

ESTUDO DE POLIMORFISMOS DOS GENES DE BIOMETABOLISMO *GSTM1* E *GSTT1* EM UMA POPULAÇÃO DE ALCOOLISTAS DE PARNAÍBA (PI)

Mônika Machado de Carvalho (Bolsista PIBIC/CNPq), Deborah Yasmin de Sousa (Colaborador, UFPI), Fábio José do Nascimento Motta (Colaborador, UFPI), Renata Canalle (Orientadora, Departamento do Curso de Biomedicina/UFPI).

Introdução

O álcool é uma droga psicoativa que pode, dependendo da dose, da frequência e das circunstâncias, ser usada sem problemas. Contudo, o seu uso inadequado pode trazer graves consequências tanto orgânicas como psicológicas e sociais, caracterizando a ação conhecida como dependência ao álcool ou alcoolismo.¹

No mundo quase 4% de todas as mortes são atribuídas ao álcool, ele é associado com muitas questões sociais sérias, como violência, negligência infantil e abusos, além de faltas ao trabalho. O número de mortes por álcool, 2,5 milhões de mortes todos os anos, é maior do que as de mortes causadas por AIDS, violência e tuberculose.²

Segundo pesquisa recente do Ministério da Saúde, [Teresina](#) é a segunda capital brasileira com o maior percentual de adultos, 23% deles, com idade igual ou maior de 18 anos, que consomem bebidas alcoólicas de forma obsessiva.³ No entanto, permanece para ser esclarecido como grande parte das diferenças entre indivíduos quanto à dependência alcoólica, pode ser explicada por fatores genéticos, e em que condições esta desordem é mediada geneticamente por características pessoais. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo avaliar se os polimorfismos de determinadas enzimas metabolizadoras de xenobióticos e de defesa antioxidante (genes *GSTM1* e *GSTT1*) predisõem ao alcoolismo ou aumentam a suscetibilidade ao desenvolvimento de doenças relacionadas com o uso abusivo do álcool.

Metodologia

O estudo foi realizado utilizando amostras de sangue periférico de pacientes alcoolistas atendidos nas unidades de saúde da cidade de Parnaíba (CAPS –AD), no estado do Piauí, nordeste do Brasil e indivíduos controles voluntários de Parnaíba. Todos os indivíduos foram esclarecidos dos objetivos da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para a participação como sujeitos do estudo.

As amostras de sangue periférico obtidas por punção venosa foram submetidas à extração do DNA com o kit *Wizard® Genomic DNA Purification (Promega)*, de acordo com as especificações do fabricante. Em seguida, as amostras de DNA de trabalho foram armazenadas em freezer. A reação de amplificação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada baseada no protocolo para PCR Multiplex de Abdel-Rahman et al. (1996).⁴

As frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos estudados foram determinadas por simples contagem. O teste de probabilidade exato de Fisher (bi-caudal) foi aplicado para verificar a significância estatística das associações. A “odds ratio” (OR) (razões de probabilidade) e o intervalo de confiança (IC) de 95% foram calculados como uma estimativa de risco relativo e grau de associação. O teste do qui-quadrado (χ^2) foi utilizado para a comparação entre as frequências gênicas

observadas neste estudo e as observadas em outras populações. O nível de probabilidade (P) menor ou igual a 0,05 foi usado como critério de significância. Para a análise dos dados foi utilizado o programa GraphPrism 6.0.

Resultados e Discussão

Dos dois grupos formados, pacientes e controles, conseguiu-se um total de 200 indivíduos dos quais 137(68,5%) eram homens e 63(31,5%) eram mulheres, com uma variação de idade entre 18 e 89 anos (média = 53 anos) todos pertencentes ao município de Parnaíba (PI) e Planície Litorânea.

O grupo de 100 pacientes alcoolistas apresentou 5 indivíduos do sexo feminino (5%) e 95 do sexo masculino (95%), com idades que variaram de 18 a 83 anos (média = 40 anos). Nossa amostra de alcoolistas foi classificada como consumo pesado de álcool de acordo com a quantidade em gramas de álcool ingeridas por dia (acima de 168,72 g/L/dia).

O grupo controle foi composto por 100 indivíduos todos pertencentes ao banco de dados existente no Laboratório de Genética e Biologia Molecular da UFPI, Campus Ministro Reis Veloso, sendo 42 homens (42%) e 58 mulheres (58%), com idades que variaram de 65 a 89 anos (média = 67 anos). Sem histórico de consumo de álcool ou apenas ingerindo quantidades irrisórias durante o ano e com 50% fazendo uso diário ou quase diário de cigarro.

A distribuição do polimorfismo dos genes *GSTM1* e *GSTT1* para a amostra total, pacientes e controles, apresentou a frequência de 34,5% e 35% nas deleções homozigotas para os loci *GSTM1* e *GSTT1* (genótipos nulos), respectivamente (TABELA 1).

O polimorfismo desses genes é caracterizado pela deleção completa do gene. A FIGURA 1 mostra o polimorfismo das glutathione S-transferases mu e teta, onde podem ser detectados os alelos homozigotos nulos para os genes *GSTM1* e *GSTT1* por meio da técnica de PCR multiplex. No caso de indivíduos que possuem o genótipo *GSTM1* positivo a amplificação resulta em um fragmento de 215 pb, no caso de indivíduos que possuem o genótipo *GSTT1* positivo a amplificação permite a visualização de um fragmento de 480 pb.

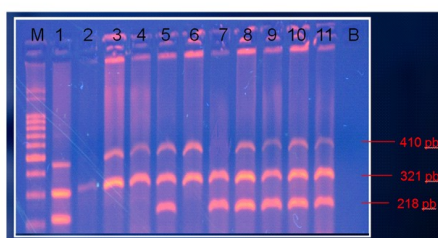


FIGURA 1: PCR-multiplex em gel de agarose 2% para detecção dos polimorfismos nos genes *GSTM1*(318 pb) e *GSTT1*(410 pb), e o gene *CYP1A1*(321 pb) como controle interno da reação, onde M= marcador de peso molecular (100 pb) e B= branco (todos os reagentes, exceto DNA). Linhas 1, 5, 8, 9, 10 e 11 todos os genes estão presentes. Linha 2 o gene *GSTM1* e *GSTT1* estão nulos. Linhas 3, 4 e 6 o gene *GSTM1* é nulo. Linha 7 o gene *GSTT1* é nulo.

As frequências dos genótipos *GSTM1* e *GSTT1* em alcoolistas e nos controles estão apresentadas na TABELA 2. A análise dos dados mostrou que as deleções homozigotas para o loci *GSTM1* (genótipo nulo) foram encontrados nas frequências de 29 % e 40% nos alcoolistas e controles, respectivamente, com isso obteve-se um $p=0,13$, uma O.R. de 0,61 e um IC de (0,34 – 1,1), sugerindo que a ausência desse gene confere uma possível proteção ao indivíduo de se tornar alcoolista. E na análise do loci *GSTT1* (genótipo nulo), foram encontradas as frequências de 28% e

42% para alcoolistas e controles, respectivamente, com $p=0,05$, uma O.R de 0,53 e um IC de (0,29 – 0,96) indicando que a ausência do gene confere proteção significativa aos indivíduos.

TABELA 1: Distribuição das frequências dos polimorfismos dos genes *GSTM1* e *GSTT1* na população total (pacientes e controles).

LOCU	GENOTIPO	NUMERO (%)	
		População	Total (Pacientes e Controles, n = 200)
<i>GSTM1</i>	Presente	131	(65,5)
	Nulo	69	(34,5)
<i>GSTT1</i>	Presente	130	(65)
	Nulo	70	(35)

Nulo = deleção gene.

TABELA 2: Distribuição dos Alcoolistas e indivíduos controles, em relação às frequências dos polimorfismos dos genes *GSTM1* e *GSTT1*.

GENOTIPO	NUMERO/TOTAL (%)			OR (95% IC)	P
	Alcoolistas	Controles			
<i>GSTM1</i> presente	71/100 (71)	60/100 (60)		1 (referencia)	
<i>GSTM1</i> nulo	29/100 (29)	40/100 (40)		0,61 (0,34 – 1,1)	0,13
<i>GSTT1</i> presente	72/100 (72)	58/100 (58)		1 (referencia)	
<i>GSTT1</i> nulo	28/100 (28)	42/100 (42)		0,53 (0,29 – 0,96)	0,05

Nulo = deleção; P = os valores foram calculados pelo teste de probabilidade exato de Fisher; OR = "odds ratio"; IC = intervalo de confiança.

A partir dos dados observados neste estudo é possível concluir que o polimorfismo *GSTT1* nulo influencia na susceptibilidade individual para o alcoolismo, conferindo proteção contra o uso abusivo do álcool para indivíduos portadores deste genótipo. Estes resultados vão ajudar a fornecer dados para a compreensão da genética populacional parnaibana e sobre os efeitos desses genes na dependência ao álcool e no desenvolvimento de doenças relacionadas ao uso abusivo do álcool, buscando atendimento e tratamento mais individualizados para os pacientes alcoolistas.

Conclusão

Os resultados deste estudo sugerem que a deleção homocigótica de ambos os genes, *GSTT1* e *GSTM1*, pode estar associada com uma menor susceptibilidade ao alcoolismo na população estudada, entretanto se faz necessária a realização de outros estudos, incluindo um número maior de pacientes para confirmar esses achados. Os resultados apresentados neste estudo, assim como os dados relatados em outros trabalhos, deixam claro que a diversidade do genoma humano é um fator muito importante a ser analisado, quando se trata de susceptibilidade a doença e dependência a drogas.

Apoio: CNPq e UFPI.

Referências

- Burim, R. V.; Canalle, R.; Martinelli Ade, L.; Takahashi, C. S. Polymorphisms in glutathione S-transferases *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* and cytochromes P450 *CYP2E1* and *CYP1A1* and susceptibility to cirrhosis or pancreatitis in alcoholics. **Mutagenesis**, v.19, n.4, p.291-8. 2004b.
- OMS. Global Status Report on Alcohol and Health 2011. Disponível em: <http://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/en/index.html> . Acesso em 12 Mai 2012.
- Brasil. Vigitel Brasil 2009: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico / **Ministério da Saúde**, Secretaria de Vigilância em Saúde, Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa. – Brasília: Ministério da Saúde, 2011.
- Abdel-Rahman, S.Z. et al. A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of *GSTM1* and *GSTT1* genes in population studies. **Cancer Letters**. n. 10, p. 229-233, 1996.

Palavras-chave: Alcoolismo. Polimorfismo Genético. *GSTs*.