



POLIMORFISMOS DOS GENES *GSTM1*, *GSTT1* E A4889G E T6235C DO GENE *CYP1A1*, RELACIONADOS AO METABOLISMO DE CARCINÓGENOS, NO RISCO DO CÂNCER DE LARINGE

Anderson Zanetti, Gustavo J. Lourenço, Carlos T. Chone, Carmen S. P. Lima. E-mail: anderznt@fcm.unicamp.br

Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Ciências Médicas, CP 6111
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brasil.

INTRODUÇÃO

O carcinoma epidermóide (CEC) de laringe está associado a agentes químicos presentes em bebidas alcoólicas e no tabaco¹. A doença é frequente em nosso país e está associada a alta morbidade e mortalidade a seus portadores². As glutathione S-transferases (*GSTs*) são enzimas detoxificantes que atuam no mecanismo de proteção contra a carcinogênese. Os genes *GSTM1* e *GSTT1* são polimórficos em humanos e estão deletados de forma homocigótica em cerca de 50% e 20% dos indivíduos saudáveis, respectivamente³. Já os genótipos variantes GG e CC dos polimorfismos A4889G e T6235C do gene *CYP1A1*, identificados em cerca de 2% e de 2,2% dos indivíduos saudáveis^{4,5}, respectivamente, parecem mais eficazes na ativação de carcinógenos⁶. Entretanto seus papéis na ocorrência do CEC de laringe são controversos. Nosso objetivo neste trabalho foi o de avaliar se os genótipos destes genes influenciam o risco de CEC de laringe em nossa região.

MATERIAIS E MÉTODOS

O DNA genômico de 96 pacientes (88 homens, 8 mulheres; idade mediana: 59 anos, variação: 39 a 92 anos; 87 caucasóides, 9 negróides) com CEC de laringe e de 190 controles (174 homens, 16 mulheres; idade mediana: 53 anos, variação: 49 a 60 anos; 171 caucasóides, 19 negróides) foi avaliado por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) multiplex para os polimorfismos *GSTM1* e *GSTT1*; só foram considerados os genótipos que apresentavam uma banda correspondente ao gene da globina beta⁷ (figura 1). Os genótipos dos polimorfismos A4889G (figura 2) e T6235C (figura 3) do gene *CYP1A1* foi avaliado por meio de PCR e digestão enzimática⁸. O significado estatístico das diferenças entre grupos foi calculado por meio do teste do chi-quadrado ou da probabilidade exata de Fisher. O teste de verificação do Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi realizado com o intuito de verificar se ocorreu distribuição preferencial de algum dos genótipos avaliados no grupo de pacientes e controles utilizados no estudo⁸.

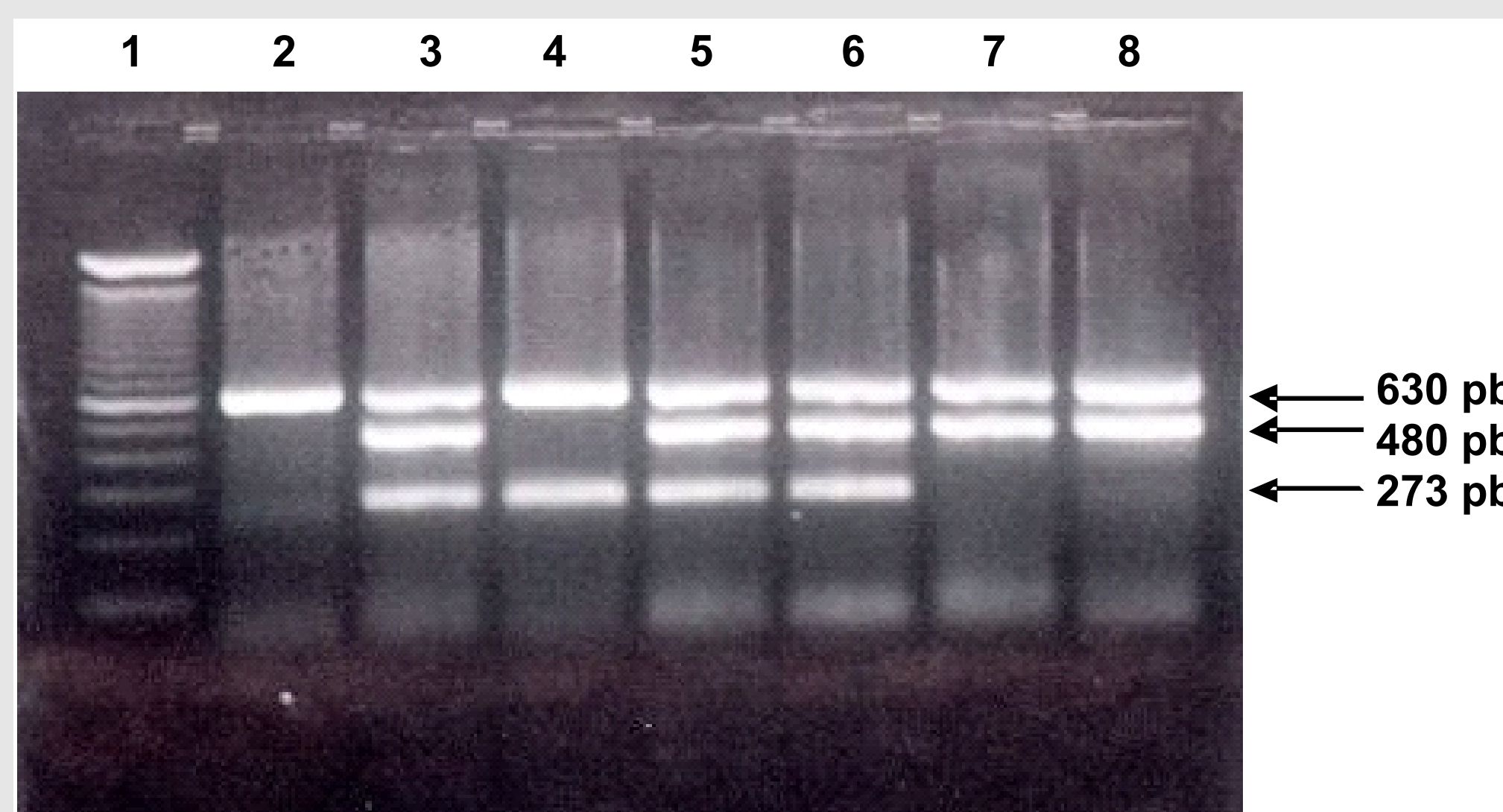


Figura 1. Multiplex-PCR para a identificação dos genótipos dos genes *GSTM1* e *GSTT1* do sistema da glutathione S-transferase, em pacientes e controles, em gel de agarose a 2,0%. O fragmento de 630 pares de base (pb) representa um fragmento do gene da globina beta, utilizado para o controle da amostra de DNA. Fragmentos de 480 pb e 273 pb correspondem à presença dos alelos *GSTT1* e *GSTM1*, respectivamente. O marcador do tamanho do DNA, ladder 100 pb, está apresentado na coluna 1. O resultado obtido de um indivíduo com deleção combinada dos genes *GSTM1* e *GSTT1* está apresentado na coluna 2. Os resultados obtidos em indivíduos com a presença dos alelos *GSTM1* e *GSTT1* estão apresentados nas colunas 3, 5 e 6 e o obtido em um indivíduo com deleção homocigótica do gene *GSTT1* está apresentado na coluna 4. Os resultados obtidos de indivíduos com deleção homocigótica do gene *GSTM1* estão apresentados nas colunas 7 e 8.

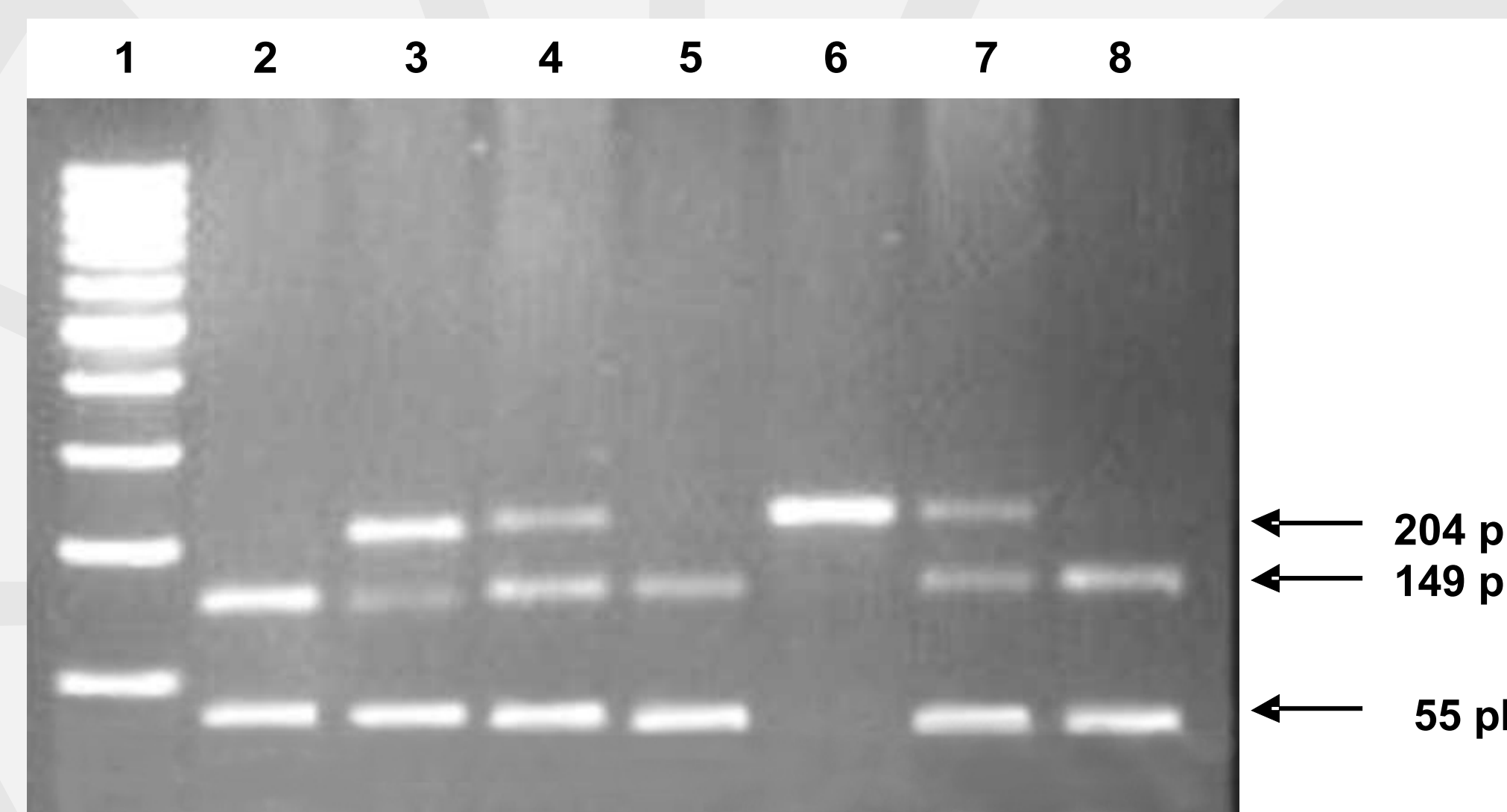


Figura 2. Produtos da amplificação gênica e da digestão enzimática com a enzima *BsrDI* para a identificação dos genótipos do polimorfismo A4889G do gene *CYP1A1*, do sistema do citocromo P450, em gel de agarose 2%. O fragmento de 204 pares de base (pb) corresponde ao alelo variante G e os fragmentos de 149 pb e 55 pb correspondem ao alelo selvagem A. O marcador do tamanho do DNA, ladder 100 pb, está representado na coluna 1. Os resultados obtidos de indivíduos com o genótipo selvagem estão representados nas colunas 2, 5 e 8. Os resultados obtidos em indivíduos com o genótipo heterocigoto AG estão representados nas colunas 3, 4 e 7 e com genótipo variante em homocigose GG na coluna 6.

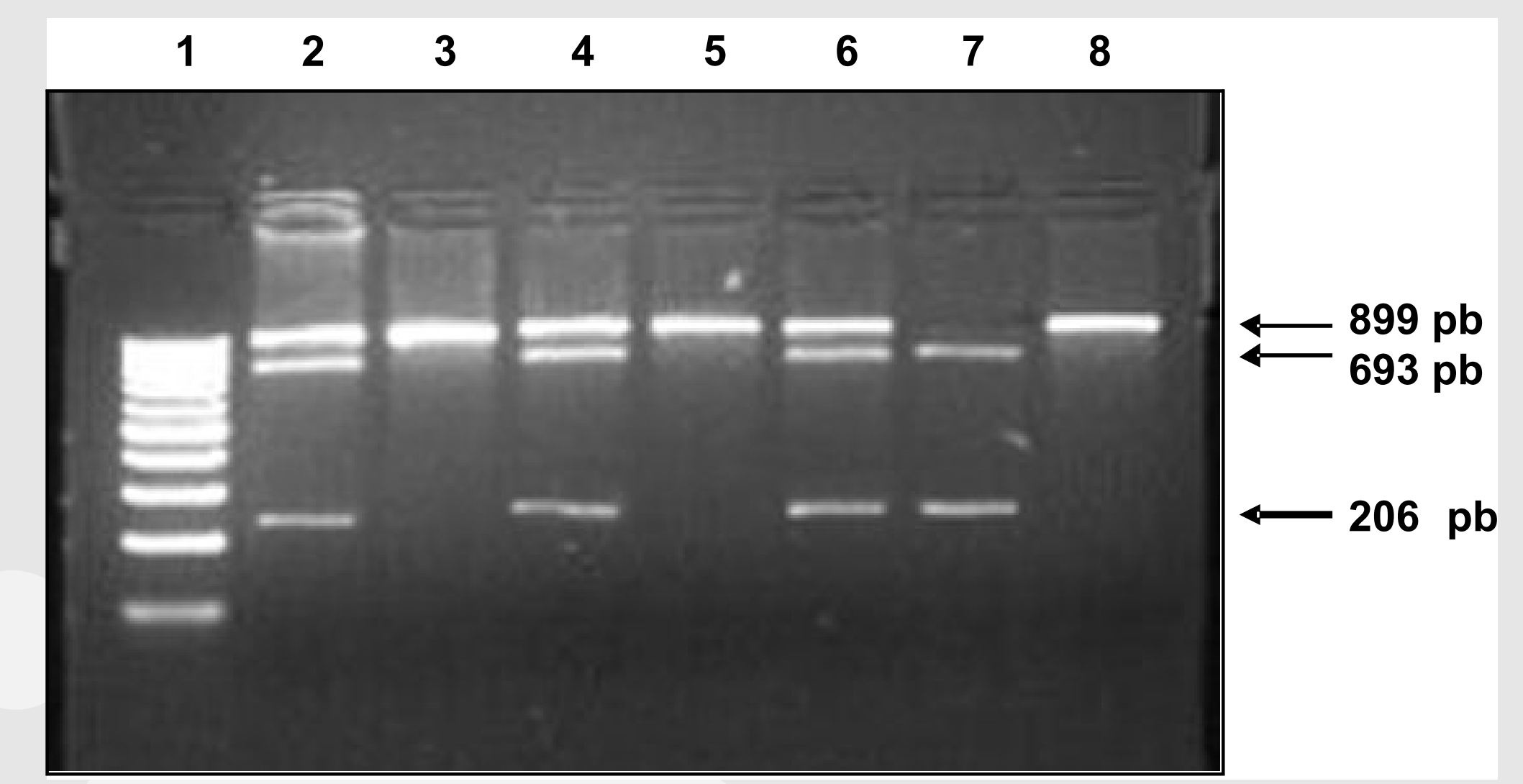


Figura 3. Produtos da amplificação gênica e da digestão enzimática com a enzima *MspI* para a identificação dos genótipos do polimorfismo T6235C do gene *CYP1A1* do sistema do citocromo P450, em pacientes e controles, em gel de agarose 2%. Os fragmentos de 899 pares de base (pb) correspondem ao alelo selvagem T e os fragmentos de 203 e 693 pb correspondem ao alelo polimórfico C. O marcador do tamanho do DNA ladder 100 pb está representado na coluna 1. Indivíduos com o genótipo variante heterocigoto TC estão representados nas colunas 2, 4 e 6. Indivíduos com o genótipo selvagem estão representados nas colunas 3, 5 e 8. Um indivíduo com o genótipo variante CC em homocigose está apresentado na coluna 7.

RESULTADOS

Os controles do estudo avaliados para os polimorfismos A4889G e T6235C do gene *CYP1A1* estiveram no equilíbrio de Hardy-Weinberg ($X^2=0,10$, $P=0,74$ e $X^2=0,24$, $P=0,62$, respectivamente). Em contraste, os pacientes não confirmaram a expectativa de Hardy-Weinberg no lóci A4889G e T6235C do gene *CYP1A1* ($X^2=14,66$; $P=0,005$; $X^2=19,54$; $P=0,0001$). As frequências da deleção homocigótica do *GSTM1*, do *GSTT1* e combinada dos genes em pacientes com CEC de laringe foram similares às observadas em controles. Indivíduos com os genótipos distintos dos genes, isolados e combinados, estiveram sob riscos similares de ocorrência da doença (Tabela 1). Frequências similares dos genótipos do polimorfismo *CYP1A1* A4889G. Indivíduos com os genótipos distintos do gene estiveram sob riscos similares de ocorrência da doença (Tabela 2). A frequência do genótipo selvagem 6235TT do gene *CYP1A1* foi maior em pacientes com CEC de laringe do que em controles. Portadores do genótipo selvagem estiveram sob risco cerca de 2,5 vezes maior de apresentar CEC de laringe do que os portadores do alelo variante C. Frequências similares dos genótipos estudados combinados foram similares entre pacientes e controles (Tabela 2).

Tabela 1: Frequência dos genótipos dos genes *GSTM1* e *GSTT1* em 96 pacientes e 190 controles

	<i>GSTM1</i>		<i>GSTT1</i>		<i>GSTM1/T1</i>		
	Presente n (%)	Deletado n (%)	Presente n (%)	Deletado n (%)	Ambos presentes n (%)	Um deletado n (%)	Ambos deletados n (%)
Casos	49 (57,3)	41 (42,7)	72 (75)	24 (25)	43 (44,8)	41 (42,7)	12 (12,5)
Controles	108 (56,8)	82 (43,2)	158 (83,2)	32 (16,8)	88 (46,3)	88 (46,3)	13 (6,84)
OR (IC 95%)	1,00 (ref)	1,05 (0,60–1,83)	1,00 (ref)	1,45 (0,72–2,90)	1,00 (ref)	0,76 (0,43–1,34)	1,92 (0,73–5,06)
Valor P	0,88		0,30		0,34		

n: número de casos, OR: razão das chances ajustado por idade, sexo e raça

Tabela 2: Frequência dos polimorfismos A4889G e T6235C do gene *CYP1A1* em 96 pacientes e 190 controles

Genótipos	Pacientes n (%)	Controles n (%)	OR (IC 95%)	Valor de P
A4889G				
AA	74 (77,1)	137 (72,1)	1,00 ref	
AG	15 (15,6)	48 (25,3)	0,64 (0,31–1,32)	0,23
GG	7 (7,3)	5 (2,6)	2,23 (0,59–8,37)	0,23
AA + AG	89	184	1,00 ref	
GG	7 (7,3)	5 (2,6)	2,55 (0,70–9,34)	0,16
AA	7 (7,3)	5 (2,6)	1,00 ref	
AG + GG	22 (22,9)	53 (27,9)	0,81 (0,43–1,53)	0,52
T6235C				
TT	72 (75)	118 (62,1)	1,00 ref	
TC	15 (15,6)	62 (32,6)	3,69 (1,71–7,97)	0,0009
CC	9 (9,4)	10 (5,26)	0,79 (0,28–2,24)	0,66
TT + TC	87	180	1,00 ref	
CC	6 (4,2)	5 (3,5)	0,58 (0,21–1,64)	0,3
TT	72 (75)	118 (62,1)	1,00 ref	
TC + CC	24 (25)	72 (37,9)	2,40 (1,27–4,56)	0,007

n: número de casos, OR: razão das chances ajustada por idade, sexo e raça, AA: indivíduos com o genótipo selvagem (A4889G), AG: indivíduos com o genótipo variante (A4889G), GG: indivíduos com o genótipo variante em homocigose (A4889G), TT: indivíduos com o genótipo selvagem (T6235C), TC: indivíduos com o genótipo variante em heterocigose (T6235C), CC: indivíduos com o genótipo variante em homocigose (T6235C).

CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que a deleção homocigótica dos genes *GSTM1* e *GSTT1* e o polimorfismo A4889G do gene *CYP1A1* parecem não influenciar o risco de ocorrência do CEC de laringe em indivíduos de nossa região. Entretanto, o genótipo selvagem do polimorfismo T6235C do gene *CYP1A1* parece aumentar o risco da doença em nossa população. Assim, portadores do genótipo selvagem do gene merecem receber orientações adicionais para evitar a exposição a bebidas alcoólicas e ao tabaco e seguimento clínico para a prevenção ou diagnóstico precoce da doença.

Suporte Financeiro: FAPESP e CNPq

REFERÊNCIAS

- ISMAEL, G. F. V.; SEGALLA, J.G.M.; CORADAZZI, A.L.; PIRES, A.C.B.; BEATO, C.A.M. Tumores da laringe. In: GUIMARÃES, J. L. M.; DORNELLES ROSA, D. Rotinas em Oncologia. Porto Alegre: Artmed, Cap. 20, p. 146-150, 2008.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Instituto Nacional do Câncer, Secretaria de Estado da Saúde, Fundação Oncocentro de São Paulo, Secretaria Municipal de Saúde e Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. Incidência de Câncer no Município de São Paulo, Brasil 1997-1998. Mortalidade de câncer no Município de São Paulo, Brasil. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2006.
- HAYES, J. & PULFORD, D. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 30(6): 445-600, 1995.
- DUELL, E. J.; HOLLY, E. A.; BRACCI, P. M. A population-based, case-control study of polymorphisms in carcinogen-metabolizing genes, smoking, and pancreatic adenocarcinoma Risk. *Journal of the National Cancer Institute*, v.94 (4), p.297-306, 2002.
- VARZIM, G.; MONTEIRO, E.; SILVA, R. A.; FERNANDES, J.; LOPES, C. *CYP1A1* and XRCC1 gene polymorphisms in SCC of the larynx. *European Journal Cancer Prevention*, 12(6):495-499, 2003.
- CASCORBI, I.; BROCKMOLLER, J.; ROOTS, I. A. C4887A polymorphism in exon 7 of human *CYP1A1*: population frequency, mutation linkages, and impact on lung cancer susceptibility. *Cancer Research*, 56: 4965-4969, 1996.
- ARRUDA, V. R.; GRIGNOLLI, C. E.; GONÇALVES, M. S.; SOARES, M. C.; MENEZES, R.; SAAD, S. T. O.; COSTA, F. F. Prevalence of homozygosity for the deleted alleles of glutathione S-transferase mu (*GSTM1*) and theta (*GSTT1*) among distinct ethnic groups from Brazil: relevance to environmental carcinogenesis. *Clinical Genetics*, 54: 210-214, 1998.
- BEIGUELMAN, B. Dinâmica dos Genes nas Famílias e Populações. Ribeirão Preto, Brazilian Journal Genetic, 2.ed. p. 1-472, 1995.