticos (EC) não cirróticos (ENC), apresentando-se para as diversas combinações o Odds Ratio (OR) com intervalo de confiança de 95% (IC). 70

RESUMO

O desenvolvimento da cirrose hepática alcoólica deve envolver fatores herdáveis, visto que, no máximo 30% dos etilistas a desenvolvem. Assim, é intensa a busca por marcadores genéticos dessa predisposição, focalizando, principalmente os genes envolvidos no metabolismo de xenobióticos, tais como aqueles que codificam as enzimas do glutationo-S-transferase e citocromo P450, que realizam detoxificação e ativação de produtos químicos, respectivamente.

Os genes *GSTT1*, *GSTM1*, *CYP2D6* e *CYP2E1* estão envolvidos no metabolismo do tabaco e do álcool. Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar, por PCR e PCR/RFLP, a distribuição de polimorfismos nesses genes no DNA de uma população miscigenada do estado de São Paulo (Ct, n=226), etilistas-cirróticos (EC, n=136) e etilistas não-cirróticos (ENC, n=74). Todavia, os alelos *CYP2D6**3, *CYP2D6**4 e *CYP2D6**5 foram investigados somente em 46 EC, 49 ENC e 35 Ct. O alelo *CYP2D6**3 ocorreu menos freqüentemente na amostra Ct que naquelas de etilistas ($p < 0,05$). Adicionalmente, a freqüência desse alelo foi de 0,17 na amostra Ct, maior que aquelas descritas para europeus e norte-americanos.

A freqüência de *GSTT1* nulo não diferiu entre as três amostras enquanto o *GSTM1* nulo foi detectado em 52,9% da amostra EC, diferindo significativamente da amostra ENC (37,8%; $p = 0,036$). A presença de ambos os genes prevaleceu na amostra ENC, principalmente entre fumantes ($p = 0,01$), sugerindo que os genes *GSTT1* e *GSTM1* conferem proteção contra a cirrose alcoólica.

Os alelos *CYP2E1**c2 e *CYP2E1**C foram identificados, respectivamente, em 12,8% e 22% da amostra EC. Esses valores não diferiram do observado para a amostra ENC (*CYP2E1**c2 = 10,8% e *CYP2E1**C = 26,8%) nem para a Ct (*CYP2E1**c2 = 14% e *CYP2E1**C = 23,6%). Todavia, quando combinados os genes *GSTT1*, *GSTM1* e *CYP2E1*, a freqüência de seus alelos selvagens foi maior em ENC que em EC (40,8% vs 22,9%; Odds ratio = 2,3; $p = 0,01$). Essa diferença foi amplificada quando foram considerados somente os indivíduos fumantes de ambos os grupos ($p = 0,004$).

Os resultados obtidos no presente estudo sugerem a existência de um efeito sinérgico dos alelos selvagens desses genes na proteção contra a cirrose alcoólica, evidenciando uma interação gene-gene e gene-ambiente na suscetibilidade à essa doença.

ABSTRACT

The development of alcohol-related liver cirrhosis may involve genetic factors since this disease affects around 30% of the alcohol abusers. In this manner, there is an intense search of the genetic biomarkers for cirrhosis susceptibility, focusing on xenobiotics metabolizing genes, such as those codifying for the glutathione-S-transferase and cytochrome P450 enzymes that play a role in chemical detoxification and activation, respectively.

The *GSTT1*, *GSTM1*, *CYP2E1* and *CYP2D6* genes are involved in tobacco and alcohol metabolism. The aim of this study was to investigate, by PCR and PCR/RFLP techniques, the distribution of polymorphisms for these genes in DNA samples of a Sao Paulo State population where miscegenation is a predominant feature (control sample, n=226) and in heavy drinkers with (n=136) and without (n=74) liver cirrhosis. However, the *CYP2D6**3, *CYP2D6**4 and *CYP2D6**5 alleles were only searched in 46 cirrhotics, 49 non-cirrhotic and 35 controls. The *CYP2D6**3 allele was significantly under-represented in the controls, compared to both samples of alcohol abusers ($p < 0.05$). In addition, the frequency of this allele was 0.17 in this control sample, higher than those reported for Europeans and North Americans.

GSTT1 null genotype prevalence was similar in the three groups, while the *GSTM1* null genotype was detected in 52.9% of the cirrhotic and in 37.8% of the non-cirrhotic individuals ($p = 0.036$). The presence of both genes was more frequent in the non-cirrhotic sample, mainly in smokers ($p = 0.01$). This fact suggested that *GSTT1* and *GSTM1* wild type alleles may give protection against alcoholic cirrhosis.

The *CYP2E1**c2 and *CYP2E1**C alleles were detected, respectively, in 12.8% and 22% of the cirrhotic individuals. These frequencies do not differ of those observed in non-cirrhotic alcohol abusers (*CYP2E1**c2 = 10.8% and *CYP2E1**C = 26.8%) or in the control sample (*CYP2E1**c2 = 14% and *CYP2E1**C = 23.6%). Nevertheless, the frequency of the genotypic combination for the wild-type alleles of the *GSTT1*, *GSTM1* and *CYP2E1* genes was higher in the non-cirrhotic group than in the cirrhotic one (40.8% versus 22.9%; odds ratio=2.3; $p = 0.01$). This difference was increased when only smokers from these two groups were compared ($p = 0.004$).

The present study puts forward for consideration a protective and synergistic effect of the wild-type alleles of these genes concerning alcoholic cirrhosis, making clear a gene-gene and an environmental-gene interaction when the cirrhosis susceptibility is taken in account.

I- INTRODUÇÃO

O consumo de álcool é extremamente heterogêneo entre os diversos países do mundo, sendo influenciado por hábitos culturais e religiosos. O consumo médio mundial é de 9 gramas de etanol por pessoa por dia, equivalendo-se a 3% do total necessário de energia. O menor consumo, inferior a 1% da energia diária, é registrado em alguns países de baixa renda na Ásia, Oriente Médio e Norte da África, enquanto os maiores consumos são registrados na Europa, em países como França, Itália e Portugal, onde o consumo de álcool corresponde a cerca de 10% da energia diária.

Em geral, a maior parte do álcool é ingerida por homens e seu consumo em sub-grupos de uma população pode variar de zero a 25% da energia diária, este último nível caracterizando os abusadores de álcool ou etilistas, que fazem uma ingestão crônica diária de cerca de 70g de álcool, o que corresponde a cerca de dois litros de cerveja, uma garrafa de vinho ou quatro doses de destilados como cachaça e uísque (WORLD CANCER RESEARCH FUND & AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH, 1997).

O uso crônico ou esporádico do álcool tem efeito imediato sobre o comportamento humano, existindo uma correlação linear entre seu consumo e o risco para mortes por causas violentas, como suicídio, homicídio e acidentes, aumentando o índice de mortalidade para 3,6 vezes maior que o esperado (PELL & D'ALONZO, 1973). Esse composto também promove efeitos metabólicos e fisiológicos no indivíduo. Como consequência, diante de uso crônico de álcool praticamente todos os sistemas de órgãos humanos sofrem o efeito tóxico do álcool, de modo que o etilismo está fortemente associado ao desenvolvimento de inúmeras doenças crônicas que afetam o fígado, o sistema cardiovascular, podendo ainda promover neuropatias, encefalopatias, desnutrição e câncer (MONSON & LYONS, 1975; SHERLOCK, 1982).

O metabolismo do etanol fornece 7,1 kcal/g, portanto, em etilistas é habitual a dieta de baixo valor nutritivo e calórico promovendo a desnutrição primária.

Adicionalmente, observa-se a desnutrição secundária por má-digestão e má-absorção, que são conseqüências diretas da ação do etanol sobre a mucosa gastrintestinal (MEZEY, 1978; LIEBER & DE CARLI, 1991; CAREGARO *et al.*, 1996), de modo que a desnutrição protéica é observada na grande maioria dos etilistas avaliados. Durante muitos anos acreditou-se que as hepatopatias em indivíduos etilistas fossem devidas exclusivamente à desnutrição, mas pesquisas têm revelado que a essa condição nutricional pode-se atribuir o agravamento do quadro da hepatopatia e não a sua origem (CAREGARO *et al.*, 1996).

Apesar dos estudos experimentais não comprovarem o efeito carcinogênico do álcool, as evidências epidemiológicas são tão fortes que a “International Agency for Research on Cancer” (IARC, 1988) classificou o álcool como agente carcinogênico do grupo 1¹ para câncer de boca, faringe, laringe, esôfago e fígado (por meio da cirrose). Além desses, a IARC conclui também que é provável o aumento do risco para câncer de cólon, reto e mama e possível para câncer de pulmão.

O efeito do álcool sobre o risco do câncer de fígado é bastante sutil, mas a cirrose hepática é comum em etilistas e é considerada uma condição pré-neoplásica, *per se*, pelo nível de desorganização celular e alterações moleculares induzidas. O câncer de fígado é identificado em 5 a 10% dos portadores de cirrose alcoólica, mas em geral há associação com vírus de hepatite. Todavia, em países onde é baixa a freqüência de hepatite viral torna-se óbvia a associação entre o abuso de álcool e o câncer de fígado (WHO, 1983; QIAO *et al.*, 1988). Alguns autores sugerem o álcool como co-carcinógeno para os vírus da hepatite e outros xenobióticos - substâncias estranhas ao organismo, incluindo poluentes ambientais, drogas e insumos agrícolas (FISHER *et al.*, 1974; SCHOTTENFELD, 1979; BRÉCHOT *et al.*, 1982).

¹A IARC estabeleceu critérios que combinam dados experimentais e epidemiológicos para avaliar o potencial carcinogênico para o homem de compostos químicos específicos. Esses compostos são classificados como: **grupo 1**, carcinogênico; **grupo 2A**, provavelmente carcinogênico; **grupo 2B**, possivelmente carcinogênico; **grupo 3**, não classificável; **grupo 4**, provavelmente não carcinogênico.

I.1- Cirrose Hepática Alcoólica

Existem três formas anátomo-clínicas da doença hepática alcoólica que não são mutuamente excludentes: esteatose, hepatite e cirrose. A esteatose é o acúmulo de gordura no fígado após o uso de etanol, geralmente conduzindo à hepatomegalia. É a primeira alteração no fígado, visível ao microscópio óptico, aparecendo rapidamente após o uso abusivo do álcool, sendo reversível cessando-se o estímulo. Apesar dessa reversibilidade característica, a esteatose, quando extensa, provoca alterações metabólicas e ultraestruturais no hepatócito que podem ser irreversíveis (LIEBER, 1975). Essas mesmas alterações ultraestruturais podem ser observadas na hepatite alcoólica, uma entidade de maior gravidade caracterizada ainda pela presença de necrose e inflamação no tecido hepático (SHERLOCK & DOOLEY, 1997).

A cirrose hepática é considerada a fase final e irreversível da hepatopatia alcoólica, e é caracterizada, anatomicamente, pela presença de nódulos que se projetam do fígado apresentando a cor marrom-amarelado, daí a sua denominação derivada do grego *kirrhos*, que denomina essa cor. A cirrose pode ser definida como um fibrose hepática disseminada com formação de nódulos, sendo um fenômeno que se segue à necrose de hepatócitos por causas diversas, incluindo as injúrias por agentes biológicos ou químicos.

Inicialmente, a exposição do tecido hepático a um agente agressor promove um aumento na síntese e deposição de proteínas da matriz extracelular como colágenos, proteoglicanos, fibronectina, laminina e elastina. Se essa agressão for crônica, os fibroblastos tomarão o lugar dos hepatócitos mortos intensificando a síntese e deposição das proteínas da matriz extracelular, principalmente colágenos, preenchendo o fígado com tecido conjuntivo. Assim, a fibrose progride para o estágio irreversível: a cirrose.

A evolução de um quadro de esteatose à cirrose alcoólica pode não necessariamente passar pelo estágio de hepatite, como sugerido por NAKANO *et al.* (1982) e WORNER & LIEBER (1985), que descreveram uma nítida progressão à cirrose

em indivíduos que apresentavam esteatose, acompanhados por biópsias repetidas, sem sinais evidentes de hepatite alcoólica. Todavia, essa hipótese é bastante questionada, pois tanto a necrose dos hepatócitos quanto a reação inflamatória, características da hepatite, parecem ser os fatores mais importantes para a fibrose hepática alcoólica (D'ALBUQUERQUE & SILVA, 1990, p.87).

I.1.1- Dados epidemiológicos sobre a cirrose hepática alcoólica

Os principais agentes etiológicos da cirrose são: o etilismo crônico e as hepatites provocadas pelos vírus B e C (HBV e HCV, respectivamente), seguidos pela colestase prolongada, insuficiência cardíaca com obstrução da veia supra-hepática, hemocromatose e outras anomalias de metabolismo. A associação do alcoolismo com a cirrose hepática foi primeiramente reconhecida na Europa por Matthew Baillie, em 1793 (*apud* SHERLOCK & DOOLEY, 1997), e hoje é indubitável, havendo uma forte associação entre o percentual e o perfil de abusadores de álcool numa população e a ocorrência de cirrose alcoólica. Um exemplo clássico foi observado na França, entre 1941 e 1947, quando houve um intenso racionamento de vinho reduzindo o consumo *per capita* de cinco para um litro por semana, com posterior redução maior que 50% na mortalidade por cirrose (PEQUIGNOT & CYRULNIK, 1970 *apud* SHERLOCK, 1978).

Dentre os males que o álcool pode induzir no organismo do seu abusador, a cirrose não é a mais freqüente, porém, é o quadro de maior incidência nos ambulatórios de gastroenterologia, denotando a sua capacidade de debilitar o indivíduo, constituindo-se numa das principais causas de morte na faixa etária de 45 a 64 anos de idade (VAILLANT, 1999). A cirrose hepática alcoólica pode permanecer assintomática, dita compensada, por um período variável, podendo ser casualmente diagnosticada nesse período em exames de rotina ou durante uma intervenção cirúrgica efetuada por outra condição. Ainda é desconhecido o mecanismo pelo qual um fígado cirrótico torna-se descompensado conduzindo o paciente a um quadro de

debilidade geral, com febre discreta e contínua (37,5 a 38°C), perda de peso, fadiga muscular, problemas gastrintestinais, edema de membros inferiores e abdome, quando usualmente o paciente procura tratamento médico. Sob terapêutica adequada, a cirrose pode reverter-se ao estado compensado ou ter sua progressão controlada; porém, em um estudo prospectivo CHEDID *et al.* (1991) observaram que em dois anos mais que a metade dos pacientes com cirrose foram à óbito, assim como dois terços daqueles com cirrose acompanhada de hepatite alcoólica, indicando o mau prognóstico dessa doença.

I.2- O Metabolismo do Álcool e a sua Hepatotoxicidade

O álcool penetra facilmente em todos os tecidos do corpo, afetando muitas funções vitais, porque é uma molécula pequena e solúvel tanto em água quanto em lipídios. O etanol é absorvido no trato gastrintestinal e somente 2-10% são eliminados pelos rins e pulmões, sendo o restante oxidado no corpo, principalmente no fígado, pois apenas uma pequena fração é metabolizada em tecido extrahepático, como acontece no estômago.

Os hepatócitos contêm três principais vias de metabolismo do etanol localizadas em diferentes compartimentos subcelulares: (1) a via da álcool desidrogenase (ADH), no citosol; (2) o sistema de oxidação microssomal do etanol (MEOS) localizado no retículo endoplasmático e representado pelo citocromo P450; (3) a via da catalase, localizada nos peroxissomos (LIEBER, 1991). Esta última enzima é capaz de oxidar o álcool *in vitro* na presença de um sistema gerador de peróxido (H_2O_2); todavia, sob condições fisiológicas, parece não ter participação no metabolismo do álcool (INATOMI *et al.*, 1989).

Um esquema simplificado da oxidação do etanol é apresentado na Figura 1, enquanto na Figura 2 podem ser visualizadas outras rotas metabólicas que podem ser

influenciadas por esse metabolismo, conduzindo a alguns dos distúrbios observados em etilistas.

A principal via de metabolismo do etanol envolve a ADH, uma enzima que catalisa a oxidação do etanol transferindo um hidrogênio para o dinucleotídeo de adenina nicotinamida (NAD), reduzindo-o a NADH e gerando o acetaldeído, um metabólito altamente tóxico. A ADH é sintetizada principalmente no fígado, porém há uma elevada concentração no tecido gástrico, que diante da ingestão de pequenas quantidades de bebida alcoólica (consumo social), funciona como uma primeira barreira protetora contra um efeito sistêmico do álcool. O fígado é o segundo órgão atingido pelo etanol, sendo o seu principal metabolizador. Aqui também, a ADH é a via natural de metabolização do etanol.

O acetaldeído produzido é rapidamente transformado em acetato, pela ação da enzima mitocondrial aldeído desidrogenase (ALDH), gerando também o NADH. Todavia, em etilistas tem-se um desequilíbrio completo desse sistema: a primeira barreira contra o efeito do álcool (ADH gástrica) tem sua síntese extremamente reduzida pelo consumo crônico desse composto (DI PADOVA *et al.*, 1987; FREZZA *et al.*, 1990). Assim, mais álcool chega ao fígado e nessa condição (uso crônico), a principal via de oxidação do etanol passa a ser o MEOS, representado pela enzima citocromo P450 2E1 (CYP2E1), que, diante do consumo social de álcool responde pelo metabolismo de apenas 10% desse composto.

Não é questionável que a CYP2E1 seja induzida pelo etanol, porém, existem três possíveis mecanismos para explicar o aumento dessa proteína associada ao uso crônico do etanol: (1) o gene *CYP2E1* tem sua transcrição induzida direta ou indiretamente pelo etanol; (2) há aumento da estabilidade do seu RNA mensageiro (RNAm) ou (3) há aumento da estabilidade protéica, em virtude da proteção fornecida pelos substratos contra a degradação (ELIASSON *et al.*, 1992; TAKAHASHI *et al.*,

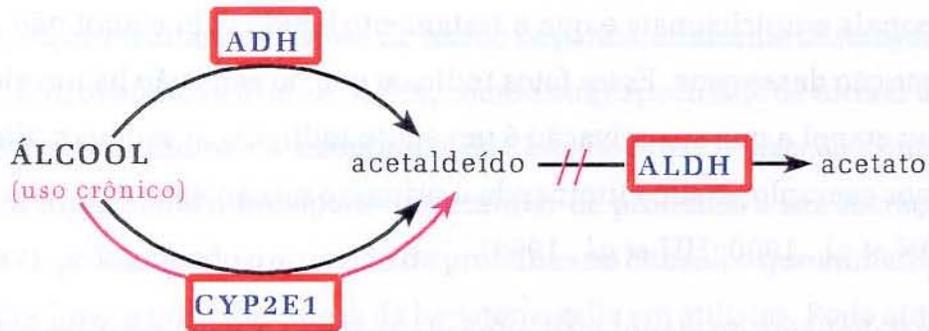


FIGURA 1: Principais vias de oxidação do etanol nos hepatócitos: ADH e CYP2E1.

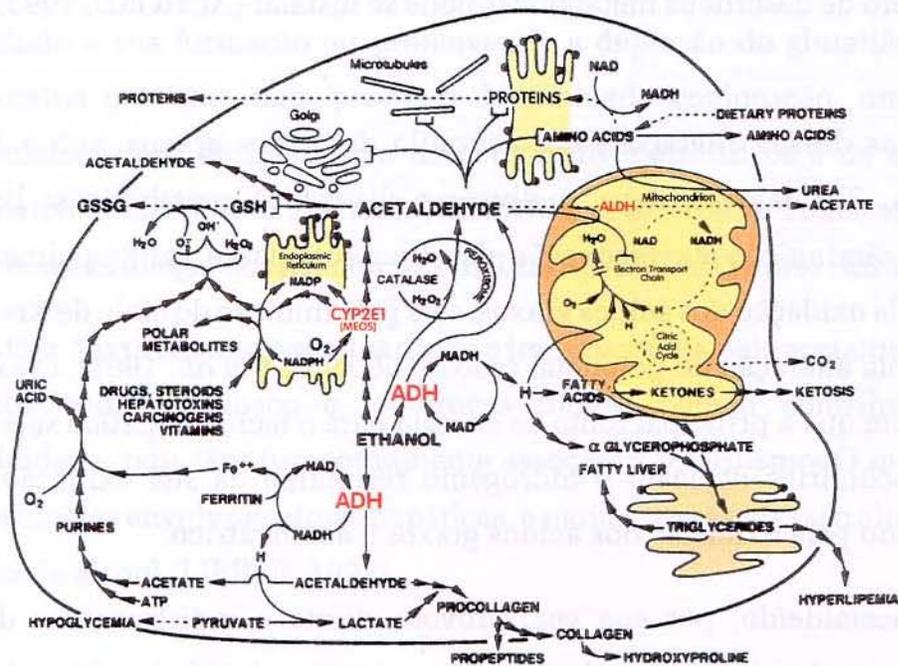


FIGURA 2: Oxidação do etanol no hepatócito, ressaltando-se alguns metabólitos gerados, os quais estão associados a efeitos tóxicos do metabolismo oxidativo do etanol: o excesso de NADH mediado pela ADH, a geração de compostos polares (eletrofílicos) pela CYP2E1 e a produção do acetaldeído principal produto tóxico do referido metabolismo.

----passos deprimidos; →→ vias estimuladas ou ativadas (adaptado de LIEBER, 1994).

1993). Outros trabalhos demonstraram que a expressão do CYP2E1 é influenciada por fatores hormonais e nutricionais e que o tratamento agudo com etanol não altera a taxa de transcrição desse gene. Esses fatos indicam que no gene não há um elemento de resposta ao etanol e que sua ativação é um efeito indireto causado por alterações hormonais, por exemplo, assim eliminando o primeiro mecanismo aqui relacionado (JOHANSSON *et al.*, 1990; HU *et al.*, 1995).

O metabolismo do etanol mediado pela enzima CYP2E1 também resulta na produção de agentes citotóxicos, pois, como resultado bruto, a oxidação do etanol gera acetaldeído e agentes reduzidos, principalmente NADPH, cujo excesso destrói a capacidade dos hepatócitos manterem o potencial redox e, conseqüentemente, um grande número de desordens metabólicas pode se instalar (ACHORD, 1993; LIEBER, 1994).

Um das alterações é o acúmulo de ácidos graxos, sob a forma de triglicerídios. Tal fato se deve a diversos distúrbios metabólicos: lipogênese aumentada, diminuição da renovação das lipoproteínas e, principalmente, pela diminuição da oxidação dos ácidos graxos, seja pela inibição do ciclo de Krebs (ácido cítrico) ou pela alteração do potencial redox (GRUNNET *et al.*, 1985). O excesso de NADH faz com que a principal fonte de energia para o tecido hepático seja o etanol, pois as mitocôndrias utilizam o hidrogênio resultante da sua oxidação, em vez daquele gerado pela oxidação dos ácidos graxos e ácido cítrico.

O acetaldeído, por sua vez, provoca direta e indiretamente distúrbios funcionais e estruturais no hepatócito, e seu excesso no tecido hepático de etilistas é explicado tanto pela sua produção aumentada como pelo decréscimo do seu metabolismo, um reflexo da diminuição da atividade da ALDH que, por sua vez, é resultado da lesão hepática em si, independente do consumo do álcool (VIDAL *et al.*, 1998). Assim, tem-se caracterizado um ciclo de alterações metabólicas que sempre resultam em maior efeito tóxico para o tecido hepático.

Um dos mais drásticos efeitos tóxicos do acetaldeído é sobre a síntese de colágeno, o que resultará na fibrose do tecido hepático, conforme destacado na Figura 2. Porém, outros efeitos são observados, como a sua capacidade de formar adutos com proteínas e fosfolipídios da membrana dos hepatócitos. A ligação com proteínas, como a tubulina, afeta o transporte intracelular de proteínas e sua secreção (TUMA *et al.*, 1987), promovendo o acúmulo de proteínas no citosol, o que aumenta o volume dos hepatócitos - a principal causa da hepatomegalia em etilistas. Pode ainda resultar em inativação enzimática, como observado para a glicose-6-fosfato desidrogenase (MAUCH *et al.*, 1986). A ligação do acetaldeído com fosfolipídios da membrana plasmática altera antígenos de superfície prejudicando respostas imunológicas. O acetaldeído aumenta diretamente a concentração de radicais livres nos hepatócitos, seja induzindo a sua formação ou promovendo a depleção do glutatião reduzido (GSH), proteína que atua num processo denominado conjugação, um dos mais eficientes mecanismos de inativação de compostos eletrofílicos e de espécies de oxigênio reativo (SHAW *et al.*, 1983; LOGUERCIO *et al.*, 1993). Todos esses efeitos comprometem a fisiologia dos hepatócitos (HILLS & WESTABY, 1997; LIEBER, 1997).

Além dos problemas gerados direta e indiretamente pelo acetaldeído, outros xenobióticos como o tabaco e as drogas ilícitas podem contribuir para a hepatotoxicidade, pois têm uso comumente associado ao etilismo. O metabolismo dessas substâncias envolve enzimas hepáticas, e muitas dessas vias são alteradas pelo uso crônico de álcool (LIEBER, 1997).

I.2.1- Interação do metabolismo do álcool com outros compostos

A indução do *CYP2E1* parece ser uma resposta adaptativa à ingestão crônica do etanol e, da mesma forma, os etilistas tendem a desenvolver tolerância a várias outras drogas, como o foi demonstrado para isoniazida, rifampicina, fenitoína, propranolol e diazepam, que têm a meia-vida reduzida em abusadores de álcool (GRASSI & GRASSI, 1975; SELLMAN *et al.*, 1975; SOTANIEMI *et al.*, 1981).

Os metabólitos gerados pela ação das enzimas do MEOS são, em geral, mais tóxicos que os seus precursores. Pelo fato da CYP2E1 ser uma enzima que atua na ativação de inúmeros compostos genotóxicos e ser álcool-induzida, há exposição dos hepatócitos a danos provocados pelo aumento da toxicidade inerente a outros substratos ou indutores dessa enzima. Essa condição foi descrita para anestésicos tais como o enflurano e o halotano (TAGAKI *et al.*, 1983; TSUTSUMI *et al.*, 1990) e fármacos como isoniazida, paracetamol e fenilbutazona (BESKID *et al.*, 1980; SEEFF *et al.*, 1986). Alguns solventes industriais, como o tetracloreto de carbono e alguns derivados de benzeno, têm sua toxicidade aumentada em etilistas (HETU *et al.*, 1983; SIEGERS *et al.*, 1983). Essas substâncias, normalmente consideradas inócuas para a população geral, podem tornar-se hepatotóxicas para etilistas.

O etilismo está, muito freqüentemente, associado ao tabagismo e algumas nitrosaminas presentes na fumaça do cigarro são ativadas a carcinógenos pela CYP2E1 (YOO *et al.*, 1988). Adicionalmente, a indução do CYP2E1 pelo etanol promove um aumento simultâneo de outras enzimas que promoverão a ativação de carcinógenos, como observado para a hidroxilase de benzo[a]pireno no intestino delgado (SEITZ *et al.*, 1978). Esses fatos podem justificar a ação sinérgica do álcool com xenobióticos, principalmente o cigarro, na etiologia de diversos cânceres como de esôfago e intestino (TUYNS *et al.*, 1982; TUYNS, 1983).

I.3- Suscetibilidade à Cirrose Alcoólica

Existe uma clara associação entre a ingestão de álcool e o desenvolvimento de hepatopatia alcoólica, mas nem o tempo de consumo do álcool tampouco o histórico da quantidade de álcool ingerida explica por que apenas de 17 a 30% daqueles que ingerem grande quantidade de álcool desenvolvem a cirrose alcoólica. Assim, é notável que outros fatores exógenos, como vírus e nutrição, bem como endógenos, incluindo imunocompetência e características genéticas, atuem na etiologia dessa doença.

Dentre os fatores endógenos, não existe dúvida que há diferença na suscetibilidade à cirrose entre os sexos. Em números absolutos, a proporção sexual entre os portadores de cirrose alcoólica é de dois homens para cada mulher. Contudo, as mulheres são mais suscetíveis a essa hepatopatia pois a dose cirrogênica média de álcool é menor em mulheres: estima-se que a ingestão diária de 20g de álcool aumenta significativamente o risco para a cirrose alcoólica em mulheres, enquanto para homens essa dose é de 40 a 60g diárias (PEQUIGNOT *et al.*, 1978). Esse fato pode ser explicado por diferenças fisiológicas nas enzimas do metabolismo do álcool, como a menor atividade da ADH gástrica em mulheres, especialmente antes dos 50 anos de idade (FREZZA *et al.*, 1990; SEITZ *et al.*, 1993).

As infecções pelos vírus HCV e HBV também conferem suscetibilidade diferencial à cirrose alcoólica, pois esses agentes exibem um efeito sinérgico ao álcool, acelerando o desenvolvimento das hepatopatias crônicas, incluindo o hepatocarcinoma (SHERMAN & WILLIAMS, 1994).

A suscetibilidade genética à cirrose alcoólica tornou-se evidente quando, em estudos com grandes amostras de pares de gêmeos, foi demonstrada uma taxa de concordância para a cirrose alcoólica cerca de três vezes maior para monozigóticos que para dizigóticos (HRUBEC & OMENN, 1981; REED *et al.*, 1996). O trabalho pioneiro estimulou um grande número de pesquisas objetivando identificar os genes envolvidos na suscetibilidade às doenças hepáticas álcool-induzidas. Desde então, muitos genes têm sido objeto de intensa investigação, sendo os principais aqueles envolvidos no metabolismo do álcool, visto que esse processo está submetido à ação de inúmeras enzimas, e muitas dessas são polimórficas na população humana.

I.4- Polimorfismos Genéticos

Classicamente, **polimorfismo** é definido como um traço mendeliano que existe numa população em no mínimo dois fenótipos, nenhum dos quais ocorre em frequência menor que 1% (VOGEL & MOTULSKY, 1986).

Durante décadas as proteínas foram o principal objeto de estudos dos polimorfismos genéticos. Todavia, com o advento das técnicas de biologia molecular, principalmente a reação em cadeia da polimerase (PCR) e o seqüenciamento, o DNA tornou-se o principal alvo desses estudos (GYLLENSTEN & ERLICH, 1988; SAIKI *et al.*, 1988; HIGUCHI & OCHMAN, 1989).

A grande maioria das alterações na seqüência de nucleotídios do DNA é de caráter neutro, do ponto de vista adaptativo, pois apresentam-se em regiões não codificadoras e, portanto, não conduzem a alterações fenotípicas. Todavia, podem inserir ou remover sítios de reconhecimento das enzimas de restrição e assim possibilitam a sua identificação através do polimorfismo no tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP). Essas técnicas moleculares, que analisam o genótipo, conduziram à ampliação da definição de polimorfismo genético pela inclusão das variantes alélicas neutras.

Hoje, quando estão sendo desenvolvidos projetos para o seqüenciamento genômico de diversos organismos, tornou-se óbvia a intensa plasticidade do DNA pela identificação de uma enorme gama de alelos polimórficos. Assim, procedeu-se a uma intensa busca pela caracterização de populações quanto a esses polimorfismos, tendo sido descritas distribuições diferenciais considerando-se as diversas categorias taxonômicas e, na espécie humana, envolvendo agrupamentos étnicos, como caucasóides, negróides e ameríndios, dentre outros.

Na espécie humana, além dos estudos descritivos populacionais, é crescente o interesse pelo estudo dos polimorfismos gênicos na tentativa de decifrar a

variabilidade individual ou populacional na suscetibilidade às doenças, principalmente ao câncer.

O desenvolvimento de câncer em um indivíduo, com raras exceções, depende da complexa interação entre fatores genéticos e ambientais. Assim considerando, KNUDSON *et al.* (1985) sugeriram que a população humana poderia ser dividida em quatro oncodemes (unidade demográfica com sensibilidade peculiar para um câncer específico), de acordo com a contribuição relativa do ambiente e da genética para o risco de desenvolver câncer. Esses oncodemes seriam: (1) espontâneo, onde o câncer ocorreria por mutações casuais na população normal; (2) ambiental, pela ação exclusiva de carcinógenos ambientais (como produtos químicos, radiação e vírus) sobre o genoma da população normal; (3) ambiental/genético, quando há suscetibilidade genética a agentes ambientais; e (4) genético, quando há uma predisposição genética ao desenvolvimento do câncer.

Os indivíduos pertencentes ao 4^o oncodeme estão geneticamente **predispostos** a desenvolver um tipo particular de câncer e têm um alto risco de fazê-lo em algum estágio de suas vidas, independente do ambiente. Todavia, apenas 5% dos casos de câncer exibem um padrão de herança familiar. Por outro lado, existe um grupo muito maior de pessoas compondo o 3^o oncodeme, que comparativamente tem menores chances para o desenvolvimento de neoplasias, mas seus riscos ainda são mais elevados que os da população geral, pois respondem drasticamente à ação do ambiente. Esses são ditos **suscetíveis** (PONDER, 1990). Assim, a precisa identificação de marcadores de suscetibilidade é de fundamental importância na predição de riscos.

Em 1987, o Conselho Norte-americano de Pesquisa, definiu três tipos de marcadores disponíveis para os estudos em sistemas biológicos: (1) **marcadores de exposição**, que medem a quantidade de xenobióticos a que os indivíduos estão expostos; (2) **marcadores de efeito**, que indicam a presença de doenças ou precursores de doenças; e (3) **marcadores de suscetibilidade**, que indicam indivíduos

ou populações com diferenças biológicas capazes de afetar a resposta do organismo a agentes ambientais (EUBANKS, 1994).

O princípio básico dos **marcadores de suscetibilidade** reside na diferença inter-individual que confere graus de sensibilidade a doenças induzidas pelo ambiente. Esses marcadores podem incluir características genéticas, diferenças no metabolismo ou a capacidade diferencial de um órgão se recuperar de agressões ambientais (NEBERT *et al.*, 1996).

Existem três grupos principais de marcadores de suscetibilidade. Um primeiro grupo reflete diferenças genéticas na capacidade das células repararem lesões no DNA causadas por agentes ambientais; um segundo grupo diz respeito à defeitos genéticos pré-existentes que aumentam o risco de câncer e o terceiro grupo, baseia-se no fato de que muitos produtos químicos são alterados por enzimas e essas modificações podem aumentar ou diminuir a habilidade dessas substâncias interagirem com DNA, RNA ou proteínas. Assim, o balanço entre as enzimas que aumentam a toxicidade ou inativam os produtos químicos pode conferir sensibilidade individual diferenciada (EUBANKS, 1994).

O metabolismo de xenobióticos, em geral, ocorre em duas fases: fase I (ativação) e fase II (inativação ou detoxificação). As enzimas metabolizadoras de drogas da fase I, principalmente representadas pela superfamília CYP, usualmente introduzem um ou mais grupos hidroxilas no substrato, tornando-o eletrofílico. Dessa forma, um procarcinógeno pode ser transformado em carcinógeno, como o benzo[a]pireno que é convertido em epóxido de benzo[a]pireno. Em contraponto, as enzimas de conjugação da fase II, como as glutatíon-S-transferases (GST) e N-acetiltransferases (NAT), atuam sobre os produtos da fase I ou qualquer outro composto que já tenha um grupamento funcional, gerando produtos hidrofílicos que podem ser facilmente excretados (NEBERT *et al.*, 1996).

A superfamília de genes *CYP* agrupa genes para mais de 100 isoenzimas, algumas necessárias ao metabolismo oxidativo (biossíntese e degradação) de

esteróides, ácidos graxos, prostaglandinas. Além disso, essas enzimas também metabolizam um incontável número de compostos, convertendo-os em substâncias eletrofílicas, sendo muitas delas genotóxicas e/ou carcinogênicas (NEBERT & GONZALEZ, 1987; SCHUSTER, 1989).

Devido à importância do papel das proteínas CYP na ativação metabólica de inúmeros procarcinógenos, extensivas pesquisas têm sido concentradas na relação entre a distribuição de variantes polimórficas de diferentes isoenzimas CYP e a suscetibilidade ao câncer. Dentre essas pesquisas encontram-se aquelas que focalizam os genes *CYP2D6* e *CYP2E1*.

I.4.1- *CYP2D6*

O polimorfismo genético relacionado ao metabolismo da droga anti-hipertensiva debrisoquina foi o primeiro descrito para um gene da superfamília CYP, o gene *CYP2D6*, que codifica a debrisoquina 4-hidroxilase e localiza-se em 22q13.1 (GOUGH *et al.*, 1993).

A enzima CYP2D6, além de metabolizar a debrisoquina, está envolvida no metabolismo de nitrosaminas, dentre outros compostos químicos a que o homem se expõe largamente e que se encontram associados à origem tumoral, como a nitrosamina 4-(metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1-butanona ou NNK (CRESPI *et al.*, 1991; GONZALEZ & IDLE, 1994). De acordo com a capacidade de metabolizar a debrisoquina, os indivíduos de uma população podem ser classificados em metabolizadores fracos (“poor metabolizer”, PM), metabolizadores intensos (“extensive metabolizer”, EM) e ultra-rápidos metabolizadores (“ultrarapid metabolizer”, UM) (MAHGOUB *et al.*, 1977; JOHANSSON *et al.*, 1993).

O loco CYP2D6 é altamente polimórfico e geralmente consiste de uma cópia ativa do gene e dois pseudogenes *CYP2D7P* e *CYP2D8P* (HEIM & MEYER, 1992). Todavia, o fenótipo UM caracteriza-se pela presença de duas a cinco ou treze cópias

ativas do referido gene (AKLILLU *et al.*, 1996). Análises moleculares, incluindo RFLP, permitiram a descrição de mais de 65 alelos, sendo três comumente associados ao fenótipo PM: (1) o alelo CYP2D6*4, responsável por até 80% dos fenótipos PM e que exibe uma transição $^{1934}G \rightarrow A$, causando um defeito de “splicing” (HANIOKA *et al.*, 1990); (2) o alelo CYP2D6*3, que apresenta uma deleção do nucleotídeo ^{2637}A no exon 5, gerando um erro por deslocamento na matriz de leitura (KAGIMOTO *et al.*, 1990); e (3) o alelo CYP2D6*5, onde há uma deleção completa do referido gene (GAEDIGK *et al.*, 1991). Esses, juntamente com alguns outros alelos descritos para o CYP2D6, estão listados na Tabela 1, citando-se mutações características dos mesmos, destacando-se aquelas que promovem o efeito sobre o metabolismo.

Alguns autores têm sugerido que há distribuição étnica diferencial para alguns alelos do gene CYP2D6, como o CYP2D6*3 e CYP2D6*4, que são os mais freqüentemente associados ao fenótipo PM em caucasóides e extremamente raros em asiáticos (BROLY *et al.*, 1991; DAHL *et al.*, 1995). Esses dados coincidem com a freqüência do fenótipo bioquímico PM que entre europeus ou brancos-americanos é bem maior (7,5%) que aquela, de até 2%, observada nas populações asiáticas e de afro-americanos (HORAI *et al.*, 1989; ALVAN *et al.*, 1990; BERTILSSON *et al.*, 1992; EVANS *et al.*, 1993).

Adicionalmente, há sugestões de freqüências diferenciais desses alelos em outros grupos populacionais, tais como portadores de neoplasias, demonstrando-se uma associação entre o fenótipo EM e o risco aumentado para alguns tipos de câncer, principalmente pulmão (HIRVONEN *et al.*, 1992; EL-ZEIN *et al.*, 1997).

Tabela 1: Nomenclatura de alelos CYP2D6, mutação original e seu efeito sobre o metabolismo.

Alelo	Nome trivial	Mutação	Efeito sobre o metabolismo
CYP2D6*1A	selvagem	nenhuma	nenhum
CYP2D6*1B	idem	G3916A (não altera o AA)	nenhum
CYP2D6*2	CYP2D6L	G1749C; C2938T ; G4268C	diminuição no metabolismo <i>in vivo</i>
CYP2D6*3	CYP2D6A	deleção A2637	ausência de metabolismo da debrisoquina e esparteína
CYP2D6*4	CYP2D6B	C188T; C1062A; A1072G; C1085G; G1749C; G1934A ; G4268C (splicing defect)	idem
CYP2D6*5	CYP2D6D	deleção do gene CYP2D6	(não há síntese de proteína)
CYP2D6*6	CYP2D6T	deleção T1795 (frameshift)	ausência de metabolismo da debrisoquina e esparteína <i>in vivo</i>
CYP2D6*8	CYP2D6G	G1749C; G1846T ; G4268C (non sense)	idem
CYP2D6*9	CYP2D6C	deleção A2701-A274	deleção de um AA, mas sem efeito sobre o cDNA nem sobre o metabolismo da debrisoquina e esparteína
CYP2D6*12	CYP2D6F	G212A ; G1749C; C2938T; G4268C (missense)	ausência de metabolismo da esparteína <i>in vivo</i>
CYP2D6*13		quimera Ex1 CYP2D7:Ex 2-9 CYP2D6 (frameshift)	ausência de metabolismo do dextrometorfan <i>in vivo</i>

Quando mais de uma mutação foi descrita para um determinado alelo, aquela em negrito é responsável pelo efeito metabólico (modificada de WORMHOUDT *et al.*, 1999).

I.4.2- *CYP2E1*

O gene *CYP2E1*, localizado em 10q24-3-qter, é o mais conservado dos genes das isoformas CYP2. Existe uma única cópia no genoma humano, bem como em ratos e camundongos, enquanto os coelhos apresentam duas cópias similares. A atividade catalítica da *CYP2E1* é bastante similar entre as espécies, sugerindo que essa é uma enzima com atividade no metabolismo de algum composto fisiologicamente importante (GONZALEZ, 1992).

Esse gene tem a transcrição induzida pelo etanol e seu produto (dimetilnitrosamina desmetilase) está envolvido no metabolismo oxidativo do próprio etanol, bem como de inúmeros carcinógenos ambientais, como as nitrosaminas, o benzeno e o cloreto de vinila. A *CYP2E1* também promove a oxidação de drogas medicamentosas, como alguns agentes anestésicos e a isoniazida, e drogas não-medicamentosas, como a cocaína (revisto por LIEBER, 1997). Assim, a indução do *CYP2E1* pelo etanol pode interferir na ativação de carcinógenos, que por sua vez podem atuar promovendo neoplasias em diversos órgãos.

Com a utilização das enzimas de restrição foram descritos diferentes alelos para o *CYP2E1*, como os alelos *CYP2E1**c2 e *CYP2E1**C (Tabela 2). O *CYP2E1**c2 é resultante de uma transição $^{-1019}\text{G}\rightarrow\text{C}$ na região promotora do referido gene, que insere um sítio para a enzima *Pst*I. Essa mutação encontra-se em completo desequilíbrio de ligação com a transversão $^{-1259}\text{G}\rightarrow\text{C}$, que ocorre na mesma região e remove um sítio para *Rsa*I (WATANABE *et al.*, 1990). Ambas promovem o mesmo efeito sobre a transcrição, ou seja, mudam a ativação transcricional do gene. HAYASHI *et al.* (1991) detectaram dez vezes mais RNAm em homozigotos *CYP2E1**c2 que nos homozigotos para o alelo alternativo *CYP2E1**c1. Esses achados foram confirmados em hepatócitos humanos, obtidos por biópsia, quando TSUTSUMI *et al.* (1994a) detectaram três vezes mais RNAm em heterozigotos que nos homozigotos *CYP2E1**c1.

Tabela 2: Principais características dos alelos CYP2E1*c1 e CYP2E1*D.

	Alelos selvagens	
	CYP2E1*c1	CYP2E1*D
mutação	⁻¹⁰¹⁹ G→C	⁷⁷⁶⁶ A→T
alelo raro	CYP2E1*c2	CYP2E1*C
enzima de reconhecimento	<i>Pst</i> I (+) ou <i>Rsa</i> I (-)	<i>Dra</i> I (+)
efeito funcional	muda a ativação transcricional do gene ^b	associado à maior formação de adutos de DNA ^c

^aNEBERT *et al.* (1999) propuseram uma nomenclatura padronizada para alelos polimórficos de enzimas metabolizadoras de drogas, onde os alelos CYP2E1*c2 e CYP2E1*C passam a denominar-se CYP2E1*5b e CYP2E1*6, respectivamente, e suas formas alternativas correspondem ao alelo “wt” (wild type).

^bHAYASHI *et al.*, 1991 e TSUTSUMI *et al.*, 1994a.

^cKATO *et al.*, 1995.

Um outro RFLP gerado pela perda de um sítio *Dra*I no íntron 6 do *CYP2E1* (⁷⁷⁶⁶A→T) permite a identificação dos alelos CYP2E1*D (selvagem) e CYP2E1*C (raro). Análises específicas em portadores do alelo CYP2E1*C não identificaram qualquer alteração estrutural ou funcional na enzima correspondente, mas há indícios de alteração na expressão gênica (UEMATSU *et al.*, 1994). Adicionalmente, o nível de guanina N-(m)etilada foi maior em portadores do alelo CYP2E1*C quando da exposição aos compostos que podem originar tais adutos, como a di(m)etilnitrosamina, presente na fumaça do cigarro (KATO *et al.*, 1995).

Estudos epidemiológicos associam o alelo CYP2E1*D com maior suscetibilidade ao câncer de pulmão em japoneses (UEMATSU *et al.*, 1991, 1994) e havaianos (LE MARCHAND *et al.*, 1998), o que não foi observado para chineses (PERSSON *et al.*, 1999).

No gene *CYP2E1*, o polimorfismo *Pst*I foi o mais estudado e em muitas populações, mas apesar disso, são contraditórios os resultados de pesquisas que

buscam a identificação de variantes de risco para câncer. Diversos autores não observaram frequências alélicas diferenciadas entre portadores de câncer de pulmão e controles (KATO *et al.*, 1992; SUGIMURA *et al.*, 1995; WATANABE *et al.*, 1995; PERSSON *et al.*, 1999). Em contraposição, EL-ZEIN *et al.* (1997) descreveram uma forte associação do alelo CYP2E1*c2 com adenocarcinoma de pulmão em uma população americana, enquanto LE MARCHAND *et al.* (1998) descreveram o inverso para uma população havaiana, ou seja, esse alelo forneceu proteção contra cânceres de pulmão de modo geral.

Essas contradições aparentes podem ser reflexo de distribuição étnica diferencial para os alelos CYP2E1*c2 e CYP2E1*C, sugerida pela sua maior frequência em populações asiáticas que o descrito para caucasóides americanos ou europeus e negros-americanos (KATO *et al.*, 1992; STEPHENS *et al.*, 1994; YU *et al.*, 1995; LE MARCHAND *et al.*, 1998; MORITA *et al.*, 1999).

I.4.3- GST

A família de isoenzimas GST corresponde a um dos mais importantes sistemas de destoxificação do organismo, atuando na fase II do biometabolismo. São enzimas diméricas que catalisam a conjugação entre o glutatião reduzido e compostos eletrofílicos, gerando metabólitos inativos que são facilmente excretados (PICKETT & LU, 1989). As GST também catalisam a redução de peróxidos, contribuindo para a proteção celular contra o estresse oxidativo (MANNERVIK, 1985).

Dentre os agentes carcinogênicos inativados pelas enzimas GST encontram-se os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos presentes na dieta alimentar e na fumaça dos cigarros, os compostos quimioterapêuticos, pesticidas e poluentes ambientais (revisado em WORMHOUDT *et al.*, 1999).

De acordo com o ponto isoelétrico, existem quatro classes de GST citosólicas: alfa (GST2, GSTA), mu (GST1, GSTM1), pi (GST3, GSTP) e teta (GSTT1),

com atividades detectadas em todos os tecidos humanos, cada tecido exibindo um conjunto singular de isoenzimas GST, com diferenças quantitativas e qualitativas. Mas, diferentes células de um mesmo tecido podem exibir diferenças quanto a esse conjunto (HAYES *et al.*, 1991). As enzimas GSTT1 e GSTM1 são sintetizadas principalmente no fígado (JURONEN *et al.*, 1996; WHALEN & BOYER, 1998).

O gene *GSTM1*, localizado no cromossomo 1, é polimórfico na população humana, com dois alelos funcionais (*GSTM1**A e *GSTM1**B) e um alelo com atividade nula (*GSTM1**0), sendo que os alelos funcionais têm a mesma eficácia metabólica (WIDERSTEN *et al.*, 1991). O *GSTT1*, localizado no cromossomo 22, também é polimórfico, apresentando fenótipo nulo por deleção (alelo *GSTT1**0). A deleção em homozigose do gene *GSTM1* é observada em taxas médias de 50%, variando de 20%, em um grupo indígena brasileiro (ARRUDA *et al.*, 1998), a 88% em habitantes da Ilha de Samoa, na Polinésia (LIN *et al.*, 1994). Para o genótipo *GSTT1* nulo, as taxas foram de 10%, em uma população sueca (WARHOLM *et al.*, 1995), a cerca de 60%, em chineses e coreanos (NELSON *et al.*, 1995).

Pelo fato das enzimas *GSTM1* e *GSTT1* catalisarem a conjugação do glutationa com xenobióticos, a sua ausência poderia reduzir a capacidade de um organismo detoxificar metabólitos reativos. Nessa direção, diversos estudos têm detectado uma frequência elevada do fenótipo nulo desse gene em portadores de diferentes neoplasias, tais como câncer de pulmão, coloretal e de bexiga.

I.5- Polimorfismos de Genes do Biometabolismo e as Hepatopatias

As pesquisas de marcadores genéticos da predisposição às hepatopatias alcoólicas têm se concentrado principalmente em genes envolvidos no metabolismo do etanol (*ADH*, *ALDH* e *CYP2E1*), pois todos exibem polimorfismos moleculares. Porém, é escassa a literatura sobre a associação desses polimorfismos e a cirrose alcoólica e, na maioria dos trabalhos, apenas um único loco foi investigado gerando resultados conflitantes, principalmente negativos (POUPON *et al.*, 1992; MAEZAWA

et al., 1994; TSUTSUMI *et al.*, 1994b; CARR *et al.*, 1995; CHAO *et al.*, 1995; AGÚNDEZ *et al.* 1996). Como o álcool produz danos no fígado por diferentes mecanismos, qualquer explicação para uma predisposição genética à cirrose deve envolver diversos genes, incluindo aqueles envolvidos na destoxificação. Alguns grupos investigaram diversos polimorfismos simultaneamente, mas, em geral, o possível risco oferecido por genótipos combinados não foi estimado (HARADA, 1994; LISKER-YOURKOWITZKY *et al.* 1995; LUCAS *et al.*, 1996; TANAKA *et al.* 1996; RODRIGO *et al.*, 1999).

O conjunto de resultados contraditórios sobre a suscetibilidade genética ao câncer e às hepatopatias, demonstra a complexidade da questão, pois a identificação de um genótipo desfavorável pode ser mascarada pela presença de um outro, não considerado, mas também envolvido em metabolismo ou no reparo de lesões nas biomoléculas. Assim, é fundamental intensificar as pesquisas para a precisa identificação dos marcadores de suscetibilidade à toxicidade e doenças, desempenhando papel relevante no campo da saúde pública e da medicina preventiva.

II- OBJETIVOS

São objetivos específicos deste projeto:

- 1- determinar a frequência de alelos polimórficos dos genes *GSTM1*, *GSTT1*, *CYP2E1* e *CYP2D6* em uma população-referência do sudeste do Brasil;
- 2- determinar a frequência desses alelos polimórficos em indivíduos etilistas portadores ou não de cirrose hepática alcoólica,;
- 3- investigar a associação de variáveis genéticas e ambientais na etiologia dessa doença;
- 4- determinar se alelos das famílias CYP e GST podem ser utilizados como marcadores de risco para a cirrose alcoólica na população investigada.

III- CASUÍSTICA

A população-referência da região sudeste do Brasil, foi composta por 197 homens e 29 mulheres, com idades entre 19 e 70 anos ($\bar{x}=40,9$; $s=11,8$)², estudantes e funcionários da UNICAMP (Universidade Estadual de Campinas) e da UNESP (Universidade Estadual Paulista), e doadores de sangue do Hemocentro de São José do Rio Preto e do Centro de Hematologia e Hemoterapia da UNICAMP (**amostra Ct**).

Para pesquisar a suscetibilidade genética à cirrose alcoólica, foram analisados dois grupos de etilistas: **amostra EC**, composta por 136 indivíduos com diagnóstico clínico e laboratorial de cirrose alcoólica, sendo 119 homens e 17 mulheres, de 23 a 74 anos de idade ($\bar{x}=48,48$ anos, $s=9,63$); e **amostra ENC**, formada por 74 etilistas não-cirróticos, com idades entre 35 a 80 anos ($\bar{x}=47,5$ anos; $s=10,7$), que preencheram dois requisitos básicos: (1) consumo de álcool semelhante ao obtido para a amostra EC e (2) ausência de cirrose hepática diagnosticada por exames clínico-laboratoriais.

Os integrantes da amostra EC foram selecionados pelo Serviços de Gastrenterologia da FAMERP - Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto (n=130) e do Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP (n=6). Enquanto que a amostra ENC foi triada pelo próprio Serviço de Gastrenterologia da FAMERP (54) e pelo Centro de Referência e Informações sobre Alcoolismo e Drogadição, Prefeitura Municipal de Campinas (n=20).

A histologia hepática, único exame que comprovaria a presença da cirrose alcoólica, não é utilizada como rotina de diagnóstico nas unidades onde foi realizado este projeto, e há restrições quanto a sua indicação para fins de pesquisa, por ser um procedimento invasivo. Assim, o diagnóstico da cirrose foi definido por três ou mais dos seguintes critérios (HAUBRICH *et al.*, 1988; SHERLOCK & DOOLEY, 1997):

² \bar{x} =média dos valores obtidos para a amostra; s =desvio padrão desses valores.

- a- clínico: anamnese sugestiva de hepatopatia crônica e presença de seus sinais clínicos, como eritema palmar, aranhas vasculares, hepatomegalia, etc.;
- b- laboratorial: coagulograma e funções hepáticas alteradas, identificadas pelas dosagens de albumina, gama-glutamiltransferase (GGT) e fosfatase alcalina (FA);
- c- endoscopia: presença de varizes de esôfago;
- d- ultrassonografia ou laparoscopia hepática evidenciando fígado de tamanho aumentado ou atrófico, superfície irregular, bordas rombas, irregularidades nos vasos supra-hepáticos e parênquima hepático heterogêneo;
- e- histopatologia: arquitetura do tecido hepático compatível com cirrose;

Utilizando-se uma classificação étnica que considerou cor da pele, características faciais e textura do cabelo, entre os Ct pôde-se estimar em 81% a freqüência de caucasóides e 19% de negróides. Na amostra EC, 79,4% dos integrantes foram considerados caucasóides, 19,1% negróides e 1,5% orientais, enquanto que entre os ENC 77% eram caucasóides e 33% negróides.

Objetivando-se a identificação de variáveis de estilo de vida que possam interagir com as características genéticas aqui investigadas para promover suscetibilidade à cirrose alcoólica, de todos os indivíduos foram obtidas informações sobre sua história pessoal, incluindo a origem étnica, história ocupacional e de vida social (tabagismo e etilismo) bem como da saúde em geral (ANEXOS I, II).

Apesar da indiscutível dificuldade de se obter um histórico do consumo de bebidas alcoólicas com informações obtidas do próprio etilista, essa variável foi investigada e para tanto considerou-se 17 g de etanol para o consumo de 50 ml de cachaça, uísque ou conhaque e 23 g para uma garrafa de cerveja (600 ml), segundo os parâmetros definidos por NEVES *et al.* (1995).

O protocolo utilizado neste estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da UNICAMP e da FAMERP, e de cada indivíduo participante, foi obtido consentimento escrito pós-informação.

IV- METODOLOGIA

De cada indivíduo foram puncionados de 10 a 15 ml de sangue periférico usando-se EDTA ou heparina, como anticoagulantes. O DNA foi obtido por meio da técnica de extração “salting-out” descrita por ABDEL-RAHMAN *et al.* (1994), onde inicialmente faz-se um isolamento de células brancas por meio de centrifugação em gradiente de concentração (Ficoll Paque-Pharmacia ou Hystopaque-Sigma). Em seguida essas células foram submetidas à lise na presença de SDS, RNase e proteinase K. A solução aquosa de DNA é tratada com uma solução saturada de cloreto de sódio 6 M, precipitando-o em etanol absoluto.

Essa técnica não se mostrou eficiente para a extração de DNA em etilistas cirróticos, uma vez que esses indivíduos apresentam leucopenia por hiperesplenismo, comprometendo o isolamento de células por gradiente de concentração. Assim, o método de extração utilizado foi o clássico, com lise seqüencial dos glóbulos vermelhos e brancos e o DNA foi extraído pelo uso de solução fenol:clorofórmio e precipitado em etanol absoluto.

IV.1- Genotipagem dos Genes *GSTM1/GSTT1*

O genótipo nulo para os genes *GSTT1* e *GSTM1* foi determinado pela técnica de PCR multiplex, descrito por ABDEL-RAHMAN *et al.* (1996), com modificações. Nesse PCR utilizou-se um segmento do gene *CYP1A1* ou da β -globina como controle interno da amplificação. Para tais amplificações utilizaram-se os seguintes oligonucleotídeos (“primers”):

GSTM1 (BELL *et al.*, 1993):

5'-GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC e 5'- GTTGGGCTCAAATATACGGTGG

GSTT1 (PEMBLE *et al.*, 1994):

5'-TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC e 5'-TCACCGGATCATGGCCAGCA

CYP1A1 (ABDEL-RAHMAN *et al.*, 1996):

5'-GAACTGCCACTTCAGCTGTCT e 5'-CAGCTGCATTTGGAAGTGCTC

β -globina:

5'-ATACAATGTATCATGCCTCTTTGCACC e

5'-GTATTTTCCCAAGGTTTGAAGTAGCTC

A reação de PCR continha os “primers” de *GST* numa concentração de 0,2 μ M e os “primers” de *CYP1A1* ou β -globina em 0,1 μ M, dNTP 0,4mM, tampão, MgCl₂ 1,5 mM e 1,5 U da enzima Taq DNA polimerase. Foram realizados 35 ciclos de amplificação onde a desnaturação aconteceu a 94°C/2 minutos, o anelamento a 59°C/1 minuto e a extensão a 72°C/1 minuto.

O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio, onde é observado um fragmento de 480 pares de bases (pb) do gene *GSTT1*, 215 pb do *GSTM1*, e 312 pb do *CYP1A1* ou 630 pb da β -globina. Como a metodologia aqui apresentada não permite a identificação dos genótipos heterozigotos, a presença da banda correspondente ao *GSTT1* ou *GSTM1*, foi representado pelo sinal +, indicando a presença do alelo selvagem em homozigose ou heterozigose.

A genotipagem considerou os genes individualmente, analisando-se *GSTT1* nulo ou *GSTM1* nulo, mas também foram consideradas as possíveis combinações *GSTT1/GSTM1*, identificadas pela presença de ambos os genes (+/+), ausência de um desses (*GSTT1/GSTM1*, 0/+ ou +/0) ou de ambos (0/0).

IV.2- PCR do Gene *CYP2E1* e Análise de RFLP *Pst* I

Para a pesquisa do alelo *CYP2E1**c2, uma versão superexpressa do referido gene, foi amplificada uma seqüência de 410 pb da sua região promotora utilizando-se os “primers” 5'-CCAGTCGAGTCTACATTGTCA e 5'-TTCATTCTGTCTTCTAAC TGG (KATO *et al.*, 1992).

Para análise do polimorfismo RFLP *CYP2E1/Pst*I a PCR continha 0,2 µM de cada primer, dNTP 0,4mM, tampão, MgCl₂ 1,5mM e 1 U de Taq DNA polimerase. Foram realizados 35 ciclos de amplificação onde a desnaturação aconteceu a 94°C/1 minuto, o anelamento a 60°C/1 minuto e a extensão a 72°C/1 minuto.

O produto do PCR foi submetido à digestão pela enzima *Pst*1 (GIBCO) e a análise do polimorfismo realizada após eletroforese em agarose 2% em tampão TBE. O alelo *CYP2E1**c1 é visualizado como um fragmento de 410 pb e o *CYP2E1**c2, portador do sítio de restrição *Pst*I, é identificado pela presença de dois fragmentos de 290 e 120 pb.

IV.3- PCR do Gene *CYP2E1* e Análise de RFLP *Dra* I

Para pesquisa do alelo *CYP2E1**D foi amplificada uma seqüência de 995 pb do íntron 6, utilizando-se os “primers” 5'- TCGTCAGTTCCTGAAAGCAGG e 5'-GAGCTCTGATGCAAGTATCGCA (HIRVONEN *et al.*, 1993a).

A reação de PCR para análise do RFLP *CYP2E1/Dra*I continha 0,5 µM de cada primer, dNTP 0,8mM, tampão, MgCl₂ 2mM e 2 U de Taq DNA polimerase. Foram realizados 35 ciclos de amplificação onde a desnaturação aconteceu a 94°C/1 minuto, o anelamento a 62°C/1 minuto e a extensão a 72°C/4 minutos.

O produto do PCR foi submetido à digestão pela enzima *Dra*I (GIBCO) e a análise do polimorfismo realizada após eletroforese em agarose 2% corada com brometo de etídio. O alelo *CYP2E1**D é portador de dois sítios de restrição o que gera

os fragmentos de 303, 572 e 120 bp enquanto o alelo CYP2E1*C é portador de um único sítio *DraI*, sendo visualizado como dois fragmentos (875 e 120 bp).

IV.4- PCR do Gene *CYP2D6* e Análise de RFLP *ScrFI* e *DraIII*

Para pesquisa dos alelos polimórficos CYP2D6*3, CYP2D6*4 e CYP2D6*5 desse gene, foi amplificada uma seqüência de 644 pb do *CYP2D6* e outra de 101 pb referente ao gene *CYP2D8* (controle interno de amplificação) utilizando-se basicamente a metodologia descrita por SPURR *et al.* (1991) modificada por ANWAR *et al.* (1996), com os seguintes “primers”:

CYP2D6: 5'-TGCCGCCTTCGCCAACCCT e 5'-GGCTGGGTCCGAGGTCACCC

CYP2D8: 5'-CGGCCCAGCCACTCTCGTGT 5'-AACAGGGTCCCAGCTGAGGAG

A reação de PCR para análise de RFLP no *CYP2D6* continha 0,25 µM de cada “primer” *CYP2D6*, 0,125 µM de cada “primer” *CYP2D8*, 6% DMSO, dNTP 200 µM, tampão, MgCl₂ 2 mM e 2 U da enzima Taq DNA polimerase, em um volume final de 50 µl. Foram realizados 35 ciclos de amplificação com desnaturação em 94°C/1 minuto, anelamento a 62°C/1 minuto e extensão a 72°C/1 minuto.

O “primer” anti-sense contém duas bases diferentes da seqüência genômica original. Esse fato conduz à eliminação de um sítio de restrição *ScrFI* e criação de um sítio para a enzima *DraIII*, o qual é eliminado se acontecer a deleção característica do alelo CYP2D6*3 (FIGURA 3).

O produto do PCR foi submetido à digestão simultânea com duas unidades de cada uma das enzimas *ScrFI* e *DraIII* (New England Biolabs) em tampão de digestão (NE Buffer 3) e soro-albumina bovina (BSA, 100 µg/ml). O segmento amplificado possui dez sítios de digestão, sendo que os dois primeiros sítios geram fragmentos de 109 e 216 pb, respectivamente. O primeiro sítio de restrição é

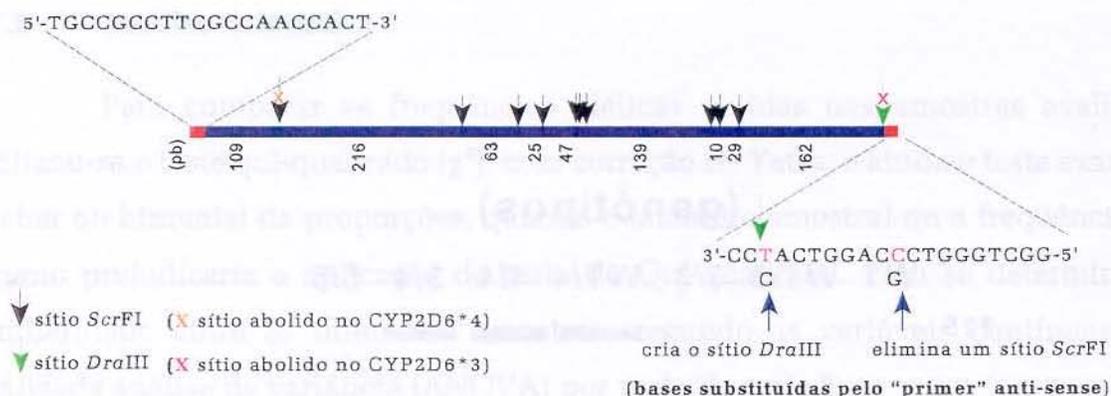


FIGURA 3: Esquema da amplificação parcial do gene CYP2D6, para pesquisa simultânea dos alelos CYP2D6*3 e CYP2D6*4, localizando-se os sítios de restrição para as enzimas *DraIII* e *ScrFI*.

eliminado quando da transição G→A, característica do alelo CYP2D6*4, de modo que o fragmento resultante dessa mutação terá 325 pb. Dos sete demais sítios *ScrFI*, são gerados seis fragmentos menores que 100 pb e um de 139 pb, comuns a todos os genótipos, exceto para o alelo CYP2D6*5 (deleção completa do gene). Na extremidade 3' existe um sítio para a *DraIII*, gerando fragmentos de 162 e 18 pb. Esse sítio é eliminado pela deleção de um par de bases que caracteriza o alelo CYP2D6*3, resultando no fragmento de 180 pb.

A análise do polimorfismo foi realizada após eletroforese em Agarose 1000 (Gibco - BRL Products) ou Metaphor (FMC - Bioproducts) 3,5 % corada com brometo de etídio, onde o alelo CYP2D6*3 é identificado pela presença de uma banda de 180 bp (ausência do sítio *DraIII*), o alelo CYP2D6*4, pela banda de 325 bp (perda do sítio *ScrFI*) e o CYP2D6*5, pela ausência do fragmento CYP2D6 amplificado (FIGURA 4).

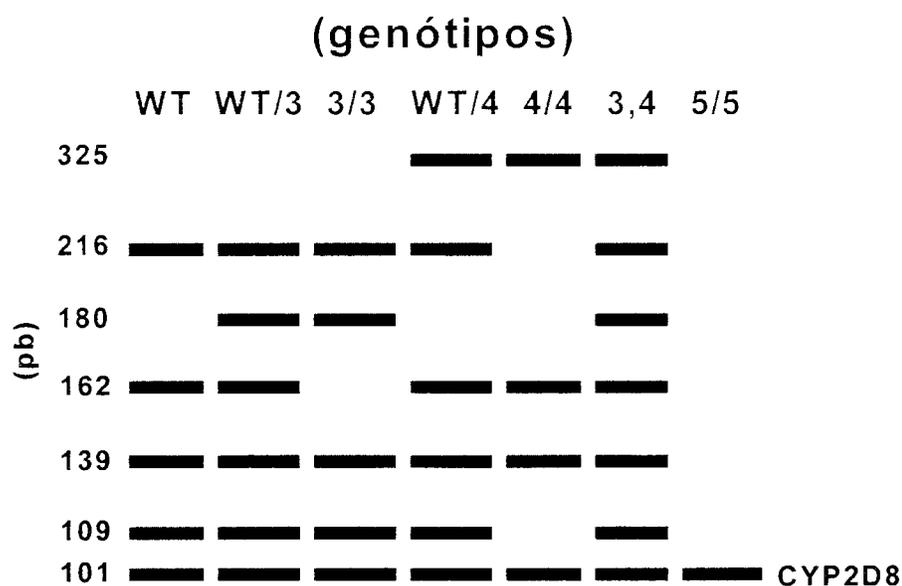


FIGURA 4: Esquema de digestão do gene *CYP2D6* para pesquisa simultânea dos alelos *CYP2D6*3*, *CYP2D6*4* e **5*, apresentando-se os possíveis genótipos.

(A banda de 101 pb representa o marcador de amplificação)

WT=genótipo WT para os alelos *3 e *4 (bandas 162 e 216 pb);
 WT/4= heterozigoto para o alelo *4 (bandas de 216 e 325 pb);
 4/4= homozigoto para o alelo *4 (banda 325 pb);
 WT/3= heterozigoto para o alelo *3 (bandas 162 e 180 pb);
 3/3= homozigoto para o alelo *3 (banda 180 pb);
 3,4= duplo heterozigoto (bandas 216, 325, 162 e 180 pb);
 5/5= homozigoto para o alelo *5

IV.5- Análise Estatística

Para comparar as frequências alélicas obtidas nas amostras avaliadas utilizou-se o teste qui-quadrado (χ^2), com correção de Yates, e ainda o teste exato de Fisher ou binomial de proporções, quando o tamanho amostral ou a frequência do evento prejudicaria a aplicação do teste do Qui-quadrado. Para se determinar a similaridade entre as diferentes amostras, segundo as variáveis contínuas, foi realizada análise de variância (ANOVA) por meio do teste F.

Objetivando-se determinar o conjunto de variáveis inerentes à cirrose alcoólica, considerando-se as amostras EC e ENC, determinou-se o *Odds Ratio* por regressão logística ajustando-se as variáveis idade, hábito de tabagismo, tempo e quantidade de cigarros consumida, tempo e quantidade de álcool consumida, bem como as variáveis genéticas. Essa análise foi realizada utilizando-se o programa SAS (Statistical Analysis Software, Cary, NC), versão 6.11.

Para estimar o *Odds Ratio* por regressão logística as variáveis genéticas foram organizadas de maneira dicotômica: uma determinada condição foi considerada suscetível, e o conjunto das demais, não-suscetível.

V- RESULTADOS

Utilizando-se os questionários apresentados nos anexos I e II foi obtida uma grande quantidade de informações sobre o estilo de vida e a história ocupacional e de saúde dos indivíduos integrantes das amostras aqui consideradas.

Entretanto, algumas variáveis mostraram-se extremamente complexas, como aquelas referentes à etnia e ao consumo de álcool. Considerando-se a dificuldade em classificar subjetivamente a etnia segundo cor da pele, características faciais e textura de cabelo, optou-se pela história dos antecedentes do propósito, por pelo menos duas gerações. Com esse critério buscou-se investigar a mistura de grupos raciais, comum à grande maioria dos brasileiros.

Analisando uma amostra de 215 indivíduos, caracterizada por um único observador, obteve-se que 38% daqueles identificados como caucasóides brasileiros relataram miscigenação com negros ou ameríndios, descrevendo pais ou avós como negros. Daqueles indivíduos caracterizados como negróides 23% relataram miscigenação com brancos. Assim, um indivíduo negro que relata um dos pais como caucasóides seria classificado como negróide, desconsiderando-se o “background” genético do genitor caucasóide. Fazer a análise classificando em todos os grupos necessários para uma identificação ideal acarretaria em muitas classes, comprometendo desse modo a análise estatística em virtude do tamanho das amostras. Por esse motivo, durante a análise dos resultados optou-se por desconsiderar a etnia dos indivíduos, classificando-se a amostra como miscigenada.

Entretanto, a variável com maior probabilidade de incoerência, e que não pôde ser ignorada, é a própria história de etilismo, que certamente apresenta subestimativa do tempo e quantidade de álcool consumida. Esse fato é aceito unanimemente entre os profissionais que lidam com etilistas, os quais afirmam que a real história sempre será desconhecida, até mesmo pelo próprio etilista. Porém, é possível uma aproximação dessa realidade dependendo do nível de confiança

estabelecido entre o interlocutor e o etilista. Outra possibilidade é, a título de comparação, levantar as mesmas informações com uma pessoa que co-habita com o referido etilista. Considerando-se que para este projeto houveram, no máximo, dois contatos entre o etilista e o entrevistador, é certo o desvio da real história de etilismo. Todavia, esse mesmo viés deve estar presente em todas as amostras, o que minimizaria seu efeito quando das análises dos resultados.

Assim sendo, as variáveis consideradas básicas para as comparações neste estudo foram aquelas referentes à idade (faixa etária), etilismo (tempo de hábito e quantidade diária de álcool consumida) e tabagismo (tempo de hábito e quantidade diária de cigarros consumida). Determinou-se ainda um índice que agrega tempo e quantidade de exposição ao álcool ou tabaco, denominados, respectivamente, álcool-ano e maço-ano.

Na Tabela 3 é apresentada a classificação dos indivíduos EC, ENC e Ct quanto a algumas variáveis ambientais. Nessa, observa-se que nas três amostras a grande maioria dos integrantes é do sexo masculino (EC=87,5%; ENC=93,2% e Ct=87,2%).

Por existir diferença quanto ao sexo para o risco de cirrose alcoólica, foi realizada uma análise prévia, comparando-se os grupos segundo o sexo. Nenhuma diferença foi detectada para as variáveis referentes à idade, etilismo e tabagismo, exceto para a amostra Ct, onde as mulheres são mais idosas (51,9 anos vs 39,2 anos; $F_{(1;224)}=32,9$; $p=0$) e fumam por mais tempo (25,8 anos vs 18,3 anos; $F_{(1;224)}=4,15$; $p=0,045$). As frequências dos diferentes genótipos também foram similares entre os sexos. Assim, optou-se por se desconsiderar o sexo de todos os indivíduos, o que foi subsidiado pelas análises apresentadas no Anexo III.

Na amostra EC as idades variaram entre 23 e 74 anos ($\bar{X}=48,2$, $s=9,8$), enquanto que na amostra ENC os integrantes tinham entre 35 e 80 anos ($\bar{X}=47,9$, $s=10,7$), sendo identificada semelhança entre esses dois grupos por meio da análise de variância ($F_{(1;208)}=0,22$; $p=0,639$). Na amostra Ct as idades são observadas entre 19

e 70 anos ($\bar{x}=40,9$; $s=11,8$) e a sua distribuição diferiu significativamente das demais ($F_{(2;433)}=22,3$; $p<<0,001$). Desse modo, diante de análises que envolveram a variável idade, optou-se por classificar os indivíduos em faixas etárias. Esses dados podem ser visualizados na Tabela 4 e Figura 5.

Ao se investigar a naturalidade dos integrantes das três amostras observou-se que quatro Estados foram comumente referidos: São Paulo (EC=86,7%; ENC=73%; Ct=65,6%), Minas Gerais (EC=5,9%; ENC=17,6%; Ct=14,7%), Bahia (EC=2,3%; ENC=6,8%; Ct=7,6%) e Paraná (EC=1,5%; ENC=2,7%; Ct=3,6%). Na amostra Ct, 5,4% dos seus integrantes declararam-se naturais de Pernambuco.

Na Tabela 3, tem-se ainda que 50,9% dos indivíduos Ct declararam não serem consumidores de bebida alcoólica ou consumirem-na raramente. O consumo de bebidas dito social, aqui considerado como até 40 g/dia para homens e 20 g/dia para mulheres, foi identificado em 33,6% dos integrantes dessa amostra. Apesar desse limite aparentemente elevado, o consumo médio de etanol para os indivíduos considerados etilistas sociais foi de 17,9 g/dia ($s=9,8$) por um período de 17,5 anos ($s=9,8$), valores bastantes inferiores aos obtidos para os etilistas tanto da amostra Ct quanto das demais amostras. Cerca de 15% dos Ct relataram o abuso crônico de álcool com média de 70,6 g/dia ($s=23,7$), consumidos por um período de 5 a 57 anos ($\bar{x}=20,3$ anos, $s=11,3$), conforme será apresentado no item IV.I.2.

Os dados referentes ao tabagismo mostram que cerca de 80% dos indivíduos EC e ENC são fumantes, consumindo cerca de 20 cigarros/dia por cerca de 30 anos. Ao contrário, 62,4% da amostra Ct declararam-se não-fumantes, sendo que os fumantes consumiam até 20 cigarros por cerca de 20 anos. Essas variáveis ambientais serão melhor avaliadas nos próximos itens, bem como, a interação dessas com as variáveis genéticas investigadas neste estudo.

Tabela 3: Classificação das amostras de etilistas cirróticos (EC), etilistas não-cirróticos (ENC) e controles (Ct), segundo sexo, idade e hábitos de etilismo e tabagismo.

	EC (%) n=136	ENC (%) n=74	Ct (%) n=226
Sexo			
homem	87,5	93,2	87,2
mulher	12,5	6,8	12,8
Faixas etárias (anos)			
<30	2,9	0,0	19,9
30-39	14,7	24,3	29,2
40-49	39,0	37,8	28,3
>49	43,4	29,7	22,6
álcool (g/dia)*			
não consome	0,0	0,0	50,9
<50	0,0	0,0	35,8
50-149	39,7	44,6	12,9
150-200	18,4	18,9	0,0
>200	41,9	36,5	0,0
tempo de etilismo*			
<20	24,4	50,0	27,0
20-29	37,5	28,6	43,2
>29	38,2	21,4	25,7
nº cigarros/dia**			
não-fumante	17,6	13,5	63,3
<10	3,7	8,1	4,4
10-20	55,9	59,5	27,0
21-40	18,4	16,2	3,5
>40	4,4	2,7	1,8
tempo de tabagismo (anos)**			
<10	4,5	3,1	16,9
10-20	22,3	18,8	49,4
21-30	27,7	51,6	16,9
>30	45,5	26,6	16,9

* foram computados apenas os indivíduos etilistas

** foram computados apenas os indivíduos fumantes

Tabela 4: Descrição das amostras de etilistas cirróticos (EC), etilistas não-cirróticos (ENC) e controles (Ct), segundo a idade.

amostra	n	\bar{x}	s	min	máx	Q1	Q3
EC	136	48,2	9,8	23	74	41	55,8
ENC	74	47,5	10,7	35	80	40,5	52
Ct	226	40,9	11,8	19	70	31	49

\bar{x} = média
s = desvio padrão

min = n^o mínimo
max = n^o máximo

Q1 = 1^o quartil
Q3 = 3^o quartil

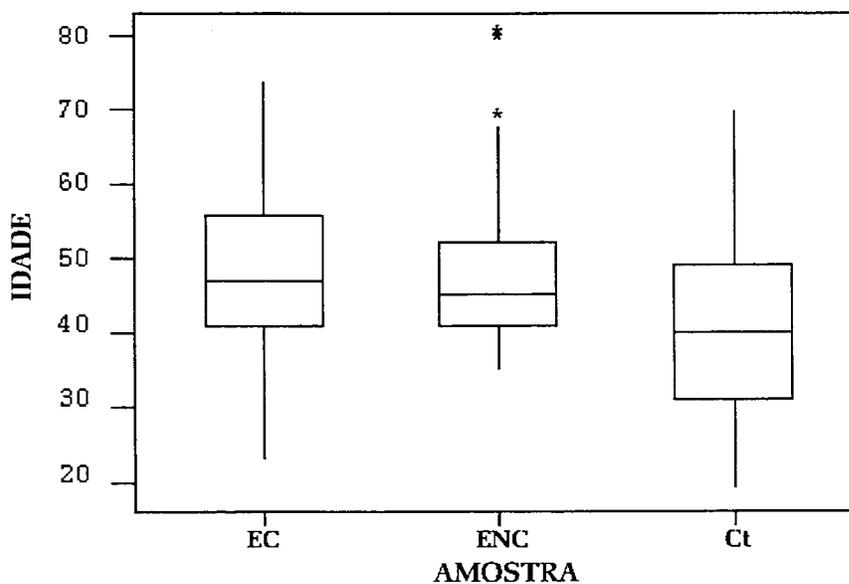


FIGURA 5: Distribuição dos indivíduos etilistas cirróticos (EC), etilistas não-cirróticos (ENC) e controles (Ct), segundo a idade.

V.1- Variáveis Ambientais

V.1.1- Infecção por HBV e HCV

Na amostra EC somente seis indivíduos (4,4%) não foram submetidos a exames sorológicos para identificação de infecção pelos vírus HBV e HCV, comumente associados à cirrose hepática. Dos demais 130 portadores de cirrose alcoólica, dezesseis (12,3%) apresentaram sorologia positiva para o vírus HCV e igual frequência foi observada para o HBV. Dentre esses portadores de vírus para hepatite, 44% submeteram-se à biópsia hepática e tiveram confirmação histopatológica de lesão cirrose alcoólica.

Em virtude da fração considerável de EC portando vírus para hepatite, foram constituídos dois subgrupos segundo a presença ou ausência de HBV ou HCV. Procedeu-se, então, a uma análise para verificar se outras variáveis estabeleceriam diferenças entre esses sub-grupos (Tabela 5). Como resultado, não se observou diferença quanto às idades e ambos os sub-grupos relataram um consumo semelhante de álcool e cigarro. Em consequência, não houve diferença no tempo de etilismo até o diagnóstico da cirrose. Esses fatos forneceram a base estatística que permitiu o agrupamento desses sub-grupos, quando necessário.

Vinte indivíduos da amostra ENC (27,4%) foram investigados quanto à presença de infecção pelos vírus HBV e HCV. Desses, apenas um (5%) apresentou sorologia positiva para HBV. Esse indivíduo (ENC21), juntamente com ENC20 e ENC78 foram os únicos submetidos à biópsia hepática com exclusão de cirrose alcoólica. Para os demais não havia qualquer sinal clínico, bioquímico e de imagem sugestivo de cirrose.

V.1.2- Tabagismo

Nas Tabelas 6 a 8 são apresentados os dados referentes à análise estatística descritiva das amostras EC, ENC e Ct, quanto às variáveis idade, etilismo e tabagismo.

Aplicou-se o teste de ANOVA para comparação das amostras quanto às variáveis referentes ao hábito de tabagismo e etilismo, considerando-se apenas aqueles indivíduos expostos ao cigarro ou ao álcool. A estatística descritiva desses grupos, bem como o resultado da análise de variância estão contidas nas Tabelas 9 e 10, respectivamente. Nessas, pode-se perceber que não são significativas as diferenças entre as amostras EC e ENC, e que, em geral a amostra Ct exhibe diferenças quando comparada às demais.

Conforme já relatado, houve um excesso de indivíduos fumantes na amostra EC, visto que 82,4% deles identificaram-se como fumantes consumindo em média 22,6 cigarros/dia ($s=12,4$) por um período de 30 anos ($s=10,5$; Tabela 6). Esses valores não diferiram quando foram considerados separadamente os soropositivos para HBV ou HCV (Tabela 5). Na amostra ENC a proporção de fumantes foi de 86,5%, e não diferiu daquela observada para EC ($\chi^2=0,796$; $p=0,372$). O tempo médio de consumo de cigarros na amostra ENC (Tabela 6) foi de 27,1 anos ($s=10,6$), menor que na amostra EC, porém não significativamente ($F_{(1;167)}=3,18$; $p=0,076$). Essa mesma diferença foi observada para a idade início do hábito do tabagismo, quando se observa que os integrantes da amostra EC começaram a fumar em idades entre 4 e 35 anos de idade ($\bar{X}=14,96$ anos; $s=15,0$), mais jovens que o declarado pela amostra ENC, que foi de 9 a 41 anos ($\bar{X}=16$ anos; $s=5,3$; $F_{(1;168)}=3,22$; $p=0,074$)

A quantidade média de cigarros consumida diariamente na amostra ENC (Tabela 7) foi de 20,9 cigarros ($s=11,0$), semelhante ao relatado pela amostra EC ($F_{(1;143)}=1$; $p=0,320$). Na amostra Ct (Tabela 8) a quantidade média de cigarros consumida pelos indivíduos fumantes foi 18,5 cigarros/dia ($s=12,3$), menor que o observado para a amostra EC ($F_{(1;189)}=4,6$; $p=0,033$; Tabela 9). Deve-se ressaltar que a frequência de indivíduos fumantes na amostra Ct (36,7%) foi significativamente

menor que em ambas amostras de etilistas ($\chi^2=89,711$; $p=0$), evidenciando a forte associação entre os hábitos de etilismo e tabagismo.

Essa associação foi confirmada na amostra Ct, pois foi visto que 63,9% dos 83 indivíduos fumantes consumiam bebida alcoólica, sendo que 22,9% eram abusadores de álcool, consumindo em média 65,8 g de álcool por dia. Dentre os não-fumantes, cerca de 59,4% relataram não ingerir bebidas alcoólicas ($\chi^2= 10,45$; $p=0,005$).

O tempo de consumo de tabaco também foi menor na amostra Ct ($\bar{X}=20,04$ anos, $s=11,18$) que nas amostras de etilistas (ENC $\bar{X}=26,9$ anos, $s=10,6$; EC $\bar{X}=30,0$ anos, $s=10,5$). Todavia, esse fato é reflexo da menor idade média dos fumantes na amostra Ct que nas demais (Tabela 9).

Por se considerar cumulativo o efeito do tabaco sobre o organismo humano, utilizou-se um índice que corresponde ao produto entre a quantidade consumida desse agente e o tempo de exposição ao mesmo. Assim, tomou-se o índice maço-ano, sugerido por LAFUENTE *et al.* (1993) e que corresponde ao produto entre o número de maços de cigarro consumidos por dia e o número de anos que o indivíduo consumiu cigarros ou similares. Em média, esse índice foi de 33,9 ($s=21,0$) na amostra EC, e de 20,9 ($s=11,0$) na amostra ENC, mostrando-se similares ($F_{(1;167)}=2,98$; $p=0,086$). Ambos diferiram do obtido para a amostra Ct ($\bar{X}=17,7$; $s=20,4$; $p<0,005$), haja vista a diferença observada para a quantidade consumida e/ou tempo de tabagismo (Tabela 9).

V.1.3- Etilismo

Foi observado que os integrantes da amostra EC consumiram álcool cronicamente entre 5 e 60 anos (Tabela 6), com um tempo médio de 26,8 anos ($s=10,8$). Na amostra ENC (Tabela 7) o tempo de consumo de álcool foi de 10 a 70 anos ($\bar{X}=26,3$ anos; $s=11,6$), enquanto que para os etilistas da amostra Ct (Tabela 8) a

variação foi de 5 a 57 anos, com média de 20,3 anos ($s=11,3$). O agrupamento desses valores em faixas de consumo, conforme listadas na Tabela 3, não resultou em diferenças significativas, muito embora a menor idade dos etilistas da amostra Ct tenha introduzido um viés conduzindo o resultado para um valor próximo do limite de significância ($\chi^2=9,133$; $p=0,058$). Assim, comparando-se apenas as amostras EC e ENC, o tempo de consumo de álcool mostrou-se independente do desenvolvimento da cirrose ($\chi^2=1,372$; $p=0,504$).

O consumo médio de álcool, estimado a partir do relato dos próprios etilistas, foi bastante semelhante entre as amostras EC e ENC, com valores de 209,3 g/dia ($s=122,6$) e de 196,1 g/dia ($s=97,9$), respectivamente, cujas diferenças não se mostraram significativas pela análise de variância ($F_{(1;208)}=0,04$; $p=0,845$). Esses valores diferiram significativamente do consumo médio obtido para o grupo de etilistas integrantes da amostra controle (Tabela 10).

Para o etilismo tomou-se um índice denominado álcool-ano, equivalente ao produto entre o número de doses cirrogênicas de álcool consumidas diariamente e o tempo de abuso de álcool. Essa dose cirrogênica foi correspondente a 20 g para mulheres e 40 g para homens, pois segundo PEQUIGNOT *et al.* (1978) essas oferecem um risco relativo para a cirrose alcoólica equivalente a 5x. O valor médio da variável álcool-ano foi de 158,6 ($s=129,8$) na amostra EC, similar à média observada para ENC ($\bar{X}=136,6$; $s=96,7$; $F_{(1;208)}=0,77$; $p=0,380$). E aqui, mais uma vez, a amostra Ct diferiu das demais ($\bar{X}=34,3$; $s=18,0$; $p<0,001$; Tabela 10).

A investigação quanto ao tempo de etilismo até o diagnóstico da cirrose alcoólica revelou que na amostra EC esse tempo variou de 5 a 60 anos, com valor médio de 25,2 anos ($s=10,6$), mostrando-se independente da presença ou não dos vírus HBV ou HCV (Tabela 5).

A Tabela 11 resume os dados quanto à variável idade e àquelas referentes aos hábitos de tabagismo e etilismo obtidos para as três amostras investigadas no presente trabalho.

Tabela 5: Estatística descritiva da amostra de etilistas cirróticos com sorologia positiva (soro +) ou negativa (soro -) para os vírus HBV ou HCV, segundo as variáveis idade, tabagismo, etilismo e tempo para desenvolvimento da cirrose. São destacados o tamanho dos sub-grupos e o resultado da análise de variância (ANOVA).

Variável	n		mínimo		máximo		média		desvio padrão		ANOVA
	soro +	soro -	soro +	soro -							
idade (anos)	32	98	26	29	74	63	49,2	48,5	10,8	9,6	$F_{(1;128)} = 0,49;$ $p = 0,484$
tempo de tabagismo (anos) ^a	24	77	10	10	49	63	28,1	30,4	10,4	10,1	$F_{(1;128)} = 0,39;$ $p = 0,534$
nº de cigarros/dia ^a	24	77	5	5	60	60	21,5	23,3	11	12,7	$F_{(1;128)} = 0,72;$ $p = 0,396$
maço-ano ^{ab}	24	77	5	4	75	93	30,7	35,1	18,1	21,1	$F_{(1;128)} = 0,94;$ $p = 334$
tempo de etilismo (anos)	24	98	7	5	60	43	28,8	26,2	13,4	9,2	$F_{(1;128)} = 1,55;$ $p = 0,215$
álcool (g/dia)	32	98	65	70	680	500	215,5	210	153,5	112	$F_{(1;128)} = 0,05;$ $p = 0,817$
álcool-ano ^c	32	98	26,2	14	952	462,5	193	149	201	91,8	$F_{(1;128)} = 1,93;$ $p = 0,167$
tempo para o desenvolvimento da cirrose (anos)	32	98	7	5	60	43	27,4	24,4	12,8	9,2	$F_{(1;128)} = 2,22;$ $p = 0,139$

^aPara as variáveis referentes ao hábito de tabagismo foram computados apenas os indivíduos fumantes e ex-fumantes.

^bMaço-ano = quantidade diária de cigarros consumidos x tempo (anos) de tabagismo

20

^cálcool-ano = tempo (anos) de etilismo x quantidade diária de álcool
20 (para mulheres) ou 40 (para homens)

Tabela 6: Estatística descritiva da amostra de etilistas cirróticos (EC) para variáveis referentes à idade, tabagismo, etilismo e tempo para desenvolvimento da cirrose.

Variável	No. de observações	Min	Max	Média	Desvio Padrão
idade (anos)	136	23	74	48,1	9,8
tempo de tabagismo (anos) ^a	107	10	56	30,0	10,5
n ^o de cigarros/dia	107	5	60	22,6	12,4
maço-ano	107	4	93	33,9	21,0
tempo de etilismo (anos)	136	5	60	28,8	10,8
álcool (g/dia)	136	65	680	209,3	122,6
álcool-ano	136	14	952	158,6	129,8
tempo para o desenvolvimento da cirrose (anos)	136	5	60	25,2	10,6

^apara as variáveis referentes ao tabagismo computou-se apenas os indivíduos fumantes.

Tabela 7: Estatística descritiva da amostra de etilistas não-cirróticos (ENC) para variáveis referentes à idade e consumos de tabaco e álcool.

Variável	No. de observações	Min	Max	Média	Desvio Padrão
idade (anos)	74	35	80	47.5	10.7
tempo de tabagismo (anos) ^a	63	8	56	26.6	11.1
n ^o de cigarros/dia	63	8	56	20.4	11.2
maço-ano	63	4	128	27.8	20.4
tempo de etilismo (anos)	74	10	70	26.5	11.9
álcool (g/dia)	74	60	680	196.1	97.9
álcool-ano	74	15	612	136.6	96.7

^apara as variáveis referentes ao tabagismo computou-se apenas os indivíduos fumantes

Tabela 8: Estatística descritiva da amostra controle (Ct) para variáveis referentes à idade e consumos de tabaco e álcool.

Variável	Nº de observações	Min	Max	Média	Desvio Padrão
idade (anos)	226	19	70	40,9	11,8
tempo de tabagismo (anos) ^a	83	5	57	19,0	11,5
nº de cigarros/dia	83	2	70	18,5	12,1
maço-ano	83	1	140	17,7	20,2
tempo de etilismo (anos) ^a	35	5	57	20,3	11,3
álcool (g/dia)	35	45	140	70,6	23,7
álcool-ano	35	6.3	85.5	34,3	18,0

^apara as variáveis referentes ao tabagismo computou-se apenas os indivíduos fumantes, da mesma forma que para as variáveis de etilismo foram considerados apenas os abusadores de álcool.

Tabela 9: Estatística descritiva das amostras de etilistas cirróticos (EC), etilistas não-cirróticos (ENC) e controles (Ct) segundo a variável idade e outras referentes ao hábito do tabagismo, considerando-se apenas os indivíduos fumantes. São destacados o tamanho amostral (n) e a análise de variância (ANOVA).

Variável	amostra	n	\bar{x}	s	min	max	ANOVA
idade (anos)	EC	107	48,1	9,9	23	74	EC x ENC: $F_{(1;167)} = 0,19$; $p = 0,66$
	ENC	63	47,3	10,4	35	80	ENC x Ct: $F_{(1;145)} = 5,89$; $p = 0,017$
	Ct	83	42,6	11,3	19	70	Ct x EC: $F_{(1;190)} = 11,19$; $p = 0,001$
tempo de fumo (anos)	EC	107	30,0	10,5	10	56	EC x ENC: $F_{(1;167)} = 3,18$; $p = 0,076$
	ENC	63	26,6	11,1	8	56	ENC x Ct: $F_{(1;145)} = 16,92$; $p = 0$
	Ct	83	19,0	11,5	5	57	Ct x EC: $F_{(1;190)} = 44,67$; $p = 0$
cigarros/dia	EC	107	22,6	12,4	5	60	EC x ENC: $F_{(1;167)} = 1$; $p = 0,32$
	ENC	63	20,4	11,2	4	50	ENC x Ct: $F_{(1;145)} = 0,99$; $p = 0,320$
	Ct	83	18,5	12,1	2	70	Ct x EC: $F_{(1;190)} = 4,60$; $p = 0,033$
maço-ano	EC	107	33,9	21,0	4	93	EC x ENC: $F_{(1;167)} = 2,98$; $p = 0,086$
	ENC	63	27,8	20,4	4	128	ENC x Ct: $F_{(1;145)} = 8,85$; $p = 0,003$
	Ct	83	17,7	20,2	1	140	Ct x EC: $F_{(1;190)} = 27,30$; $p = 0$

Tabela 10: Estatística descritiva das amostras de etilistas cirróticos (EC), etilistas não-cirróticos (ENC) e controles (Ct) segundo as variáveis idade e hábito de etilismo. São destacados o tamanho amostral (n) e a análise de variância (ANOVA).

Variável	ANOVA			
	n	\bar{x}	s	mín máx
idade				
EC	136	48.1	9.8	23 74
ENC	74	47.5	10.7	35 80
Ct*	35	41.8	11.9	22 70
				EC x ENC: $F_{(1;208)} = 0,22$; $p = 0,639$ ENC x Ct: $F_{(1;100)} = 3,87$; $p = 0,052$ Ct x EC: $F_{(1;162)} = 6,78$; $p = 0,10$
tempo de				
álcool (anos)				
EC	136	28.8	10.8	5 60
ENC	74	26.5	11.9	10 70
Ct	35	20.3	11.3	5 57
				EC x ENC: $F_{(1;208)} = 0,04$; $p = 0,845$ ENC x Ct: $F_{(1;100)} = 6,15$; $p = 0,015$ Ct x EC: $F_{(1;162)} = 8,92$; $p = 0,003$
álcool				
(g/dia)				
EC	136	209.3	122.6	65 680
ENC	74	196.1	97.9	60 680
Ct	35	70.6	23.7	45 140
				EC x ENC: $F_{(1;208)} = 0,63$; $p = 0,427$ ENC x Ct: $F_{(1;100)} = 41,58$; $p = 0$ Ct x EC: $F_{(1;162)} = 33,15$; $p = 0$
álcool-ano				
EC	136	158.6	129.8	14 952
ENC	74	136.6	96.7	15 612
Ct	35	34.3	18	6.3 85.5
				EC x ENC: $F_{(1;208)} = 0,77$; $p = 0,380$ ENC x Ct: $F_{(1;100)} = 19,39$; $p = 0$ Ct x EC: $F_{(1;162)} = 24,14$; $p = 0$

*para esta descrição, foram considerados apenas os indivíduos etilistas identificados na amostra Ct.

Tabela 11: Valores de média (\bar{x}) e respectivo desvio padrão (s) observados para variáveis referentes à idade e consumo de tabaco e álcool em uma amostra de etilistas cirróticos (EC), etilistas não-cirróticos (ENC) e controles (Ct).

Variável	EC (n=136)		ENC (n=74)		Ct (n=226)	
	\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s
idade (anos)	48,2	9,8	47,5	10,7	40,9	11,8
idade dos fumantes (anos) ^a	48,1	11,3	47,3	10,4	42,6	11,3
tempo de tabagismo (anos)	30,0	10,5	27,8	20,4	19,0	11,5
n ^o de cigarros/dia	22,6	12,4	20,4	11,2	18,5	12,1
maço-ano	33,9	21,0	27,8	20,4	18,7	20,2
tempo de etilismo (anos) ^a	28,8	10,8	26,5	11,9	20,3	11,3
álcool (g/dia)	209,3	122,6	196,1	97,9	70,6	23,7

^apara as variáveis referentes ao tabagismo computou-se apenas os indivíduos fumantes, da mesma forma que para as variáveis de etilismo foram considerados apenas os abusadores de álcool.

V.2- Variáveis Genéticas e sua Relação com as Variáveis Ambientais

Antes de se proceder à análise cruzada entre as amostras investigadas no presente estudo, realizou-se uma exaustiva investigação intra-amstral, a fim de identificar variáveis genéticas e/ou ambientais que pudessem apresentar associação com a ocorrência de algum dos genótipos estudados. Assim, foram investigadas as variáveis referentes à idade (faixa etária), tabagismo (tempo de tabagismo, quantidade diária de cigarros consumida e maço-ano) e etilismo (tempo de etilismo, quantidade de álcool por dia e álcool-ano).

A análise dessas variáveis ambientais apontou que apenas a variável idade, conforme o esperado, mostrou associação com o tempo de etilismo e tempo de tabagismo, nas três amostras analisadas. Nenhum cruzamento realizado identificou dependência dessas variáveis para com os diferentes genótipos. Esse fato permitiu a comparação livre dessas variáveis entre as diferentes amostras, principalmente com relação à idade, variável para a qual a amostra Ct exibiu distribuição diferente das demais.

V.2.1- GST

Os polimorfismos GSTT1 e GSTM1 foram investigados em 136 indivíduos da amostra EC, 73 ENC e 224 Ct, sendo possível a identificação de quatro fenótipos³ combinando-se os referidos genes (Figura 6). Os resultados da pesquisa desses polimorfismos nas três amostras encontram-se compilados na Tabela 12.

³No presente trabalho a expressão **fenótipo** também será usada em referência ao padrão observado após eletroforese de produto de PCR, correspondendo à presença/ausência de um fragmento amplificado ou à presença/ausência de sítio de restrição.

Tabela 12: Frequências relativas (%) de genótipos nulos para os genes *GSTT1* e *GSTM1* e suas possíveis combinações, observadas em indivíduos portadores de cirrose alcoólica (EC), etilistas não-cirróticos (ENC) e controles (Ct).

Amostras	n	GSTT1 nulo	GSTM1 nulo	GSTT1/GSTM1 ^a			
				0/0	+/0	0/+	+/+
EC	136	27.2	52,9 ^b	13.2	39.7	14	33.1
ENC	74	20.3	37,8	9.5	28.4	12.3	51.4
Ct	224	18.3	46	8.5	37.5	9.8	44.2

^afenótipo +/+ = presença de ambos os genes; +/0 = presença apenas do GSTT1;

0/+ = presença apenas do GSTM1 e fenótipo 0/0 = ausência de ambos os genes,

^bEC x ENC $\chi^2=4,383$; $p=0,036$

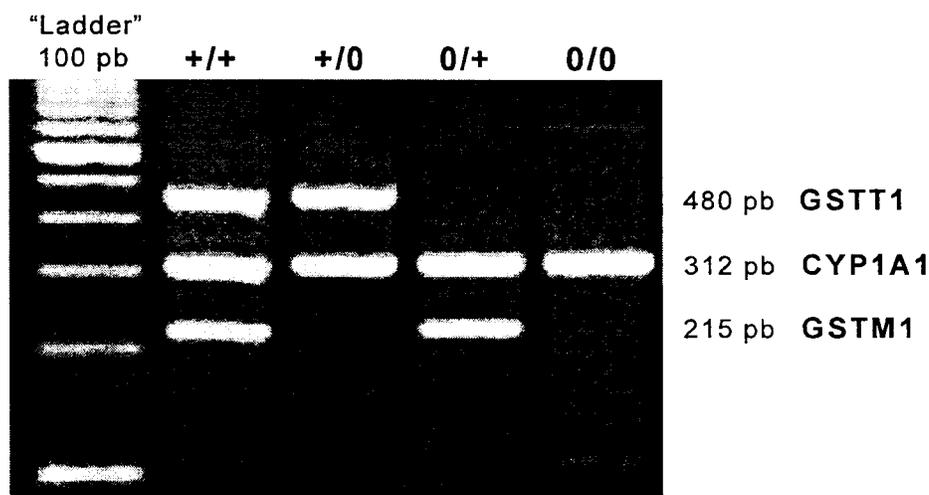


FIGURA 6: Fotografia de gel sob luz UV, apresentando os fenótipos observados para os genes *GST T1/M1* após PCR para identificação de seus genótipos nulos:

+/+, presença de GSTT1 e GSTM1;
 +/0, presença apenas de GSTT1;
 0/+, presença apenas do GSTM1;
 0/0, ausência de ambos.

Nas Tabelas 13 a 15 apresentam-se as freqüências relativas dos fenótipos observados para os polimorfismos GSTT1 e GSTM1 nas amostras EC, ENC e Ct, respectivamente. Essas freqüências foram calculadas segundo as variáveis ambientais idade, tabagismo, etilismo e, para a amostra EC, sorologia positiva para vírus de hepatite.

Nessas tabelas pode-se observar que as freqüências desses fenótipos geralmente ocorreram em valores similares entre as diferentes classes dessas variáveis, o que pode ser percebido comparando-se a proporção das freqüências fenotípicas com aquela do número de indivíduos por classe. Essa comparação apontou diferenças significativas, na proporção das combinações fenotípicas consideradas, apenas na faixa de idade entre 30 e 39 anos da amostra controle, sendo uma diferença introduzida pelo excesso de GSTT1 nulo ($\chi^2=4,04$; $p=0,045$), que se encontrou principalmente associado ao GSTM1 nulo (0/0; $\chi^2=5,518$; $p=0,019$). Como esse foi um fato isolado, será considerado apenas quando do envolvimento simultâneo das variáveis idade e *GSTT1* para a amostra Ct. Portanto, para as amostras EC e ENC, principal objeto de foco neste estudo, não foi detectada qualquer dependência dessas classes com a ocorrência de genótipos nulos referentes aos genes investigados.

Na amostra EC não se detectou diferença na distribuição dos genótipos GST quando foram comparados os sub-grupos soropositivo e soronegativo para HBV ou HCV, sugerindo independência entre essas variáveis ($p>0,2$).

Cerca de 53% dos indivíduos da amostra EC apresentaram-se homozigotos para a deleção do *GSTM1* (Tabela 16). Comparativamente, essa amostra exibiu uma freqüência significativamente maior de genótipo GSTM1 nulo que os 37,8% obtidos para a amostra ENC ($\chi^2=4,383$; $p=0,036$). Na amostra Ct o GSTM1 nulo apresentou-se numa taxa intermediária às demais amostras (46,0%) não diferindo da amostra EC ($\chi^2=1,641$; $p=0,200$) ou da amostra ENC ($\chi^2=1,040$; $p=0,308$).

O gene *GSTT1* esteve ausente em 27,2% da amostra EC e em 20,3% dos integrantes da amostra ENC e em 18,3% de Ct (Tabela 16). A frequência em EC não diferiu de ENC ($\chi^2=1,237$; $p=0,266$) nem de Ct ($\chi^2=0,141$; $p=0,707$). Já a frequência em EC foi significativamente maior que na amostra Ct ($\chi^2= 3,951$; $p=0,047$), apesar da semelhança observada na faixa etária de 30-39 anos de idade ($\chi^2=0,46$; $p=0,830$). A diferença entre essas amostras acentuou-se quando foram comparados apenas os indivíduos fumantes de ambas (27,1% vs 12,5%; $\chi^2=6,49$; $p=0,018$), conforme pode ser observado na Tabela 16. A análise apenas do grupo de fumantes da amostra ENC resultou em diminuição na frequência do *GSTT1* nulo (17,5%), porém ao ser comparada à amostra EC e Ct essa diferença ainda não se mostrou significativa ($\chi^2=2,049$; $p=0,152$).

O polimorfismo *GSTM1* nulo não exibiu associação com a variável tabagismo, ou seja, em nenhuma das amostras se observou diferenças entre os grupos de fumantes e não-fumantes.

Como esses genes têm papel similar na destoxificação de xenobióticos, verificou-se as possíveis combinações entre esses polimorfismos (Tabela 16). Para a combinação genotípica *GSTT1/M1* foram observados 33,1% dos integrantes da amostra EC com o fenótipo +/+, uma frequência menor que a observada para a amostra ENC (51,4%; $\chi^2=5,945$; $p=0,01$), e também menor que aquela da amostra Ct (44,2%; $\chi^2=3,9$; $p=0,048$). Considerando-se apenas os indivíduos fumantes manteve-se a dependência entre o fenótipo +++ e a ocorrência ou não de cirrose em etilistas, pois 33,6% dos EC fumantes apresentaram o fenótipo +++ enquanto nos ENC essa frequência foi de 54% ($\chi^2=5,949$; $p= 0,01$),

Adicionalmente, 13,2% da amostra EC eram portadores do genótipo nulo para ambos os genes em questão (0/0) enquanto apenas 8,4% da amostra Ct exibiu tal genótipo, todavia essa diferença não foi estatisticamente significativa ($\chi^2= 2,073$; $p=0,21$). Considerando-se apenas os fumantes, a diferença tornou-se significativa ($z=2,17$; $p=0,015$), pois a frequência desse genótipo foi de 12,2% na amostra EC e

3,8% na Ct. Neste caso, em particular, optou-se pela aplicação do teste binomial de proporções, visto que: (1) o número de indivíduos 0/0 na amostra Ct comprometia a análise pelo teste do qui-quadrado, e (2) o tamanho amostral não era adequado para o teste exato de Fisher.

A presença de um único gene (GSTT1 ou GSTM1), traduzida pelos combinações fenotípicas +/0 e 0/+, foi investigada e suas respectivas freqüências na amostra EC foram de 39,7% e 14% (Tabela 12). Esses valores foram de 28,4% e 10,8% na amostra ENC e na amostra Ct corresponderam a 37,5% e 9,8%. Da mesma forma, em todas as amostras, essas combinações fenotípicas não apresentaram dependência das variáveis investigadas, tampouco resultaram em diferenças significativas na comparação do fenótipo +/0 ($\chi^2=2,104$; $p=0,349$) ou para o fenótipo 0/+ ($\chi^2=2,104$; $p=0,162$) entre as três amostras.

Tabela 13: Frequências relativas (%) de fenótipos GSTT1 e GSTM1 nulos e suas combinações em uma amostra de etilistas cirróticos (EC), segundo algumas variáveis ambientais.

Variável	n	%	GST (%)				
			T1 nulo	M1 nulo	T1/M1 0/0	T1/M1 +/+	
idade (anos)	<30	4	2,9	2,7	2,8	0	2,2
	30-39	20	14,7	16,2	16,7	22,2	13,3
	40-49	53	39	35,1	36,1	27,8	42,2
	>49	59	43,4	46,0	44,4	50,0	42,2
HBV/HCV	SD ^a	6	4,4	2,7	5,6	5,6	4,4
	soro -	98	72,1	70,3	66,7	55,6	75,6
	soro +	32	23,5	27,0	27,8	38,9	20,0
tabagismo (cigarros/dia)	0	24	17,6	16,2	23,6	27,8	20,0
	<10	5	3,7	2,7	5,6	5,6	2,2
	10-20	76	55,9	56,8	54,2	44,4	46,7
	>20	31	22,8	24,3	16,7	22,2	31,1
etilismo (g álcool/dia)	50-149	54	39,7	27,0	44,4	22,2	35,6
	150-200	25	18,4	18,9	16,7	22,2	22,2
	>200	57	41,9	54,1	38,9	55,6	42,2
TOTAL	136			27,2	52,9	13,2	33,1

^aSD=sem diagnóstico sorológico ou molecular para a presença de HBV ou HCV

Tabela 14: Frequências relativas (%) de fenótipos GSTT1 e GSTM1 nulos e suas combinações em uma amostra de etilistas não-cirróticos (ENC), segundo idade, tabagismo e etilismo.

Variável	n	%	GST (%)				
			T1 nulo	M1 nulo	T1/M1 0/0	T1/M1 +/-	
idade (anos)	30-39	18	24,3	20,0	21,4	28,6	29,0
	40-49	32	43,2	46,7	42,9	28,6	39,5
	>49	24	32,4	33,3	35,7	42,9	29,0
tabagismo (cigarros/dia)	0	10	14,9	20,0	10,7	0,0	10,5
	<10	6	8,1	6,7	7,1	14,3	10,5
	10-20	44	58,1	66,7	57,1	71,4	57,9
	>20	14	18,9	6,7	25,0	14,3	21,1
etilismo (g álcool/dia)	50-149	27	36,5	46,7	35,7	42,9	34,2
	150-200	20	27,0	26,7	14,3	14,3	34,2
	>200	27	36,5	26,7	50,0	42,9	31,6
TOTAL	74			20,3	37,8	9,5	51,4

Tabela 15: Frequências relativas (%) de fenótipos GSTT1 e GSTM1 nulos e suas combinações em uma amostra controle (Ct), segundo idade, tabagismo e etilismo.

Variável	n	%	GST				
			T1 nulo	M1 nulo	T1/M1 0/0	T1/M1 +/-	
idade (anos)	>30	45	19,9	12,2	22,3	10,5	18,2
	30-39	66	29,2	46,3 ^a	30,1	57,9 ^b	26,3
	40-49	64	28,3	19,5	20,4	15,8	38,4
	>49	51	22,6	22,0	27,2	15,8	17,2
tabagismo (cigarros/dia)	0	143	63,4	73,2	63,1	84,2	60,6
	<10	10	4,4	2,4	1,9	5,3	4,0
	10-20	61	27,0	19,5	24,3	10,5	30,3
	>20	12	5,3	4,8	10,7	0,0	5,1
etilismo (g álcool/dia)	0	116	51,3	53,7	51,5	63,2	51,5
	<50	81	35,8	29,3	33,9	15,8	38,4
	50-149	29	12,8	17,1	15,5	21,1	10,1
TOTAL	226			18,1	45,6	8,4	43,8

^a $\chi^2=4,04$; $p=0,045$

^b $\chi^2=5,518$; $p=0,019$

Tabela 16: Freqüências relativas de alguns fenótipos observados para os genes *GSTT1* e *GSTM1* nas amostras de etilistas cirróticos (EC), etilistas não-cirróticos (ENC) e controles (Ct), segundo o hábito do tabagismo.

AMOSTRA	TOTAL			FUMANTE		
	n	T1 nulo	%	n	T1 nulo	%
EC	136	37	27,2	107	29	27,1
ENC	74	15	20,3	63	11	17,5
CT	224	41	18,1	85	11	12,5
	n	M1 nulo	%	n	M1 nulo	%
EC	136	^a 72	52,9	107	57	53,3
ENC	74	28	37,8	63	25	41,3
CT	224	103	46,0	85	38	45,8
	n	+/+	%	n	+/+	%
EC	136	45	33,1	107	36	^b 33,6
ENC	74	37	51,4	63	34	54,0
CT	224	99	44,2	85	38	44,7
	n	0/0	%	n	0/0	%
EC	136	18	13,2	85	13	^c 12,2
ENC	74	7	9,5	63	7	11,1
CT	224	19	8,4	85	3	3,8

^aEC x ENC $\chi^2=4,383$; p=0,036

^bEC x ENC $\chi^2=5,949$; p=0,01

^cEC x Ct p=0,015 (teste binomial de proporções)

V.2.2- *CYP2D6*

Três mutações inativadoras do gene *CYP2D6* foram pesquisadas e identificadas neste estudo: a transição G→A na junção do intron 3 e exon 4 (*CYP2D6*4*); a deleção de uma base no exon 5 (*CYP2D6*3*) e a deleção completa do gene (*CYP2D6*5*). Especificamente para este polimorfismo, foram estudados apenas homens, fumantes e, entre os cirróticos, apenas aqueles com sorologia negativa para os vírus HBV ou HCV, objetivando-se homogeneizar as variáveis ambientais.

O gene *CYP2D6* foi investigado em 46 EC, 49 ENC e 35 Ct e nesses foi identificada uma maioria de indivíduos homocigotos para o alelo selvagem⁴ (WT/WT). Em menor frequência, observou-se heterocigotos para os alelos *CYP2D6*3* (WT/3) e *CYP2D6*4* (WT/4), homocigotos para esses alelos (3/3 e 4/4), além daqueles para o alelo *CYP2D6*5* (5/5). Detectou-se ainda um genótipo onde foram identificadas as duas mutações pontuais características dos alelos *CYP2D6*3* e *CYP2D6*4*. Todavia, não se pôde determinar se essas alterações encontravam-se em *cis* ou *trans* (genótipo WT/3,4 ou 3/4), o que permitiria a classificação quanto à capacidade de metabolização, pois a primeira condição resultaria no fenótipo EM e a segunda, em PM. Assim, optou-se por excluir os indivíduos portadores desse genótipo quando da classificação segundo a capacidade de metabolização (fenótipo indefinido).

A comprovação de que essas mutações podem ser observadas em *cis* foi dada pela identificação, nas amostras EC e ENC, de portadores do genótipo *CYP2D6 3/34*, onde certamente um dos cromossomos apresenta simultaneamente as referidas mutações. Esses genótipos podem ser visualizados na Figura 7.

A proporção de indivíduos que apresentaram os polimorfismos descritos, bem como as frequências alélicas obtidas para esses encontram-se na Tabela 17. Nessa, pode-se observar que 41,3% dos EC exibiram o genótipo homocigoto selvagem,

⁴Foi considerado alelo selvagem aquele que não apresentou as mutações investigadas no presente trabalho.

freqüência essa que não diferiu daquelas observadas para as amostras ENC (34,7%; $\chi^2=0,258$; $p=0,768$) e Ct (48,6%; $\chi^2=0,425$; $p=0,670$).

Dois dos genótipos pesquisados não foram observados em todas as amostras: (1) o genótipo 3/34, identificado em 8,7% e 6,1% das amostras EC e ENC, respectivamente, estando ausente na amostra Ct; (2) o homozigoto para o alelo CYP2D6*4 só foi detectado na amostra ENC (4,1%). Os demais genótipos observados ocorreram em todas as amostras em diferentes freqüências, porém foram encontradas diferenças estatisticamente significativas.

Se considerarmos os fenótipos sugeridos por MUIRAS *et al.* (1998), onde são PM somente aqueles indivíduos homozigotos para ao menos um dos locos investigados, teremos que 30,4% da amostra EC e 36,7% da amostra ENC são portadores do fenótipo PM, diferença essa não significativa ($\chi^2=0,637$; $p=0,562$). Na amostra Ct, cerca de 17% dos integrantes exibiram fenótipo PM, freqüência discretamente menor que na amostra ENC ($\chi^2=2,94$; $p=0,08$). Nas três amostras o fenótipo PM foi devido, principalmente, ao genótipo homozigoto para o alelo CYP2D6*3 (genótipos 3/3 e 3/34), seguido do homozigoto CYP2D6*5/5 (Tabela 17).

A determinação da freqüência alélica em EC revelou uma freqüência de 0,313 para o alelo CYP2D6*3 e 0,115 para CYP2D6*4. A freqüência do alelo CYP2D6*5 foi de 0,087, porém esta é subestimada visto que o referido alelo só pôde ser identificado em homozigose. Essas freqüências não diferiram daquelas observadas para as amostras ENC, que foram de 0,347, 0,122 e 0,102, respectivamente (Tabela 18). A amostra Ct apresentou uma freqüência de 0,171 para o alelo CYP2D6*3, ligeiramente menor que o observado para a amostra EC ($\chi^2=2,737$; $p=0,09$), porém significativamente menor que na amostra ENC ($\chi^2=6,326$; $p=0,02$).

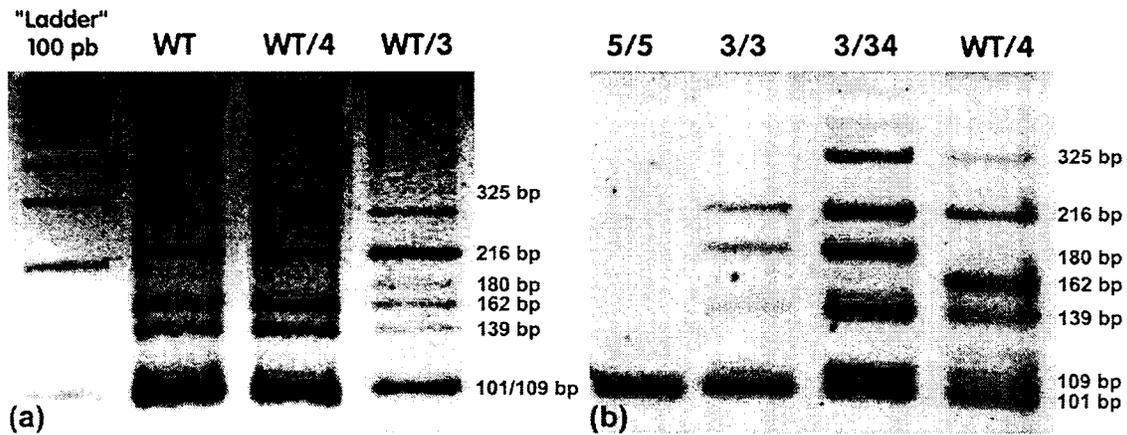


FIGURA 7: Negativo de gel fotografado sob luz UV, apresentando genótipos observados para o gene *CYP2D6*, após pesquisa dos alelos *CYP2D6*3*, *CYP2D6*4* e *CYP2D6*5*.

WT =	indivíduo com genótipo “wild type”
WT/4=	heterozigoto para o alelo <i>CYP2D6*4</i>
WT/3=	heterozigoto para o alelo <i>CYP2D6*3</i>
55=	homozigoto para a deleção completa do gene
33=	homozigoto para o alelo <i>CYP2D6*3</i>
3/3,4=	homozigoto para o alelo <i>CYP2D6*3</i> e heterozigoto para o alelo <i>CYP2D6*4</i>

Tabela 17: Frequências (%) dos genótipos *CYP2D6* observados nas amostras de etilistas cirróticos (EC), não-cirróticos (ENC) e controles (Ct). São também apresentadas as frequências de pobres metabolizadores (PM), extensivos metabolizadores (EM).

Genótipos	EC		ENC		Ct	
	n	%	n	%	n	%
WT/WT	19	41,3	17	34,7	17	48,6
WT/3	6	13,0	9	18,4	3	8,6
3/3*	6	13,0	8	16,3	4	11,4
WT/4	3	6,5	2	4,1	8	22,8
4/4	0	0	2	4,1	0	0
3,4**	4	8,7	3	6,1	1	2,9
3/34*	4	8,7	3	6,1	0	0
5/5*	4	8,7	5	10,2	2	5,7
TOTAL	46		49		35	
EM	28	60,9	28	57,1	28	80,0
PM	14	30,4	18	36,7	6	17,1
indefinidos**	4	8,7	3	6,1	1	2,9

*genótipos PM

** genótipo excluído da classificação quanto à capacidade de metabolismo.

Tabela 18: Frequências de indivíduos portadores de diferentes alelos do gene *CYP2D6* e respectiva frequência alélica (FA) observadas em etilistas cirróticos (EC) não-cirróticos (ENC) e controles (Ct).

Amostras		CYP2D6*3	CYP2D6*4	CYP2D6*5 ¹
EC (n=46)	n	20 (43,5%)	11 (23,9%)	4 (8,7%)
	FA	0,326	0,120	0,087
ENC (n=49)	n	23 (46,9%)	10 (20,4%)	5 (10,2%)
	FA	0,347	0,122	0,102
Ct (n=35)	n	28 (22,9%)	9 (25,7%)	2 (5,7%)
	FA	0,171	0,129	0,057

¹o valor obtido para o alelo CYP2D6*5 é subestimado pois o mesmo não pôde ser detectado em heterozigose.

²Ct x EC $\chi^2 = 7,918$; p=0,005 e Ct x ENC $\chi^2 = 4,103$; p=0,043

³Ct x EC $\chi^2 = 2,737$; p=0,09 e Ct x ENC $\chi^2 = 6,326$; p=0,02

V.2.3- CYP2E1

O polimorfismo CYP2E1/*Pst*I foi pesquisado em 133 EC, 75 ENC e 222 controles, sendo que o alelo CYP2E1*c2 foi observado somente em heterozigose (c1/c2), conforme pode-se observar na Figura 8. O genótipo c1/c2 foi identificado em 12,8% dos EC, freqüência essa similar àquelas observadas para as amostras ENC (10,8%) e Ct (14,0%). Por conseguinte, a freqüência do alelo CYP2E1*c2 não diferiu entre as referidas amostras ($\chi^2=2,060$; $p=0,725$), representando em torno de 6% do total de alelos (Tabela 19).

O polimorfismo CYP2E1/*Dra*I foi pesquisado em 132 indivíduos da amostra EC, 71 ENC e 212 Ct. O alelo CYP2E1*C ocorreu, principalmente, em heterozigose, sendo que apenas um indivíduo apresentou o genótipo homozigoto C/C (Figura 9). Esse alelo foi identificado em 22,1% dos integrantes da amostra EC, 26,8% dos ENC enquanto que a amostra Ct exibiu uma freqüência intermediária a essas, equivalente a 23,6% (Tabela 20). Esses valores não diferiram significativamente ($\chi^2=0,769$; $p=0,681$) considerando-se as três amostras.

A comparação entre os subgrupos soropositivo e soronegativo para os vírus HBV ou HCV não revelou diferenças nas freqüências dos alelos CYP2E1*c2 ($\chi^2=0,734$; $p=0,392$) e CYP2E1*C ($\chi^2=0,009$; $p=0,924$). Da mesma forma, esses subgrupos mostraram-se semelhantes à amostra ENC para ambos os alelos ($\chi^2=1,587$; $p=0,452$ e $\chi^2=0,116$; $p=0,994$, respectivamente).

A baixa freqüência dos alelos CYP2E1*c2 E CYP2E1*C comprometeu a sensibilidade dos testes que investigariam a associação desses alelos com outras variáveis genéticas e/ou ambientais.

A análise simultânea dos polimorfismos *Pst*I e *Dra*I na amostra EC resultou na identificação de 74,0% de seus integrantes como homozigotos para os alelos selvagens (c1 e D) e 8,4% como portadores de ambos alelos raros c2 e C (Tabela 21). Na amostra ENC o genótipo duplo selvagem foi observado em 73,2%, semelhante à

amostra EC ($\chi^2=0,283$; $p=0,595$). Todavia, na amostra ENC o genótipo c1/c2 sempre esteve associado ao D/C, enquanto em EC essa combinação só foi identificada em 68,7% dos indivíduos c1/c2. Essa comparação identificou uma tendência para associação entre os genótipos D/C e c1/c2 em ENC, embora não tenha sido significativa ($\chi^2=2,795$; $p=0,09$).

Isoladamente, os polimorfismos investigados no gene *CYP2E1* não se mostraram associados ao desenvolvimento de cirrose alcoólica. Mas, percebeu-se uma interação entre esse e os genes *GSTT1* e *GSTM1* na suscetibilidade à referida hepatopatia (Tabela 22). Na amostra EC, 26,7% dos seus integrantes apresentaram simultaneamente os alelos selvagens para *GSTT1*, *GSTM1* e *CYP2E1/PstI*. Esse valor foi menor que o de 45,1% observado para a amostra ENC ($\chi^2=6,193$; $p=0,01$). A mesma associação foi identificada para o polimorfismo *CYP2E1/DraI*, pois o alelo selvagem *CYP2E1**D apresentou-se combinado com *GSTT1/M1* +/+ em 40,8% dos ENC e em 25,2% dos EC ($\chi^2=4,594$; $p=0,03$). A análise considerando-se os quatro polimorfismos simultaneamente apontou maior frequência do genótipo selvagem na amostra ENC (40,8%) comparada à amostra EC (22,9%; $\chi^2=6,329$; $p=0,01$). Todas essas combinações geraram *odds ratio* maior que 2.

A prevalência dos referidos genótipos selvagens combinados tornou-se mais acentuada quando foram considerados apenas os indivíduos fumantes, visto que 46% dos ENC apresentaram tal característica genética enquanto que na amostra EC apenas 23,3% o fizeram. Esse resultado indicou a condição mais fortemente associada à proteção contra a cirrose alcoólica, onde o *odds ratio* correspondeu a 2,8 (IC=1,43-5,51; $p=0,004$).

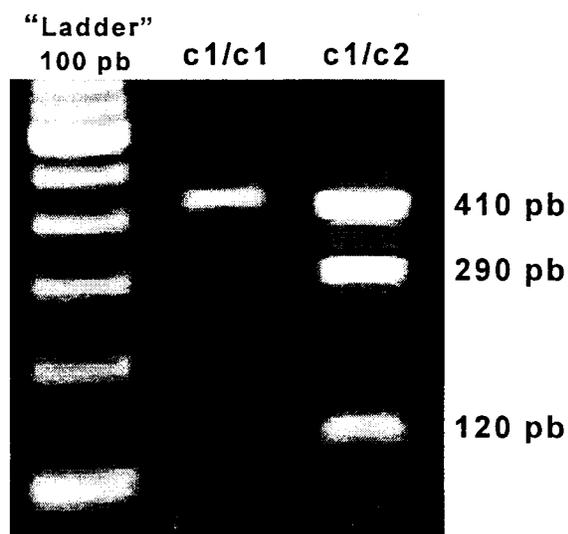


FIGURA 8: Fotografia de gel sob luz UV, apresentando os genótipos observados para o gene *CYP2E1* após digestão com a enzima *PstI*.

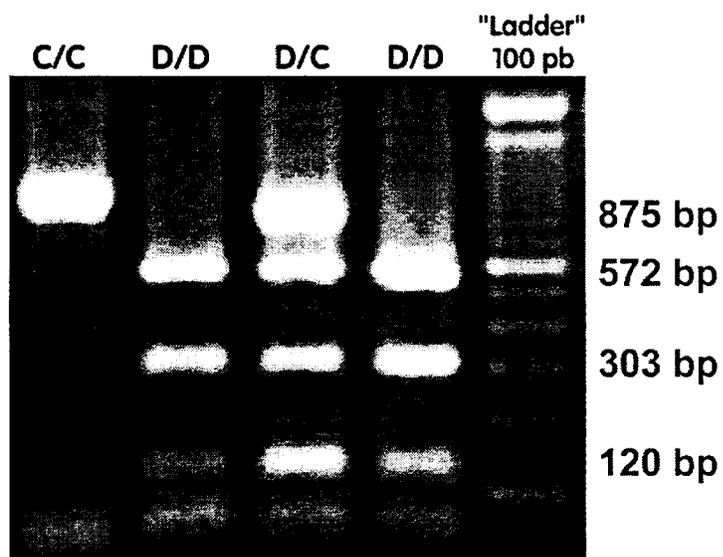


FIGURA 9: Fotografia de gel sob luz UV, apresentando os genótipos observados para o gene *CYP2E1* após digestão com a enzima *DraI*.

Tabela 19: Frequências (%) dos genótipos obtidos para o polimorfismo CYP2E1/*Pst*1 em amostras de etilistas cirróticos (EC), etilistas não-cirróticos (ENC) e controles (Ct), apresentando-se a frequência alélica para o CYP2E1*c2 (FA).

AMOSTRA	c1/c1		c1/c2		CYP2E1*c2
	n	%	n	%	FA
EC	116	87.2	17	12.8	0.064
HBV/HCV +	26	81.2	6	18.8	0.094
HBV/HCV -	90	89.1	11	10.9	0.054
ENC	66	89.2	8	10.8	0.054
Ct	191	86	31	14	0.07

HBV/HCV+ vs HBV/HCV - $\chi^2=0,734$; p=0,392

HBV/HCV+ vs HBV/HCV vs ENC $\chi^2=1,587$; p=0,452

Tabela 20: Frequências (%) dos genótipos observados para o polimorfismo CYP2E1/*Dra*1 em amostras de etilistas cirróticos (EC), etilistas não-cirróticos (ENC) e controles (Ct), apresentando-se a frequência alélica para o CYP2E1*C (FA).

AMOSTRA	DD		DC		CC		CYP2E1*C
	n	%	n	%	n	%	FA
EC	103	78.9	29	22.1	0	0	0.111
HBV/HCV +	26	75	8	25	0	0	0.125
HBV/HCV -	51	72.8	20	28.2	0	0	0.141
ENC	52	74.2	19	26.8	0	0	0.134
Ct	161	76.9	50	23.6	1	0.6	0.144

HBV/HCV+ vs HBV/HCV - $\chi^2=0,009$; p=0,924

HBV/HCV+ vs HBV/HCV vs ENC $\chi^2=0,116$; p=0,944

Tabela 21: Proporção das combinações genotípicas observadas para os polimorfismos CYP2E1/*Pst*I (alelos c1 e c2) e CYP2E1/*Dra*I (alelos D e C).

AMOSTRAS (n)	c1/c1			c1/c2		
	n	n	(%)	n	n	(%)
EC (131)	115	DD	97 (74,0)	16	DD	5 (3,8)
		DC	18 (13,7)		DC	11 (8,4)
ENC (71)	64	DD	52 (73,2)	7	DD	0 (0)
		DC	12 (16,9)		DC	7 (9,9)
Ct (210)	182	DD	151 (71,9)	29	DD	9 (4,3)
		DC	31 (14,8)		DC	19 (9,1)

Tabela 22: Relação entre os polimorfismos GSTT1, GSTM1, CYP2E1/*Pst*I e CYP2E1/*Dra*I em amostras de etilistas cirróticos (EC) e não cirróticos (ENC), apresentando-se para as diversas combinações o *Odds Ratio* (OR) com intervalo de confiança de 95% (IC).

GENÓTIPOS	EC (%)	ENC (%)	χ^2	OR (IC 95%)
GSTT1/M1+/+	45 (34,4)	37 (52,1)	$\chi^2 = 5,309$	2,08 (1,15-3,75)
demais genótipos	86 (65,6)	34 (47,9)	$p = 0,02$	
+/+; D/D	33 (25,2)	29 (40,8)	$\chi^2 = 4,594$	2,05 (1,11-3,80)
demais genótipos	98 (74,8)	42 (59,2)	$p = 0,03$	
+/+; c1/c1;	35 (26,7)	32 (45,1)	$\chi^2 = 6,193$	2,25 (1,23-4,13)
demais genótipos	96 (73,3)	39 (54,9)	$p = 0,01$	
+/+; c1/c1; D/D	30 (22,9)	29 (40,8)	$\chi^2 = 6,329$	2,32 (1,24-4,34)
demais genótipos	101 (77,1)	42 (59,2)	$p = 0,01$	

(somente fumantes)				
+/+; c1/c1; D/D	24 (23,3)	29 (46,0)	$\chi^2 = 8,277$	2,80 (1,43-5,51)
demais genótipos	79 (76,7)	34 (54,0)	$p = 0,004$	

VI- DISCUSSÃO

O cotidiano do ser humano, bem como das demais espécies, envolve o contato, praticamente imensurável, com uma enorme gama de substâncias. Conseqüentemente, são descritas muitas doenças cuja etiologia envolve agentes ambientais, para as quais a epidemiologia tem identificado grupos de maior risco. Dentre essas substâncias químicas, têm recebido mais atenção àquelas associadas ao estilo de vida, incluindo o hábito alimentar, história ocupacional, tabagismo e etilismo, dentre outros fatores.

Embora seja efetiva a associação entre determinadas doenças e o grau de exposição à carcinógenos, é amplamente conhecida a resposta diferencial do ser humano à exposição aos xenobióticos. O primeiro fator de variabilidade é a própria exposição, seguindo-se as diferenças na absorção e principalmente no metabolismo desses compostos. Adicionalmente, ainda há variabilidade na capacidade de reparar lesões nas biomoléculas como DNA e proteínas. Todos esses fatores conduzem à suscetibilidade diferencial para o desenvolvimento de algumas doenças, incluindo o câncer.

As etapas de absorção, metabolização e reparo das biomoléculas estão sob controle genético, o que permite o delineamento de estudos para a identificação de fatores de suscetibilidade. Com esse objetivo, surgiu a Epidemiologia Molecular, área de pesquisa que associa as técnicas de biologia molecular à metodologia clássica de epidemiologia para identificação de fatores de risco. Com essa nova abordagem epidemiológica objetiva-se o estabelecimento de riscos relativos de determinados genótipos para o desenvolvimento de doenças, permitindo a identificação de indivíduos com riscos elevados para tais doenças, o que antes a epidemiologia clássica só permitia para grupos de risco.

Nos últimos anos, o principal foco dos estudos de suscetibilidade tem sido os genes e proteínas envolvidos no metabolismo de xenobióticos, para os quais foram

descritos polimorfismos moleculares associados a, ou responsáveis por, diferentes atividades das enzimas que modulam o biometabolismo. Dentre esses genes encontram-se aqueles das famílias CYP e GST. Porém, apesar de existir um razoável número de estudos nessa direção, somente para poucos alelos está estabelecida uma associação convincente para o desenvolvimento de doenças crônicas, como câncer.

Os alelos polimórficos de genes relacionados ao metabolismo de xenobióticos têm aparente distribuição diferencial nas populações investigadas. Essa variação tem sido associada principalmente à composição étnica e faixa etária das mesmas. Dessa forma, o conhecimento da distribuição desses polimorfismos na população-alvo, permite minimizar o efeito dessas variáveis em estudos que investigam a interação entre fatores ambientais, "background" genético e doenças específicas.

VI.1- Polimorfismos em Genes do Biometabolismo Segundo Etnia

Para os quatro genes investigados neste estudo (*GSTT1*, *GSTM1*, *CYP2E1* e *CYP2D6*) alguns autores sugerem variabilidade nas freqüências dos alelos polimórficos segundo a origem étnica da população considerada. Os alelos *CYP2E1**c2 e *CYP2E1**C acontecem em freqüências mais elevadas em populações asiáticas que nas demais investigadas. Em contraposição os alelos *CYP2D6**3 e *4 são muito mais raros entre os asiáticos que entre os brancos-americanos (BROLY *et al.*, 1991; DAHL *et al.*, 1995). O genótipo nulo para *GSTM1*, que geralmente é descrito em freqüências em torno de 50% para europeus, foi detectado em 20% dos ameríndios brasileiros (ARRUDA *et al.*, 1998) e em 27,6% de uma população afro-americana (CHEN *et al.*, 1996).

Contudo, como realizar a classificação étnica em populações miscigenadas, como a brasileira? O Brasil é um país altamente miscigenado, desde a sua origem, pois a colonização portuguesa iniciou-se em 1502, mas as primeiras mulheres brancas

só chegaram cerca de 50 anos depois. Assim, a miscigenação imediata deu-se entre brancos e ameríndias e ocorreu intensivamente na região Sudeste visto que nela se iniciou a colonização do Brasil (SALZANO & FREIRE-MAIA, 1967).

Com o início do tráfico de escravos, que se acredita ter acontecido em torno de 1540, os negros passaram a ser o principal grupo de miscigenação com o branco. Durante três séculos ocorreu intensa miscigenação entre portugueses, índios e negros, visto que somente no século XIX ocorreram os três principais movimentos de imigração de europeus para o Brasil. O primeiro se estendeu de 1808, com a conhecida abertura dos portos, até 1850, com a Lei Eusébio de Queiroz que proibiu o tráfico de escravos. Nesse período, cerca de 21.600 imigrantes formaram núcleos coloniais, principalmente de suíços e alemães, estabelecendo-se no estado do Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e Santa Catarina. O segundo período (de 1850 a 1888, com a abolição da escravatura) trouxe para o Brasil mais de 880 mil estrangeiros, na sua maioria italianos (33% do total), alemães (7%) e espanhóis (3%), que se estabeleceram principalmente no Rio Grande do Sul e São Paulo. O período de maior intensidade de imigração para o Brasil foi entre 1889 e 1913 com cerca de 1 milhão de imigrantes a cada dez anos, sendo os italianos os mais frequentes, seguidos dos portugueses, espanhóis, japoneses e alemães. São Paulo, mais uma vez, acolheu grande parte desses imigrantes.

Tanto os negros quanto os europeus e asiáticos distribuíram-se nas diversas regiões do país em diferentes combinações e proporções, promovendo uma heterogeneidade entre essas regiões. Esse padrão regional de miscigenação vem sendo alterado continuamente em virtude das correntes de migração interna, uma delas trazendo grande contingente de pessoas para a região sudeste do país, um importante centro industrial.

Uma idéia da intensa imigração de brasileiros para o estado de São Paulo é fornecida pelo último Censo Demográfico (IBGE, 1991). Nos relatórios desse censo constam que 77,1% dos residentes no estado de São Paulo haviam nascido no próprio

estado, mas se considerarmos apenas os indivíduos na faixa etária de 30 a 59 anos de idade e que aqui residem há mais de 10 anos, essa proporção cai para 66%. Esses dados sugerem que há algumas décadas foi maior a participação dos migrantes na composição desta população, sendo que os estados que mais contribuíram foram: Minas Gerais (9,77%), Bahia (6,34%), Paraná (3,45%), Pernambuco (4,27%) e Ceará (2,81%). Essas proporções são similares àquelas obtidas para os integrantes das amostras investigadas no presente estudo.

Conforme pôde ser observado, o estado de São Paulo além de ser o berço da miscigenação entre portugueses e índias, recebeu grande contingente de escravos negros e, em seguida, foi o principal receptor de estrangeiros, principalmente italianos, portugueses e japoneses. Adicionalmente, sempre esteve na rota das correntes de migração interna. A geneticista Eliane Azevedo, percebendo essa qualidade na população da região sudeste, descreveu:

*...“De modo geral, o Brasil é mulato no litoral, branco e mestiço no interior. É também mais índio ao norte, menos branco no nordeste, mais índio e mais branco no centro-oeste, menos preto no sul e **tudo no sudeste...**”*
(AZEVEDO, 1987. p.40)

Essa extrema miscigenação observada na região sudeste inviabiliza a classificação da população quanto à etnia, considerando-se somente os grupos caucasóide, negróide, ameríndio e asiático, principalmente se os únicos critérios forem cor da pele e textura do cabelo. A tentativa de associação de uma variável genética com grupos étnicos só poderia ter algum valor quando comparadas populações de estados brasileiros que ainda guardam diferenças quanto à sua composição, como descreveu FRANCO *et al.* (1982) para os estados do Rio Grande do Sul (RS) e Rio Grande do Norte (RN). Nesse estudo, em uma amostra de brancos da região de Porto Alegre (RS) foi estimada em 8% a presença de ancestrais de outros grupos étnicos, enquanto para os brancos de Natal (RN), essa taxa foi de 33%. Porém, é inviável buscar tal associação em um estado, como São Paulo, onde, assim como em

Natal (RN), a grande maioria das pessoas tem diferentes percentuais de ancestrais caucasóides, negróides, ameríndios e asiáticos.

Para alguns polimorfismos, como G6PD A e HbS, é clara a associação com a população negróide. Nesses casos, independente do viés introduzido pela miscigenação, é de grande valia a identificação dos indivíduos quanto à etnia aparente. Porém, para os polimorfismos aqui investigados há apenas uma sugestão de variabilidade segundo a etnia e assim, a inclusão dessa variável para se estabelecer riscos poderia resultar em conclusões errôneas, principalmente quando a população em estudo é altamente miscigenada.

Por esses fatos optou-se por avaliar a população do estado de São Paulo como uma unidade, ou seja, um grupo cuja identidade é a heterogeneidade étnica, opinião essa compartilhada por GOLDBERG *et al.*, (1998).

VI.2- *GSTT1* e *GSTM1*

VI.2.1- *GSTT1* e *GSTM1* nulos na população brasileira

Um único trabalho na literatura pertinente refere-se aos polimorfismos *GSTT1* e *GSTM1* na população brasileira. Nesse, ARRUDA *et al.* (1998) investigaram três populações brasileiras, sendo uma de indivíduos considerados caucasóides, por não relatarem miscigenação étnica nas três últimas gerações. O segundo grupo composto por negros do estado da Bahia, um dos estados brasileiros com maioria negróide, e um terceiro grupo de ameríndios de uma tribo da Amazônia brasileira, sem miscigenação conhecida com outros grupos étnicos. Nesses grupos, os autores observaram o genótipo *GSTM1* nulo em frequências de 55% nos caucasóides, 33% nos negróides e 22% na população indígena, enquanto que a prevalência do *GSTT1* nulo foi de 18,5%, 19% e 11%, respectivamente.

Essas populações não representam a grande maioria dos brasileiros, cuja característica é a heterogeneidade étnica. Fato é que duas populações brasileiras altamente miscigenadas, pertencentes aos estados do Pará e de São Paulo, portanto, geograficamente muito distantes (± 2800 km) e de composições étnicas historicamente distintas, não diferiram significativamente quanto às frequências de GSTT1 e GSTM1 nulos (CABRAL *et al.*, dados não publicados).

Na amostra Ct do presente trabalho, a que deve ter maior similaridade com a população geral do estado de São Paulo, a frequência do genótipo GSTM1 nulo (46%) não diferiu significativamente da observada por ARRUDA *et al.* (1998) para os caucasóides da mesma região. Ao mesmo tempo, essa frequência é similar àquelas obtidas para diversas populações, com graus muito menores de miscigenação, como os valores de 42 a 51% observados em populações de brancos dos Estados Unidos da América - EUA (ABDEL-RAHMAN *et al.*, 1996; CHEN *et al.*, 1996; LIN *et al.*, 1994; EL-ZEIN *et al.*, 1997; CHENG *et al.*, 1999); e de cerca de 53% observados em brancos da Suécia e da Holanda (ALEXANDRIE *et al.*, 1994; OUDE-OPHIUS *et al.*, 1997; VIEZZER *et al.*, 1999).

A frequência de 18% para o genótipo GSTT1 nulo na amostra Ct também foi similar àquela de caucasóides brasileiros descrita por ARRUDA *et al.* (1998). Assim como foi evidenciado para GSTM1 nulo, o genótipo GSTT1 nulo apresentou-se em frequências semelhantes àquelas observadas em populações de brancos na Europa (10-20%, OUDE-OPHUIS *et al.*, 1997; FALCK *et al.*, 1999; JOURENKOVA-MIRONOVA *et al.*, 1999) e nos EUA (15-22%, ABDEL-RAHMAN *et al.*, 1996; EL-ZEIN *et al.*, 1997; KRAJINOVIC *et al.*, 1999).

Os dados, tanto de GSTT1 quanto GSTM1, sugerem fragilidade na suposta idéia de variação étnica para tais polimorfismos, visto que há frequências similares de genótipos GSTT1 e GSTM1 nulo entre populações de etnias tão distintas quanto italianos e ameríndios brasileiros. Da mesma forma, há grande variabilidade dentro de um mesmo país, como na China onde GSTM1 nulo tem variação de 26 a 49% em

diferentes estudos (GUO *et al.*, 1996; GAO & ZHANG, 1999). Esses fatos indicam que a etnia, no máximo, pode ser um dos fatores de variabilidade populacional nas frequências de GSTT1 e GSTM1 nulos porém, isoladamente não tem grande impacto.

VI.2.2- GSTT1 e GSTM1 nulos e a cirrose alcoólica

As enzimas GST já foram detectadas em diversos tecidos, incluindo fígado e pulmão, sugerindo fortemente que a expressão dos genes *GST* não é tecido-específica. Essas enzimas são importantíssimas na inativação dos carcinógenos da fumaça do tabaco, e sua ação se inicia no epitélio pulmonar, porém a maior parte dos compostos alcança a corrente sangüínea sofrendo metabolização no tecido hepático. Tanto no pulmão quanto no fígado esses compostos estão sujeitos à ativação pelas enzimas CYP ou inativação pelas enzimas GST, dentre outras. Porém, para os referidos grupos enzimáticos foi estabelecido que a ação se dá predominantemente em tecido extra-pulmonar, principalmente no fígado, onde a enzima GSTM1 é uma das mais transcritas, dentre as GST (WALEN & BOYER, 1998).

Os polimorfismos nos genes da família GST têm sido pouco investigados em portadores de cirrose alcoólica, visto que esses não estão envolvidos no metabolismo do álcool. Todavia, existe uma forte associação entre os hábitos de tabagismo e etilismo, conforme detectado no presente trabalho. Assim, pesquisou-se os genes *GSTT1* e *GSTM1*, cujos produtos inativam muitas substâncias presentes na fumaça do cigarro. Os resultados dessa análise indicaram que o genótipo GSTM1 nulo está fortemente associado ao desenvolvimento da cirrose alcoólica, visto que se observou maior frequência desse na amostra EC comparada à ENC (Tabela 12). Ambas as amostras relataram um consumo similar de álcool e tabaco quanto ao tempo e quantidade, porém, ao contrário do observado para a amostra ENC, a maioria dos integrantes da amostra EC não sintetizava a enzima GSTM1 (genótipo nulo), o que sugere um aumento no nível de exposição do organismo aos produtos do cigarro e outros agentes citotóxicos, substratos para essa enzima.

Para o genótipo GSTT1 nulo não foi detectada diferença estatisticamente significativa entre os grupos EC e ENC, e duas hipóteses podem ser sugeridas: primeiro, esse polimorfismo, isoladamente, não estaria envolvido na etiologia da cirrose alcoólica; e segundo, como a amostra EC diferiu da Ct, provavelmente o tamanho da amostra ENC tenha comprometido a análise.

A literatura pertinente não refere outro estudo sobre GSTT1 nulo em portadores de hepatopatias alcoólicas. Adicionalmente, são contraditórios os resultados de pesquisas que investigaram a associação entre genótipo GSTT1 nulo e o desenvolvimento de tumores em abusadores de álcool. CHENG *et al.* (1999), estudando uma amostra norte-americana, identificaram maior frequência de GSTT1 nulo em etilistas portadores de câncer de cabeça e pescoço, resultado posteriormente não confirmado por KATOH *et al.* (1999) em uma população japonesa. Do mesmo modo, não são convincentes os resultados que associam o genótipo GSTT1 nulo com a suscetibilidade a neoplasias associadas ao tabagismo, como câncer de pulmão e de cabeça e pescoço, tendo sido demonstrados resultados positivos (EL-ZEIN *et al.*, 1997; KELSEY *et al.*, 1997; JOURENKOVA-MIRONOVA *et al.*, 1999) e negativos (DEAKIN *et al.*, 1996; TO-FIGUERAS *et al.*, 1997; SAARIKOSKI *et al.*, 1998).

A associação descrita no presente trabalho para o genótipo GSTM1 nulo e a cirrose alcoólica corrobora os resultados obtidos por SAVOLAINEN *et al.* (1997) que, investigando uma amostra de 313 abusadores de álcool finlandeses, identificaram um excesso de GSTM1 nulo entre os portadores de fibrose, diferindo do observado para os grupos de etilistas sem hepatopatias alcoólicas. HARADA (1994), também identificou um excesso de GSTM1 nulo em japoneses portadores de hepatopatias alcoólicas não especificadas. Por outro lado, são dados contrários aos descritos por RODRIGO *et al.*, (1999), que não observaram aumento na frequência de GSTM1 nulo quando compararam uma amostra de 120 etilistas cirróticos e 30 etilistas não-cirróticos espanhóis. Todavia, este último é um resultado que também pode ter sido comprometido pelo pequeno número de não-cirróticos analisados.

É comprovado que, além da cirrose, os etilistas têm risco aumentado para o desenvolvimento de câncer de boca, faringe, laringe e esôfago (IARC, 1988). O álcool, isoladamente, aumenta o risco para tumores nesses órgãos, mas seu maior efeito é observado em sinergismo ao tabaco (FRANCESCHI *et al.*, 1990; GAO *et al.*, 1994). Da mesma forma, a IARC (1988) sugere um possível risco para câncer de pulmão entre etilistas, o que provavelmente é resultado do consumo simultâneo de tabaco.

Assim como se detectou frequências elevadas de GSTM1 nulo entre os cirróticos investigados no presente trabalho, há referências de excesso desse genótipo em portadores de câncer de pulmão, cabeça e faringe (SEIDEGÅRD *et al.*, 1990; HIRVONEN *et al.*, 1993b; ALEXANDRIE *et al.*, 1994; LONDON *et al.*, 1995; CONFORTI-FROES *et al.*, 1997; COUTELLE, *et al.*, 1997; CHENG *et al.*, 1999). Mas, alguns estudos relatam resultados discordantes daqueles (MORITA *et al.*, 1997; 1999; OUDE-OUPHIUS *et al.*, 1997; PERSSON *et al.*, 1999). Pelo fato do *GSTM1* ser pouco expresso em tecido extra-hepático é ainda desconhecido o mecanismo de seu efeito protetor contra a carcinogênese química nesses órgãos.

Esses fatos sugerem que para a maioria dos integrantes das amostras EC e ENC, pela ocorrência simultânea dos hábitos de etilismo e tabagismo, há um risco elevado para o desenvolvimento das neoplasias de pulmão, cabeça e pescoço, que se acentuaria nos indivíduos portadores de GSTM1 nulo. Esse risco deve ser considerado pelos profissionais da saúde, principalmente médicos, quando da avaliação clínica dos etilistas, a fim de se prevenir outras doenças crônicas além das hepatopatias.

Entre os integrantes das amostras de etilistas, não houve relato de neoplasias nesses órgãos, porém, não é possível a sua exclusão sem exames específicos. Na amostra EC foi registrada a ocorrência de um câncer de pele, outro de estômago e um terceiro de próstata. A Figura 10 mostra a distribuição dos indivíduos EC+ENC fumantes e a incidência de neoplasias malignas de pulmão e cabeça e pescoço para

observar que a distribuição das amostras do presente estudo (EC+ENC) exibe um discreto deslocamento para a esquerda, que não é estatisticamente significativo.

Em média, a sobrevivência dos portadores de cirrose é diminuída, principalmente quando do desenvolvimento de icterícia, hematêmese ou ascite, tendo sido descrito um período de apenas 5 anos de sobrevida para 50% de etilistas cirróticos com uma dessas características (BRUNT *et al.*, 1974). A quase totalidade dos indivíduos etilistas do presente trabalho se encontra em acompanhamento médico desde 1998, sendo que as queixas principais foram ascite, icterícia ou hematêmese. Assim, é possível que para os integrantes da amostra EC ocorra o óbito antes da manifestação clínica de neoplasias de cabeça e pescoço ou pulmão, visto que, na região sudeste, 65% dos casos de tumores de cabeça e pescoço são

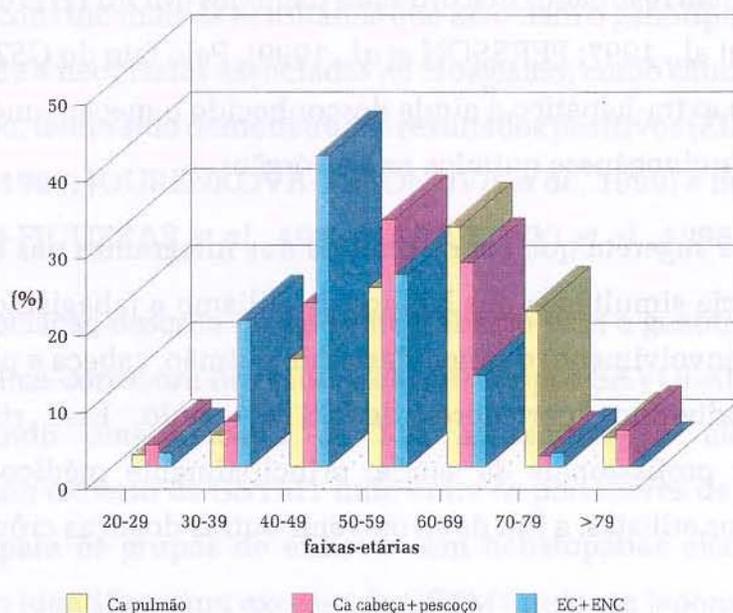


FIGURA 10: Frequências de câncer (Ca) de pulmão e cabeça+pescoço descritas para a população do sudeste brasileiro e distribuição dos integrantes das amostras EC+ENC segundo idade (Fonte: BRASIL, 2000).

diagnosticados após os 50 anos de idade, o mesmo ocorrendo para 79% dos casos de câncer de pulmão. A proporção de indivíduos fumantes da amostra EC e ENC do presente trabalho, nessa faixa etária, é significativamente menor do que a observada para a ocorrência desses cânceres na região sudeste.

A presença simultânea de *GSTT1* e *GSTM1* associada ao grupo ENC sugere um efeito sinérgico desses genes na proteção à cirrose, que é corroborado pela maior suscetibilidade à essa doença atribuída ao genótipo duplo nulo, ou seja a ausência de ambos, detectado em excesso na amostra EC. Esse efeito foi anteriormente sugerido por KELSEY *et al.* (1997) e SAARISKOSKI *et al.* (1998) que identificaram maior risco para câncer de pulmão para indivíduos que possuíam esse genótipo duplo nulo para *GSTT1* e *GSTM1*.

Em resumo, os dados do presente trabalho sugerem um papel para o *GSTM1* nulo na suscetibilidade à cirrose hepática alcoólica, bem como aponta um efeito sinérgico dos genes *GSTM1* e *GSTT1* na proteção à cirrose, principalmente quando associado o hábito de tabagismo ao de etilismo, evidenciando a importância da interação gene-gene e gene-ambiente no aparecimento das doenças.

De modo geral, os estudos de epidemiologia molecular, incluindo-se este, conduzem a três proposições quanto às divergências observadas na busca de associação dos genes *GSTT1* e *GSTM1* com a suscetibilidade a doenças crônicas:

- 1) é extremamente variável a frequência de genótipos nulos para os genes *GSTT1* e *GSTM1* em diferentes populações sem uma correlação direta com etnia; 2) *GSTM1*, e provavelmente o *GSTT1*, parecem estar envolvidos na etiologia do câncer em mais de um órgão; 3) o risco conferido a portadores de genótipo nulo para esses genes parece ser de pequena magnitude, todavia esse risco amplifica-se quando da interação com outras variáveis genéticas e/ou ambientais.

VI.3- CYP2D6

VI.3.1- CYP2D6 na população brasileira

O gene CYP2D6 é altamente polimórfico, sendo que os alelos mais freqüentes são o CYP2D6*1 (alelo selvagem), seguido do CYP2D6*4, CYP2D6*3 e CYP2D6*5. Entre os alelos associados à diminuição ou ausência de metabolismo de debrisoquina, o CYP2D6*4 é descrito como o mais freqüente, com valores que oscilam entre 0,1 e 0,2 conforme observado em caucasóides de diversos países da Europa (BROLY *et al.*, 1991; AGÚNDEZ *et al.*, 1994; TEFRE *et al.*, 1994; LUCOTTE *et al.*, 1996; SACHSE *et al.*, 1997; GRIESE *et al.*, 1998; MUIRAS *et al.*, 1998; TOPIĆ *et al.*, 2000) e dos EUA (EVANS *et al.*, 1993; LONDON *et al.*, 1997). Nessas mesmas populações as freqüências do alelo CYP2D6*3 alcançaram valores até 10 vezes menores que aquelas obtidas para o CYP2D6*4, variando de 0,02 a 0,2.

Sugerindo uma variação étnica, EVANS *et al.* (1993) e LONDON *et al.* (1997) descreveram freqüências mais baixas para esses alelos em afro-americanos: 0,002 e 0,006 para o alelo CYP2D6*3 e 0,085 e 0,073 para CYP2D6*4, respectivamente. Em asiáticos esses alelos são extremamente raros (JOHANSSON *et al.*, 1991; WANG *et al.*, 1993; DAHL *et al.*, 1995), resultando na raridade do fenótipo PM. No entanto, os alelos que promovem apenas a diminuição da capacidade metabólica são mais comuns, e conseqüentemente, os EM asiáticos metabolizam o substrato mais lentamente que os EM caucasóides (BERTILSSON *et al.*, 1992).

ROSSIT *et al.* (1999) descreveram proporções similares dos alelos CYP2D6*3 e CYP2D6*4 (0,12) em uma amostra de doadores de sangue de Campinas (São Paulo). Esse dado é concordante com o observado para a amostra Ct do presente estudo, sugerindo que a população brasileira difere das demais populações. Essa diferença foi estabelecida pela freqüência elevada de alelos CYP2D6*3, que resultou em maior ocorrência de indivíduos PM (17,1%) quando comparada aos 7,5% de PM observados em populações de caucasóides da Europa e EUA e aos 2% em asiáticos e

afro-americanos (LOU *et al.*, 1987; HORAI *et al.*, 1989; ALVAN *et al.*, 1990; BERTILSSON *et al.*, 1992; EVANS *et al.*, 1993).

A frequência do alelo CYP2D6*5 é subestimada por esse ser identificado apenas no portador em homozigose. Apesar dessa limitação pôde-se comparar os resultados obtidos com aqueles publicados para outras populações, haja vista a estimativa ter sido realizada do mesmo modo. Na amostra Ct do presente estudo foram identificados 5,7% de indivíduos homozigotos para tal alelo, resultando numa frequência alélica de 0,057. Esse alelo foi responsável por 33,3% do total de PM dessa amostra. A frequência alélica para o CYP2D6*5 nessa população do sudeste brasileiro não diferiu daquela descrita por LONDON *et al.* (1997) para afro-americanos (0,069), mas foi bastante superior àquelas detectadas em brancos europeus e norte-americanos, que variaram de 0,01 a 0,03 (BROLY *et al.*, 1991; AGÚNDEZ *et al.*, 1994; LONDON *et al.*, 1997).

Muitos cientistas que investigam os polimorfismos no gene CYP2D6 não publicam as frequências alélicas ou dos diferentes genótipos observados para aquela amostra em questão, optando por classificar os indivíduos quanto à capacidade de metabolização (EM ou PM). Esse fato resulta em uma grande dificuldade para se comparar os dados de diferentes populações. Apesar disso, averiguou-se que a população brasileira investigada no presente trabalho apresentou o alelo CYP2D6*4 em proporção semelhante ao descrito para caucasóides, enquanto o alelo CYP2D6*5 foi similar ao observado para afro-americanos e o alelo CYP2D6*3 em frequência superior às demais descritas. Considerando-se o alto grau de miscigenação na amostra em questão (Ct), sugere-se a importância de se investigar uma grande amostra da mesma, aplicando-se as técnicas de PCR/RFLP e seqüenciamento, a fim de se fornecer maior base para o entendimento desse polimorfismo gênico na população brasileira.

VI.3.1- CYP2D6 em etilistas cirróticos

O interesse pela pesquisa da associação dos polimorfismos CYP2D6 e o risco para doenças crônicas surgiu quando se determinou que as variantes alélicas desse gene explicavam o polimorfismo no metabolismo da debrisoquina, descrito por MAGHOUB *et al.* (1977).

A debrisoquina hidroxilase, produto do gene CYP2D6, tem importante atuação no metabolismo de produtos carcinógenos da fumaça do cigarro, como NNK e nicotina (CRESPI *et al.*, 1991; CHOLERTON *et al.*, 1994). Considerando-se que os níveis de adutos de DNA provocados por nitrosaminas são reduzidos em portadores do fenótipo bioquímico PM (KATO *et al.*, 1995), é possível que esses indivíduos tenham menor risco para o desenvolvimento de neoplasias em cuja etiologia estejam envolvidos os substratos da referida enzima. Utilizando-se de estudos bioquímicos diversos autores confirmaram essa proposição, dentre eles destacam-se os estudos de AYESH *et al.* (1984), LAW *et al.* (1989) e CAPORASO *et al.* (1990).

Não há relato de pesquisas sobre a associação do polimorfismo no CYP2D6 e o desenvolvimento de cirrose alcoólica e no presente estudo esse polimorfismo não foi elucidativo. Se o fenótipo PM atribuísse menor risco para essa doença em fumantes, a amostra ENC apresentaria maior frequência desse fenótipo que a população geral (amostra Ct). De fato a amostra ENC apresentou mais que o dobro de indivíduos PM que a amostra Ct, todavia não foi uma diferença significativa. Além disso, a amostra EC apresentou frequências genotípicas e fenotípicas similares à ENC, sugerindo que esse gene não está envolvido na predisposição à cirrose alcoólica. Entretanto, o pequeno número de indivíduos estudados em cada amostra impediu que se realizasse uma análise classificando os seus integrantes segundo o tempo ou a quantidade diária de fumo, o que pode ter enviesado os resultados.

Resultados conflitantes foram descritos para câncer de pulmão, uma neoplasia para a qual, conforme já referido, o álcool exerce um efeito sinérgico ao tabaco. KERB *et al.* (1992) e HIRVONEN *et al.* (1993c) identificaram menor frequência

de alelos não-funcionais do CYP2D6 em portadores dessa neoplasia, resultados não confirmados por TEFRE *et al.* (1994) e LONDON *et al.* (1997). Esses últimos achados são corroborados por um experimento *in vitro*, no qual não se identificou influência do fenótipo EM ou PM sobre a taxa de aberrações cromossômicas induzidas por NNK em linfócitos periféricos humanos cultivados (ABDEL-RAHMAN *et al.*, 2000).

Para aumentar a controvérsia, WOLF *et al.* (1992) descreveram maior risco para carcinoma de bexiga em indivíduos PM, neoplasia essa também associada ao tabagismo. Buscando explicar essas contradições, TANINGHER *et al.* (1999) propuseram que enquanto os EM produzem maior quantidade de metabólitos genotóxicos e/ou carcinogênicos, os indivíduos PM expõem-se por mais tempo aos compostos que independem de bioativação para exercerem seu efeito carcinogênico. Assim, em se tratando de um carcinógeno final (não precisa de bioativação), a duração da exposição seria mais importante para os PM, enquanto o efeito da dose seria mais evidente nos EM.

Na população aqui estudada, as frequências observadas para o alelo CYP2D6*4 podem ser entendidas pela miscigenação entre africanos e europeus, pois estas foram intermediárias às dos povos de origem. Porém, o alelo CYP2D6*3 não poderia ter a mesma explicação, visto que a sua frequência foi muito superior àquelas descritas para caucasóides e negros norte-americanos e africanos (EVANS *et al.*, 1993; AGÚNDEZ *et al.*, 1994; TEFRE *et al.*, 1994; AKILILLU *et al.*, 1996; LONDON *et al.*, 1997; LUCOTTE *et al.*, 1996; SACHSE *et al.*, 1997; GRIESE *et al.*, 1998; MUIRAS *et al.*, 1998; TOPIĆ *et al.*, 2000). Todavia essa possibilidade ainda não pode ser desconsiderada em virtude da escassez de dados sobre esse polimorfismo em populações africanas e derivadas, bem como pelo pequeno número de indivíduos analisados na população brasileira.

Assim, conforme pode ser observado na Figura 11, para as amostras de etilistas do presente estudo, as frequências do alelo CYP2D6*3 e do fenótipo PM foram as mais elevadas já descritas, merecendo maiores investigações para se esclarecer tais diferenças.

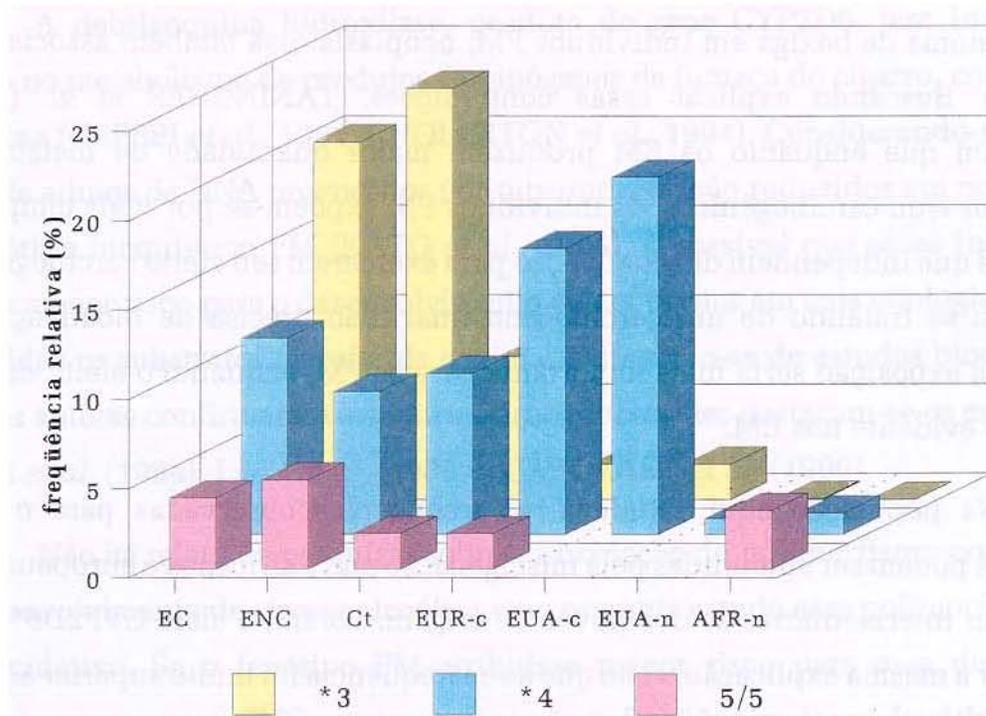


FIGURA 11: Frequência dos alelos de *CYP2D6* identificados em três populações brasileiras comparada com o observado para populações europeias e norte-americanas.

EC = etilistas cirróticos; ENC = etilistas não-cirróticos; Ct = controles; EUR-c = caucasóides europeus; EUA-c = caucasóides norte-americanos, EUA-n = afro-americanos e AFR-n = africanos.

VI.4- *CYP2E1*

VI.4.1- Alelos *CYP2E1**c2 e *CYP2E1**C na população brasileira

São mais convincentes os achados de variabilidade interétnica para os polimorfismos *CYP2E1*, visto que, comparadas às demais populações, na Ásia o alelo *CYP2E1**c2 ocorre em freqüências muito superiores, variando de 0,17 a 0,26 (UEMATSU *et al.*, 1991; KATO *et al.* 1992; CHAO *et al.*, 1995; YU *et al.*, 1995; LEE *et al.*, 1997; MORITA *et al.*, 1997, 1999; PERSSON *et al.*, 1999).

Em geral, nas populações européias a freqüência desse alelo apresenta-se em torno de 0,03 a 0,07 em espanhóis, italianos e franceses (INGELMAN-SUNDBERG *et al.*, 1993; AGÚNDEZ *et al.*, 1996; LADERO *et al.*, 1996; LUCAS *et al.*, 1996), similar à observada em norte-americanos (KATO *et al.* 1992; EL-ZEIN *et al.*, 1997). Porém, algumas populações específicas dos EUA exibiram elevadas taxas de *CYP2E1**c2 (cerca de 0,15), como no Texas e Havaí (WU *et al.*, 1997; LE MARCHAND *et al.* 1998). Note-se que essas populações caracterizam-se pela presença marcante de descendentes de Mexicanos e japoneses, respectivamente.

A única referência ao polimorfismo *Pst1* no gene *CYP2E1* em população brasileira é feita por SUGIMURA *et al.* (1995), todavia, os resultados desse não podem ser extrapolados para a população geral do estado por ser um estudo de caso-controle. Porém, resultados obtidos em populações dos estados do Pará e de São Paulo indicaram a presença de 17% e 14% de portadores do alelo *CYP2E1**c2 (CABRAL *et al.*, dados não publicados). As respectivas freqüências alélicas foram de 0,10 e 0,08. Assim, na amostra Ct do presente trabalho, a prevalência de portadores desse alelo, bem como a sua freqüência, apresentaram-se similares àquelas obtidas para as populações paraense e paulista.

O alelo *CYP2E1**C ocorreu, nas três amostras do presente estudo, em freqüências similares àquela obtida para uma população da mesma região por ROSSIT *et al.* (1999).

O alelo CYP2E1*C ocorre em freqüências duas à três vezes maior que a do CYP2E1*c2, conforme observado no presente estudo. E a análise simultânea desses polimorfismos tem demonstrado que esses alelos encontram-se em forte desequilíbrio de ligação (STEPHENS *et al.*, 1994; PERSSON *et al.*, 1999), apesar de ocasionalmente serem identificados indivíduos portadores do haplótipo c2/D, cuja origem pode ser a recombinação.

Diante do desequilíbrio de ligação, é esperada a maior ocorrência do alelo CYP2E1*C nas populações asiáticas quando comparadas às demais populações. STEPHENS *et al.* (1994) e PERSSON *et al.* (1999) determinaram em cerca de 0,25 a freqüência do referido alelo em asiáticos, enquanto essa foi de 0,08 para afro-americanos e 0,11 para euro-americanos (STEPHENS *et al.*, 1994); 0,08 para franceses (LUCAS *et al.*, 1996) e 0,06 para finlandeses (SAVOLAINEN *et al.*, 1997).

Note-se que as freqüências obtidas para os alelos CYP2E1*c2 e CYP2E1*C em populações no Brasil mostram-se mais elevadas que aquelas obtidas para norte-americanos e europeus, exceto para o alelo raro C em uma população afro-americana. Esse resultado pode refletir a miscigenação envolvendo asiáticos, ocorrida na formação do povo brasileiro, ou ainda, a miscigenação com africanos. Todavia, não há referências que investigassem tais polimorfismos naquele grupo étnico. No presente estudo, três integrantes declararam-se descendentes de asiáticos (japoneses) e somente um apresentou genótipo c1/c2; D/C, sendo os demais selvagens para ambos os alelos.

Assim como ocorreu na grande maioria dos estudos, excetuando-se aqueles que focalizaram os asiáticos, na população brasileira não se observou o genótipo homozigoto c2/c2 e apenas um indivíduo exibiu o genótipo CC (amostra Ct). Todavia, tal ausência é esperada, em virtude da baixa freqüência do genótipo heterozigoto correspondente, demonstrando que esses alelos se encontram em equilíbrio de Hardy & Weinberg.

VI.3.2- Alelos CYP2E1*c2 e CYP2E1*C em etilistas cirróticos

Os polimorfismos no gene *CYP2E1* têm sido bastante investigados na predição de riscos para câncer de pulmão e hepatopatias alcoólicas, pelo fato de ser um gene induzido pelo etanol e tabaco, entre outros agentes xenobióticos (KOOB & CASAZZA, 1985; VILLARD *et al.*, 1998). Esse gene é transcrito em diversos tecidos, incluindo cérebro e pulmão (TINDBERG & INGELMAN-SUNDBERG, 1989; HANSSON *et al.*, 1990), mas sua maior expressão, seja constitutiva ou induzida, ocorre na região centrilobular do fígado (INGELMAN-SUNDBERG *et al.*, 1988).

A investigação do envolvimento desses polimorfismos na etiologia do câncer de pulmão tem gerado dados contraditórios, havendo sugestões de maior risco para portadores dos alelos CYP2E1*c2 e CYP2E1*C (UEMATSU *et al.*, 1991; EL-ZEIN *et al.*, 1997), bem como para portadores da versão molecular selvagem CYP2E1*c1; (WU *et al.*, 1997; LE MARCHAND *et al.*, 1998) e ainda aqueles que não apontam qualquer associação entre um determinado genótipo e a suscetibilidade ao câncer de pulmão (KATO *et al.*, 1992; HIRVONEN *et al.*, 1993a; WATANABE *et al.*, 1995; PERSSON *et al.*, 1999).

Os polimorfismos no gene *CYP2E1* são amplamente investigados na pesquisa da suscetibilidade às doenças hepáticas alcoólicas. Baseando-se na análise dos alelos CYP2E1*c2 e CYP2E1*C, alguns estudos identificaram maior frequência do alelo CYP2E1*c2 em portadores das hepatopatias alcoólicas em geral, incluindo-se a cirrose (TSUTSUMI *et al.*, 1994b; PIRMOHAMED *et al.*, 1995; LUCAS *et al.*, 1996). Contudo, a maioria dos estudos tem falhado em identificar tal associação especificamente com a cirrose alcoólica, em diversas populações, como a norte-americana (CARR *et al.*, 1995), francesa (LUCAS *et al.*, 1996), finlandesa (SAVOLAINEN *et al.*, 1997) e espanhola (AGÚNDEZ *et al.*, 1996; RODRIGO *et al.*, 1999). Tal fato pode ser atribuído às baixas frequências desses alelos, o que comprometeria as análises estatísticas.

Todavia, tanto para os genes GST quanto CYP2E1, a grande maioria das pesquisas considera individualmente os genes, ou seja, não se investiga a interação entre genes de ativação e destoxificação, como o fizeram ALEXANDRIE *et al.* (1994), EL-ZEIN *et al.* (1997) e PERSSON *et al.* (1999) para câncer de pulmão. Esses autores conseguiram identificar uma combinação genotípica que oferece maior risco para as doenças investigadas. ALEXANDRIE e PERSSON são integrantes de um grupo no *Karolinska Institutet* (Suécia) que desde a década de 80 estuda a associação de polimorfismos genéticos e os riscos à saúde. Nos seus trabalhos aqui já referidos, esses autores identificaram maior risco para o desenvolvimento de câncer de pulmão em portadores do genótipo GSTM1 nulo/CYP1A1 m2/m2, em suecos e chineses, respectivamente. EL-ZEIN *et al.* (1997), apontaram a combinação genética CYP2D6-EM/CYP2E1*c2 como de maior risco para o câncer de pulmão no Texas (USA), seguida da combinação GSTM1 nulo/CYP2E1*c2.

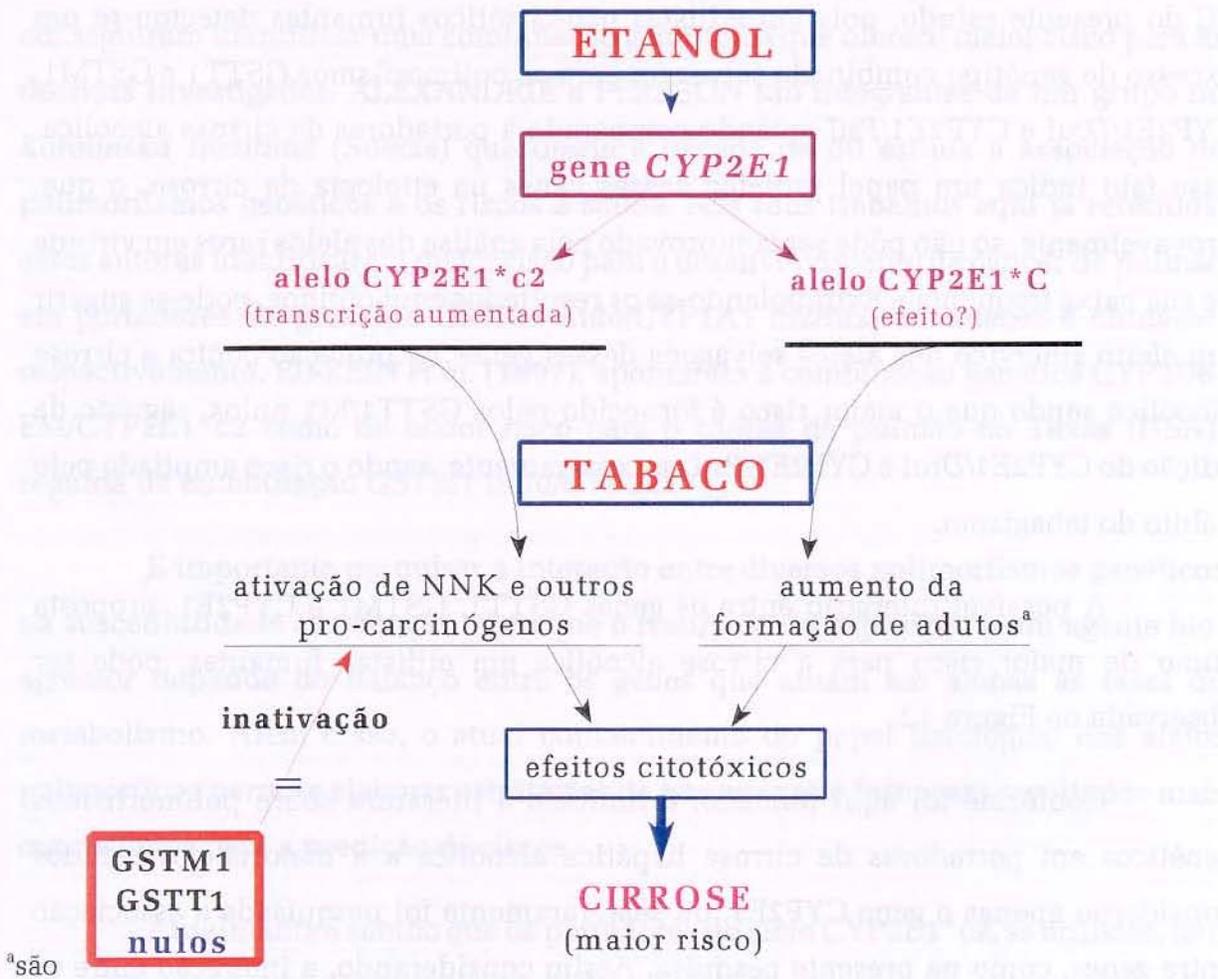
É importante pesquisar a interação entre diversos polimorfismos genéticos na suscetibilidade às doenças, visto que o resultado da exposição a um agente bioagressor depende do balanço entre os genes que atuam em ambas as fases do metabolismo. Além disso, o atual conhecimento do papel fisiológico dos alelos polimórficos permite elaborar estratégias de pesquisa que forneçam resultados mais consistentes para a predição de riscos.

Atualmente é sabido que os portadores do alelo CYP2E1*c2, se etilistas, têm um aumento de duas vezes na taxa de transcrição desse gene e também maior quantidade da proteína CYP2E1 para ativar pro-carcinógenos, resultando em maior efeito genotóxico. Essa ação foi comprovada *in vitro* pela descrição de que o NNK induziu maior quantidade de aberrações cromossômicas em linfócitos periféricos humanos cultivados de portadores do genótipo c1/c2 que naqueles c1/c1 (ABDELRAHMAN *et al.*, 2000). Adicionalmente KATO *et al.* (1995) sugeriram maior formação de adutos de DNA, promovidos por produtos do cigarro, para portadores do alelo CYP2E1*C.

Assim considerando, pode-se pressupor que os indivíduos etilistas que possuem simultaneamente os alelos mutantes para o gene CYP2E1 e genótipo nulo para GSTT1 e/ou GSTM1 sofreriam maior exposição aos carcinógenos da fumaça do tabaco dentre outros agentes citotóxicos. Essa associação foi identificada na amostra EC do presente estudo, pois em etilistas não-cirróticos fumantes detectou-se um excesso de genótipo combinado selvagem para os polimorfismos GSTT1 e GSTM1, CYP2E1/*Dra*I e CYP2E1/*Pst*I, quando comparado à portadores de cirrose alcoólica. Esse fato indica um papel protetor desses genes na etiologia da cirrose, o que, provavelmente, só não pôde ser comprovado pela análise dos alelos raros em virtude de sua baixa frequência. Extrapolando-se os resultados aqui obtidos, pode-se sugerir um efeito sinérgico dos alelos selvagens desses genes na proteção contra a cirrose alcoólica sendo que o maior risco é fornecido pelos GSTT1/M1 nulos, seguido da adição do CYP2E1/*Dra*I e CYP2E1/*Pst*I, sucessivamente, sendo o risco ampliado pelo hábito do tabagismo.

A possível interação entre os genes GSTT1, GSTM1 e CYP2E1, proposta como de maior risco para a cirrose alcoólica em etilistas fumantes, pode ser observada na Figura 12.

Conforme foi aqui relatado, é limitada a literatura sobre polimorfismos genéticos em portadores de cirrose hepática alcoólica e a maioria dos estudos considerou apenas o gene CYP2E1, ou seja, raramente foi pesquisada a associação entre genes, como na presente pesquisa. Assim considerando, a interação entre os genes deve ser o fator fundamental para a suscetibilidade a essa doença, podendo-se supor que esse fato conduziu ao grande número de estudos que não conseguiram identificar o risco à cirrose, atribuído por polimorfismos nos genes do biometabolismo. O presente estudo é uma evidência de que a suscetibilidade à cirrose alcoólica, e provavelmente para outras doenças crônicas, resulta da forte **interação entre genes e ambiente**.



formados adutos entre o DNA e metabólitos da fumaça do cigarro

FIGURA 12: Esquema ilustrativo da possível interação entre variáveis ambientais (álcool e cigarro) e genéticas (*GSTM1*, *GSTT1* e *CYP2E1*) na etiologia da cirrose alcoólica.

VII- CONCLUSÕES

Os dados obtidos para a população-referência do sudeste brasileiro, em relação aos polimorfismos nos genes *CYP2E1* e *CYP2D6*, revelaram frequências elevadas dos alelos *CYP2E1**c2, *CYP2E1**C e, principalmente, do alelo *CYP2D6**3 quando comparadas àquelas descritas para caucasóides europeus e norte-americanos. Em relação aos polimorfismos nos genes *GSTT1* e *GSTM1*, as frequências dos genótipos nulos são bastantes semelhantes às encontradas nas mais diversas populações, independentemente de seu grau de miscigenação.

Nenhuma conclusão pôde ser estabelecida sobre o papel do gene *CYP2D6* no desenvolvimento da cirrose alcoólica, porém, a frequência aumentada do alelo *CYP2D6**3 nas amostras de etilistas permite a inferência de uma possível associação desse gene com outra doença de risco aumentado para os etilistas, como algumas neoplasias.

No presente estudo, o *GSTM1* nulo foi a variável genética que ofereceu maior risco para a cirrose alcoólica, quando essas variáveis foram consideradas isoladamente. Para os demais polimorfismos investigados, a baixa frequência do alelo mais raro provavelmente contribuiu para a diminuição do poder de resolução da análise estatística, porém a combinação de vários genes apontou que os alelos *GSTT1* nulo, *CYP2E1**c2 e *CYP2E1**C também têm relação com a suscetibilidade à cirrose. Adicionalmente, a inclusão do tabagismo na combinação de variáveis de risco para essa doença evidencia a interação gene-ambiente na sua etiologia.

Os resultados obtidos sugerem que os genes *GSTT1*, *GSTM1* e *CYP2E1* podem ser úteis como biomarcadores para se predizer o risco à cirrose alcoólica. Todavia, deve-se ressaltar que a inclusão de outros genes, como aqueles envolvidos na fibrogênese, poderá tornar mais robusta essa proposição, o que seria de grande importância para a medicina preventiva dessa doença - uma das mais freqüente nos ambulatórios de gastroenterologia.

Aqui, pela primeira vez se ressalta a importância de se considerar, simultaneamente, genes de ativação e destoxificação para o entendimento da suscetibilidade genética às doenças hepáticas crônicas, bem como para se estimar os riscos individuais.

VIII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-RAHMAN SZ, NOURALDEEN AM, AHMED AE. Molecular interaction of [2,3-¹⁴C] acrylonitrile with DNA in gastric tissue of rat. *J. Biochem. Toxicol.* 1994 9:191-198.
- ABDEL-RAHMAN SZ, EL-ZEIN RA, ANWAR WA, AU WW. A multiplex PCR procedure for genetic polymorphism of the GSTM1 and GSTT1 genes in human. *Cancer Lett* 107:229-33, 1996.
- ABDEL-RAHMAN SZ, SALAMA SA, AU WW, HAMADA FA. Role of polymorphic CYP2E1 and CYP2D6 in NNK-induced chromosome aberrations in cultured human lymphocytes. *Pharmacogenetics* 10:239-49, 2000.
- ACHORD JL. Review of alcoholic hepatitis, and its treatment. *Am J Gastroenterol* 88:1822-31, 1993.
- AGÚNDEZ J, MARTINEZ C, LEDESMA MC, LADONA MG, LADERO JM, BENITEZ J. Genetic basis for differences in debrisoquin polymorphism between a Spanish and other white populations. *Clin Pharmacol Ther* 55:412-7, 1994.
- AGÚNDEZ J, LADERO J, DÍAZ-RUBIO M, BENITEZ J. *Rsa* I polymorphism at the cytochrome P4502E1 locus is not related to the risk of alcohol-related severe liver disease. *Liver* 16:380-3, 1996.
- AKLILLU E, PERSON I, BERTILSSON L, JOHANSSON I, RODRIGUES F, INGELMAN-SUNDBERG M. Frequent distribution of ultrarapid metabolizers of debrisoquine in an Ethiopian population carrying duplicated and multiplied functional CYP2D6 alleles. *J Pharmacol Exp Ther* 278:441-6, 1996.
- ALEXANDRIE A-K, INGELMAN-SUNDBERG M, SEIDGÅRD J, TORNLING G, RANNUG A. Genetic susceptibility to lung cancer with special emphasis on *CYP1A1* and *GSTM1*: a study on host factors in relation to age at onset, gender and histological cancer types. *Carcinogenesis* 15:1785-90, 1994.

- ALVAN G, BECHTEL P, ISELIUS L, GUNDER-REMY U. Hydroxylation polymorphisms of debrisoquine and mephenytoin in European population. *Eur J Clin Pharmacol* 39:533-7, 1990.
- ANWAR WA, ABDEL-RAHMAN SZ, EL-ZEIN RA, MOSTAFA HM, AU WW. Genetic polymorphism of GSTM1, CYP2E1 and CYP2D6 in Egyptian bladder cancer patients. *Carcinogenesis*, 17:1932-1929, 1996.
- ARRUDA VR, GRIGNOLLI CE, GONÇALVES MS, SOARES MC, MENEZES R, SAAD STO, COSTA FF. Prevalence of the homozygous for the deleted alleles of glutathione S-transferase mu (GSTM1) and theta (GSTT1) among distinct ethnic groups from Brazil: relevance to environmental carcinogenesis. *Clinic. Genet.* 54:210-214, 1998.
- AYESH R, IDLE JR, RITCHIE JC, CROTHERS MJ, HETZEL MR. Metabolic oxidation phenotypes as markers for susceptibility to lung cancer. *Nature* 312:169-170, 1984.
- AZEVEDO E. *Raça: conceito e preconceito*. São Paulo, Ed Ática, 1987.
- BELL DA, TAYLOR F, DAVID F, Genetic risk and carcinogen exposure: a common inherited defect of the carcinogen-metabolism gene glutathione S-transferase M1 (GSTM1) that increases susceptibility to bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 85:1159-64, 1993.
- BERTILSSON L, LOU YQ, DU YL, LIU Y, KUANG TY, LIAO XM, WANG KY, RIVIRIEGO J, ISELIUS L, SJOQVIST F. Pronounced differences between native Chinese and Swedish populations in the polymorphic hydroxylations of debrisoquin and S-mephenytoin. *Clin Pharmacol Ther* 51:388-97, 1992.
- BESKID M, BIALEK J, DZIENISZEWSKI J *et al*. Effect of combined phenylbutazone and ethanol administration on rat liver. *Exp Pathol* 18:487-91, 1980.
- BRASIL-Ministério da Saúde. *Informações de Saúde: morbidade hospitalar do SUS, 2000*. Disponível na Internet : URL : <http://www.datasus.gov.br/cgi/sih/rmopcao.htm>
- BRÉCHOT C, NALPAS B, COUROUCE A-M Evidence that hepatitis B virus has a role in liver-cell carcinoma in alcoholic disease. *N Engl J Med* 306:1384-7, 1982.

- BROLY F, GAEDIGK A, HEIM M, EICHEMBAUM M, MORIKE K, MEYER UA. Debrisoquine/spartein hydroxylation genotype and phenotype: analysis of common mutation and alleles of CYP2D6 in a European population. *DNA Cell Biol* 10:545-58, 1991.
- BRUNT PW, KEW MC, SCHEUTER PJ, SHERLOCH S. Studies in alcoholic disease in Britain. I. Clinical and pathological patterns related to natural history. *Gut* 15:52- 58, 1974.
- CABRAL IR, ROSSIT ARB, CONFORTI-FROES NDT, HACKEL C. Polymorphisms in genes of biometabolism: a study in two admixture Brazilian populations. (dados não publicados).
- CAPORASO NE, TUCKER MA, HOOVER RN, HAYES RB, PICKLE LW, ISSAQ HJ, MUSCHIK GM, GREEN-GALLO L, BUIVYS D, AISNER S, RESAU JH, TRUMP BF, TOLLERUD D, WESTON A, HARRIS CC. Lung cancer and debrisoquine metabolic phenotype. *J Natl Cancer Inst* 82:1264-72, 1990.
- CAREGARO L, ALBERTINO F, AMODIO P, MERKEL C, BOLOGNESI M, ANGELI, P, GATTA A. Malnutrition in alcoholic and virus-related cirrhosis. *Am J Clin Nutr*, 63:602-9, 1996.
- CARR LG, HARTLEROAD JY, LIANG Y, MENDENHALL C, MORITZ T, THOMASSON H. Polymorphism at the P450IIE1 locus is not associated with alcoholic liver disease in Caucasian men. *Alcohol Clin Exp Res* 19:182-4, 1995.
- CHAO Y-C, YOUNG T-H, CHANG W-K, TANG H-S, HSU C-T. An investigation of whether polymorphism of cytochrome P450E1 are genetic markers of susceptibility to alcoholic end-stage organ damage in a Chinese population. *Hepatology* 22:1409-14, 1995.
- CHEDID A, MENDENHALL CL, MORITZ TE, FRENCH SW, RABIN L. Prognostic factors in alcoholic liver disease. VA Cooperative Study Group. *Am J Gastroenterol* 86:210-6, 1991.
- CHEN CL, LIU Q, RELLING MV. Simultaneous characterization of glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphism by polymerase chain reaction in American whites and blacks. *Pharmacogenetics* 6:187-91, 1996.

- CHENG L, STURGIS EM, EICHER SA, CHAR D, SPITZ MR, WEI Q. Glutathione-S-transferase polymorphisms and risk of squamous-cell carcinoma of the head and neck. *Int J Cancer* 84:220-4, 1999.
- CHOLERTON S, ARPANAHI A, McCracken N, BOUSTEAD C, TABER H, LOHNSTONE E, LEATHART J. Poor metabolisers of nicotine and CYP2D6 polymorphism. *Lancet* 343:62-63, 1994.
- COUELLE C, WARD PJ, FLEURY B, QUATTROCCHI P, CHAMBRIN H, IRON A, COUZIGOU P, CASSAIGNE A. Laryngeal and oropharyngeal cancer, and alcohol dehydrogenase 3 and glutathione S-transferase M1 polymorphisms. *Hum Genet* 99:319-325, 1997.
- CONFORTI-FROES NDT, EL-ZEIN R, ABDEL-RAHMAN SZ, ZWISCHENBERGER JB, AU WW. Predisposing genes and increased chromosome aberration in lung cancer cigarette smokers. *Mutat Res* 379:53-9, 1987.
- CRESPI CL, PENMAN BW, GELBOIN HV, GONZALEZ FJ. A tobacco smoke-derived nitrosamine, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridil)-1-butanone, is activated by multiple human cytochrome P450s including the polymorphic human cytochrome P4502D6. *Carcinogenesis* 7:1197-1201, 1991.
- DAHL ML, YUE QY, ROH HK. Genetic analysis of the CYP2D locus in relation to debrisoquine hydroxylation capacity in Korean, Japanese and Chinese subjects. *Pharmacogenetics* 5:159-64, 1995.
- D'ALBUQUERQUE LAC & SILVA AO. Aspectos Evolutivos. In: *Doença hepática Alcoólica*. São Paulo, Ed Sarvier, 1990. p.85-100.
- DEAKIN M, ELDER J, HENDRICKSE C, PECKHAM D, BALDWIN D, PANTIN C, WILD N, LEOPARD P, BELL DA, JONES P, DUNCAN H, BRANNIGAN K, ALLDERSEA J, FRYER AA, STRANGE RC. Glutathione S-transferase GSTT1 genotypes and susceptibility to cancer: studies of interactions with GSTM1 in lung oral, gastric and colorectal cancers. *Carcinogenesis* 17(4):881-884, 1996.
- DI PADOVA C, WORNER TM, JULKUNEN RJK, LIEBER CS. Effects of fasting and chronic alcohol consumption on the first pass metabolism of ethanol. *Gastroenterology* 92:1169-73, 1987.

- ELEXPURU-CAMIRUAGA J, BUXTON N, KANDULA V, DIAS VS, CAMPBELL D, McINTOSH J, BROOME J, JONES P, INSKIP A, ALLDERSEA J, FRYER AA, STRANGE RC. Susceptibility to astrocytoma and meningioma: influence of allelism at glutathione S-transferase (GSTT1 and GSTM1) and cytochrome P-450 (CYP2D6) loci. *Cancer Res* 55:4237-9, 1995.
- ELIASSON E, JOHANSSON I, INGELMAN-SUNDBERG M. Hormone and substrate regulated intracellular degradation of cytochrome P450 (2E1) involving MgATP-activated rapid proteolysis in the in the endoplasmic reticulum membranes. *J Biol Chem* 267:15765-9, 1992.
- EL-ZEIN R, CONFORTI-FROES N, AU WW. Interactions between genetic predisposition and environmental toxicants for development of lung cancer. *Environ Mol Mutagen* 30:196-204, 1997.
- EUBANKS M. Biomarkers: the clues to genetic susceptibility. *Environ Health Perspect* 102:50-56, 1994.
- EVANS WE, RELING MV, RAHMAN A, McLEOD HL, SCOTT EP, LIN JS. Genetic basis for a lower prevalence of deficient CYP2D6 oxidative drug metabolism phenotypes in black American. *J Clin Invest* 91:2150-4, 1993.
- FALCK GC, HIRVONEN A, SCARPATO R, SAARIKOSKI ST, MIGLIORE L, NORPPA H. Micronuclei in blood lymphocytes and genetic polymorphism for GSTM1, GSTT1 and NAT2 in pesticide-exposed greenhouse workers. *Mutat Res* 441:225-37, 1999.
- FISHER RL, SCHEUR, PJ, SHERLOCK S. Primary liver cell carcinoma: alcohol and chronic liver disease. *Gut* 15:343-4, 1974.
- FRANCESCHI S, TALAMINI R, BARRA S, BARON AE, NEGRI E, BIDOLI E, SERRANO D, LAVECCHIA C. Smoking and drinking in relation to cancers of the oral cavity, pharynx, larynx, and esophagus in northern Italy. *Cancer Res* 50:6502-7, 1990.
- FRANCO MHLF, WEIMER T, SALZANO FM. Blood polymorphism and racial admixture in two Brazilian populations. *Am J Phys Anthropol* 58:127-32, 1982.

- FREEZZA M, DI PADOVA C, POZZATO G, TERPIN M, BARAONA E, LIEBER CS. High blood alcohol levels in women: Role of decreased gastric alcohol dehydrogenase activity and first pass metabolism. *N Engl J Med* 322:95-99, 1990.
- GAEDIGK A, BLUM M, GAEDIGK R, EICHELBAUM M, MEYER UA. Deletion of the entire cytochrome P450 CYP2D6 gene as a cause of impaired drug metabolism in poor metabolizers of the debrisoquine/sparteine polymorphism. *Am J Hum Genet* 48:943-50, 1991.
- GAO YT, McLAUGHLIN JK, BLOT WJ, JI B-T, BENINCHOU J, DAI Q, FRAUMENI Jr JK. Risk factors for esophageal cancer in Shanghai, China. I. Role of cigaret smoking and alcohol drinking. *Int J Cancer* 58:192-6, 1994.
- GAO Y, ZHANG Q. Polymorphism of the GSTM1 and CYP2D6 genes associated with susceptibility to lung cancer in Chinese. *Mutat Res* 444:441-9, 1999.
- GOLDBERG AC, CHIARELLA JM, MARIN MLC, ROSALES C, BANIC D, OLIVEIRA MA, RODRIGUES H, VIGGIANI CS, KALIL J. Molecular typing of HLA class II antigens in São Paulo population. *Genet Molec Biol* 21:301-5, 1998.
- GOUGH AC, SMITH CA, HOWELL SM, WOLF CR, BRYANT SP, SPURR NK. Localization of CYP2D gene locus to human chromosome 22q13.1 by polymerase chain reaction, in situ hybridization, and linkage analysis. *Genomics* 15:430-2, 1993.
- GONZALEZ FJ. Human cytochromes P450: problems and prospects. *Trends Pharmacol Sci* 13:346-52, 1992.
- GONZALEZ FJ, IDLE JR. Pharmacogenetic phenotyping and genotyping: present status and future potential. *Clin Pharmacokinet* 26:59-70, 1994.
- GRASSI GG, GRASSI C. Ethanol-antibiotic interactions at hepatic level. *J Clin Pharmacol Biopharmacol* 36:33-38, 1975.
- GRIESE E-U, ZANGER UM, BRUDERMANN S U, GAEDIGK A, MIKUS G, MÖRIKE K, STÜVEN T, EICHELBAUM M. Assessment of the predictive power of genotypes for the in-vivo catalytic function of CYP2D6 in a German population. *Pharmacogenetics* 8:15-26, 1998.

- GRUNNET N, KONDRUP J, DICH J. Effect of ethanol on lipid metabolism in cultured hepatocytes. *Biochem J* 228:673-81, 1985.
- GUO J-Y, WAN D-S, ZENG R-P, ZHANG Q. The polymorphism of GSTM1, mutagen sensitivity in colon cancer and healthy control. *Mutat Res* 372:17-22, 1996.
- GYLLENSTEN UB, ERLICH HA. Generation of single-stranded DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA-DQA locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:7652-6, 1988.
- HANIOKA N, KIMURA S, MEYER UA, GONZALEZ FJ. The human CYP2D locus associated with a common genetic defect in drug oxidation. A G1934→A base change in intron 3 of a mutant CYP2D6 allele results in an aberrant 3' splice recognition site. *Am J Hum Genet* 47:994-1001, 1990.
- HANSSON T, TINDBERG N, INGELMAN-SUNDBERG M, KÖHLER C. Regional distribution of ethanol-inducible cytochrome P450 IIE1 in the rat central nervous system. *Neuroscience* 34:451-63, 1990.
- HARADA S. Investigation of the genetic markers associated with alcoholic liver diseases. *Alcohol Alcohol* 29 (supl 1):33-7, 1994.
- HAYASHI S, WATANABE J, KAWAGIRI K. Genetic polymorphisms in 5'-flanking region change transcriptional regulation of the human cytochrome *P450IIE1* gene. *J Biochem* 110:559-65, 1991.
- HAYES PC, MAY L, HAYES JD, HARRINSON DJ. Glutathione S-transferases in human liver cancer. *Gut* 32:1546-9, 1991.
- HAUBRICH WS, SCHAFFNER F, BERK JE. *Gastroenterology*. 5a ed. Philadelphia : WB Saunders, 1995. v.2 e 3.
- HEIM MH, MEYER UA. Evolution of a highly polymorphic human cytochrome P450 gene cluster: CYP2D6. *Genomics* 14:49-58, 1992.
- HETU C, DUMONT A, JOLY J-G. Effects of chronic ethanol administration on bromobenzene liver toxicity in rat. *Toxicol Appl Pharm* 67:166-7, 1983.

- HIGUCHI RG, OCHMAN H. Production of single-stranded DNA templates by exonuclease digestion following the polymerase chain reaction. *Nucleic Acid Res* 17:5865, 1989.
- HILLS KS, WESTABY D. Alcohol and the liver. *Br J Hosp Med* 57:517-521, 1997.
- HIRVONEN A, HUSGAFVEL-PURSIAINEN K, ANTILLA S, KARJALAINEN A, SORSA M, VAINIO H. Metabolic cytochrome P450 genotypes and assessment of individual susceptibility to lung cancer. *Pharmacogenetics* 2:259-63, 1992.
- HIRVONEN A, HUSGAFVEL-PURSIAINEN K, ANTILLA S, KARJALAINEN A, VAINIO H. The human CYP2E1 gene and lung cancer: *Dra*I and *Rsa*I restriction fragment length polymorphism in a Finnish study population. *Carcinogenesis* 14:85-88, 1993a.
- HIRVONEN A, HUSGAFVEL-PURSIAINEN K, ANTILLA S, VAINIO H. The GSTM1 null genotype as a potential risk modifier for squamous cell carcinoma of the lung. *Carcinogenesis* 14:1479-81, 1993b.
- HIRVONEN A, HUSGAFVEL-PURSIAINEN K, ANTILLA S, KARJALAINEN A, PELKONEN O, VAINIO H. PCR-based CYP2D6 genotyping for Finnish lung cancer patients. *Pharmacogenetics* 3:19-27, 1993c.
- HORAI Y, NAKANO M, ISHIZAKI T, ISHIKAWA K, ZHOU HH, ZHOU BI, LIAO CL, ZHANG LM. Metoprolol and mephentoin oxidation polymorphisms in Far Eastern Oriental subjects: Japanese versus mainland Chinese. *Clin Pharmacol Ther* 46:198-207, 1989.
- HU Y, INGELMAN-SUNDBERG M, LINDROS KO. Induction mechanisms of cytochrome P450 in liver: interplay between ethanol treatment and starvation. *Biochem Pharmacol* 50:155-61, 1995.
- HRUBEC A, OMENN GS. Evidence of genetic predisposition to alcoholic cirrhosis and psychosis: twin concordances for alcoholism and its biological end points by zygosity among males veterans. *Alcohol Clin Exp Res* 5:207-15, 1981.
- IARC. *Alcohol drinking IARC monograph on the evaluation of carcinogenic risks to humans*. v 44 Lyon: International Agency for Research on Cancer, 1988.

- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Censo demográfico 1991: migração*. Rio de Janeiro, IBGE, 1991, n.21.
- INATOMI N, KATO S, ITO D, LIEBER CD. Role of peroxissomal fatty acid beta-oxidation in ethanol metabolism. *Biochem Biophys Res Commun* 163:418-23, 1989.
- INGELMAN-SUNDBERG M, JOHANSSON I, PENTILLÄ KE, GLAUMANN H, LINDROS K. Centrilobular expression of ethanol-inducible cytochrome P-450 (IIE1) in rat liver. *Bioch Biophys Res Commun* 157:55-60, 1988.
- INGELMAN-SUNDBERG M, JOHANSSON I, YIN H, TERELIUS Y, ELIASSON E, CLOT P, ALBANO E. Ethanol-inducible cytochrome P450E1: genetic polymorphism, regulation, and possible role in the etiology alcohol-induced liver disease. *Alcohol* 10:447-452, 1993.
- JOHANSSON I, LINDROS KO, ERICKSON H, INGELMAN-SUNDBERG M. Transcriptional control of CYP2E1 in the perivenous liver region and during starvation. *Biochem Biophys Res Commun* 173:331-338, 1990.
- JOHANSSON I, YUE QY, DAHL ML, HEIM M, SAWE J, BERTILSSON L, MEYER UA, SJOQVIST F, INGELMAN-SUNDBERG M. Genetic analysis of the interethnic difference between Chinese and Caucasians in the polymorphic metabolism of debrisoquine and codeine. *Eur J Clin Pharmacol* 40:553-6, 1991.
- JOHANSSON I, LUNDQVIST E, BERTILSSON L, DAHL MJ, SJÖQVIST F, INGELMAN-SUNDBERG M. Inherited amplification of an active gene in the cytochrome P450 CYP2D locus as a cause of ultrarapid metabolism of debrisoquine. *Proc Natl Acad Sci. USA* 90:11825-9, 1993.
- JOURENKOVA-MIRONOVA N, VOHO A, BOUCHARDY C, WIKMAN H, DAYER P, BENHAMOU S, HIRVONEN A. Glutathione S-transferase GSTM1, GSTM3, GSTP1 and GSTT1 genotypes and the risk of smoking-related oral and pharyngeal cancers. *Int J Cancer* 81:44-48, 1999.
- JURONEN E, TASA G, UUSKULA M, POOGA M, MIKELSAAR AU. Purification, characterization and tissue distribution of human class theta glutathione S-transferase T1-1. *Biochem J* 318:297-303, 1996.

- KAGIMOTO M, HEIM M, KAGIMOTO K, KAGIMOTO K, ZEUGIN T, MEYER UA. Multiple mutations of the human cytochrome P450IID6 (*CYP2D6*) in poor metabolizer of debrisoquine. *J Biol Chem*, 265:17209-14, 1990.
- KATO S, SHIELDS PG, CAPORASO NE, HOOVER RN, TRUMP BF, SUGIMURA H, WESTON A, HARRIS CC. Cytochrome P450IIE1 genetic polymorphisms, racial variation, and lung cancer risk. *Cancer Res* 52:6712-5, 1992.
- KATO S, BOWMAN ED, HARRINGTON AM, BLOMEKE B, SHIELDS PG. Human lung carcinogen-DNA adduct levels mediated by genetic polymorphisms in vivo. *J Natl Cancer Inst* 87:902-7, 1995.
- KATOH T, KANEKO S, KOHSHI K, MUNAKA M, KITAGAWA K, KUNUGITA N, IKEMURA K, KAWAMOTO T. Genetic polymorphisms of tobacco-and alcohol-related metabolizing genes and oral cavity cancer. *Int J Cancer* 83:606-9, 1999.
- KERB R, BROCKMÖLLER J, DRAKOULIS L *et al.* CYP2D6 and glutathione S-transferase class mu as host factors of lung cancer susceptibility. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 3(suppl):131, 1992.
- KELSEY KT, SPITZ MR, ZUO Z-F, WIENCKE JK. Polymorphisms in the glutathione S-transferase class mu and theta genes interact and increase susceptibility to lung cancer in minority populations (Texas, United States). *Cancer Causes Control* 8:554-559, 1997.
- KNUDSON Jr AG. Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. *Cancer Res* 45:1437-43, 1985.
- KOOP DR, CASAZZA JP. Identification of ethanol-inducible P-450 isozyme 3a as the acetone and acetol monooxygenase of rabbit microsomes. *J Biol Chem* 260:13607-12, 1985.
- KRAJINOVIC M, LABUDA D, RICHER C, KARIMI S, SINNETT D. Susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia: influence of CYP1A1, CYP2D6, GSTM1, and GSTT1 genetic polymorphisms. *Blood*, 93:1496-1501, 1999.
- IARC *Alcohol drinking IARC monograph on the evaluation of carcinogenic risks to humans*. vol 44 Lyon:International Agency for research on Cancer, 1988.

- LAFUENTE A, PUJOL F, CARRETERO P, VILLA JP, CUCHI A. Human glutathione S-transferase μ (GST μ) deficiency as a marker for the susceptibility to bladder and larynx cancer among smokers.
- LAW RR, HETZEL MR, IDLE JR. Debrisoquine metabolism and genetic predisposition to lung cancer. *Br J Cancer* 59:686-7, 1989.
- LEE KH, KWAK BY, KIM JH, YOO SK, YUM SK, JEONG HS. Genetic polymorphism of cytochrome P-450E1 and mitochondrial aldehyde dehydrogenase in a Korean population. *Alcohol Clin Exp Res* 21:953-6, 1997.
- LE MARCHAND L, SIVARAMAN L, PIERCE L, SEIFRIED A, LUM A, WILKENS LR, LAU AF. Association of *CYP1A1*, *GSTM1*, and *CYP2E1* polymorphisms with lung cancer suggest cell type specificities to tobacco carcinogens. *Cancer Res* 58:4858-63, 1998.
- LIEBER CS. Liver disease and alcohol: fatty liver, alcohol hepatitis, cirrhosis and their relationship. *Ann N Y Acad Sci* 252:63-84, 1975.
- LIEBER CS. Hepatic, metabolic and toxic effects of ethanol: 1991 update. *Alcohol Clin Exp Res* 15:573-592, 1991.
- LIEBER CS, DECARLI LM. Hepatotoxicity of ethanol. *J Hepatol* 12:394-401, 1991.
- LIEBER CS. Alcohol and the liver: 1994 update. *Gastroenterology* 106:1085-1105, 1994.
- LIEBER CS. Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism. *Clin Chim Acta* 257:59-84, 1997.
- LIN HL, HAN C-Y, BERNSTEIN DA, HSIAO W, LIN BK, HARDY S. Ethnic distribution of the glutathione transferase Mu 1-1 (*GSTM1*) null genotype in 1473 individuals and application to bladder cancer susceptibility. *Carcinogenesis* 15:1077-81, 1994.
- LISKER-YOURKOWITZKY R, RAMIREZ-ARROYO E, PEREZ-RENDON G, DIAZ-BARRIGO RP, SIPERSTEIN-BLUMOVICZ M, MUTCHINICK-BARINGOLTZ O. Genotype of alcohol-metabolizing enzymes in Mexicans with alcoholic liver cirrhosis. *Arch Med Res* 26:S63, 1995.

- LOGUERCIO C, CLOT P, PETRONE E, ARICO S. Lipid peroxidation and glutathione depletion in the erythrocytes of chronic alcohol abusers. *Ital J Gastroenterol* 5:113, 1993.
- LONDON SJ, DALY AK, COOPER J, NAVIDI WC, CARPENTER CL, IDLE JR. Polymorphism of glutathione-S-transferase M1 and lung cancer risk among African-Americans and Caucasians in Los Angeles County, CA. *J Natl Cancer Inst* 87:1246-53, 1995.
- LONDON SJ, DALY AK, LEATHART JBS, *et al.* Genetic polymorphism of CYP2D6 and lung cancer risk in African-Americans and Caucasians in Los Angeles County. *Carcinogenesis* 18:1203-1214, 1997.
- LOU Y-C, YING L, BERTILSSON L, SJOQVIST F. Low frequency of slow debrisoquine hydroxylation in a native Chinese population. *Lancet* 2:852, 1987.
- LUCOTTE G, TURPIN JC, GERARD N, PANSE RAT S, KRISHNAMOORTHY R. Mutation frequencies of the cytochrome CYP2D6 gene in Parkinson disease patients and in families. *Am J Med Genet* 67:361-365, 1996.
- LUCAS D, MÉNEZ C, FLOCH F, GOURLAOUEN Y, SPARFEL O, JOANNET I, BODÉNEZ P, JEZEQUEL J, GOUÉROU H, BERTHOU F, BARDOU L-G, MÉNEZ J-F. Cytochromes P4502E1 and P4501A1 genotypes and susceptibility to cirrhosis or upper aerodigestive tract cancer in alcoholic caucasians. *Alcohol Clin Exp Res* 20:1033-37, 1996.
- MAEZAWA Y, YAMAUCHI M, TODA G, SUZUKI H, SAKURAI S. Association between restriction fragment length polymorphism of the human cytochrome P450IIE1 gene and susceptibility to alcohol liver cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 89:561-5, 1994.
- MAHGOUB A, DRING LG, IDLE JR, DRING LG, LANCASTER R, SMIDT RL. Polymorphic hydroxylation of debrisoquine in man. *Lancet* 2:584-586, 1977.
- MANNERVIK B. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 113:490-5, 1985.
- MAUCH TJ, DONOHUE TM Jr, ZETTERMAN RK, SORRELL MF, TUMA DJ. Covalent binding of acetaldehyde selectively inhibits the catalytic activity of lysine-dependent enzymes. *Hepatology* 6:263-9, 1986.

- MEZEY E. Liver disease and nutrition. *Gastroenterology* 74:770-83, 1978.
- MONSON RR, LYONS JL. Proportional mortality among alcoholics. *Cancer* 36:1077-9, 1975.
- MORITA S, YANO M, SHIOZAKI H, TSUJINAKA T, EBISUI C, MORIMOTO T, KISHIBUTI M, FUJITA J, OGAWA A, TANIGUCHI M, INOUE M, TAMURA S, YAMAZAKY K, KIKKAWA N, MIZUNOYA S, MONDEN M. *CYP1A1*, *CYP2E1* and *GSTM1* polymorphisms are not associated with susceptibility to squamous-cell carcinoma of the esophagus. *Int J Cancer* 71:192-5, 1997.
- MORITA S, YANO M, TSUJINAKA T, AKIYAMA Y, TANIGUCHI M, KANEKO K, MIKI H, FUJII T, YOSHINO K, KUSUOKA H, MONDEN M. Genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes and susceptibility to head-and-neck squamous-cell carcinoma. *Int J Cancer* 80:685-8, 1999.
- MUIRAS M-L, VERASDONCK P, COTTET F, SCHÄCHTER F. Lack of association between human longevity and genetic polymorphisms in drug-metabolizing enzymes at the NAT2, GSTM1 and CYP2D6 loci. *Hum Genet* 102: 526-532, 1998.
- NAKANO M, WORNER TM, LIEBER CS. Perivenular fibrosis in alcoholic liver injury: ultrastructure and histologic progression. *Gastroenterology* 83:777-85, 1982.
- NEBERT DW, MCKINNON R A, PUGA A. Human drug-metabolism enzyme polymorphisms: effects on risk of toxicity and cancer. *DNA Cell Biol* 15:273-280, 1996.
- NEBERT DW, GONZALEZ FJ. P450: structure, evolution and regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 56:945-993, 1987
- NEBERT DW, INGELMAN-SUNDBERG M, DALY AK. Genetic epidemiology of environmental toxicity and cancer susceptibility: human allelic polymorphism in drug-metabolizing enzyme genes, their functional importance, and nomenclature issues. *Drug Metab Rev* 31:467-87, 1999.

- NELSON HH, WEINCKE JK, CHRISTIANI DC, CHENG TJ, ZUO Z-F, SCHWARTZ S, LEE B-K, SPITZ MR, WANG M, XU X, KELSEY KT. Ethnic differences in the prevalence of the homozygous deleted genotype of glutathione S-transferase theta. *Carcinogenesis* 16:1243-5, 1995.
- NEVES MM et al. Concentração de etanol em bebidas alcoólicas mais consumidas no Brasil. *GED* 8:17-20, 1995.
- OUDE-OPHUIS MB, VAN LIESHOUT MM, ROELOFS HM, PETERS WHM, MANNI JJ. Glutathione S-transferases M1 and T1 and cytochrome P4501A1 polymorphisms in relation to the risk for benign and malignant head and neck lesions. *Cancer* 82:936-943, 1997.
- PELL S, D'ALONZO C A. A five year mortality study of alcoholics. *J Occup Med* 15:120-5, 1973.
- PEMBLE S, SCHROEDER KR, SPENCER SR, MEYER DJ, HALLIER E, BOLT HM, KETTERER B, TAYLOR JB. Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem J* 300:271-6, 1994.
- PERSSON I, JOHANSSON I, LOU, Y-C, YUE Q-Y, DUAN L-S, BERTILSSON L, INGELMAN-SUNDBERG M. Genetic polymorphism of xenobiotic metabolizing enzymes among Chinese lung cancer patients. *Int J Cancer* 81:325-329, 1999.
- PEQUIGNOT G, TUYNS AJ, BERTA JL. Ascitic cirrhosis in relation to alcohol consumption. *Int J Epidemiol* 7:113-121, 1978.
- PICKETT CB, LU AYH. Glutathione S-transferases: gene structure, regulation, and biological function. *Annu Rev Biochem* 58:743-64, 1989.
- PIRMOHAMED M, KITTINGHAM NR, QUEST LJ, ALLOTT RL, GREEN VJ, GILMORE IT, PARK BK. Genetic polymorphism of cytochrome P4502E1 and risk of alcoholic liver disease in Caucasians. *Pharmacogenetics* 5:351-7, 1995.
- PONDER, BAJ. Inherited predisposition to cancer. *TIG* 6:213-218, 1990.

- POUPON RE, NALPAS B, COUTELLE C, FLEURY B, COUZIGOU P, HIGUERET D. Polymorphisms of alcohol and aldehyde dehydrogenase activities: implication in alcoholic cirrhosis in white patients. The French Group for research on Alcohol and Liver. *Hepatology* 15:1017-22, 1992.
- QUIAO Z-K, HALLIDAY ML, RANKIN JG, COATES RA. Relationship between hepatitis B surface antigen prevalence, per capita alcohol consumption and primary liver cancer death rate in 30 countries. *J Clin Epidemiol* 41, 787-92, 1988.
- REED T, PAGE WF, VIKEN RJ, CHRISTIAN JC. Genetic predisposition to organ-specific endpoints to alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res* 20:1528-33, 1996.
- RODRIGO L, ALVAREZ V, RODRIGUEZ M, PEREZ R, ALVAREZ R, COTO E. N-acetyltransferase-2, glutathione S-transferase M1, alcohol dehydrogenase, and cytochrome P450IIE1 genotypes in alcoholic liver cirrhosis: a case-control study. *Scand J Gastroenterol* 34:303-7, 1999.
- ROSSIT ARB, CABRAL IR, CONFORTI-FROES NDT. Avaliação das frequências alélicas de genes do biometabolismo em uma população brasileira. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MUTAGÊNESE, CARCINOGENESE E TERATOGENESE AMBIENTAL, 4, Águas de São Pedro, 1999. *Genet Mol Biol* 22 (suppl 4):p001, 1999.
- SAARIKOSKI ST, VOHO A, REINIKAINEN M, ANTILLA S, KARJALAINEN A, MALAVEILLE C, VAINIO H, HUSGAFVEL-PURSIAINEN K, HIRVONEN A. Combined effect of polymorphic GST genes on individual susceptibility to lung cancer. *Int J Cancer*, 77:516-21, 1998.
- SACHSE C, BROCMÖLLER J, BAUER S, ROOTS I. Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *Am J Hum Genet* 60:284-295, 1997.
- SAIKI RF, GELFAND DH, STOFFEL S, SCHARF SJ, HIGUCHI R, HORN GT, MULLIS K, ERLICH HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491, 1988.
- SALZANO FM, FREIRE-MAIA N. *Populações brasileiras: aspectos demográficos, genéticos e antropológicos*. São Paulo, EDUSP, 1967.

- SAVOLAINEN VT, PAJARINEN J, PEROLA M, PENTILLA A, KARHUNEN PJ. Polymorphism in the cytochrome P450 2E1 gene and the risk of alcoholic liver disease. *J Hepatol* 26:55-61,1997.
- SCHOTTENFELD D. Alcohol as a co-factor in the etiology of cancer. *Cancer* 43:1962-6, 1979.
- SCHUSTER, I. (Ed) *Cytochrome P-450: Biochemistry and Biophysics*, Taylor and Francis, London, 1989, pp. 1-902.
- SEEFF LB, CUCCHERINI BA, ZIMMERMAN HJ, CUCCHERINI BA, ZIMMEMRMAN HJ, ADLER E, BENJAMIN SB. Acetaminophen hepatotoxicity in alcoholics. A therapeutic misadventure. *Ann Intern Med* 104:399-404, 1986.
- SEIDEGÅRD J, PERO RW, MARKOVITZ MM, ROUSH G, MILLER DG, BEATTIE EJ. Isoenzyme(s) of glutathione transferase (class mu) as a marker for the susceptibility to lung cancer: a follow up study. *Carcinogenesis* 11:33-6, 1990.
- SEITZ HK, GARRO AJ, LIEBER CS. Effect of chronic ethanol ingestion on intestinal metabolism of and mutagenicity of benzo(a)pyrene. *Biochem Biophys Res Commun* 85:1061-6, 1978.
- SEITZ HK, EGERER G, SIMANOWSKI UA, WALDHERR R, ECKEY R, AGARWAL DP, GOEDDE HW, VonWARTBURG JP. Human gastric alcohol dehydrogenases activity: effect of age, gender, and alcoholism. *Gut* 34:1433-7, 1993.
- SELLMAN R, KANTO J, RAIJOLA E, PEKKARINEN A. Human and animal study on elimination from plasma and metabolism of diazepam after chronic alcohol intake. *Acta Pharmacol Toxicol* 36:33-38, 1975.
- SHAW S, RUBIN KP, LIEBER CS. Depressed hepatic glutathione and increased diene conjugates in alcoholic liver disease. Evidence of lipid peroxidation. *Dig Dis Sci* 28:585-91, 1983.
- SHERLOCK S. *Doenças do Fígado e do Sistema Biliar*. 5a. Ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1978. p.328.
- SHERLOCK S. Alcohol and disease. *Brit Med Bull* 38:1-108, 1982.

- SHERLOCK S, DOOLEY J. *Diseases of the liver and biliary system*. Blackwell Science (Ed), 10th edition, Oxford, 1997 pp 531-534.
- SHERMAN D, WILLIAMS R. Liver damage: mechanisms and management. *Br Bull Med* 50:124-38, 1994.
- SIEGERS CP, HEIDBUCHEL K, YOUNES M. Influence of alcohol, ditiochard and (+)-catechin on the hepatotoxicity and metabolism of vinylidene chloride in rats. *J Appl Toxicol* 3:90-5, 1983.
- SPURR N, COUGH AC, SMITH D, WOLF CR. Genetic analysis of cytochrome P450 system. *Methods Enzymol* 206:149-66, 1991.
- SOTANIEMI EA, ANTTILA M, RAUTIO A, STENGARD J, SAUKKO P, JARVENSIVU P. Propanolol and sotalol metabolism after drinking party. *Clin Pharmacol Ther* 12:192-201, 1981;
- STEPHENS EA, TAYLOR JA, KAPLAN N, YANG CH, HSIEH LL, LUCIER GW, BELL DA. Ethnic variation in the CYP2E1 gene: polymorphism analysis of 695 African-Americans, European-American and Taiwanese. *Pharmacogenetics* 4(4):185-92, 1994.
- SUGIMURA H, HAMADA GS, SUZUKI I, IWASE T, KIYOKAWA E, KINO I, TSUGANE S. CYP1A1 and CYP2E1 polymorphism and lung cancer, case-control study in Rio de Janeiro, Brazil. *Pharmacogenetics* 5:S145-8, 1995.
- TAGAKI T, ISHII H, TAKAHASHI H, KATO S, OKUNO F, EBIHARA Y, YAMAUCHI H, NAGATA S, TASHIRO M, TSUCHIYA M. Potentiation of halothane hepatotoxicity by chronic ethanol administration in rat: An animal model of halothane hepatitis. *Pharmacol Biochem Behav* 18(Supl 1):461-5, 1983.
- TAKAHASHI T, LASKER JM, ROSMAN AS, LIEBER CS. Induction of P4502E1 in human liver by ethanol is due to a corresponding increase in encoding mRNA. *Hepatology* 17:236-45, 1993.
- TANAKA F, SHIRATORI Y, YOKOSUKA O, IMAZEKI F, TSUKADA Y, OMATA M. High incidence of ALH2*1/ALDH2*1 genes among Japanese alcohol dependents and patients with alcoholic liver disease. *Hepatology* 23:234-9, 1996.

- TANINGHER M, MALACARNE D, IZZOTTI A, UGOLLINI D, PARODI S. Drug metabolism polymorphism as modulators of cancer susceptibility. *Mutat Res* 436:227-61, 1999.
- TEFRE T, DALY AK, ARMSTRONG M, LEATHART JB, IDLE JR, BRÖGGER A, BORRESEN AL. Genotyping of the CYP2D6 gene in Norwegian lung cancer patients and controls. *Pharmacogenetics* 4:47-57, 1994.
- TINDBERG N, INGELMAN-SUNDBERG M. Cytochrome P-450 and oxygen toxicity. Oxygen-dependent induction of ethanol-inducible cytochrome P-450 (IIE1) in rat liver and lung. *Biochemistry* 28:4499-504, 1989.
- TO-FIGUERAS J, GENÉ M, GÓMEZ-CATALÁN J, GALAN MC, FUENTES M, RAMAONJM, HUGUETE E, CORBELLA J, Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) and T1 (GSTT1) polymorphisms and lung cancer risk among Northwestern Mediterraneans. *Carcinogenesis* 18:1529-33, 1997.
- TOPIĆ E, ŠTEFANOVIĆ M, IVANIŠEVIĆ AM, PETRONIVIĆ R, ČURČIĆ I. The cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) gene polymorphism among breast and head and neck cancer patients. *Clin Chim Acta* 296:101-9, 2000.
- TSUTSUMI R, LEO MA, KIN C, TSUTSUMI M, LASKER J, LOWE N, LIEBER CS. Interaction of ethanol with enflurane metabolism and toxicity: role of P450IIE1. *Alcoholism: Clin Exp Res* 14:174-9, 1990.
- TSUTSUMI M, WANG J-S, TAKASE S, TAKADA A. Hepatic messenger RNA contents of cytochrome P4502E1 in patients with different P4502E1 genotypes. *Alcohol Alcohol* 29, S1:29-32, 1994a.
- TSUTSUMI M, TAKADA A, WANG J-S. Genetic polymorphisms of cytochrome P4502E1 to the development of alcoholic liver disease. *Gastroenterology* 107:1430-1435, 1994b.
- TUMA DJ, JENNETT RB, SORRELL MF. The interaction of acetaldehyde with tubulin. *Ann NY Acad Sci* 492:277-86, 1987.
- TUYNS AJ. Oesophageal cancer in non-smoking drinkers and in non-drinking smokers. *Int J Cancer*, 32:443-4, 1983.

- TUYNS AJ, PEQUIGNOT G, GIGNOUX M, VALLA A. Cancer of the digestive tract, alcohol and tobacco. *Int J Cancer* 30:9-11, 1982.
- UEMATSU F, KIKUCHI H, MOTOMYIA M, ABE T, SAGAMII, OHMACHI T, WAKUI A, KANAMARU R, WATANABE M. Association between restriction fragment length polymorphism of the human cytochrome P450IIE1 gene and susceptibility to lung cancer. *Jpn J Cancer Res*, 82:254-256, 1991.
- UEMATSU F, IKAWA S, KIKUCHI H, ABE T, SAGAMO I, OHMACHI T, WAKUI A, KANAMARU R, WATANABE M. Restriction fragment length polymorphism of the human *CYP2E1* (cytochrome P450IIE1) gene and susceptibility to lung cancer: possible relevance to low smoking exposure. *Pharmacogenetics* 4:58-63, 1994.
- VAILLANT G E. Alcoolismo e morbidade. In: _____ - *A História natural do alcoolismo revisitada*. Porto Alegre, Ed. Artes Médicas Sul Ltda., 1999. p.162-71.
- VIDAL F, TODA R, GUTIERREZ C, BROCH H, FERNADEZ-MUIXI F, LORENZO A, RICHARD C. Influence of chronic alcohol abuse and liver disease on hepatic aldehyde dehydrogenase activity. *Alcohol* 15(1):3-8 1998.
- VIEZZER C, NORPPA H, CLONFERO E, GARBANI G, HIRVONEN A, CELOTTI L. Influence of *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, and *EPXH* gene polymorphisms on DNA adduct level and *HPRT* mutant frequency in coke-oven workers. *Mutat Res* 431:259-69, 1999.
- VILLARD P-H, SEREE EM, RE J-L, MEO M, BARRA Y, ATTOLINI L, DUMENIL G, CATALIN J, DURAND A, LACARELLE B. Effects of tobacco smoke on the gene expression of the *Cyp1a*, *Cyp2b*, *Cyp2e*, and *Cyp3a* subfamilies in mouse liver and lung: relation to single strand breaks of DNA. *Toxicol Appl Pharmacol* 148:195-204, 1998.
- VOGEL F, MOTULSKY AG. Human genetics - Problems and Approaches. 2nd edition. Springer, Berlin, 1986.
- WANG SL, HUANG J, LAI MD, LIU BH, LAI ML. Molecular basis for genetic variation in debrisoquine hydroxylation in Chinese subjects: polymorphism in RFLP and DNA sequence of CYP2D6. *Clin Pharmacol Ther* 53:410-8, 1993.

- WARHOLM M, RANNE A, ALEXANDRIE AK, MONAGHAN G, RANNUG. Genotypic and phenotypic determination of polymorphic glutathione transferase T1 in a Swedish population. *Pharmacogenetics* 5:252-4, 1995.
- WATANABE J, HAYASHI S-I, NAKACHI K, IMAI K, SUDA Y, SEKINE T, KAWAJARI K. *Pst1* and *Rsa1* RFLPs in complete linkage disequilibrium at the CYP2E gene. *Nuc Acids Res* 18:7194, 1990.
- WATANABE J, YANG J-P, EGUCHI H, HAYASHI S-C, IMAI K, NAKACHI K, KAWAJIRI K. An *RsaI* polymorphism in the CYP2E1 gene does not affect lung cancer risk in a Japanese population. *Jpn J Cancer Res* 86:245-8, 1995.
- WHALEN R, BOYER TD. Human glutathione S-transferases. *Semin Liver Dis* 18:345-58, 1998.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Prevention of liver cancer. *Report of WHO Meeting*, Geneva, 1983. WHO Technical Series 691.
- WIDERSTEN M, PEARSON WR, ENGSTROM A, MANERVICK B. Heterologous expression of the allelic variant mu-class glutathione transferases mu and psi. *Biochem J* 276:519-24, 1991.
- WOLF CR, SMITH CA, GOUGH AC, MOSS JE, VALLIS KA, HOWARD G, CAREY FJ, MILLS K, McNEE W, CARMICHAEL J, *et al.* Relationship between the debrisoquine hydroxylase polymorphism and cancer susceptibility. *Carcinogenesis* 13:1035-8, 1992.
- WORMHOUDT, LW, COMMANDEUR JNM, VERMEULEN NPE. Genetic polymorphism of human N-acetyltransferase, cytochrome P450, glutathione-S-transferase, and epoxide hydrolase enzymes: relevance to xenobiotic metabolism and toxicity. *Clin Rev Toxicol* 29:59-124, 1999.
- WORNER TM, LIEBER CS. Perivenular fibrosis as precursor lesion of cirrhosis. *JAMA* 254:627-30, 1985.
- WORLD CANCER RESEARCH FUND & AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH. Nutrition, Food and Cancer. In: *Food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective*. American Institute for Cancer Research, Washington DC, 1997. Cap V, p398-403.

- WU X, SHI H, JIANG H, KEMP B, HONG WK, DELCLOS GL, SPITZ MR. Association between cytochrome P4502E1 genotype, mutagen sensitivity, cigarette smoking and susceptibility to lung cancer. *Carcinogenesis* 18:967-973, 1997.
- YANG CS, PATTEN CJ, ISHIZAKI H, YOO JH. Induction, purification, and characterization of cytochrome P450IIE1. *Methods Enzymol* 206:595-602, 1992.
- YOOJ-SH, GUENGERICH FP, YANG CS. Metabolism of N-nitrosodialkylamines by human liver microsomes. *Cancer Res* 48:1499-1504, 1988.
- YU M-W, GLADEK-YARBOROUGH A, CHIAMPRASERT S, SANTELLA RM, LIAW Y-F, CHEN C-J. Cytochrome P450 2E1 and Glutathione S-transferase polymorphism and susceptibility to hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 109:1266-73, 1995.

ANEXOS

Projeto: “Polimorfismos de genes envolvidos no metabolismo de xenobióticos em indivíduos portadores de hepatopatias associadas ao etilismo crônico”

PROTOCOLO: _____

1- Nome do Paciente: _____ Sexo: ()M () F

2- Hospital: _____ Rg: _____

3- Local e Data de Nascimento: _____

4- Endereço: _____

5a- Profissão atual e tempo de atuação _____

5b- Profissões anteriores e tempo de atuação: _____

5g- Exposição profissional a agentes genotóxicos: _____

6- “Raça” do indivíduo: _____

Antecedentes raciais: _____

7- Exposição ao tabaco:

7a- () fumante ativo () ex-fumante () nunca fumou

7b- idade-início do hábito: _____

7c- duração do hábito: _____

7d- consumo diário: _____

7e- fumo passivo (relação e tempo de convivência diária com o fumante): __

8- Exposição a bebidas alcoólicas:

8a- () etilista ativo () ex-etilista () consumo social

8b- idade-início do hábito: _____ 8c- duração do hábito: _____

8d- tipo de bebida ingerida e consumo diário: _____

8e- etilismo na família: _____

9- Exposição a drogas não-medicamentosas:

9a- consumidor ex-consumidor nunca consumiu

9b- idade-início do hábito: _____ 9c- duração do hábito: _____

9d- tipo de droga consumida: _____

10a- Drogas medicamentosas usadas em tratamentos prolongados e (b) período do tratamento: _____

11- Ficha médica: _____

11a- Doença álcool-associada: _____

11b- Data e forma de diagnóstico: _____

11c- Apresentou os seguintes sintomas (data):

inchaço das pernas (___/___/___)

aumento do volume abdominal (___/___/___)

sangramento em fezes ou vômitos (___/___/___)

11e- Hepatite por vírus: sim não

11e.1- tipo: _____

11e.2- forma de diagnóstico: _____

11f- Outras doenças infecciosas: _____

11g- Doenças na família (diabetes, cirrose, câncer) _____

11h- Relato de transfusão sanguínea: _____

11i- Perfil bioquímico hepático: _____

Data: _____ Ass. entrevistador: _____

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
CENTRO DE BIOLOGIA MOLECULAR E ENGENHARIA GENÉTICA
LABORATÓRIO DE GENÉTICA HUMANA
RESPONSÁVEL: Profa. Dra. Christine Hackel (019-7881145)

TERMO DE CONSENTIMENTO

NOME: _____

RG: _____

Autorizo a obtenção de amostra de DNA para utilização em estudos moleculares para o entendimento do desenvolvimento humano e de doenças crônicas. As informações genéticas obtidas, bem como os dados pessoais aqui coletados podem ser apresentados em reuniões e publicações científicas sem a minha identificação pessoal.

Campinas, ___/___/____.

DADOS PESSOAIS

PROTOCOLO: _____

NOME: _____

LOCAL E DATA DE NASCIMENTO: _____

ENDEREÇO: _____

Nº DE FILHOS: _____

RAÇA (pelas características físicas): _____

ASCENDÊNCIA RACIAL: _____

HISTÓRICO PROFISSIONAL: _____

HISTÓRICO DE TABAGISMO:

() NÃO-FUMANTE:

exposição a cigarros em casa: _____

exposição a cigarros no trabalho: _____

() FUMANTE ATIVO:

idade que começou a fumar: _____

quantidade de cigarros consumida por dia: _____

() EX-FUMANTE:

idade que começou a fumar: _____

quantidade de cigarros consumida por dia: _____

tempo de abstinência: _____

duração do hábito: _____

HISTÓRICO DE ETILISMO:

freqüência de consumo de bebidas alcoólicas: _____

tipo de bebida alcoólica: _____

idade que começou a consumir álcool regularmente: _____

duração do hábito: _____

() ETILISTA SOCIAL = consumo máximo de 30g de álcool/dia, 4x/semana

() ETILISTA LEVE = consumo máximo de 60g de álcool/dia, 4x/semana

() ETILISTA MODERADO = consumo 60-150g de álcool/dia, 4x/semana

() ETILISTA PESADO = consumo >150g de álcool/dia, 4x/semana

DOENÇAS CRÔNICAS NA FAMÍLIA (diabetes, câncer, cirrose e etc.) _____

Data da entrevista: ____/____/____

Entrevistador: _____

Indivíduos etilistas cirróticos (EC) classificados por variáveis ambientais e genéticas segundo o sexo.

variável	homens (n=119)	mulheres (n=17)	Estatística; probabilidade
idade	47,70 \pm 9,89	51,24 \pm 8,70	$F_{(1,135)}=1,95$; $p=0,165$
fumantes	95 (79,8%)	12 (70,6%)	$\chi^2=0,758$; $p=0,38$
tempo de fumo (anos)	29,71 \pm 10,39	32,25 \pm 11,17	$F_{(1,105)}=0,63$; $p=0,43$
consumo de fumo (un)	23,21 \pm 7,29	17,92 \pm 8,38	$F_{(1,105)}=1,97$; $p=0,163$
maço-ano	34,44 \pm 21,25	29,56 \pm 18,85	$F_{(1,105)}=0,57$; $p=0,45$
álcool/dia (g)	205,0 \pm 117,8	239,3 \pm 153,1	$F_{(1,135)}=1,16$; $p=0,283$
tempo de álcool (anos)	27,03 \pm 10,71	25,35 \pm 11,82	$F_{(1,135)}=0,35$; $p=0,553$
GSTT1*0	30 (25,2%)	7 (41,2%)	$\chi^2=1,915$; $p=0,16$
GSTM1*0	61 (51,3%)	6 (35,3%)	$\chi^2=1,075$; $p=0,299$
c1/c2	17 (14,7%)	0 (0%)	$\chi^2=1,623$; $p=0,203$
D/C	25 (21,6%)	4 (23,5%)	$\chi^2=0$; $p=0,992$

Indivíduos etilistas não-cirróticos (ENC) classificados por variáveis ambientais e genéticas segundo o sexo.

variável	homens (n=69)	mulheres (n=5)	Estatística; probabilidade
idade	47,03 ±10,36	53,40 ±14,94	$F_{(1;72)}=1,66$; $p=0,201$
fumantes	60 (87,0%)	3 (60,0%)	
tempo de fumo (anos)	26,57 ±11,06	35,0 ±16,27	$F_{(1;62)}=2,5$; $p=0,119$
consumo de fumo (un)	21,0 ±11,08	17,5 ±5,0	$F_{(1;62)}=0,39$; $p=0,35$
maço-ano	28,32 ±20,45	28,25 ±10,25	$F_{(1;62)}=0$; $p=0,995$
álcool/dia (g)	185,87 ±80,95	338 ±191,33	$F_{(1;72)}=13,12$; $p=0,001$
tempo de álcool (anos)	26,30 ±12,01	29,20 ±10,13	$F_{(1;72)}=0,28$; $p=0,601$
GSTT1*0	14 (20,3%)	1 (20,0%)	$\chi^2=0$; $p=0,99$
GSTM1*0	27 (39,1%)	1 (20,0%)	$\chi^2=0,725$; $p=0,394$
c1/c2	6 (8,7%)	3 (40,0%)	$\chi^2=1,482$; $p=0,223$
D/C	16 (24,2%)	3 (60,0%)	$\chi^2=1,663$; $p=0,1973$

Indivíduos Ct classificados por variáveis ambientais e genéticas segundo o sexo.

variável	homens (n=197)	mulheres (n=29)	Estatística; probabilidade
idade	39,23 ±11,07	51,86 ±11,03	$F_{(1;224)}=32,9$; p=0
fumantes	72 (36,5%)	11 (37,9%)	$\chi^2=0,02$; p=0,885
tempo de fumo (anos)	18,25 ±11,21	25,8 ±9,17	$F_{(1;80)}=4,15$; p=0,045
consumo de fumo (un)	18,33 ±10,35	22,9 ±21,21	$F_{(1;80)}=1,26$; p=0,265
maço-ano	15,73 ±14,28	34,74 ±42,18	$F_{(1;80)}=8,32$; p=0,005
GSTT1*0	36 (18,5%)	5,29 (17,2%)	$\chi^2=0,025$; p=0,874
GSTM1*0	92 (47,2%)	11 (37,9%)	$\chi^2=0,869$; p=0,351
c1/c2	29 (15%)	2 (6,9%)	$\chi^2=1,387$; p=0,239
D/C	42 (23,0%)	8 (28,6%)	$\chi^2=0,424$; p=0,515