**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**ESTUDO CITOGENÉTICO E MOLECULAR DE
UMA POPULAÇÃO DE ALCOOLISTAS**

Carla Ivane Ganz Vogel

**Ribeirão Preto
2007**

Carla Ivane Ganz Vogel

**ESTUDO CITOGENÉTICO E MOLECULAR DE
UMA POPULAÇÃO DE ALCOOLISTAS**

Orientadora: Profa. Dra. Catarina Satie Takahashi

**Tese apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para a
obtenção do grau de Doutor em
Ciências, área de concentração
Genética.**

Ribeirão Preto

2007

FICHA CATALOGRÁFICA

Vogel, Carla Ivane Ganz

Estudo Citogenético e Molecular de uma População de Alcoolistas,
Ribeirão Preto, 2007.

74p; il. 30cm

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP,
Departamento de Genética

Orientadora: Takahashi, Catarina Satie

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro das seguintes entidades e instituições:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES
- CAPES/PROBRAL/DAAD
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq
- Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência – FAEPA
- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP
- Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

AGRADECIMENTOS

A Deus;

A minha orientadora Professora Catarina Takahashi por ter aceitado me orientar na elaboração deste trabalho e confiado em mim. Seu profissionalismo, dedicação e amor à pesquisa são exemplos para a vida toda;

A minha família que mesmo sem entender muito bem o que eu fazia, nunca deixou de me estimular a seguir em frente e querer mais;

Ao meu namorado que esteve sempre presente nos momentos bons e maus e nunca deixou de me incentivar e ajudar;

Ao professor Erikson Felipe Furtado, que me recebeu com o maior carinho no seu grupo de pesquisa e me abriu oportunidades para meu estágio na Alemanha. Sem seu apoio, carinho, compreensão e conselhos este trabalho não seria possível;

A professora Elza Tiemi pelo carinho e preocupação com minha saúde;

Ao professor Ademilson Espencer que me orientou no programa PAE e sempre esteve disposto a ouvir e aconselhar;

Aos Catarinetes: Raquel, Mônica, Aline, Ana Claudia, Cristiano, Vinicius e Leonardo. Diálogo, respeito e muito bom humor estiveram sempre presentes no nosso grupo;

Aos meus queridos colegas de laboratório: Patrícia, Ana Paula, Carmen, Danilo, Douglas, Paulo, Igor, Danillo, Geovana, Gustavo, Juliana, Flávia.

Aos técnicos Sueli Aparecida Neves (colega!!!!) e Luis Augusto da Costa Junior (sangue bom) pelos serviços técnicos prestados no laboratório e principalmente, pela amizade;

Às técnicas do Hospital das Clínicas, sala 535, Elisabeth e Anália pelo sangue coletado, paciência e disposição para ajudar no meu trabalho;

Aos meus estagiários Gustavo e Vinicius que me ajudaram neste trabalho e me ensinaram a orientar;

Aos participantes do grupo de pesquisa PAI/PAD que sempre me trataram com carinho;

As secretárias do Departamento de Genética Susie, Maria Aparecida e Cleusa pela simpatia e atenção que sempre me deram;

As minhas amigas de RepOur: Maria Antonieta, Maria Fernanda, Maria Laura, Maria Lolita, Maria Rita e Maria Fiori. Por mais que o dia tivesse sido difícil, era uma benção saber que vocês estariam em casa. Foi um privilégio morar com vocês;

Aos colegas que já saíram do laboratório: Cássia, Cleide, Stephano, Marcelo, Sol, Luciana, Gilmara, Marjorie, Renato. O laboratório ficou mais triste sem vocês;

A todos os pacientes e controles pela sua contribuição indispensável para a realização deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1:** Representação esquemática das três vias de metabolização do álcool. **A** – Via nos microsossomos (MEOS), mediada pela enzima CYP2E1; **B** – Via no citosol mediada pela enzima ADH e **C** – via catalase nos peroxissomos. Modificado de: www.benbest.com/health/alcohol.html 2
- FIGURA 2:** Anormalidades hepática, nutricional e metabólica após uso abusivo de etanol. A má nutrição, primária ou secundária, pode ser diferenciada por mudanças metabólicas ou toxicidade direta, resultando parcialmente de mudanças mediadas pela ADH ou de efeitos secundários por indução microsossomal, ou produção de acetaldeído (Retirado de Burim, 2002) 5
- FIGURA 3:** Representação esquemática da influência dos fatores que conferem susceptibilidade no processo de carcinogênese ambiental ou no aparecimento de doenças, iniciando-se com a exposição ambiental, ocupacional, terapêutica ou endógena aliadas ou não ao estilo de vida (hábito tabagista, alcoolismo, drogas e dieta). Os compostos mutagênicos e carcinogênicos presentes interagem com a molécula de DNA, RNA e proteínas e podem causar lesões que, somadas às possíveis alterações em genes críticos (pré-existent ou não), levam ao desenvolvimento de câncer. Sabe-se que toda esta via pode ser influenciada por outras condições tais como etnia, sexo, condições sócio-econômicas, diferentes áreas geográficas, estado de saúde (doenças crônicas, desnutrição) e ainda por polimorfismos genéticos (Retirado de Burim, 2002) 7
- FIGURA 4:** Distribuição da frequência de AC/100 células observadas em controles, alcoolistas abstinentes e crônicos..... 33
- FIGURA 5:** Frequência média de AC/100 células observadas nos grupos alcoolistas em corrente uso de álcool, alcoolistas em abstinência e controles, subdivididos quanto ao hábito tabagista 33
- FIGURA 6:** PCR-RFLP para a detecção do polimorfismo CYP1A1-MspI, onde M= marcador de peso molecular (100 pb) e B= Branco (todos os reagentes exceto DNA). **Colunas 1, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16 e 17** são homozigotos selvagem (m1/m1); **Colunas 5, 7 e 11** são heterozigotos (m1/m2); **Coluna 2** é homozigoto mutante (m2/m2) 35
- FIGURA 7:** PCR-RFLP para a detecção do polimorfismo CYP2D6-BstN1, onde M= marcador de peso molecular (50 pb); **Colunas 1 e 17** = heterozigotos (w/m); **Colunas 2 a 16 e 19**= homozigoto selvagem (w/w); **Coluna 18**= homozigoto mutante (m/m)..... 36
- FIGURA 8:** PCR-RFLP para detecção do polimorfismo CYP2E1-PstI, onde M= marcador de peso molecular (100 pb) e B= branco (todos os reagentes exceto DNA). **Colunas 1, 2, 3, 5, 8, 9 e 10** são homozigotos selvagem (c1/c1); **Colunas 6 e 7** são heterozigotos (c1/c2); **Coluna 4** é homozigoto mutante (c2/c2) 37
- FIGURA 9:** PCR multiplex para detecção de alelos homozigotos nulos das glutathione S-transferase um (GSTM1) e teta (GSTT1), onde M = marcador de peso molecular (100 pb) e B = branco (todos os reagentes exceto o DNA). Os produtos de PCR de 215 e 480 pb correspondem à presença dos genes GSTM1 e GSTT1, respectivamente. O fragmento de 312 pb corresponde ao gene constante CYP1A1, o qual foi usado como controle interno da reação. **Colunas 1, 3, 4, 5, 6, 8, 20 e 11**, genes GSTM1 e GSTT1 presentes; **colunas 2 e 7**, GSTT1 ausente, **coluna 12, 13** GSTM1 ausente..... 38

FIGURA 10: PCR-RFLP para detecção do polimorfismo DRD2-TaqA1, onde M= marcador de peso molecular (100 pb); **Coluna 1**, homozigoto mutante (A1/A1); **Colunas 2, 4, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16** = homozigoto normal (A2/A2); **Colunas 3, 5, 8 e 17** = heterozigoto (A1/A2) 39

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Dados de todos os pacientes e controles dos quais foi realizado o estudo citogenético.....	18
TABELA 2: Caracterização dos pacientes alcoolistas dos quais foi realizado o estudo de polimorfismos.....	25
TABELA 3: Caracterização dos controles nos quais foi realizado o estudo de polimorfismos	27
TABELA 4: Frequência de AC e IM em linfócitos de sangue periférico do grupo controle e dos alcoolistas.....	32
TABELA 5: Média dos valores do IM e frequência de AC/100 células de cada um dos grupos de estudo, subdivididos em fumantes e não-fumantes.....	33
TABELA 6: Média dos valores de IM e frequência de AC/100 células, observadas em linfócitos de sangue periférico de alcoolistas de acordo com a quantidade de álcool ingerida ao dia	34
TABELA 7: Média dos valores de IM e frequência de AC/100 células, observadas em linfócitos de sangue periférico de alcoolistas de acordo com o tempo de consumo de bebidas alcoólicas.....	34
TABELA 8: Distribuição dos genótipos <i>CYP1A1</i> , <i>CYP2D6</i> , <i>CYP2E1</i> , <i>GSTM1</i> , <i>GSTT1</i> e <i>DRD2</i> em alcoolistas e indivíduos controle.....	43
TABELA 9: Distribuição das frequências dos polimorfismos dos genes CYP1A1 , CYP2D6 , CYP2E1 , GSTM1 e GSTT1 nos diferentes grupos de alcoolistas e indivíduos controles	44
TABELA 10: Distribuição e frequência dos genótipos <i>CYP1A1</i> entre os grupos de alcoolistas e controles e entre os grupos de alcoolistas	45
Tabela 11: Distribuição e frequência dos genótipos <i>CYP2D6</i> entre os grupos de alcoolistas e controles e entre os grupos de alcoolistas	46
TABELA 12: Distribuição e frequência dos genótipos <i>CYP2E1</i> entre os grupos de alcoolistas e controles e entre os grupos de alcoolistas	47
Tabela 13: Distribuição e comparação das frequências dos genótipos <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> entre os grupos de alcoolistas e controles e entre os grupos de alcoolistas	49
Tabela 14 Distribuição dos grupos de alcoolistas em relação aos genes <i>CYP1A1</i> (polimorfismo <i>MspI</i>), <i>CYP2D6</i> (polimorfismo <i>BstNI</i>) de acordo com o hábito tabagista	50
TABELA 15: Distribuição dos grupos de alcoolistas em relação aos genes <i>CYP2E1</i> (polimorfismo <i>PstI</i>), <i>GSTM1</i> , <i>GSTT1</i> e <i>DRD2</i> (polimorfismo <i>TaqA1</i>) de acordo com o hábito tabagista	51

TABELA 16: Frequências dos alelos selvagens e mutantes para os genes CYP2D6 (polimorfismo BstN1), CYP2E1 (polimorfismo PstI) e CYP1A1 nos diferentes grupos de alcoolistas e controles.....	52
TABELA 17: Distribuição dos genótipos para DRD2 em relação à continuidade do consumo de álcool.....	52
TABELA 18: Distribuição dos genótipos DRD2 (polimorfismo TaqA1) nos alcoolistas em relação à idade de início do consumo de álcool e ao tempo de consumo de álcool..	52
TABELA 19 : Distribuição dos genótipos CYP1A1, CYP2D6, CYP2E1, GSTM1 e GSTT1 e da frequência de micronúcleo nos alcoolistas e controles	53
Tabela 20: Distribuição e comparação dos genótipos CYP1A1, CYP2D6, CYP2E1, GSTM1 e GSTT1 em relação à média de células com micronúcleo (MN) analisadas	54

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Considerações gerais a respeito do álcool.....	1
1.2. O metabolismo do álcool.....	1
1.3. O efeito do álcool no fígado e no pâncreas	3
1.4. Aberrações cromossômicas como biomarcadores da toxicidade do álcool.....	5
1.5. Variabilidade inter-individual e metabolismo de xenobióticos	6
1.5.1. ENZIMAS METABOLIZADORAS DA FASE I	8
Polimorfismo CYP1A1-Msp I	8
Polimorfismo CYP2D6-BstN1	8
Polimorfismo CYP2E1-Pst I	9
1.5.2. ENZIMAS METABOLIZADORAS DA FASE II	10
Polimorfismos da glutathione S-transferase M1	10
Polimorfismos da glutathione S-transferase T1	11
1.6. Neurotransmissores e álcool.....	11
Polimorfismo DRD2-TaqIA1	12
2. OBJETIVOS	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1. INDIVÍDUOS	14
3.2. ESTUDO DE BIOMONITORAMENTO CITOGENÉTICO	14
3.2.1. INDIVÍDUOS PARA O ESTUDO DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS	14
3.2.2. CULTURA DE LINFÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO HUMANO ..	15
3.2.3. PREPARAÇÕES CROMOSSÔMICAS	15
3.2.4. COLORAÇÃO DO MATERIAL	16
3.2.5. ANÁLISE DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS	16
3.2.6. PREPARAÇÕES PARA O TESTE DO MICRONÚCLEO (MN)	16
3.2.7. CRITÉRIOS DE ANÁLISE DO MICRONÚCLEO	17
3.2.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	17

3.3. ESTUDO DE POLIMORFISMOS	19
3.3.1. INDIVÍDUOS	19
3.3.2. Extração de DNA de sangue periférico.....	19
3.3.3. Detecção dos polimorfismos	19
3.3.3.1. Reação para obtenção do polimorfismo CYP1A1 - MspI	19
3.3.3.2. Reação para obtenção do polimorfismo CYP2D6 - BstN1	20
3.3.3.3. Reação para obtenção do polimorfismo CYP2E1 – PstI ...	21
3.3.3.4. Reação Multiplex para obtenção dos polimorfismos das enzimas GSTM1 e GSTT1	22
3.3.3.5. Reação para obtenção do polimorfismo DRD2 – TaqA1	23
3.3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS POLIMORFISMOS.....	24
4. RESULTADOS	30
4.1. ANÁLISE DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS	30
4.2. ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS DAS ENZIMAS METABOLIZADORAS DE XENOBIÓTICOS	35
4.2.1. Detecção dos diferentes polimorfismos estudados.....	35
4.2.2. Distribuição dos genótipos GSTM1, GSTT1, CYP1A1, CYP2D6, CYP2E1 e DRD2 em alcoolistas crônicos e controles.....	40
5. DISCUSSÃO.....	55
5.1. ANÁLISE DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS	55
5.2. ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS.....	57
6. CONCLUSÕES	65
7. RESUMO.....	67
8. ABSTRACT.....	68
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

ANEXOS

Anexo A - Termo de consentimento pós-informação
Anexo B - Questionário de coleta de dados
Anexo C - Ofício de aprovação do projeto no comitê de ética
Anexo D - Trabalho realizado no doutorado sanduíche.....

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações gerais a respeito do álcool

O alcoolismo é uma doença multifatorial que consiste numa interação de influências poligênicas (genéticas) e ambientais (Ratsma, 2002).

O uso contínuo e abusivo de bebidas alcoólicas tem crescido no mundo todo, inclusive no Brasil. Cerca de 30% das internações hospitalares ocorrem devido ao consumo excessivo de álcool. O alcoolismo é uma doença que não tem restrições à classe social nem idade de início do hábito de beber. O abuso de álcool leva a uma variedade de problemas de saúde incluindo cirrose hepática, pancreatite aguda e crônica, doenças cardiovasculares e disfunções fisiológicas e neurológicas (Maffei *et al.* 2002).

Segundo relatório da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2004) o consumo de álcool nos últimos vinte anos tem diminuído nos países desenvolvidos e aumentado nos países em desenvolvimento. O álcool contribuiu em 4% dos óbitos provocados por doenças em 2000, enquanto substâncias ilícitas contribuíram com 0,8% (WHO, 2004).

Um estudo de levantamento de uso de drogas psicotrópicas no Brasil avaliou o perfil de amostra de populações das 107 maiores cidades brasileiras. Aproximadamente 68,7% da população, nessas cidades, já consumiram álcool em algum momento da vida, sendo que 11,2% das pessoas que usam álcool regularmente são dependentes. Além disso, o consumo regular de álcool pelo sexo masculino é cinco vezes maior do que pelo feminino, sendo que o número de indivíduos dependentes masculinos é três vezes maior (Carlini *et al.* 2001).

1.2. O metabolismo do álcool

O álcool é metabolizado por várias reações diferentes no fígado, a maioria das quais envolve reações de oxidação/redução (Cunningham e Van Horn, 2003). A oxidação do álcool pode ser realizada por meio de três caminhos distintos nos hepatócitos: via desidrogenase alcoólica, que ocorre no citoplasma celular; via sistema microsomal de

oxidação do álcool (MEOS) no retículo endoplasmático; ou via catalase nos peroxissomos (Zima, 1993) (FIGURA 1).

FIGURA 1: Representação esquemática das três vias de metabolização do álcool. **A** – Via nos microsossomos (MEOS), mediada pela enzima CYP2E1; **B** – Via no citosol mediada pela enzima ADH e **C** – via catalase nos peroxissomos. Modificado de: www.benbest.com/health/alcohol.html

Em indivíduos cujo consumo de álcool ocorre em um nível moderado e/ou ocasional, grande parte do álcool ingerido é quebrado pela enzima álcool desidrogenase (ADH). Esta enzima converte o álcool em acetaldeído, altamente tóxico e reativo. Durante esta reação, um próton de hidrogênio (H^+) é removido do álcool e transferido para uma molécula chamada NAD, que por sua vez, é reduzida a NADH. A NADH participa de várias outras reações metabólicas passando o H para outros compostos e o excesso de NADH na célula tem efeitos danosos em outras células. Subseqüentemente, o acetaldeído é convertido em acetato por uma segunda enzima, a aldeído desidrogenase (ALDH) (Cunningham e Van Horn, 2003).

O MEOS representa um papel importante no metabolismo do álcool, particularmente quando os níveis de consumo são elevados. A principal componente do MEOS é a enzima citocromo P450, que, como a ADH, converte o álcool em acetaldeído. Esta reação libera um oxigênio e uma molécula reduzida, a NADPH que resulta na formação de NADP e água (Lieber, 2003). Como bioprodutos destas reações, que são altamente reativas, moléculas contendo oxigênio, chamadas de radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (ROS) são geradas. Estas ROS contribuem para danos no fígado através de uma variedade de mecanismos (Wu e Cederbaum, 2003).

Apesar da taxa na qual a ADH quebra o álcool geralmente permanecer a mesma, a atividade do MEOS pode ser aumentada (induzida) pelo consumo de álcool (Lieber, 2003).

1.3. O efeito do álcool no fígado e no pâncreas

Após a ingestão de álcool somente 2 a 10% do total absorvido é eliminado pelos rins, o restante é oxidado, principalmente no fígado (Lieber, 1997). O etanol é capaz de provocar mudanças notáveis no fígado, e estes efeitos estão relacionados ao metabolismo do etanol (FIGURA 2).

Os tipos mais comuns de doença alcoólica de fígado (Alcoholic Liver Disease – ALD) são o aumento de gordura no fígado, a hepatite alcoólica e a cirrose. Frequentemente, as doenças progridem no indivíduo nessa ordem, mas podem ocorrer simultaneamente (Mann *et al.* 2003; Kirsh *et al.* 1995). Evidências sugerem que a ALD pode ser desenvolvida devido a alterações que o álcool provoca no ambiente celular do fígado, iniciando interações anormais entre as células hepáticas (Cunningham e Van Horn, 2003).

Aproximadamente 20% dos alcoolistas desenvolvem cirrose hepática. Na cirrose ocorre uma interrupção do fluxo sanguíneo normal no fígado devido ao aparecimento de fibrose nos tecidos hepáticos (Mann *et al.* 2003). A icterícia e a hepatomegalia estão entre os primeiros sintomas físicos da cirrose (Lieber, 2001). O avanço da doença provoca a diminuição e endurecimento do fígado, deixando-o com consistência nodular.

Graus variados de ascite podem ser encontrados em pacientes com cirrose avançada (Marsano *et al.* 2003).

A pancreatite é uma doença que envolve fibrose, atrofia e desaparecimento do parênquima do pâncreas. A pancreatite crônica pode ter várias causas, mas a mais comum nos países ocidentais é o consumo pesado de bebidas alcoólicas (Lowenfels e Maisonneuve, 2006). Porém, como no caso da cirrose, nem todos os alcoolistas pesados desenvolvem pancreatite crônica: <1% no Japão e 5% nos Estados Unidos (Drelling e Koller, 1985).

No Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, uma pesquisa realizada em 1997 (Cunha *et al.* 1997) concluiu que o alcoolismo foi responsável por 93,4% dos casos de pancreatite. As causas restantes foram fatores hereditários (0,7%), deficiências nutricionais (0,5%), alterações metabólicas (0,5%) e obstrução do fluxo pancreático (0,3%).

Outro fator de risco adicional para o desenvolvimento de pancreatite crônica nos alcoolistas é o consumo de tabaco, que pode acelerar o processo inflamatório da pancreatite contribuindo para um futuro desenvolvimento de câncer pancreático (Maisonneuve *et al.* 2006).

FIGURA 2: Anormalidades hepática, nutricional e metabólica após uso abusivo de etanol. A má nutrição, primária ou secundária, pode ser diferenciada por mudanças metabólicas ou toxicidade direta, resultando parcialmente de mudanças mediadas pela ADH ou de efeitos secundários por indução microsossomal, ou produção de acetaldeído (Retirado de Burim, 2002).

1.4. Aberrações cromossômicas como biomarcadores da toxicidade do álcool

Aberrações cromossômicas (AC) são mudanças na estrutura e/ou número dos cromossomos, podendo ocorrer espontaneamente ou induzidas por tratamentos com compostos químicos ou radiações (Mateuca *et al.* 2006). Dependendo do critério morfológico podem ser classificadas em duas classes principais: modificações que acontecem nas duas cromátides de um ou vários cromossomos ou aberrações que envolvem apenas uma das duas cromátides.

Estudos a respeito de biomonitoramento citogenético humano em células somáticas têm sido realizados desde 1970 para avaliação de efeitos genotóxicos de

exposição a agentes nocivos (Norpa *et al.* 2006; Boffetta *et al.* 2006; Norpa, 2004; Maffei *et al.* 2002). A análise de AC vem sendo usada como uma importante ferramenta para a avaliação dos efeitos mutagênicos do álcool (Burim *et al.* 2004; Maffei *et al.* 2002).

Alguns estudos reportam uma diminuição na frequência de AC em alcoolistas em abstinência (Obe *et al.* 1980). No entanto, estudos mais recentes mostram não haver diferenças na frequência de AC entre alcoolistas em uso corrente de bebida alcoólica e alcoolistas abstinentes (Burim *et al.* 2004; Maffei *et al.* 2002). Em nosso estudo os indivíduos que interromperam o consumo de bebidas alcoólicas há mais de um ano foram considerados abstinentes.

A permanência de AC em alcoolistas em abstinência pode levar a um risco maior no desenvolvimento de câncer. Portanto, nossa hipótese é de que o monitoramento genético de alcoolistas pesados usando aberrações cromossômicas como biomarcador pode fornecer dados sobre os possíveis riscos de danos à saúde devido à toxicidade do álcool.

1.5. Variabilidade inter-individual e metabolismo de xenobióticos

O objetivo da genômica ambiental é entender como a variabilidade genética influencia nas respostas individuais a efeitos ambientais, baseando-se em que genótipos de alto risco acumulam maiores danos e representam um grande risco para o desenvolvimento de doenças (Miller, 2001).

O homem está exposto a mais de 70.000 compostos químicos incluindo drogas, aditivos alimentares, herbicidas, pesticidas e agentes industriais (Schoket *et al.* 2001). Estes compostos podem desencadear eventos que são caminhos diretos ou indiretos para o surgimento de várias doenças (Bonassi e Au, 2002) (FIGURA 3).

A variabilidade inter-individual no metabolismo de xenobióticos e resposta a drogas é extensa. O nível de droga no plasma pode variar até mil vezes entre dois indivíduos com o mesmo peso, tendo ingerido a mesma quantidade de uma mesma droga (Ingelman-Sundberg, 2001).

Geralmente os carcinógenos são oxidados para intermediários reativos pelas enzimas da fase I (ativadoras) enquanto as enzimas da fase II (detoxificadoras) geralmente mediam a conjugação de moléculas hidrossolúveis a esses intermediários, tornando-os menos reativos (Miller *et al.* 2001).

FIGURA 3: Representação esquemática da influência dos fatores que conferem susceptibilidade no processo de carcinogênese ambiental ou no aparecimento de doenças, iniciando-se com a exposição ambiental, ocupacional, terapêutica ou endógena aliadas ou não ao estilo de vida (hábito tabagista, alcoholismo, drogas e dieta). Os compostos mutagênicos e carcinogênicos presentes interagem com a molécula de DNA, RNA e proteínas e podem causar lesões que, somadas às possíveis alterações em genes críticos (pré-existent ou não), levam ao desenvolvimento de câncer. Sabe-se que toda esta via pode ser influenciada por outras condições tais como etnia, sexo, condições sócio-econômicas, diferentes áreas geográficas, estado de saúde (doenças crônicas, desnutrição) e ainda por polimorfismos genéticos (Retirado de Burim, 2002).

1.5.1. ENZIMAS METABOLIZADORAS DA FASE I

A superfamília de enzimas citocromo P450 (CYP) catalisa um dos primeiros passos do metabolismo de carcinógenos, como os PAHs, nitroaromáticos e arilaminas (Wenzlaff *et al.* 2005). Existem aproximadamente 58 genes que codificam para enzimas CYP (Ingelman-Sundberg, 2001). A maioria dos genes CYP são polimórficos, apenas os genes CYP1A1 e CYP2E1 são relativamente bem conservados. Devido a sua importância no metabolismo de xenobióticos, três enzimas da família P450 foram escolhidas para este estudo: CYP1A1, CYP2D6 e CYP2E1.

Polimorfismo CYP1A1-Msp I

Em humanos o gene *CYP1A1* está localizado no cromossomo 15 região 15q22-q24. O gene para esta enzima contém dois sítios polimórficos associados com alguns tipos de câncer, como os de pulmão e mama. Um na região de ligação heme do éxon 7, transição de A para G e outro, usado neste estudo, na região flangeadora 3', conhecido como mutação Msp I (alelo CYP1A1*2), que corresponde a uma transição de T para C (Smith *et al.* 2001).

A função exata da enzima CYP1A1 ainda permanece desconhecida, mas acredita-se que devido a importância do receptor Ah no ciclo celular, CYP1A1 pode representar um papel de mediador em alguns tipos celulares (Ingelman-Sundberg, 2001).

A expressão CYP1A1 pode ser induzida pela exposição a PAHs (Goth-Goldstein *et al.* 2000). Além disso, o polimorfismo CYP1A1*2 foi associado à cirrose hepática em alcoolistas em recente estudo em nosso laboratório (Burim *et al.* 2004).

Polimorfismo CYP2D6-BstN1

A enzima CYP2D6 (debrisoquina hidroxilase) é a mais polimórfica dentre as CYPs, podendo apresentar mais de 80 variações (Bogni *et al.* 2005). No homem esta enzima está localizada no cromossomo 22, região 22q13.1. Esta enzima está envolvida no metabolismo de muitas drogas, principalmente nos hepatócitos (Komura e Ivaki, 2005).

Aproximadamente 5-10% dos caucasianos possuem mutações que inativam ambos os alelos do gene *CYP2D6* e por isso são conhecidos como metabolizadores pobres. De acordo com a taxa de metabolização da enzima, os fenótipos podem ser definidos, além de pobres, em extensivos e ultrarápidos (Lovlie *et al.* 2001). A mutação mais freqüente é a transição no sítio de "splice" G1934A (alelo *CYP2D6**4) que ocasiona a formação de uma proteína truncada (Lemos *et al.* 1999).

As variações da enzima *CYP2D6* em produzir metabolizadores normais ou pobres estão associadas com a variabilidade inter-individual no metabolismo de drogas e com o risco maior de desenvolvimento de câncer (Lemos *et al.* 1999). Um estudo sugeriu a participação desta enzima como a mais importante dentre as enzimas da família do citocromo P450 no metabolismo da nicotina (Cashman *et al.* 1992). Porém, estudo posterior não a considerou de fundamental importância no metabolismo da nicotina e sim uma influência na disposição à nicotina (Caporaso *et al.* 2001). Polimorfismos do *CYP2D6* também podem predispor ou não ao uso de drogas (Ingelman-Sundberg, 2001). Por exemplo, a forma inativa (homozigose do alelo mutado) pode resultar numa inabilidade para transformar o opioide em seus metabólitos ativos, impedindo, desta forma, um reforço da droga, funcionando como um genótipo protetor (Vanyukov *et al.*, 2003).

Polimorfismo *CYP2E1*-Pst I

O gene *CYP2E1* está localizado no braço longo do cromossomo 10, região 10q24.3 (Rossini *et al.* 2006). A mutação c2, localizada numa região de regulação da transcrição do gene causa um aumento na atividade enzimática de *CYP2E1* (Verlaan *et al.* 2004).

A oxidação do álcool pela enzima *CYP2E1* é cerca de dez vezes maior em alcoolistas crônicos (Verlaan *et al.*, 2004). Esta indução de *CYP2E1* pelo álcool também aumenta a taxa de conversão de vários xenobióticos, incluindo pró-carcinógenos (como nitrosaminas, aflatoxinas, PAHs) em seus carcinógenos finais (Pöschl e Seitz, 2004). A nicotina e outras substâncias encontradas na fumaça do cigarro também podem induzir a transcrição de *CYP2E1* (Schoedel e Tyndale, 2003).

Essa enzima também metaboliza drogas clinicamente importantes (como halotano, acetaminofeno), além de provavelmente estar envolvida no mecanismo de gluconeogênese (Schoedel e Tyndale, 2003).

1.5.2. ENZIMAS METABOLIZADORAS DA FASE II

Enzimas da fase II podem detoxificar muitos carcinógenos, tais como os presentes no cigarro e seus metabólitos e proteger o DNA de danos incluindo a formação de aductos (Ford *et al.* 2000).

A família de genes glutational S-transferase (GST) pode ser encontrada em pelo menos quatro classes principais em humanos: alfa (α), mu (μ), pi (π) e teta (θ) (Mitrinen *et al.* 2001; Ford *et al.* 2000), além de outras variantes (kappa (κ) e sigma (ξ) (Jain *et al.*, 2006). Esta classificação é de acordo com a especificidade do substrato, afinidade química, estrutura, sequência de aminoácidos e comportamento cinético da enzima (Landi, 2000). As enzimas GST são consideradas enzimas-chave da fase II do metabolismo de xenobióticos participando de processos críticos na proteção de produtos do estresse oxidativo e eletrófilos (Autrup, 2000).

A expressão de GST é alterada em alcoolistas crônicos com doença de fígado (Brind *et al.* 2004). Duas enzimas GST foram escolhidas para nosso estudo, as Glutational S-transferase M1 (GSTM1) e T1 (GSTT1).

Polimorfismos da glutational S-transferase M1

A glutational S-transferase M1 (GSTM1), uma enzima de classe GST μ , tem um papel importante na detoxificação de carcinógenos, como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs) presentes no cigarro (Ford *et al.* 2000). O gene para esta enzima está localizado no cromossomo 1, na região 1p13.3 (Acar *et al.* 2006).

O gene que codifica a isoforma GSTM1 é polimórfico e tem quatro alelos variantes GSTM1*A, GSTM1*B, GSTM1*C e GSTM1*O.

A deficiência na função da enzima GSTM1 é atribuída à deleção em homozigose do gene *GSTM1* (genótipo nulo) e tem sido associado com o aumento de risco de câncer,

como os de pulmão, colo-retal e urotelial (Hou *et al.* 2001). Indivíduos com ambos os genótipos GSTM1 ou GSTT1 nulos apresentam aumento da sensibilidade dos efeitos citogenéticos de várias genotoxinas (Tuimala *et al.* 2002).

Polimorfismos da glutathione S-transferase T1

O gene para a enzima GSTT1 está localizado no cromossomo 22 região 22q11. 2. O genótipo homozigoto para o alelo nulo é definido como GSTT1-0 enquanto os indivíduos que possuem pelo menos um alelo funcional têm sido classificados como GSTT1-1 (Capoluongo *et al.* 2007). O genótipo nulo para o gene *GSTT1* é encontrado na população caucasiana na frequência de 13 a 26% (Casso *et al.* 2006).

Assim como a enzima GSTM1, esta enzima da classe theta (θ) também tem um papel importante na detoxificação de carcinógenos. A GSTT1 metaboliza carcinógenos presentes na fumaça do cigarro (Jain *et al.* 2006). Vários estudos relatam a associação entre o genótipo nulo GSTT1 e aumento de risco de câncer de pele, pulmão, estômago, intestino, próstata, colo-retal e mama (Jain *et al.* 2006; Norppa, 2004; Park *et al.* 2000). Porém, esses dados são conflitantes com outros estudos em que estas associações não foram encontradas (Covolo *et al.* 2005; Ladero *et al.* 2005; Norppa, 2004).

1.6. Neurotransmissores e álcool

Pesquisas envolvendo estudos de famílias, gêmeos e adoções têm mostrado que fatores genéticos possuem um papel importante na etiologia do alcoolismo. Há evidência que o álcool estimula os sistemas de recompensa do cérebro em parte através da ação no sistema nervoso dopaminérgico ventral. Tais achados neurobiológicos levantaram a questão da possibilidade da estrutura ou expressão de genes da neurotransmissão dopaminérgica poderiam contribuir para a vulnerabilidade ao alcoolismo (Kono *et al.* 1997).

O sistema dopaminérgico parece ser o maior componente nos mecanismos da variação do uso abusivo de substâncias. O uso de substâncias psicoativas estimula os

neurônios dopaminérgicos e os efeitos de “recompensa” estão associados com a liberação de dopamina (Noble, 2000).

A função da dopamina é mediada por dois grupos de receptores de dopamina, os da família D1 (receptores DRD1 e DRD5) e os da família D2 (DRD2, DRD3 e DRD4). Ambas as famílias funcionam acoplando-se a proteínas G e estimulando (família D1) ou inibindo (família D2) a adenil ciclase (Vanyukov e Tarter, 2000). Vários estudos têm mostrado que o alelo A1 gene receptor de dopamina 2 (DRD2) é um dos maiores envolvidos nas disfunções neurológicas que levam a um uso abusivo do álcool (Foley *et al.* 2005; Noble, 2003) o que o torna importante para nossa pesquisa.

Polimorfismo DRD2-TaqlA1

Em 1990, Blum e colaboradores descobriram uma associação do alelo A1 do gene DRD2 e alcoolismo (Ponce *et al.* 2003). Essa mutação, reconhecida pela enzima de restrição Taql α , está presente da região 3' do gene, não codificadora, e gera uma proteína de tamanho menor do que a codificada pelo alelo selvagem (A2) (Noble, 2003). A presença do alelo TaqA1 tem sido associada com uma reduzida afinidade do receptor (DRD2) em se ligar à dopamina (Bowirrat e Oscar-Berman, 2005). A ingestão de álcool libera dopamina no estriato ventral do cérebro sugerindo que indivíduos portadores do alelo TaqA1 possuem um excesso de dopamina intracelular após estímulos, como os provocados pelo álcool (Bowirrat e Oscar-Berman, 2005).

O gene DRD2 não tem sido associado apenas ao uso pesado de álcool (Ponce *et al.*, 2003), dependência alcoólica (Berggren *et al.* 2006) ou início precoce de abuso de álcool (Kono *et al.*, 1997), mas também a outros usos abusivos de substâncias (Conner *et al.*, 2005). No entanto, apesar desses e vários estudos terem encontrado associações positivas entre este polimorfismo e mau uso de substâncias, vários resultados negativos foram encontrados (Szczepankiewicz *et al.*, 2006; Samochowiec *et al.*, 2006).

2. OBJETIVOS

Devido a grande freqüência do alcoolismo na nossa sociedade, estudos que consigam identificar genótipos de susceptibilidade a um risco maior de desenvolver doenças ocasionadas pelo alto consumo de bebidas alcoólicas, bem como avaliar as alterações cromossômicas provocadas por esse consumo, são de fundamental importância. Esses estudos podem auxiliar na prevenção de doenças secundárias ao alcoolismo, bem como auxiliar no tratamento do próprio alcoolismo.

Baseando-se nesses fatos, os objetivos deste trabalho foram:

- Avaliar as freqüências de aberrações cromossômicas (AC) e os valores de índice mitótico (IM) em alcoolistas crônicos e indivíduos controles (não alcoolistas) por meio de análise citogenética convencional;
- Obter a freqüência genotípica dos indivíduos portadores dos genes GSTM1, GSTT1, CYP1A1, CYP2E1 e CYP2D6 (responsáveis pelo metabolismo de xenobióticos) em três grupos de alcoolistas: sem evidência clínica de doenças no fígado e pâncreas, com doenças no fígado e com pancreatite alcoólica; e no grupo controle;
- Obter a freqüência genotípica dos indivíduos portadores do gene DRD2 (receptor de dopamina) no grupo de alcoolistas e controles.
- Comparar os dados com os resultados obtidos em estudo paralelo com alcoolistas utilizando a técnica de micronúcleo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. INDIVÍDUOS

Os alcoolistas e controles participantes deste estudo foram informados dos objetivos do trabalho, e após darem o consentimento para sua participação na pesquisa (ANEXO I) responderam aos questionários para coleta de informações. Os questionários podem ser encontrados no ANEXO II. Este estudo foi aprovado pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) processo HCRP nº 3253/2003 – ANEXO III).

O grupo de alcoolistas consistiu em indivíduos que estão em tratamento na Divisão de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, e de indivíduos que freqüentam o Grupo de Alcoólicos Anônimos (AA) “Unidos Venceremos” da cidade de Ribeirão Preto.

O consumo diário de bebidas alcoólicas foi classificado em leve (relativo ao consumo de <40g de etanol/dia), moderado (40-60g de etanol/dia), e pesado (>60g etanol/dia), de acordo com a Divisão de Gastroenterologia - HCRP-FMRP-USP e com Muller (1999). Todos os alcoolistas participantes desse estudo foram classificados como consumidores pesados (>60g etanol/dia), de acordo com as informações obtidas dos registros médicos. Todos os pacientes foram testados quanto à presença de infecções hepáticas virais, e quando a presença dos vírus dos tipos B e C foi detectada este paciente foi excluído da amostra.

As amostras dos indivíduos controles foram obtidas de voluntários e funcionários da FMRP-USP.

3.2. ESTUDO DE BIOMONITORAMENTO CITOGENÉTICO

3.2.1. INDIVÍDUOS PARA O ESTUDO DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS

Para a análise das aberrações cromossômicas e índice mitótico foram estudados 25 alcoolistas crônicos com doenças no fígado (10 fumantes e 11 não-fumantes), um

alcoolista crônico sem doença evidente no fígado (fumante) e 22 indivíduos controles saudáveis (3 fumantes e 19 não-fumantes). A amostra estudada compreendeu 23 pacientes do sexo masculino e 3 do sexo feminino, com idades entre 28 e 75 anos (média das idades, 51,6). A população controle (n = 22) foi composta de 17 indivíduos do sexo masculino e 5 do sexo feminino, não-alcoolistas, com idades entre 23 e 58 anos (média das idades, 39,9 anos).

3.2.2. CULTURA DE LINFÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO HUMANO

As amostras de sangue foram obtidas por punção venosa utilizando tubos vacutainer contendo heparina. As culturas de linfócitos foram preparadas utilizando-se 10 gotas de sangue total, 80% de meio RPMI 1640 (Sigma), suplementados com estreptomicina (Sigma 0,01mg/ml) e penicilina (Sigma 0,005mg/ml), 20% de soro bovino fetal (Gibco) e 0,1% de fitohemaglutinina (Gibco). As culturas foram incubadas a 37°C por 48 horas para a análise das aberrações cromossômicas e do índice mitótico (IM).

3.2.3. PREPARAÇÕES CROMOSSÔMICAS

As preparações metafásicas foram efetuadas pelo método de Moorhead *et al.* 1960 com algumas modificações, descrito a seguir.

Aproximadamente 1:30h antes da colheita foi adicionado colchicina a 0,4µg/ml para a obtenção das células em metáfase. Em seguida as culturas de linfócitos foram centrifugadas a 800 rpm por 5 minutos. Após, foi desprezado o sobrenadante e adicionado 10 ml de solução hipotônica (KCl 0,075M) a 37°C, homogeneizando delicadamente com o uso de uma pipeta "Pasteur" até atingir o tempo de 5 minutos, logo em seguida o material foi centrifugado.

A seguir desprezou-se o sobrenadante e as células receberam 5 ml de fixador (metanol/ácido acético) na proporção de 3:1, sendo este trocado por mais duas vezes.

Para a limpeza das lâminas, as mesmas foram lavadas com água e detergente, enxaguadas em água corrente por pelo menos 2 horas e transferidas para água destilada

gelada e utilizadas em seguida. Cada preparação cromossômica foi feita gotejando-se a suspensão de células sobre a lâmina previamente imersa em água gelada. As lâminas passaram rapidamente sobre a chama de uma lamparina e secas ao ar. Todas as lâminas foram codificadas por uma terceira pessoa para evitar tendenciosidade na análise.

3.2.4. COLORAÇÃO DO MATERIAL

A coloração das lâminas para a análise de AC foi processada com o corante Giemsa diluído em uma solução tampão (Na_2HPO_4 e KH_2PO_4 a 0,06M e pH 6,8) na proporção de 1 ml de corante para 30 ml de tampão, por um período de 5 minutos.

3.2.5. ANÁLISE DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS

As aberrações cromossômicas foram classificadas de acordo com Swierenga *et al.* (1991). A análise das lâminas foi feita em microscópio óptico de luz por transmissão, com a finalidade de detectar alterações cromossômicas estruturais nos diferentes grupos de indivíduos. Os cromossomos foram analisados com a objetiva de imersão (100x) em teste cego para se evitar tendenciosidade na interpretação dos resultados, observando-se alterações no grau de ploidia e aberrações estruturais, tais como as lesões acromáticas ("gaps"), as quebras cromatídicas e isocromatídicas, as "interchanges" complexas, anéis, trirradiais, quadrirradiais e outras alterações. Foram analisadas cerca de 100 metáfases por indivíduo, de acordo com o crescimento celular das preparações.

O IM foi determinado pela contagem do número de metáfases em 1000 células/cultura.

A TABELA 1 apresenta os códigos e dados de todos os indivíduos utilizados no estudo citogenético de ACs.

3.2.6. PREPARAÇÕES PARA O TESTE DO MICRONÚCLEO (MN)

A preparação para o teste do MN foi efetuada pelo método descrito por Fenech (1993), com algumas modificações. Após 44 horas de cultivo da cultura dos linfócitos adicionou-se citocalasina B, de modo que a cultura ficasse com concentração de 6 mg/ml

de cultura. Após 72 horas de cultivo centrifugou-se o material a 800 rpm por 5 minutos e descartou-se o sobrenadante. Ao precipitado acrescentou-se 3 ml de solução hipotônica de citrato de sódio a 4°C, homogeneizou-se e logo adicionou-se fixador metanol/ácido acético na proporção de 5:1 junto com 3 gotas de formaldeído, homogeneizando novamente. Centrifugou-se o material durante 5 minutos a 800 rpm e descartou-se o sobrenadante. Acrescentou-se 5 ml de fixador preparado com metanol/ácido acético na proporção 3:1, sendo este trocado mais duas vezes. Aproximadamente 30 µl deste material foi gotejado sobre a lâmina que foi previamente lavada com água e sabão e posta para enxaguar durante 90 min, secas ao ar e mergulhadas em água destilada gelada.

A coloração das lâminas para análise dos MNs foi processada com o corante Giemsa diluído em uma solução tampão (Na_2HPO_4 e KH_2PO_4 a 0,06M e pH 6,8) na proporção de 5% de corante, por um período de 7 minutos.

3.2.7. CRITÉRIOS DE ANÁLISE DO MICRONÚCLEO

Para a análise das lâminas, foi utilizado microscópio de luz, com aumento de 400x, foram contadas 2000 células binucleadas por indivíduo, sendo verificada a frequência de células binucleadas que apareciam com um, dois até três micronúcleos. As células foram analisadas apenas quando apresentava o citoplasma íntegro, para não correr o risco de perdermos micronúcleo, os núcleos deveriam estar separados na preparação (para termos certeza que a célula se dividiu) e o mesmo deveria ocorrer com o micronúcleo, de forma que só foram contados os micronúcleos que não estivessem encostados ao núcleo (para que não houvesse a confusão do micronúcleo com a estrutura de um broto nuclear).

3.2.8. Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados usando-se o programa SigmaStat 1.0 (Jandel Scientific). Para a análise do IM, AC e MN foi usado o teste Student-Newman-Keuls com $p \leq 0,05$.

TABELA 1: Dados de todos os pacientes e controles dos quais foi realizado o estudo citogenético.

Código pessoal	Sexo M/F	Idade (anos)	Fumante +sim/-não	Ingestão de etanol (g/dia)	Tempo de etilismo (anos)	Tempo de abstinência (anos)
Controles						
C003	F	32	-	-	-	-
C006	M	36	-	-	-	-
C009	F	48	-	-	-	-
C010	M	37	-	-	-	-
C011	M	32	-	-	-	-
C012	F	28	-	-	-	-
C013	M	41	-	-	-	-
C025	F	26	-	-	-	-
C026	M	34	-	-	-	-
C027	M	40	-	-	-	-
C028	M	44	+	-	-	-
C029	M	31	-	-	-	-
C030	M	58	-	-	-	-
C031	M	52	-	-	-	-
C032	F	54	+	-	-	-
C033	M	45	+	-	-	-
C034	M	47	-	-	-	-
C035	M	54	-	-	-	-
C036	M	54	-	-	-	-
C202	F	28	-	-	-	-
C203	M	23	-	-	-	-
C204	M	33	-	-	-	-
Alcoolistas						
P006	M	68	-	420	50	4
P009	M	35	-	310	18	3
P011	F	52	+	360	24	2
P014	M	49	-	360	37	0
P016	M	57	+	75,2	37	4
P017	M	28	-	168	16	0
P019	M	33	+	376	16	0
P021	M	72	-	200	44	0
P085	M	64	+	720	45	4
P028	M	49	-	190	30	3
P029	M	54	+	93,6	40	0
P030	M	43	+	376	32	0
P031	M	58	+	360	38	3,5
P032	M	68	-	364,2	38	10
P033	M	75	-	540	61	4
P034	M	54	+	70	36	0
P035	M	71	-	198	52	0
P036	M	50	+	400	32	3,5
P105	M	54	-	188	30	5
P107	M	66	-	188	44	0
P108	M	57	-	574	35	0
P109	F	51	-	60	40	1
P110	M	34	-	720	22	0
P114	M	37	+	376	19	0
P115	M	39	-	280	14	4
P116	F	52	-	154	1	3

M = masculino; F = feminino.

3.3. ESTUDO DE POLIMORFISMOS

3.3.1. INDIVÍDUOS

Para o estudo dos polimorfismos genéticos foram analisados 125 alcoolistas crônicos, dentre estes 72 com doenças no fígado (29 fumantes e 43 não-fumantes), 27 com pancreatite crônica alcoólica (18 fumantes e 9 não-fumantes), 23 sem evidências de doenças no fígado e pâncreas (20 fumantes e 3 não-fumantes), e 3 com cirrose hepática e pancreatite (2 fumantes e 1 não-fumante) (TABELA 2) e 124 indivíduos controles saudáveis (14 fumantes e 110 não-fumantes) (TABELA 3).

3.3.2. - Extração de DNA de sangue periférico

Foi realizada extração de DNA a partir de sangue total dos pacientes, utilizando-se o "Kit" DNAzol BD reagent (específico para extração de DNA a partir de sangue) da marca Promega, segundo instruções do fabricante.

A quantificação do DNA se foi dada por absorbância UV. O material foi estocado nas concentrações de 500 ng/μl e 100 ng/μl a -20 °C até sua utilização.

3.3.3. - Detecção dos polimorfismos

A detecção dos polimorfismos das enzimas estudadas foi obtida usando as técnicas de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) sendo específicas para cada polimorfismo estudado.

3.3.3.1. - Reação para obtenção do polimorfismo CYP1A1 – MspI

A reação de PCR e o polimorfismo RFLP MspI do gene CYP1A1 foram obtidos de acordo com Carstensen *et al.* (1993) nas seguintes condições:

Para um volume total de 25 μl por reação foram utilizados:

- 12,25 μl de H₂O MilliQ
- 2,5 μl de 10X tampão
- 1,0 μl (2mM) de MgCl₂

- 5,0 µl (2mM) de dNTPs
- 2,0 µl (200 ng/µl) de cada "primer": C44 e C47
- 0,25 µl (1,25 U) de Taq DNA polimerase
- 2 µl (100 ng) de DNA genômico

O ciclo de co-amplificação foi: 94 °C por 5 minutos, 30 ciclos de 94 °C por 1 min., 57 °C por 1 min. e 72 °C por 1 min. e 30 seg., seguidos de 2 min. a 72 °C. Os "primers" utilizados foram:

C44: 5' TAG GAG TCT TGT CTC ATG CCT

C47: 5' CAG TGA AGA GGT GTA GCC GCT

Após a reação de amplificação, 20 µl do produto de PCR foram digeridos com 5U (0,25 µl) da enzima MspI (BioLabs), 2,25 µl H₂O e 2,5 µl de tampão NEB2 a 37 °C durante 3 horas e então analisados em gel de poliacrilamida 10% submetido a eletroforese de 140V.

O par de "primers" C44 e C47 gera um produto de amplificação constante de 340 pb, referente ao genótipo normal (m1/m1), o qual não sofre ação da enzima MspI, originando uma banda não clivada. O genótipo mutante homozigoto (m2/m2) possui um sítio para a enzima de restrição MspI, que cliva o produto da amplificação, gerando uma banda de 200 e outra de 140 pb, e o genótipo heterozigoto (m1/m2) apresenta as três bandas: 340, 200 e 140 pb.

3.3.3.2. Reação para obtenção do polimorfismo CYP2D6 – BstNI

A reação de PCR e o polimorfismo RFLP BstNI do gene CYP2D6 foram obtidos de acordo com Lemos et al. (1999) nas seguintes condições:

Para um volume total de 25 µl por reação foram utilizados:

- 10,05 µl de H₂O MilliQ
- 2,5 µl de 10X tampão
- 0,75 µl (2mM) de MgCl₂
- 2,5 µl DMSO

- 5,0 µl (2mM) de dNTPs
- 1,0 µl (100 ng/µl) de cada "primer": CYP2D6-1 e CYP2D6-2
- 0,2 µl (1 U) de Taq DNA polimerase
- 2 µl (100 ng) de DNA genômico

O ciclo de co-amplificação foi: 94 °C por 5 minutos, 35 ciclos de 94 °C por 1 min., 60 °C por 1 min. e 72 °C por 2 min., seguidos de 4 min. a 72 °C. Os "primers" utilizados foram:

CYP2D6-1: 5' GCT TCG CCA ACC ACT CCG

CYP2D6-2: 5' AAA TCC TGC TCT TCC GAG GC

Após a reação de amplificação, 20 µl do produto de PCR foram digeridos com 5 U (0,5 µl) da enzima BstN1 (BioLabs), 1,75 µl H₂O, 0,25 µl BSA e 2,5 µl de tampão NEB 2 a 60 °C durante 6 horas e então analisados em gel de poliacrilamida 10% submetido a eletroforese de 140V.

O par de "primers" CYP2D6 gera um produto de amplificação constante de 334 pb. O genótipo normal sofre ação da enzima de restrição BstN1, originando duas bandas, uma de 230 e outra de 104 pb. O genótipo mutante G1934A não possui um sítio para a enzima de restrição BstN1 e produz apenas fragmentos não digeridos de 334 pb. O genótipo heterozigoto apresenta os três fragmentos: 334, 230 e 104 pb.

3.3.3.3. Reação para obtenção do polimorfismo CYP2E1-PstI

A reação de PCR e o polimorfismo RFLP PstI do gene CYP2E1 foram obtidos de acordo com Anwar et al. (1996) nas seguintes condições:

Para um volume total de 25 µl por reação foram utilizados:

- 10,2 µl de H₂O MilliQ
- 2,5 µl de 10X tampão
- 1,0 µl (2mM) de MgCl₂
- 5,0 µl (2mM) de dNTPs
- 2,0 µl (200 ng/µl) de cada "primer": CYP2E1-1 e CYP2E1-2

- 0,3 µl (1,5 U) de Taq DNA polimerase
- 2 µl (100 ng) de DNA genômico

O ciclo de co-amplificação foi: 95 °C por 1 minuto, 26 ciclos de 95 °C por 1 min., 55 °C por 1 min. e 72 °C por 1 min., seguidos de 4 min. a 72 °C. Os "primers" utilizados foram:

CYP2E1-1: 5' CCA GTC GAG TCT ACA TTG TCA

CYP2E1-2: 5' TTC ATT CTG TCT TCT AAC TGG

Após a reação de amplificação, 20 µl do produto de PCR foram digeridos com 6 U (0,3 µl) da enzima PstI (BioLabs), 1,95 µl H₂O, 0,25 µl BSA e 2,5 µl de tampão NEB3 a 37 °C durante 1 hora e então analisados em gel de poliacrilamida 10% submetido a eletroforese de 140V.

O par de "primers" CYP2E1 gera um produto de amplificação constante de 410 pb, referente ao genótipo normal (c1/c1), o qual não sofre ação da enzima PstI, originando uma banda não clivada. O genótipo mutante homozigoto (c2/c2) possui um sítio para a enzima de restrição PstI, que cliva o produto da amplificação, gerando uma banda de 290 e outra de 120 pb, e o genótipo heterozigoto (c1/c2) apresenta as três bandas: 410, 290 e 120 pb.

3.3.3.4. Reação Multiplex para obtenção dos polimorfismos das enzimas GSTM1 e GSTT1

A reação de co-amplificação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada baseando-se no protocolo de PCR Multiplex de Abdel-Rahman et al. (1996) nas seguintes condições:

Para um volume total de 25 µl por reação foram utilizados:

- 8,25 µl de H₂O MilliQ
- 2,5 µl de 10X tampão
- 1,0 µl (2mM) de MgCl₂
- 5,0 µl (2mM) de dNTPs

- 1,0 µl (100 ng/µl) de cada "primer": GSTM1-1, GSTM1-2, GSTT1-1, GSTT1-2, CYP1A1-1 e CYP1A1-2
- 0,25 µl (1,25 U) de Taq DNA polimerase
- 2 µl (100 ng) de DNA genômico
- o ciclo de amplificação foi: 95 °C por 5 minutos, 30 ciclos de 94 °C por 2 minutos, 59 °C por 1min. e 72 °C por 1min., seguidos de 4 min. a 72 °C.

Os primers utilizados foram três pares:

GSTM1-1 = 5'- GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC

GSTM1-2 = 5'- GTTGGGCTCAAATATACGGTGG

GSTT1- 1 = 5'- TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC

GSTT1- 2 = 5' TCACCGGATCATGGCCAGCA

CYP1A1-1 = 5' GAACTGCCACTTCAGCTGTCT

CYP1A1-2 = 5' CAGCTGCATTTGGAAGTGCTC

O par de primers CYP1A1 amplifica um fragmento constante de 312 pb, usado como controle interno da reação. O fragmento de 215 pb somente é visto nos indivíduos com genótipo GSTM1 positivo. O fragmento de 480 pb pode ser visto nos indivíduos que possuem o genótipo GSTT1 positivo. A ausência de amplificação GSTM1 ou GSTT1 na presença do controle interno da reação indica os respectivos genótipos nulos para cada gene.

3.3.3.5. Reação para obtenção do polimorfismo DRD2-TaqA1

A reação de PCR e o polimorfismo RFLP TAqA1 do gene DRD2 foram obtidos de acordo com Lemos et al. (1999) nas seguintes condições:

Para um volume total de 25 µl por reação foram utilizados:

- 9,85 µl de H₂O MilliQ
- 2,5 µl de 10X tampão
- 0,75 µl (2mM) de MgCl₂
- 2,5 µl DMSO

- 5,0 µl (2mM) de dNTPs
- 1,0 µl (25mM) de cada "primer": DRD2-F e DRD2-R
- 0,4 µl (1 U) de Taq DNA polimerase
- 2 µl (100 ng) de DNA genômico

O ciclo de co-amplificação foi: 94 °C por 5 minutos, 35 ciclos de 94 °C por 1 min., 60 °C por 1 min. e 72 °C por 2 min., seguidos de 4 min. a 72 °C. Os "primers" utilizados foram:

DRD2-F: 5' GCT TCG CCA ACC ACT CCG

DRD2-R: 5' AAA TCC TGC TCT TCC GAG GC

Após a reação de amplificação, 10 µl do produto de PCR foram digeridos com 10 U (0,5 µl) da enzima *TaqI*α (BioLabs), 1,75 µl H₂O, 0,25 µl BSA e 2,5 µl de tampão NEB2 a 65 °C durante 12 horas e então analisados em gel de poliacrilamida 10% submetido a eletroforese de 140V.

O par de "primers" DRD2 gera um produto de amplificação constante de 310 pb. O genótipo normal sofre ação da enzima de restrição *TaqI*α, originando duas bandas, uma de 130 e outra de 180 pb referentes ao genótipo A2/A2. O genótipo mutante (A1/A1) *TaqI*α não possui um sítio para a enzima de restrição *TaqI*α e produz apenas fragmentos não digeridos de 310 pb. Os indivíduos heterozigotos apresentam os três fragmentos: 310, 180 e 130 pb referentes ao genótipo A1/A2.

3.3.4. – ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS POLIMORFISMOS

A análise estatística para o estudo dos polimorfismos foi realizada utilizando-se o Teste Exato de Fisher (bi-caudal), segundo Agresti (1992). As "odds ratio" (OR) (razões de probabilidade) foram calculadas com intervalos de confiança de 95% (IC) segundo Bland e Altman (2000). A probabilidade para o nível de significância foi fixada em $p \leq 0,05$. Os genótipos nulos para *GSTM1* e *GSTT1*, ou homozigotos para os alelos mutantes ou ainda a presença de pelo menos um alelo mutante para os genes *CYP1A1*, *CYP2D6*, *CYP2E1* e *DRD2* foram considerados genótipos de risco.

TABELA 2: Caracterização dos pacientes alcoolistas dos quais foi realizado o estudo de polimorfismos

Código	Sexo M/F	Idade (anos)	Fumante +sim/- não	Ingestão de Etanol (g/dia)	Idade de Início de consumo de álcool	Tempo de etilismo	Abstinente +sim/- não	Tempo de abstinência	Etnia
Alcoolistas sem evidência de doenças no fígado e no pâncreas									
AA501	M	55	+	360	20	33,7	+	1,3	B
AA502	F	49	+	188	15	12,5	+	21,5	B
AA503	M	62	+	376	16	42	+	4	B
AA504	M	39	+	504	17	19	+	3	B
AA505	M	57	+	720	9	37	+	11	P
AA506	M	44	-	608	16	21	+	7	B
P030	M	43	+	376	11	32	+	0	B
P037	M	54	+	282	15	38	+	1	B
P038	M	42	+	94	17	25	-	0	N
P040	M	52	+	280	20	32	-	0	B
P041	M	34	+	336,8	14	20	-	0	B
P042RG	M	61	-	752	15	32	-	0	B
P058	F	60	+	672	10	50	-	0	P
P089	M	44	+	315,2	17	24	+	3	B
P090	M	74	+	376	18	34	+	22	M
P091	M	58	-	376	10	34	+	14	M
P118	F	64	+	282	12	48	+	5	M
P122	M	38	+	376	17	16	+	5	P
P124	M	23	+	75,2	15	8	-	0	B
P38RG	M	41	+	188	8	20	-	0	B
P3RG	M	46	+	404	20	24	-	0	B
P41RG	M	39	+	376	15	15	-	3	B
P4RG	M	41	+	376	14	25	-	8	B
Alcoolistas com pancreatite									
P023	M	41	+	376	12	25	+	4	P
P027	M	45	+	238	19	26	-	0	B
P042	M	48	-	560	20	28	+	1	B
P043	M	32	+	93,6	18	14	-	0	B
P044	M	59	+	408	13	11	+	10	M
P047	M	37	-	376	13	24	-	0	B
P050	M	61	+	376	7	54	-	0	M
P051	M	42	-	60	18	24	-	0	B
P053	M	44	-	150,4	10	34	-	0	N
P055	M	37	+	178	15	20	+	2	B
P060	F	46	-	263,2	36	5	+	5	N
P061	M	54	+	376	16	29	+	9	N
P063	M	41	+	188	7	34	-	0	M
P065	M	51	-	318	17	30	+	4	B
P068	M	53	+	262	15	38	-	0	M
P069	M	32	+	300	19	35	-	0	B
P070	M	40	+	488	19	18	+	3	B
P071	M	49	+	65,6	15	25	+	9	M
P074	M	50	+	376	22	20	+	8	B
P075	M	42	-	376	13	29	-	0	B
P076	M	50	+	188	18	24	+	8	M
P077	M	48	-	376	13	25	+	10	M
P080	M	52	+	94	15	37	-	0	B
P096	M	32	+	376	17	13,5	+	1,5	B
P102	M	41	+	188	19	22	-	0	P
P45RG	M	54	+	376	12	36	-	4	N
P5RG	M	37	-	112,8	29	20	-	4	B
Alcoolistas com doenças no fígado									
P001	M	62	-	37,6	25	35	+	1	M
P002	M	51	+	376	30	18	+	3	N
P004	F	25	-	188	18	7	-	0	B
P006	M	68	-	420	14	50	+	4	M
P008	M	68	-	376	10	58	+	0	N
P010	M	71	-	432	30	41	-	0	M
P011	F	52	+	360	25	24	+	2	N
P013	M	58	-	65,6	18	39	+	1	P

P014	M	49	-	360	14	37	-	0	B
P016	M	57	+	75,2	15	37	+	4	M
P018	F	65	-	140,8	20	42	+	3	B
P019	M	33	+	376	30	16	-	0	N
P020	M	72	-	376	9	54	+	3	B
P024	M	60	-	376	12	46	+	2	B
P026	M	39	+	525	14	21	+	4	B
P028	M	49	-	190	21	30	+	0	B
P029	M	54	+	93,6	13	40	-	0	N
P031	M	58	+	360	18	38	+	10	M
P032	M	68	-	364,2	26	38	+	4	B
P033	M	75	-	540	18	61	+	0	B
P034	M	54	+	70	19	36	-	0	N
P034RG	M	46	+	264	13	20	-	0	B
P035	M	71	-	198	18	52	-	3,5	B
P036	M	50	+	400	19	31	+	1	P
P048	M	33	+	188	13	20	-	0	B
P005	M	43	-	188	15	18	-	10	P
P007	M	47	+	188	21	26	+	0	P
P012	M	65	+	94	35	30	-	0	B
P045	M	76	-	397,5	17	56	+	0	B
P057	M	72	-	376	18	44	+	10	B
P059	M	38	-	188	14	22	+	2	B
P064	F	61	-	224	16	37	+	8	B
P067	M	53	+	376	12	38	+	3	B
P072	M	55	+	308,4	18	37	-	0	B
P073	M	64	+	564	27	37	-	0	M
P078	M	64	+	376	7	47	+	10	B
P079	M	49	-	94	18	30	+	1	B
P083	M	58	-	600	30	28	-	0	B
P085	M	64	+	720	15	45	+	4	B
P086	M	49	-	159,2	15	34	-	0	B
P087	M	51	+	75,2	22	29	-	0	M
P088	M	31	+	376	8	23	-	0	B
P093	M	42	+	60	18	24	+	1,5	B
P094	M	50	+	376	19	31	+	0	M
P099	M	66	-	131,2	13	51,5	+	1,5	M
P105	M	54	-	188	19	30	+	5	B
P106	M	66	+	376	7	49	+	10	B
P107	M	66	-	188	22	44	-	0	M
P108	M	47	-	574	16	35	-	0	M
P109	F	51	-	60	10	40	+	1	B
P110	M	34	-	720	12	22	-	0	B
P111	M	54	-	376	36	10	+	4	B
P112	M	40	-	300	13	27	-	0	B
P113	M	57	-	336,4	15	34	+	8	B
P115	M	39	-	280	21	14	+	4	P
P117	M	41	-	159,2	17	22,5	+	1,5	B
P120	M	61	-	100	8	28	+	25	P
P1RG	M	60	+	564	48	39	-	0	B
P2RG	M	62	+	564	17	47	-	0	B
P33RG	F	58	-	376	19	40	-	0	B
P35RG	M	48	-	190	19	34	-	0	B
P40RG	M	35	+	188	13	22	-	0	B
P43RG	M	45	-	171,2	15	20	-	2	B
P116	F	52	-	154	48	1	+	3	P
P009	M	35	-	310	15	18	+	3	M
P017	M	28	-	168	12	16	-	0	N
P021	M	44	+	200	20	44	-	0	B
P025	M	73	-	188	20	53	-	0	B
P039	M	38	+	188	12	26	-	0	M
P049	M	47	+	188	20	27	-	0	M
P119	M	55	-	376	20	30	+	5	P
P121	M	46	-	720	23	16	+	7	B

Alcoolistas com cirrose e pancreatite

P022	M	58	-	376	15	40	+	3	P
P114	M	37	+	376	18	19	+	0	N
P123	M	47	+	150,4	20	27	-	0	B

A tabela 3 apresenta dados como idade, sexo, hábito tabagista e etnia dos controles que foram usados para o estudo dos polimorfismos.

TABELA 3: Caracterização dos controles nos quais foi realizado o estudo de polimorfismos

Código	Idade (anos)	Sexo (M/F)	Etnia	Fumante (+sim/- não)
C001	24	M	B	-
C002	46	F	B	+
C003	30	M	B	-
C006	36	M	B	-
C007	30	M	O	-
C008	30	M	B	-
C009	48	F	N	-
C010	37	M	N	-
C011	32	M	P	-
C012	28	F	P	-
C013	41	M	P	-
C014	44	F	B	-
C015	41	F	B	-
C016	22	M	B	-
C017	33	F	B	-
C018	49	F	B	-
C020	47	M	O	-
C021	76	F	B	-
C023	53	M	N	-
C024	34	M	B	-
C025	26	M	B	-
C026	34	M	B	-
C027	40	M	B	-
C028	44	M	B	+
C029	31	M	B	-
C030	58	M	N	-
C031	52	M	B	-
C032	54	F	M	+
C033	45	M	B	+
C034	47	M	N	-
C035	54	M	B	-
C036	54	M	B	-
C037	49	M	B	-
C039	46	M	B	-
C040	43	M	M	-
C041	46	M	M	-
C042	49	M	B	+
C043	49	M	B	-
C044	50	M	B	-
C045	50	M	B	-
C046	45	M	B	-
C047	53	F	B	-

C048	53	F	B	-
C049	47	M	B	-
C050	43	M	B	-
C051	51	F	M	-
C052	55	F	B	+
C053	51	F	B	-
C053-2S	22	M	B	-
C054-2S	21	F	B	-
C066	24	F	B	-
C068	27	M	B	-
C080	19	F	B	-
C081	22	F	B	-
C082	23	M	B	-
C083	20	F	B	-
C084	23	M	B	-
C085	21	M	B	-
C086	21	F	B	-
C087	22	F	B	-
C088	26	F	B	-
C089	22	F	B	-
C090	19	F	B	-
C091	24	F	B	-
C092	23	F	B	-
C093	20	F	B	-
C094	22	M	B	-
C095	21	M	B	-
C096	23	F	B	-
C097	20	F	B	-
C098	26	M	B	-
C099	20	F	B	-
C100	28	M	B	-
C101	22	M	B	-
C102	22	F	B	-
C103	21	F	B	-
C110	21	F	B	-
C202	28	F	B	-
C203	23	M	B	-
C204	33	M	B	-
C205	50	F	O	-
C206	47	M	B	-
C207	30	M	B	+
C208	54	F	B	+
C209	42	F	B	-
C210	34	F	B	-
C201	34	M	B	+
C112	27	M	B	+
CRG105	26	F	B	-
CRG108	43	F	B	-
CRG110	29	F	B	-
CRG111	26	F	B	-
CRG113	34	F	B	-
CRG114	36	M	B	-
CRG116	42	M	P	-

CRG117	35	M	N	-
CRG123	21	M	B	+
CRG128	26	M	N	+
CRG129	41	M	N	+
CRG130	46	M	N	-
CRG132	23	F	B	-
CRG134	57	F	B	-
CRG136	21	F	+	+
CRG137	29	M	B	-
CRG138	25	M	B	-
CRG141	18	M	B	-
CRG142	30	M	B	-
CRG143	29	M	P	-
CRG147	31	M	B	-
CRG152	24	M	B	-
CRG154	24	M	B	-
CRG72	43	M	B	-
CRG80	25	F	B	+
CRG82	35	F	B	-
CRG85	18	M	B	-
CRG86	29	F	P	+
CRG88	24	M	B	+
CRG89	26	M	B	-
CRG92	41	M	P	-
CRG93	47	M	B	-
CRG98	30	M	B	-
C211	50	F	M	-
C111	22	F	B	-

4. RESULTADOS

4.1. ANÁLISE DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS

A TABELA 4 apresenta os dados de AC e IM, distribuídos individualmente, obtidos da análise citogenética de pacientes alcoolistas e de seus controles. Foram analisadas 100 metáfases/indivíduo, dependendo do crescimento da cultura, de modo que quando não foi possível a obtenção de 100 metáfases os resultados não foram utilizados.

Verificou-se que as AC mais freqüentemente encontradas nos dois grupos foram as “gaps” cromatídicas, seguidas pelas quebras cromatídicas. Também pode ser observado que os duplos fragmentos foram encontrados com maior freqüência no grupo de alcoolistas (TABELA 4).

A TABELA 5 contém os valores médios de IM e AC para o grupo de alcoolistas e controles. Comparando-se a médio de IM entre esses dois grupos (3,28 e 4,35 respectivamente), não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas. Estes dois grupos foram divididos em não fumantes e fumantes e foram encontradas diferenças significativas entre os IM dos controles não-fumantes (3,24) e dos alcoolistas não-fumantes (4,71) com nível de significância $p = 0,03$. A freqüência média de ACs entre os grupos de alcoolistas (2,42 AC/100 células) e controles (1,91 AC/100 células) não apresentou diferenças estatisticamente significativas. No entanto, o grupo de alcoolistas fumantes apresentou uma freqüência maior de ACs (3,45 AC/100 células) do que os controles não-fumantes (1,83 AC/100 células) sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p = 0,04$).

A FIGURA 4 apresenta a distribuição da freqüência de aberrações cromossômicas entre os controles (1,91 AC/100 células) e os alcoolistas crônicos (2,47 AC/100 células) e abstinentes (2,36 AC/100 células). Apesar do grupo de alcoolistas crônicos (em uso corrente de álcool) apresentar uma freqüência maior de ACs, estas diferenças não foram estatisticamente significativas entre os grupos.

A FIGURA 5 mostra os dados da análise da frequência de ACs nos grupos estudados quanto ao hábito tabagista. Entre os não-fumantes, o grupo que apresentou um maior número de ACs foi o dos alcoolistas em abstinência (2,11 AC/100 células). Já entre os grupos de fumantes os alcoolistas crônicos apresentaram uma maior frequência de ACs (4 AC/100 células) porém essas diferenças não foram estatisticamente significativas.

A TABELA 6 mostra os dados obtidos para o IM e frequência de ACs quando o grupo de alcoolistas foi classificado em relação a quantidade de álcool consumida diariamente e hábitos tabagistas. Não foram encontradas diferenças significativas nos IMs e frequência de AC/100 células nos grupos analisados.

Na TABELA 7 estão apresentados os dados dos alcoolistas em relação ao tempo de consumo de bebida alcoólica. Os alcoolistas não fumantes que ingeriram álcool por mais de 40 anos (1,6 AC/100 células) apresentaram uma média de aberrações cromossômicas menor do que os outros grupos de alcoolistas quando foi considerado apenas o tempo de consumo de etanol, e não o hábito tabagista, porém essas diferenças não foram estatisticamente significativas.

TABELA 4: Frequência de AC e IM em linfócitos de sangue periférico do grupo controle e dos alcoolistas

Código	IM	Total de células analisadas	Aberrações cromossômicas							Total AC	Total de células com AC	AC /100 células
			GC	GI	QC	QI	FS	DF	OA			
Controles												
C009		100	1	1	0	0	1	1	0	4	4	0,04
C010	3,4	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
C012	2,7	100	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0,01
C013	2,1	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
C025	4,1	100	3	0	1	1	0	1	1 anel	7	5	0,07
C026	-	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
C027	1,0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
C028	2,4	100	2	0	1	0	1	1	0	5	5	0,05
C029	3,5	100	2	0	0	0	0	0	0	2	2	0,02
C030	1,3	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
C031	1,0	100	2	0	0	0	0	0	0	2	2	0,02
C032	3,0	100	2	2	0	0	0	1	0	5	5	0,05
C033	6,4	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
C034	5,9	100	2	0	2	0	0	0	0	4	4	0,04
C035	2,0	100	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0,01
C036	1,6	100	0	0	0	0	0	2	0	2	2	0,02
C202	6,0	100	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0,01
C203	5,0	100	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0,01
C204	2,5	100	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0,01
C004	5,1	100	1	0	1	0	1	1	0	4	4	0,04
Pacientes												
P006	2,6	100	0	0	2	0	0	0	0	2	2	0,02
P009	3,2	100	1	0	0	1	0	1	0	3	3	0,03
P011	7,5	100	3	0	2	0	0	1	0	6	6	0,06
P014	6,0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
P016	2,8	100	1	0	1	0	0	0	0	2	2	0,02
P017	4,2	100	2	1	0	0	0	0	0	3	3	0,03
P019	4,5	100	1	0	0	0	0	1	0	2	2	0,02
P021	4,1	100	0	1	0	0	1	1	0	3	3	0,03
P028	1,8	100	0	0	0	2	0	3	0	5	4	0,05
P029	0,6	100	1	0	1	0	0	7	1 anel	10	3	0,10
P030	2,2	100	2	0	0	0	0	1	0	3	3	0,03
P031	3,1	100	2	0	0	0	0	1	0	3	3	0,03
P032	4,2	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P033	3,1	100	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0,01
P034	2,5	100	0	0	2	0	0	0	0	2	2	0,02
P035	3,6	100	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0,01
P036	4,7	100	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0,01
P085	-	100	0	0	2	0	0	0	0	2	2	0,02
P105	7,8	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
P107	8,7	100	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0,01
P108	7	100	0	0	2	0	0	0	0	2	2	0,02
P109	4,2	100	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0,01
P110	4,9	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
P114	2,5	100	0	0	1	1	0	0	0	2	2	0,02
P115	6,4	100	2	0	1	0	0	0	0	3	3	0,03
P116	2,9	100	2	0	1	1	0	0	0	4	4	0,04

GC = gap cromatídico; GI = gap cromossômico; QC = quebra cromatídica; QI = quebra cromossômica; FS = fragmento simples, DF = duplo fragmento; AO = outras aberrações

TABELA 5: Média dos valores do IM e frequência de AC/100 células de cada um dos grupos de estudo, subdivididos em fumantes e não-fumantes

Código	IM	IM *	AC/100 células ± EPM	AC/100 células* ±EPM
Controles				
Não-fumantes (n=19)	3,24	3,33	1,68 ± 0,43	1,91 ± 0,44
Fumantes (n=3)	3,93		3,33 ± 1,67	
Alcoolistas				
Não-fumantes (n=15)	4,71 ^a	4,2	1,67 ± 0,39	2,42 ± 0,42
Fumantes (n=11)	3,45		3,45 ^b ± 0,77	

EPM = erro padrão da média; * = não fumantes + fumantes; ^a = estatisticamente diferente dos controles não-fumantes (p = 0,03); ^b = estatisticamente diferente dos controles não-fumantes (p = 0,04).

FIGURA 4: Distribuição da frequência de AC/100 células observadas em controles, alcoolistas abstinentes e crônicos.

FIGURA 5: Frequência média de AC/100 células observadas nos grupos alcoolistas em corrente uso de álcool, alcoolistas em abstinência e controles, subdivididos quanto ao hábito tabagista.

TABELA 6: Média dos valores de IM e frequência de AC/100 células, observadas em linfócitos de sangue periférico de alcoolistas de acordo com a quantidade de álcool ingerida ao dia

Ingestão de etanol (g/dia)	IM	AC/100 células ± EPM	AC/100 células * ± EPM
60-300			
não-fumantes (n=9)	4,86	2,22 ± 0,5	2,83 ± 0,76
fumantes (n=3)	1,97	4,67 ± 2,67	
301-500			
não-fumantes (n=4)	4,0	1,25 ± 0,75	2,2 ± 0,55
fumantes (n=6)	4,08	2,83 ± 0,7	
>500			
não-fumantes (n=3)	5,0	1,0 ± 0,58	1,0 ± 0,58

- fumantes e não-fumantes

TABELA 7: Média dos valores de IM e frequência de AC/100 células, observadas em linfócitos de sangue periférico de alcoolistas de acordo com o tempo de consumo de bebidas alcóolicas

Tempo de consumo de álcool (anos)	IM	AC/100 células ± EPM	AC/100 células * ± EPM
1-20			
não-fumantes (n=4)	4,18	3	2,33 ± 0,49
fumantes (n=2)	5,25	1,0 ± 1,0	
21-40			
não-fumantes (n=7)	4,95	1,25 ± 1,25	2,91 ± 0,93
fumantes (n=7)	3,34	3,86 ± 1,18	
>40			
não-fumantes (n=5)	4,42	1,6 ± 0,4	1,6 ± 0,4

- * fumantes e não-fumantes

4.2. ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS DAS ENZIMAS METABOLIZADORAS DE XENOBIÓTICOS

4.2.1. Detecção dos diferentes polimorfismos estudados

A FIGURA 6 apresenta um perfil de PCR para o polimorfismo *CYP1A1 – MspI*. O polimorfismo é caracterizado pela presença ou ausência do sítio para a enzima de restrição *MspI*, localizado na região 6235 da molécula de DNA. A ausência do sítio para *MspI* em ambos alelos representa o genótipo tipo selvagem ($m1/m1$) e é caracterizado pela presença de um fragmento de 340 pb. A presença do sítio *MspI* em ambos os alelos, reflete a presença de mutação, originando o genótipo homozigoto para a mutação ($m2/m2$), que apresenta dois fragmentos: 200 e 140 pb. Um alelo mutado e outro normal caracteriza o genótipo heterozigoto ($m1/m2$), mostrando os três padrões de bandamento.

FIGURA 6: PCR-RFLP para a detecção do polimorfismo *CYP1A1-MspI*, onde M= marcador de peso molecular (100 pb) e B= Branco (todos os reagentes exceto DNA). **Colunas 1, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16 e 17** são homozigotos selvagem ($m1/m1$); **Colunas 5, 7 e 11** são heterozigotos ($m1/m2$); **Coluna 2** é homozigoto mutante ($m2/m2$).

A FIGURA 7 apresenta um perfil de PCR para o polimorfismo **CYP2D6 – BstN1**. O polimorfismo é caracterizado pela presença ou ausência do sítio para a enzima de restrição *BstN1*. A amplificação gera um produto constante de 334 pb, o qual sofre a ação da enzima de restrição *BstN1*, que cliva o produto da amplificação, gerando uma banda de 230 e outra de 104 pb, correspondente ao genótipo homozigoto normal (selvagem) (w/w). O genótipo homozigoto mutante (m/m) não sofre a ação da enzima de restrição *BstN1*, originando uma banda não clivada de 334 pb. O genótipo heterozigoto (w/m) apresenta as três bandas: 334, 230 e 104 pb.

FIGURA 7: PCR-RFLP para a detecção do polimorfismo CYP2D6-BstN1, onde M= marcador de peso molecular (50 pb); **Colunas 1 e 17** = heterozigotos (w/m); **Colunas 2 a 16 e 19**= homozigoto selvagem (w/w); **Coluna 18**= homozigoto mutante (m/m).

A FIGURA 8 apresenta um perfil de PCR para o polimorfismo **CYP2E1 – Pst I**. O polimorfismo é caracterizado pela presença ou ausência do sítio para a enzima de restrição *Pst I*. A amplificação gera um produto constante de 410 pb, referente ao genótipo homozigoto normal (c1/c1), o qual não sofre a ação da enzima de restrição *Pst I*, originando uma banda não clivada. O genótipo homozigoto mutante (c2/c2) possui um sítio para a enzima de restrição *Pst I*, que cliva o produto da amplificação, gerando uma banda de 290 e outra de 120 pb, e o genótipo heterozigoto (c1/c2) apresenta três bandas: 410, 290 e 120 pb.

FIGURA 8: PCR-RFLP para detecção do polimorfismo CYP2E1-PstI, onde M= marcador de peso molecular (100 pb) e B= branco (todos os reagentes exceto DNA). **Colunas 1, 2, 3, 5, 8, 9 e 10** são homozigotos selvagem (c1/c1); **Colunas 6 e 7** são heterozigotos (c1/c2); **Coluna 4** é homozigoto mutante (c2/c2).

O polimorfismo dos genes *GSTM1* e *GSTT1* é caracterizado pela deleção do gene. A FIGURA 9 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 9: PCR multiplex para detecção de alelos homozigotos nulos das glutathione S-transferase mu (*GSTM1*) e teta (*GSTT1*), onde M = marcador de peso molecular (100 pb) e B = branco (todos os reagentes exceto o DNA). Os produtos de PCR de 215 e 480 pb correspondem à presença dos genes *GSTM1* e *GSTT1*, respectivamente. O fragmento de 312 pb corresponde ao gene constante CYP1A1, o qual foi usado como controle interno da reação. **Colunas 1, 3, 4, 5, 6, 8, 10 e 11**, genes *GSTM1* e *GSTT1* presentes; colunas **2 e 7**, *GSTT1* ausente, colunas **12, 13** *GSTM1* ausente.

A FIGURA 10 apresenta um perfil de PCR para o polimorfismo **DRD2 –TaqA1**. O polimorfismo é caracterizado pela presença ou ausência do sítio para a enzima de restrição *Taq1α*. A amplificação gera um produto constante de 310 pb, o qual sofre a ação da enzima de restrição *Taq1α*, que cliva o produto da amplificação, gerando uma banda de 180 e outra de 130 pb, correspondente ao genótipo homozigoto normal (A2/A2). O genótipo homozigoto mutante (A1/A1) não sofre a ação da enzima de restrição *Taq1α* originando uma banda não clivada de 310 pb. O genótipo heterozigoto (A1/A2) apresenta as três bandas: 310, 180 e 130 pb.

FIGURA 10: PCR-RFLP para detecção do polimorfismo DRD2-TaqA1, onde M= marcador de peso molecular (100 pb); **Coluna 1**, homozigoto mutante (A1/A1); **Colunas 2, 4, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16** = homozigoto normal (A2/A2); **Colunas 3, 5, 8 e 17** = heterozigoto (A1/A2).

4.2.2. Distribuição dos genótipos GSTM1, GSTT1, CYP1A1, CYP2D6, CYP2E1 e DRD2 em alcoolistas crônicos e controles.

As frequências dos genótipos *CYP1A1* (polimorfismo *MspI*), *CYP2D6* (polimorfismo *BstNI*), *CYP2E1* (polimorfismo *PstI*), *GSTM1*, *GSTT1* e *DRD2* (polimorfismo *TaqA1*) em alcoolistas e nos controles estão apresentadas na TABELA 8. Nos controles, as frequências dos polimorfismos estudados estão de acordo com as obtidas em outros estudos populacionais (Burim *et al.*, 2004; Lovlie *et al.* 2001; Casso *et al.* 2006).

As tabelas 8 a 13 apresentam as distribuições dos genótipos *CYP1A1*, *CYP2D6*, *CYP2E1*, *GSTM1* e *GSTT1* nos diferentes grupos de alcoolistas (sem evidência de doenças no fígado e pâncreas, com pancreatite, com doenças no fígado e com cirrose e pancreatite simultaneamente (CP) e controles. Na TABELA 10 verificou-se que o grupo formado por alcoolistas com doenças no fígado e pancreatite apresentou uma frequência estatisticamente significativa do genótipo homozigoto mutante para o gene *CYP1A1* (m2/m2) quando comparado com o grupo de alcoolistas sem doenças ($p = 0,02$). Apesar do genótipo m2/m2 ter sido encontrado com maior frequência nos grupos de alcoolistas com doenças, estas diferenças não foram estatisticamente significativas (TABELA 9).

Pela análise da TABELA 8 foi possível verificar que o genótipo homozigoto mutante para o gene *CYP2D6* ocorreu com maior frequência nos alcoolistas com doenças no fígado (4,8%) e com pancreatite (4,0) do que nos controles, porém esta diferença não teve significância estatística. No entanto, nos alcoolistas com doenças no fígado, esta diferença esteve bem próxima de um valor estatisticamente significativo ($p = 0,07$) (TABELA 11).

O genótipo homozigoto mutante para o gene *CYP2E1* foi encontrado em 8,6% dos alcoolistas e 7,7% dos controles (TABELA 8). Na análise dos diferentes grupos de alcoolistas, os alcoolistas com doenças no fígado apresentaram 9,4% de frequência do genótipo heterozigoto (c1/c2), os com pancreatite 15% enquanto os controles apresentaram 7,4% de frequência para este genótipo, porém essas diferenças não foram estatisticamente significativas (TABELAS 9 e 12).

A análise dos dados mostrou que as deleções homozigotas para os loci *GSTM1* e *GSTT1* (genótipos nulos) foram encontrados na frequência de 40,2 % nos alcoolistas e nas frequências de 45,6% e 34,2% nos controles (TABELA 8). Estas frequências não foram estatisticamente diferentes ($p = 0,43$ e $0,35$ para o locus *GSTM1* e *GSTT1*, respectivamente) entre os alcoolistas e o grupo controle. Na análise da frequência do gene *GSTM1* nulo para os diferentes grupos de alcoolistas e o grupo controle, verificou-se o grupo de alcoolistas com cirrose e pancreatite concomitantemente apresentou a maior frequência para o genótipo nulo (66,7%), no entanto, esta diferença não foi estatisticamente significativa quando comparada com os controles (51,4%) e com os outros grupos de alcoolistas (doenças no fígado 35,7%; pancreáticos 33,3% e sem doenças 61,1%) (TABELAS 9 e 13).

O genótipo nulo para *GSTT1* foi encontrado numa frequência maior no grupo controle (51,4%) em comparação aos alcoolistas com doenças no fígado (48,6%), com pancreatite (26,0%), sem evidência de doenças no fígado e pâncreas (33,3) e com cirrose e pancreatite (33,3%), porém essas diferenças não foram estatisticamente significativas (TABELA 9 e 13).

As TABELAS 14 e 15 apresentam os dados dos grupos de alcoolistas quanto ao hábito tabagista. O genótipo mutante para o gene *CYP1A1* (m2/m2) ocorreu em maior frequência nos indivíduos pancreáticos não-fumantes (11,1%). Os indivíduos com maior frequência do genótipo m/m para o gene *CYP2D6* foram os alcoolistas não-fumantes com doenças no fígado (7,3%). O genótipo mutante para o gene *CYP2E1* (c2/c2) ocorreu em apenas um indivíduo pancreático não-fumante. Os indivíduos fumantes com doenças no fígado apresentaram uma maior frequência dos genótipos positivos *GSTM1* (71,4%) e *GSTT1* (60,7%) em relação aos indivíduos não-fumantes. Já os genótipos nulos para esse dois genes ocorreram mais frequentemente em indivíduos sem evidência de doenças, não-fumantes. Porém, em nenhum dos casos estudados houve diferenças estatisticamente significativas na distribuição dos genótipos em relação aos grupos de fumantes e não-fumantes.

A tabela 16 apresenta as frequências alélicas dos genes CYP1A1 (polimorfismo MspI), CYP2D6 (polimorfismo BstN1) e CYP2E1 (polimorfismo PstI) nos diferentes grupos de alcoolistas e grupo controle.

O genótipo homozigoto mutante para o polimorfismo TaqA1 do receptor 2 da dopamina (DRD2) foi encontrado em 9,4% dos alcoolistas e em 6,0% dos controles (TABELA 8), porém estas diferenças não foram significativas. Quando a distribuição do genótipo A1/A1 foi analisada em relação aos hábitos tabagistas, verificou-se a presença deste genótipo em 13,7% dos alcoolistas fumantes e em 7,1% dos alcoolistas não-fumantes (TABELA 15).

A TABELA 17 mostra a frequência dos genótipos para o polimorfismo TaqA1 do gene DRD2 nos alcoolistas em relação ao uso corrente de álcool ou sua interrupção (abstinência). Não foram encontradas diferenças significativas na distribuição do genótipo mutante A1/A1 entre os grupos.

A tabela 17 mostra a distribuição dos genótipos DRD2 quanto à idade de início do consumo de álcool e ao tempo de consumo de álcool. Os indivíduos com maior tempo de consumo de álcool (35 anos em média) possuem o genótipo A1/A2. Quando comparados com os indivíduos A2/A2 (28 anos em média) o tempo de consumo foi significativamente maior nos indivíduos A1/A2 ($p < 0,05$).

A tabela 18 mostra a distribuição dos genótipos CYP1A1, CYP2D6, CYP2E1, GSTM1 e GSTT1 nos indivíduos em que o estudo da frequência de micronúcleo foi realizado.

A tabela 19 mostra a distribuição média de células com micronúcleo encontradas nos diferentes genótipos. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas.

TABELA 8: Distribuição dos genótipos *CYP1A1*, *CYP2D6*, *CYP2E1*, *GSTM1*, *GSTT1* e *DRD2* em alcoolistas e indivíduos controle.

Lócus	Genótipo ¹	NÚMERO %		OR (95% IC)	P
		Alcoolistas	Controles		
CYP1A1	m1/m1	88 (74,6)	92 (82,1)	1,00 (referência)	
	m1/m2	25 (21,2)	18 (16,1)	1,45 (0,74-2,84)	0,3
	m2/m2	5 (4,2)	2 (1,8)	2,61 (0,49-13,82)	0,28
CYP2D6	w/w	88 (78,6)	69 (75,8)	1,00 (referência)	
	w/m	20 (17,8)	22 (24,2)	0,71 (0,36-1,41)	0,38
	m/m	4 (3,6)	0	—*	0,14
CYP2E1	c1/c1	84 (90,3)	100 (92,3)	1,00 (referência)	
	c1/c2	8 (8,6)	8 (7,7)	1,09 (0,39-3,03)	1,00
	c2/c2	1 (1,1)	0	—*	0,48
GSTM1	Presente	73 (59,8)	62 (54,4)	1,00 (referência)	
	Nulo	49 (40,2)	52 (45,6)	0,8 (0,48-1,34)	0,43
GSTT1	Presente	73 (59,8)	75 (65,8)	1,00 (referência)	
	Nulo	49 (40,2)	39 (34,2)	1,29 (0,76-2,19)	0,35
DRD2	A1/A1	10 (9,4)	5 (6,0)	1,57 (0,5-4,9)	0,6
	A1/A2	36 (34,0)	31 (37,3)	0,91 (0,49-1,68)	0,9
	A2/A2	60 (56,6)	47 (56,7)	1,00 (referência)	

¹ m1/m1= homozigoto para alelo selvagem; m1/m2= heterozigoto; m2/m2= homozigoto para o alelo mutante; w/w= homozigoto para o alelo selvagem; w/m= heterozigoto; m/m= homozigoto para o alelo mutante; c1/c1= homozigoto para o alelo selvagem; c1/c2= heterozigoto; c2/c2= homozigoto para o alelo mutante; Nulo = deleção homozigota; A1/A1 homozigoto para o alelo mutante; A1/A2= heterozigoto; A2/A2= homozigoto para o alelo normal; P = os valores foram calculados usando o teste de probabilidade de Fischer; OR= "odds ratio", IC= intervalo de confiança; * OR não calculada devido a número insuficiente.

TABELA 9: Distribuição das frequências dos polimorfismos dos genes **CYP1A1**, **CYP2D6**, **CYP2E1**, **GSTM1** e **GSTT1** nos diferentes grupos de alcoolistas e indivíduos controles.

Locus	Genótipo ¹	NÚMERO (%)				
		Doenças no fígado	Pâncreas	CP	Sem doenças	Controles
CYP1A1	m1/m1	49 (73,1)	19 (70,4)	2 (66,7)	18 (85,7)	92 (82,1)
	m1/m2	14 (20,9)	7 (26,0)	1 (33,3)	3 (14,3)	18 (16,1)
	m2/m2	4 (6,0)	1 (3,6)	0	0	2 (1,8)
CYP2D6	w/w	48 (76,2)	19 (76,0)	3 (100,0)	18 (85,7)	69 (75,8)
	w/m	12 (19,0)	5 (20,0)	0	3 (14,3)	22 (24,2)
	m/m	3 (4,8)	1 (4,0)	0	0	0
CYP2E1	c1/c1	48 (90,6)	16 (80,0)	3 (100,0)	17 (100,0)	100 (92,6)
	c1/c2	5 (9,4)	3 (15,0)	0	0	8 (7,4)
	c2/c2	0	1 (5,0)	0	0	0
GSTM1	Presente	45 (64,3)	18 (66,7)	1 (33,3)	7 (38,9)	62 (54,4)
	Nulo	25 (35,7)	9 (33,3)	2 (66,7)	11 (61,1)	52 (45,6)
GSTT1	Presente	36 (51,4)	20 (74,1)	2 (66,7)	12 (66,7)	75 (65,8)
	Nulo	34 (48,6)	7 (25,9)	1 (33,3)	6 (33,3)	39 (34,2)

¹ m1/m1= homozigoto para alelo selvagem; m1/m2= heterozigoto; m2/m2= homozigoto para o alelo mutante; w/w= homozigoto para o alelo selvagem; w/m= heterozigoto; m/m= homozigoto para o alelo mutante; c1/c1= homozigoto para o alelo selvagem; c1/c2= heterozigoto; c2/c2= homozigoto para o alelo mutante; Nulo = deleção homozigota.

TABELA 10: Distribuição e frequência dos genótipos *CYP1A1* entre os grupos de alcoolistas e controles e entre os grupos de alcoolistas

	CYP1A1		
	m1/m1	m1/m2	m2/m2
Doenças no fígado (n=67)	49 (73,1)	14 (20,9)	4 (6,0)
Controles (n=112)	92 (82,1)	18 (16,1)	2 (1,8)
P		0,42	0,2
OR(95% IC)	1,0(referência)	1,46 (0,67-3,18)	3,76 (0,66-21,23)
Pancreatite (n=27)	19 (70,4)	7 (26,0)	1 (3,6)
Controles (n=112)	92 (82,1)	18 (16,1)	2 (1,8)
P		0,26	0,44
OR(95% IC)	1,0(referência)	1,88 (0,69-5,13)	2,42 (0,21-28,08)
Sem Doenças (n=21)	18 (85,7)	3 (14,3)	0
Controles (n=112)	92 (82,1)	18 (16,1)	2 (1,8)
P		1,00	1,00
OR(95% IC)	1,0(referência)	0,85 (0,23-3,2)	—*
CP (n=3)	2 (66,7)	1 (33,3)	0
Controles (n=91)	92 (82,1)	18 (16,1)	2 (1,8)
P		0,43	1,00
OR(95% IC)	1,0(referência)	2,56 (0,22-29,71)	—*
F + P (n=94)	68 (72,3)	21 (22,3)	5 (5,4)
Controles (n=112)	92 (82,1)	18 (16,1)	2 (1,8)
P		0,2	0,2
OR(95% IC)	1,0(referência)	1,6 (0,78-3,19)	3,38 (0,64-17,96)
Doenças no fígado (n=67)	49 (73,1)	14 (20,9)	4 (6,0)
Pancreatite (n=27)	19 (70,4)	7 (26,0)	1 (3,6)
P		0,78	1,00
OR(95% IC)	1,0(referência)	0,78 (0,27-2,22)	1,55 (0,16-14,78)
F + P (n=94)	68 (72,3)	21 (22,3)	5 (5,4)
Sem doenças (n=21)	18 (85,7)	3 (14,3)	0
P		0,6	0,02^a
OR(95% IC)	1,0(referência)	1,85 (0,5-6,91)	—*
Doenças no fígado (n=67)	49 (73,1)	14 (20,9)	4 (6,0)
Sem doenças (n=21)	18 (85,7)	3 (14,3)	0
P		0,5	0,6
OR(95% IC)	1,0(referência)	1,71 (0,44-6,67)	—*
Pancreatite (n=27)	19 (70,4)	7 (26,0)	1 (3,6)
Sem Doenças (n=21)	18 (85,7)	3 (14,3)	0
P		0,5	1,00
OR(95% IC)	1,0(referência)	2,21 (0,49-9,89)	—*
F + CP (n=70)	51 (72,9)	15 (21,4)	4 (5,7)
Controles (n=112)	92 (82,1)	18 (16,1)	2 (1,8)
P		0,32	0,19
OR(95% IC)	1,0(referência)	1,5 (0,7-3,23)	3,61 (0,64-20,4)
P+ CP (n=30)	21 (70,0)	8 (26,7)	1 (3,3)
Controles (n=112)	92 (82,1)	18 (16,1)	2 (1,8)
P		0,18	0,47
OR(95% IC)	1,0(referência)	1,95 (0,75-5,08)	2,2 (0,19-25,3)
CP (n=3)	2 (66,7)	1 (33,3)	0
Sem doenças (n=21)	18 (85,7)	3 (14,3)	0
P		0,4	1,00
OR(95% IC)	1,0(referência)	3,0 (0,2-44,36)	—*
F + CP (n=70)	51 (72,9)	15 (21,4)	4 (5,7)
Sem doenças (n=21)	18 (85,7)	3 (14,3)	0
P		0,54	0,57
OR (95% IC)	1,0(referência)	1,77 (0,46-6,81)	—*
P + CP (n=30)	21 (70,0)	8 (26,7)	1 (3,3)
Sem doenças (n=21)	18 (85,7)	3 (14,3)	0
P		0,32	1,00
OR (95% IC)	1,0(referência)	2,29 (0,53-9,93)	—*

F + P + CP (n=97)	70 (72,2)	22 (22,7)	5 (5,1)
Controles (n=112)	92 (82,1)	18 (16,1)	2 (1,8)
P		0,22	0,24
OR(95% IC)	1,0(referência)	1,6 (0,8-3,22)	0,64 (0,11-3,59)
F + P + CP (n=97)	70 (72,2)	22 (22,7)	5 (5,1)
Sem doenças (n=21)	18 (85,7)	3 (14,3)	0
P		0,4	0,6
OR (95% IC)	1,0(referência)	1,89 (0,51-7,0)	—*

CP = cirrose e pancreatite; F+P=alcoolistas com doenças no fígado + alcoolistas com pancreatite; F+CP=alcoolistas com doenças no fígado + alcoolistas com cirrose e pancreatite; P+CP= alcoolistas com pancreatite + alcoolistas com cirrose e pancreatite; F+P+CP= alcoolistas com doenças no fígado + alcoolistas com cirrose e pancreatite + alcoolistas com pancreatite; *P* = os valores foram calculados usando o teste de probabilidade de Fischer; OR= "odds ratio", IC= intervalo de confiança; * OR não calculada devido a número insuficiente, ^a = estatisticamente significativo.

Tabela 11 Distribuição e frequência dos genótipos CYP2D6 entre os grupos de alcoolistas e controles e entre os grupos de alcoolistas

	CYP2D6		
	w/w	w/m	m/m
Doenças no fígado (n=63)	48 (76,2)	12 (19,0)	3 (4,8)
Controles (n=91)	69 (75,8)	22 (24,2)	0
P		p=0,69	0,07
OR(95% IC)	1,0(referência)	0,78 (0,35-1,73)	—*
Pancreatite (n=25)	19 (76,0)	5 (20,0)	1 (4,0)
Controles (n=91)	69 (75,8)	22 (24,1)	0
P		1,0	0,22
OR(95% IC)	1,0(referência)	0,82 (0,28-2,47)	—*
Sem Doenças (n=21)	18 (85,7)	3 (14,2)	0
Controles (n=91)	69 (75,8)	22 (24,2)	0
P		0,40	1,0
OR(95% IC)	1,0(referência)	0,52 (0,14-1,94)	—*
CP (n=3)	3 (100,0)	0	0
Controles (n=91)	69 (75,8)	22 (24,2)	0
P		1,0	1,0
OR(95% IC)	1,0(referência)	—*	—*
F + P (n=88)	67 (76,1)	17 (19,3)	4 (4,6)
Controles (n=91)	69 (75,8)	22 (24,2)	0
P		0,59	0,12
OR(95% IC)	1,0(referência)	0,80 (0,39-1,63)	—*
Doenças no fígado (n=63)	48 (76,2)	12 (19,0)	3 (4,8)
Pancreatite (n=25)	19 (76,0)	5 (20,0)	1 (4,0)
P		1,0	1,0
OR(95% IC)	1,0(referência)	0,95 (0,29-3,06)	1,19 (0,11-12,14)
F + P (n=88)	67 (76,1)	17 (19,3)	4 (4,6)
Sem doenças (n=21)	18 (85,7)	3 (14,2)	0
P		0,76	0,58
OR(95% IC)	1,0(referência)	1,52 (0,40-5,77)	—*
Doenças no fígado (n=63)	19 (76,2)	12 (19,0)	3 (4,8)
Sem doenças (n=21)	18 (85,7)	3 (14,2)	0
P		0,75	0,56
OR(95% IC)	1,0(referência)	1,5 (0,38-5,94)	—*
Pancreatite (n=25)	19 (76,0)	5 (20,0)	1 (4,0)
Sem Doenças (n=21)	18 (85,7)	3 (14,2)	0
P		0,7	1,0
OR(95% IC)	1,0(referência)	1,58 (0,33-7,59)	—*
F + CP (n=66)	51 (77,2)	12 (19,0)	3 (4,8)
Controles (n=91)	69 (75,8)	22 (24,2)	0
P		0,55	0,08
OR(95% IC)	1,0(referência)	0,74 (0,33-1,63)	—*
P + CP (n=28)	22 (78,5)	5 (17,8)	1 (3,5)
Controles (n=91)	69 (75,8)	22 (24,2)	0
P		0,61	0,25
OR(95% IC)	1,0(referência)	0,71 (0,24-2,11)	—*
CP (n=3)	3 (100,0)	0	0
Sem doenças (n=21)	18 (85,7)	3 (14,2)	0
P		1,0	1,00
OR(95% IC)	1,0(referência)	—*	—*

Tabela 11 CYP2D6 (continuação)

	CYP2D6		
	w/w	w/m	m/m
F + CP + P (n=91)	70 (76,9)	22 (24,1)	4 (4,3)
Controles (n=91)	69 (75,8)	22 (24,2)	0
P		1,0	0,12
OR(95% IC)	1,0(referência)	0,99 (0,50-1,94)	___*
F + CP (n=66)	51 (77,2)	12 (19,0)	3 (4,8)
Sem doenças (n=21)	18 (85,7)	3 (14,2)	0
P		0,75	0,57
OR(95% IC)	1,0(referência)	1,41 (0,36-5,58)	___*
P + CP (n=28)	22 (78,5)	5 (17,8)	1 (3,5)
Sem doenças (n=21)	18 (85,7)	3 (14,2)	0
P		1,0	1,0
OR(95% IC)	1,0(referência)	1,36 (0,29-6,50)	___*
F + CP + P (n=91)	70 (76,9)	22 (24,1)	4 (4,3)
Sem doenças (n=21)	18 (85,7)	3 (14,2)	0
P		0,4	0,58
OR(95% IC)	1,0(referência)	1,89 (0,51-7,01)	___*

CP = cirrose e pancreatite; F+P=alcoolistas com doenças no fígado + alcoolistas com pancreatite; F+CP=alcoolistas com doenças no fígado + alcoolistas com cirrose e pancreatite; P+CP= alcoolistas com pancreatite + alcoolistas com cirrose e pancreatite; F+P+CP= alcoolistas com doenças no fígado + alcoolistas com cirrose e pancreatite + alcoolistas com pancreatite; P = os valores foram calculados usando o teste de probabilidade de Fischer; OR= "odds ratio", IC= intervalo de confiança; * OR não calculada devido a número insuficiente.

TABELA 12: Distribuição e frequência dos genótipos CYP2E1 entre os grupos de alcoolistas e controles e entre os grupos de alcoolistas

	CYP2E1		
	c1/c1	c1/c2	c2/c2
Doenças no fígado (n=53)	48 (90,5)	5 (9,4)	0
Controles (n=108)	100 (92,5)	8 (8,0)	0
P		1,36	
OR(95% IC)	1,0(referência)	1,3 (0,4-4,2)	___*
Pancreatite (n=20)	16 (80,0)	3 (15,0)	1 (5,0)
Controles (n=108)	100 (92,5)	8 (8,0)	0
P		0,21	0,14
OR(95% IC)	1,0(referência)	2,34 (0,56-9,78)	___*
Sem Doenças (n=17)	17 (100,0)	0	0
Controles (n=108)	100 (92,5)	8 (8,0)	0
P		0,6	
OR(95% IC)	1,0(referência)	___*	___*
CP (n=3)	3 (100,0)	0	0
Controles (n=108)	100 (92,5)	8 (8,0)	0
P		1,0	
OR(95% IC)	1,0(referência)	___*	___*
F + P (n=73)	64 (87,7)	8 (11,0)	1 (1,3)
Controles (n=108)	100 (92,5)	8	0
P		0,43	1,00
OR(95% IC)	1,0(referência)	1,56 (0,56-4,37)	___*

Doenças no fígado (n=53)	48 (90,5)	5 (9,4)	0
Pancreatite (n=20)	16 (80,0)	3 (15,0)	1 (5,0)
P		0,43	1,00
OR(95% IC)	1,0(referência)	0,56 (0,12-2,59)	___*
F + P (n=72)	64 (88,88)	8 (11,11)	1 (1,3)
Sem doenças (n=17)	17 (100,0)	0	0
P		0,34	1,00
OR(95% IC)	1,0(referência)	___*	
Doenças no fígado (n=53)	48 (90,5)	5 (9,4)	0
Sem doenças (n=17)	17 (100,0)	0	0
P		0,32	___*
OR(95% IC)	1,0(referência)	___*	
Pancreatite (n=20)	16 (80,0)	3 (15,0)	1 (5,0)
Sem Doenças (n=17)	17 (100,0)	0	0
P		0,23	
OR(95% IC)	1,0(referência)	___*	___*
F + CP (n=56)	51 (91,0)	5 (9,0)	0
Controles (n=108)	100 (92,5)	8 (7,5)	0
P		0,76	1,00
OR(95% IC)	1,0(referência)	1,22 (0,38-3,94)	___*
P + CP (n=23)	19 (82,6)	3 (13,0)	1 (4,4)
Controles (n=108)	100 (92,5)	8 (7,5)	0
P		0,6	1,00
OR(95% IC)	1,0(referência)	1,97 (0,48-8,12)	___*
CP (n=3)	3 (100,0)	0	0
Sem doenças (n=17)	17 (100,0)	0	0
P		1,0	
OR(95% IC)	1,0(referência)	___*	___*
F + P + CP (n=76)	67 (88,2)	8 (10,5)	1 (1,3)
Controles (n=108)	100 (92,5)	8 (7,5)	0
P		0,44	0,4
OR(95% IC)	1,0(referência)	1,49 (0,53-4,17)	___*
F + CP (n=56)	51 (91,0)	5 (9,0)	0
Sem doenças (n=17)	17 (100,0)	0	0
P		0,58	1,00
OR(95% IC)	1,0(referência)	___*	___*
P + CP (n=23)	19 (82,6)	3 (13,0)	1 (4,4)
Sem doenças (n=17)	17 (100,0)	0	0
P		0,6	1,00
OR(95% IC)	1,0(referência)	1,97 (0,48-8,12)	___*
F + P + CP (n=76)	67 (88,1)	8 (10,5)	1
Sem doenças (n=17)	17 (100,0)	0	0
P		0,34	1,00
OR(95% IC)	1,0(referência)	___*	___*

CP = cirrose e pancreatite; F+P=alcoolistas com doenças no fígado + alcoolistas com pancreatite; F+CP=alcoolistas com doenças no fígado + alcoolistas com cirrose e pancreatite; P+CP= alcoolistas com pancreatite + alcoolistas com cirrose e pancreatite; F+P+CP= alcoolistas com doenças no fígado + alcoolistas com cirrose e pancreatite + alcoolistas com pancreatite; P = os valores foram calculados usando o teste de probabilidade de Fischer; OR= "odds ratio", IC= intervalo de confiança; * OR não calculada devido a número insuficiente.

Tabela 13: Distribuição e comparação das frequências dos genótipos GSTM1 e GSTT1 entre os grupos de alcoolistas e controles e entre os grupos de alcoolistas.

	GSTM1		GSTT1	
	Presente	Nulo	Presente	Nulo
Doenças no fígado (n=70)	45 (64,3)	25 (35,7)	36 (51,4)	34 (48,6)
Controles (n=114)	62 (54,4)	52 (45,6)	75 (65,8)	39 (51,4)
P		0,22		0,50
OR(95% IC)	1,0(referência)	0,66(0,36-1,22)	1,0(referência)	0,67 (0,26-1,73)
Pancreatite (n=27)	18 (66,7)	9 (33,3)	20 (74,0)	7 (26,0)
Controles (n=114)	62 (54,4)	52 (45,6)	75 (65,8)	39 (51,4)
P		0,28		0,06
OR(95% IC)	1,0(referência)	0,60(0,25-1,44)	1,0(referência)	1,81 (0,99-3,35)
Sem Doenças (n=18)	7 (38,9)	11 (61,1)	12 (66,7)	6 (33,3)
Controles (n=114)	62 (54,4)	52 (45,6)	75 (65,8)	39 (51,4)
P		0,31		1,0
OR(95% IC)	1,0(referência)	1,87(0,68-5,18)	1,0(referência)	0,96(0,33-2,76)
F + P (n=97)	63 (65,0)	34 (35,0)	56 (57,7)	41 (42,3)
Controles (n=114)	62 (54,4)	52 (45,6)	75 (65,8)	39 (51,4)
P		0,12		0,26
OR(95% IC)	1,0(referência)	0,64(0,37-1,12)	1,0(referência)	1,41(0,8-2,46)
F + P (n=97)	63 (65,0)	34 (35,0)	56 (57,7)	41 (42,3)
Sem doenças (n=18)	7 (38,9)	11 (61,1)	12 (66,7)	6 (33,3)
P		0,06		0,6
OR(95% IC)	1,0(referência)	0,34(0,12-0,97)	1,0(referência)	1,46(0,51-4,22)
Doenças no fígado (n=70)	45 (64,3)	25 (35,7)	36 (51,4)	34 (48,6)
Pancreatite (n=27)	18 (66,7)	9 (33,3)	20 (74,0)	7 (26,0)
P		1,0		0,06
OR(95% IC)	1,0(referência)	1,11(0,43-2,84)	1,0(referência)	(2,7(1,01-7,20)
Doenças no fígado (n=70)	45 (64,3)	25 (35,7)	36 (51,4)	34 (48,6)
Sem doenças (n=18)	7 (38,9)	11 (61,1)	12 (66,7)	6 (33,3)
P		0,06		0,3
OR(95% IC)	1,0(referência)	0,35(0,12-1,03)	1,0(referência)	1,89(0,64-5,6)
Pancreatite (n=27)	18 (66,7)	9 (33,3)	20 (74,0)	7 (26,0)
Sem Doenças (n=18)	7 (38,9)	11 (61,1)	12 (66,7)	6 (33,3)
P		0,07		0,74
OR(95% IC)	1,0(referência)	0,32(0,09-1,1)	1,0(referência)	0,7(0,19-2,58)
F + CP (n=73)	46	27	38	35
Controles (n=114)	62 (54,4)	52 (45,6)	75 (65,8)	39 (51,4)
P		0,29		0,07
OR(95% IC)	1,0(referência)	0,65(0,35-1,19)	1,0(referência)	1,77(0,97-3,23)
F + CP (n=73)	46	27	38	35
Sem doenças (n=18)	7 (38,9)	11 (61,1)	12 (66,7)	6 (33,3)
P		0,11		0,3
OR(95% IC)	1,0(referência)	0,37(0,13-1,08)	1,0(referência)	1,8(0,62-5,44)
P+ CP (n=30)	19 (63,3)	11 (36,7)	22 (73,3)	8 (26,7)
Controles (n=114)	62 (54,4)	52 (45,6)	75 (65,8)	39 (51,4)
P		0,41		0,51
OR(95% IC)	1,0(referência)	0,69(0,3-1,58)	1,0(referência)	0,7(0,29-1,71)
P + CP (n=30)	19 (63,3)	11 (36,7)	22 (73,3)	8 (26,7)
Sem doenças (n=18)	7 (38,9)	11 (61,1)	12 (66,7)	6 (33,3)
P		0,14		0,74
OR(95% IC)	1,0(referência)	0,37(0,11-1,23)	1,0(referência)	0,73(0,2-2,59)
F + CP + P (n=100)	64 (64,0)	36 (36,0)	58 (58,0)	42 (42,0)
Controles (n=114)	62 (54,4)	52 (45,6)	75 (65,8)	39 (51,4)
P		0,17		0,26
OR(95% IC)	1,0(referência)	0,67(0,39-1,16)	1,0(referência)	1,39(0,8-2,42)
F + CP + P (n=100)	64 (64,0)	36 (36,0)	58 (58,0)	42 (42,0)
Sem doenças (n=18)	7 (38,9)	11 (61,1)	12 (66,7)	6 (33,3)
P		0,36		0,6
OR(95% IC)	1,0(referência)	(0,13-1,0)	1,0(referência)	1,45(0,5-4,17)
CP (n=3)	1 (33,3)	2 (66,7)	2 (66,7)	1 (33,3)
Controles (n=114)	62 (54,4)	52 (45,6)	75 (65,8)	39 (51,4)
P		0,6		1,0
OR(95% IC)	1,0(referência)	2,38(0,21-27,05)	1,0(referência)	0,96(0,08-10,94)
CP (n=3)	1 (33,3)	2 (66,7)	2 (66,7)	1 (33,3)
Sem doenças (n=18)	7 (38,9)	11 (61,1)	12 (66,7)	6 (33,3)
P		1,0		1,0
OR(95% IC)	1,0(referência)	1,27(0,1-16,81)	1,0(referência)	1,0(0,07-13,37)

Nulo = deleção homozigota; CP = cirrose e pancreatite; F+P=alcoolistas com doenças no fígado + alcoolistas com pancreatite; F+CP=alcoolistas com doenças no fígado + alcoolistas com cirrose e pancreatite; P+CP= alcoolistas com pancreatite + alcoolistas com cirrose e pancreatite; F+CP+P= alcoolistas com doenças no fígado + alcoolistas com cirrose e pancreatite + alcoolistas com pancreatite; *P* = os valores foram calculados usando o teste de probabilidade de Fischer; OR= "odds ratio", IC= intervalo de confiança; * OR não calculada devido a número insuficiente.

Tabela 14 Distribuição dos grupos de alcoolistas em relação aos genes CYP1A1 (polimorfismo MspI), CYP2D6 (polimorfismo BstN1) de acordo com o hábito tabagista

GENÓTIPO	NÚMERO/TOTAL (%)		OR (95% IC)	P
	FUMANTE	NÃO-FUMANTE		
CYP1A1 m1/m1				
Doenças fígado	17/24 (70,8)	22/33 (66,7)	1,00 (referência)	
Pancreatite	12/16 (75,0)	5/9 (55,6)	1,00 (referência)	
CP	1/2 (50,0)	1/1 (100,0)	1,00 (referência)	
Sem doenças	16/19 (84,2)	2/2 (100,0)	1,00 (referência)	
CYP1A1 m1/m2				
Doenças fígado	5/24 (20,8)	9/33 (27,3)	0,72 (0,2-2,54)	0,76
Pancreatite	4/16 (25,0)	3/9 (33,3)	0,56 (0,09-3,44)	0,65
CP	1/2 (50,0)	0	—*	1,00
Sem doenças	3/19 (15,8)	0	—*	1,00
CYP1A1 m2/m2				
Doenças fígado	2/24 (8,4)	2/33 (6,0)	1,29(0,16-10,15)	1,00
Pancreatite	0	1/9 (11,1)	—*	1,00
CP	0	0	—*	1,00
Sem doenças	0	0	—*	1,00
CYP2D6 w/w				
Doenças fígado	20/22 (91,0)	28/41 (68,3)	1,00 (referência)	
Pancreatite	12/17 (70,6)	7/8 (87,5)	1,00 (referência)	
CP	2/2 (100,0)	1/1 (100,0)	1,00 (referência)	
Sem doenças	13/19 (68,4)	0	1,00 (referência)	
CYP2D6 w/m				
Doenças fígado	2/22 (9,0)	10/41 (24,4)	0,28 (0,06-1,42)	0,18
Pancreatite	4/17 (23,5)	1/8 (12,5)	2,33(0,22-25,25)	0,63
CP	0	0	—*	0,33
Sem doenças	6/19 (31,6)	1/1 (100,0)	—*	0,3
CYP2D6 m/m				
Doenças fígado	0	3/41 (7,3)	—*	0,27
Pancreatite	1/17 (5,9)	0	—*	1,00
CP	0	0	—*	1,00
Sem doenças	0	0	—*	1,00

m1/m1= ausência do alelo mutante; m1/m2= heterozigoto; m2/ m2= homozigoto para o alelo mutante; w/w = ausência do alelo mutante; w/m = heterozigoto; m/m = homozigoto para o alelo mutante; *P* = os valores foram calculados usando o teste de probabilidade de Fischer; OR= "odds ratio", IC= intervalo de confiança; * OR não calculada devido a número insuficiente.

TABELA 15: Distribuição dos grupos de alcoolistas em relação aos genes CYP2E1 (polimorfismo PstI), GSTM1, GSTT1 e DRD2 (polimorfismo TaqA1) de acordo com o hábito tabagista

GENÓTIPO	NÚMERO/TOTAL (%)		OR (95% IC)	P
	FUMANTE	NÃO-FUMANTE		
CYP2E1 c1/c1				
Doenças Fígado	16/19 (84,2)	20/22 (91,0)	1,00 (referência)	
Pancreatite	12/13 (92,3)	4/6 (66,7)	1,00 (referência)	
CP	2/2 (100,0)	1/1 (100,0)	1,00 (referência)	
Sem doenças	15/15 (100,0)	2/2 (100,0)	1,00 (referência)	
CYP2E1 c1/c2				
Doenças Fígado	3/19 (15,8)	2/22 (9,0)	1,88 (0,28-12,6)	0,64
Pancreatite	1/13 (7,7)	2/6 (33,3)	0,17 (0,01-2,37)	0,22
CP	0	0	—*	1,00
Sem doenças	0	0	—*	1,00
CYP2E1 c2/c2				
Doenças Fígado	0	0	—*	1,00
Pancreatite	0	1/1 (100,0)	—*	1,00
CP	0	0	—*	1,00
Sem doenças	0	0	—*	1,00
GSTM1 presente				
Doenças Fígado	20/28 (71,4)	25/42 (59,5)	1,00 (referência)	
Pancreatite	12/18 (66,7)	6/9 (66,7)	1,00 (referência)	
CP	1/2 (50,0)	0	1,00 (referência)	
Sem doenças	8/18 (44,4)	0	1,00 (referência)	
GSTM1 nulo				
Doenças Fígado	8/28 (28,6)	17/42 (40,5)	0,59 (0,21-1,64)	0,44
Pancreatite	6/18 (33,3)	3/9 (33,3)	1,0 (0,18-5,46)	1,00
CP	1/2 (50,0)	1/1 (100,0)	—*	1,00
Sem doenças	10/18 (55,6)	2/2 (100,0)	—*	0,5
GSTT1 Presente				
Doenças Fígado	17/28 (60,7)	20/42 (47,6)	1,00 (referência)	
Pancreatite	12/18 (66,7)	8/9 (88,8)	1,00 (referência)	
CP	1/2 (50,0)	1/1 (100,0)	1,00 (referência)	
Sem doenças	12/16 (75,0)	0	1,00 (referência)	
GSTT1 nulo				
Doenças Fígado	11/28 (39,3)	22/42 (52,4)	0,59 (0,22-1,55)	0,33
Pancreatite	6/18 (33,3)	1/9 (11,2)	4 (0,4-39,83)	0,36
CP	1/2 (50,0)	0	—*	0,1
Sem doenças	4/18 (25,0)	2/2 (100,0)	—*	1,00
DRD2				
A1/A1	7/51 (13,7)	3/42 (7,1)	1,00 (referência)	
A1/A2	14/51 (27,4)	17/42 (40,5)	0,6 (0,25-1,48)	0,4
A2/A2	30/51 (58,9)	22/42 (52,4)	1,71 (0,4-7,37)	0,73

Nulo = deleção homozigota; c1/c1= ausência do alelo mutante; c1/c2= heterozigoto; c2/ c2= homozigoto para o alelo mutante; A1/A1 = homozigoto para o alelo mutante; A1/A2 = heterozigoto; A2/A2 = ausência do alelo mutante; P = os valores foram calculados usando o teste de probabilidade de Fischer; OR= "odds ratio", IC= intervalo de confiança; * OR não calculada devido a número insuficiente.

TABELA 16: Frequências dos alelos selvagens e mutantes para os genes CYP2D6 (polimorfismo BstN1), CYP2E1 (polimorfismo PstI) e CYP1A1 nos diferentes grupos de alcoolistas e controles

	Frequências Alélicas					
	CYP2D6 – BstN1		CYP2E1 – PstI		CYP1A1 - MspI	
	w	m	c1	c2	m1	m2
Alcoolistas com doenças no fígado	0,953	0,047	0,953	0,047	0,836	0,164
Alcoolistas com pancreatite	0,86	0,14	0,875	0,125	0,834	0,166
Alcoolistas CP	1,00	0	1,00	0	0,833	0,167
Alcoolistas sem doenças	0,928	0,072	1,00	0	0,929	0,071
Controles	0,879	0,121	1,00	0	0,901	0,099

TABELA 17: Distribuição dos genótipos para DRD2 em relação à continuidade do consumo de álcool.

GENÓTIPO DRD2	NÚMERO/TOTAL (%)		OR (95% IC)	P
	Uso Corrente de etanol	Abstinentes		
A1/A1	5/44 (11,4)	5/49(10,2)	1,36 (0,35-5,29)	0,73
A1/A2	17/44 (38,6)	14/49 (28,6)	1,66 (0,68-4,06)	0,4
A2/A2	22/44 (50,0)	30/49 (61,2)	1,00 (referência)	

TABELA 18: Distribuição dos genótipos DRD2 (polimorfismo TaqA1) nos alcoolistas em relação à idade de início do consumo de álcool e ao tempo de consumo de álcool

GENÓTIPO DRD2	IDADE DE INÍCIO DO CONSUMO DE ALCOOL ± EPM	TEMPO DE CONSUMO DE ALCOOL ± EPM
A1/A1	17,1 ± 1,1	30,0 ± 3,75
A1/A2	16,5 ± 1,0	35,0 ^a ± 2,61
A2/A2	16,7 ± 1,1	28,2 ± 1,4

EPM = erro padrão da média; ^a = estatisticamente diferente dos homozigotos A2/A2 (p <0,05).

TABELA 19 : Distribuição dos genótipos CYP1A1, CYP2D6, CYP2E1, GSTM1 e GSTT1 e da frequência de micronúcleo nos alcoolistas e controles.

Código	Células com micronúcleo em 2000 células analisadas	Porcentagem de células binucleadas com micronúcleo	CYP1A1	CYP2D6	CYP2E1	GSTM1	GSTT1
Alcoolistas cirróticos							
P002	35	1,75	m1/m2	w/w	c1/c1	-	-
P009	38	1,9	m1/m1	w/m	c1/c1	+	+
P010	20	1	m1/m1	w/w	c1/c1	-	+
P011	57	2,85	m1/m1	w/w	c1/c1	+	+
P014	52	2,6	m1/m1	w/w	c1/c1	+	+
P016	38	2,4	m1/m1	w/w	c1/c1	+	-
P018	36	1,8	m1/m1	w/w	c1/c1	+	-
P025	25	1,25	m1/m1	w/w	c1/c1	+	-
P028	39	1,95	m1/m1	w/w	c1/c1	+	-
P031	49	2,45	m1/m1	w/w	c1/c1	+	+
P032	26	1,3	m1/m1	w/w	c1/c1	+	-
P033	32	1,6	m1/m1	w/m	c1/c1	+	-
P034	47	2,35	m1/m1	w/w	c1/c1	+	-
P035	37	1,85	m1/m1	w/m	c1/c1	-	-
P039	24	1,15	m1/m1	w/w	c1/c1	-	-
P049	9	0,45	m1/m1	w/w	c1/c1	+	+
P059	25	1,25	m1/m1	w/w	c1/c1	+	+
P064	24	1,2	m1/m1	w/w	c1/c1	+	+
P072	22	1,1	m1/m1	w/w	c1/c1	+	-
P073	25	1,25	m1/m2	w/w	c1/c1	+	+
P078	27	1,35	m1/m1	w/w	c1/c1	-	+
P079	23	1,15	m1/m1	w/w	c1/c1	-	-
P083	20	1	m1/m1	w/w	c1/c1	+	+
P087	29	1,45	m1/m1	w/w	c1/c2	+	+
Alcoolistas pancreáticos							
P027	32	1,6	m1/m1	w/w	c1/c1	+	-
P042	34	1,7	m1/m2	w/w	c2/c2	+	+
P043	17	0,85	m1/m1	w/w	c1/c1	-	+
P044	24	1,2	m1/m1	w/m	c1/c1	-	+
P053	28	1,4	m1/m1	w/w	c1/c1	+	+
P060	28	1,4	m1/m1	w/w	c1/c1	+	+
P061	25	1,25	m1/m1	w/w	c1/c1	-	-
P065	8	0,4	m1/m1	w/w	c1/c1	-	+
P068	30	1,5	m1/m1	w/w	c1/c1	+	+
P069	31	1,55	m1/m1	w/w	c1/c1	+	+
P070	13	0,65	m1/m1	w/w	c1/c2	+	+
P074	28	1,4	m1/m1	w/w	c1/c1	-	+
P075	25	1,25	m1/m1	w/m	c1/c1	+	+
P076	12	0,6	m1/m2	w/m	c1/c1	+	+
P080	33	0,9	m1/m2	w/w	c1/c1	+	-
Alcoolistas sem evidência de doença no fígado e no pâncreas							
P037	25	1,25	m1/m1	w/w	c1/c1	-	-
P038	23	1,15	m1/m1	w/w	c1/c1	-	-
P058	32	1,6	m1/m1	w/w	c1/c1	-	+
P089	7	0,35	m1/m1	w/w	c1/c1	-	+
P090	12	0,6	m1/m1	w/m	c1/c1	+	+
P091	12	0,6	m1/m2	w/w	c1/c1	-	-

Tabela 20: Distribuição e comparação dos genótipos CYP1A1, CYP2D6, CYP2E1,GSTM1 e GSTT1 em relação à média de células com micronúcleo (MN) analisadas

Lócus	Genótipo	Média de células com MN		P
		Alcoolistas com doenças (n=39)	Alcoolistas sem doenças (n=6)	
CYP1A1	m1/m1	29,1 ± 1,91	19,8 ± 4,5	0,5
	m1/m2	27,8 ± 4,33	12,0	
	m2/m2	-	-	
CYP2D6	w/w	29,1 ± 1,94	19,8 ± 4,53	0,38
	w/m	28,0 ± 3,99	12,0	
	m/m	-	-	
CYP2E1	c1/c1	29,2 ± 1,82	18,5 ± 3,92	
	c1/c2	21,0 ± 8,0		
	c2/c2	34,0		
GSTM1	Presente	30,7 ± 2,15	12,0	0,18
	Nulo	24,4 ± 2,41	19,8 ± 4,53	
GSTT1	Presente	27,2 ± 2,53	17,0 ± 7,64	1,00
	Nulo	31,6 ± 1,87	20,0 ± 4,04	

5. DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS

Um dos objetivos deste trabalho foi avaliar os danos provocados ao material genético pelo consumo pesado de álcool. Para tanto, foram coletados sangues de alcoolista pesados, ainda em uso contínuo de álcool, ou abstinentes há mais de um ano. Esses grupos foram comparados com indivíduos controles, sadios, não-alcoolistas.

A análise de aberrações cromossômicas tem sido largamente utilizada na avaliação dos efeitos mutagênicos do abuso de álcool em humanos (Maffei *et al.*, 2000). Aumentos significativos na frequência aberrações cromossômicas estruturais e numéricas têm sido observados nos linfócitos de alcoolistas crônicos quando comparados a controles (Maffei *et al.*, 2000; Burim *et al.*, 2004).

A análise dos dados deste trabalho revelou diferenças estatisticamente significativas no IM do grupo de alcoolistas não-fumantes (4,71) e o grupo dos controles não-fumantes (3,24) sugerindo um efeito do álcool no ciclo celular. No entanto, esta diferença significativa não foi encontrada entre os grupos de fumantes, nem quando os alcoolistas foram classificados em relação à quantidade de álcool consumida diariamente.

Também não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas quanto à frequência de aberrações cromossômicas entre o grupo de alcoolistas e os controles. O grupo de alcoolistas crônicos (em uso corrente de álcool) apresentou uma frequência maior de ACs (2,47 AC/100 células) do que os alcoolistas abstinentes (2,36 AC/100 células) e do que os controles (1,91 AC/100 células), porém, essas diferenças também não foram estatisticamente significativas. Embora alguns trabalhos relatem que as frequências de ACs em alcoolistas em abstinência se tornam similares às do grupo controle (Maffei *et al.*, 2002;), outros relatam que essa diminuição na frequência de ACs não ocorreu (Burim *et al.*, 2004; Gattás e Saldanha, 1997), sugerindo uma persistência de danos mesmo após a interrupção do consumo de álcool.

A frequência de ACs nos alcoolistas fumantes (3,45 AC/100 células) foi maior do que nos controles não-fumantes (1,68 AC/100 células), porém esta diferença não foi encontrada entre os alcoolistas fumantes e controles fumantes, excluindo desta forma, um efeito sinérgico entre cigarro e consumo de álcool.

Essa ausência de um efeito sinérgico entre álcool e cigarro pode ter vários motivos. Um deles conceitua o papel da enzima CYP2E1. Esta enzima, induzida pelo alto consumo de álcool, além de participar do metabolismo do etanol, participa do metabolismo de vários xenobióticos, entre eles, o cigarro. Pode acontecer que devido a presença de grandes quantidades de etanol, o metabolismo do cigarro seja inibido, sugerindo uma competição por uma via comum, o sistema microssomal de oxidação (MEOS) (Lieber, 1998).

Vários trabalhos utilizam um número maior de células analisadas por indivíduo (Burim *et al.*, 2004; Wojda *et al.*, 2006) do que o utilizado neste trabalho (100 metáfases/indivíduo), o que poderia sugerir que a falta de diferenças significativas entre os grupos de alcoolistas e controles foi devido a um número insuficiente de células analisadas. No entanto, outros trabalhos que também utilizaram 100 células/indivíduo conseguiram encontrar diferenças entre os grupos estudados (Tuimala *et al.*, 2004; Maffei *et al.*, 2002; Boffetta *et al.*, 2006; Hagmar *et al.*, 2004; Sram *et al.*, 2006) excluindo essa possibilidade.

5.2. ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS

A suscetibilidade ao desenvolvimento de doenças nos indivíduos que consomem álcool deve-se a vários fatores, entre os quais modificações nos genes que codificam para enzimas que atuam na metabolização de xenobióticos (Autrup, 2000).

A variabilidade inter-individual no metabolismo de xenobióticos e resposta a drogas é extensa. A quantificação de nível de uma droga no sangue pode variar 1000 vezes ou mais entre dois indivíduos com o mesmo peso e mesma dosagem consumida. Acredita-se que fatores genéticos seriam responsáveis por 20 a 40% desta variabilidade de resposta (Ingelman-Sundberg, 2001).

Essa variação inter-individual no metabolismo de carcinógenos tem sido reconhecida como um determinante da suscetibilidade a vários tipos de câncer. Os polimorfismos genéticos representam uma fonte em potencial para explicar essa variação (Goth-Goldstein *et al.* 2000). O conhecimento dos vários polimorfismos humanos, principalmente nas regiões codificadoras, representaria um passo de grande importância para o entendimento de doenças, bem como para a variação de respostas a determinados tratamentos (Ingelman-Sundberg, 2001).

Alguns polimorfismos genéticos em enzimas que metabolizam xenobióticos podem funcionar como marcadores de exposição a compostos carcinogênicos e efeitos prematuros (Autrup, 2000).

Existem várias enzimas, que atuam principalmente no fígado, responsáveis pela metabolização e detoxificação de vários xenobióticos, entre eles, o etanol. Estas enzimas podem ser classificadas em: enzimas de fase I e fase II. Entre as enzimas da fase I destacam-se as da família do citocromo P450, as aldeído desidrogenases e as álcool desidrogenases. Entre as enzimas da fase II, destacam-se as glutatona S-transferases e as N-acetil transferases (Ingelman-Sundberg, 2001).

Os citocromos humanos P450 representam uma superfamília com pelo menos 50 genes diferentes, subdivididos em 10 famílias. Estas enzimas são importantes no metabolismo de ácidos graxos, esteróides e xenobióticos. A maioria dos genes que

codificam para essas enzimas são polimórficos (Autrup, 2000; Ingelman-Sundberg, 2001).

A enzima CYP1A1 ainda não possui um mecanismo fisiológico estabelecido. Acredita-se que tenha um papel importante no ciclo celular (Ingelman-Sundberg, 2001). Sabe-se, entretanto, que sua indução pode ocorrer por um mecanismo dependente de hidrocarbonos aromáticos, implicando em alguma etiologia nos casos de câncer de pulmão (Smith *et al.*, 2001). Já a CYP2E1 é uma enzima envolvida na produção de radicais livres derivados da oxidação do etanol (Dupont *et al.*, 2000). Esta enzima pode ser induzida pelo consumo de álcool (Griese *et al.* 2001) o que a torna muito interessante para nosso estudo.

Outra enzima de grande importância é a CYP2D6. O gene para esta enzima possui aproximadamente 80 polimorfismos descritos, incluindo duplicações e amplificações gênicas (Ingelman-Sundberg, 2001). Sabe-se que mais de 50 drogas como antidepressivos e opiáceos funcionam como substrato para essa enzima. Indivíduos com metabolização deficiente possuem um risco maior de desenvolver efeitos resultantes de altas concentrações de substratos e toxicidade (Griese *et al.* 2001).

As glutathionas S-transferases (GSTs) são conhecidas por catalisar a conjugação da glutathione (GSH) com diferentes espécies de compostos eletrofílicos. São uma parte importante do sistema de detoxificação celular e, talvez, podem estar envolvidas na proteção celular contra metabólitos de espécies reativas de oxigênio (Landi, 2000). Estas proteínas são encontradas em todos os sistemas procarióticos e eucarióticos, o que reforça sua importância no metabolismo celular. A enzima GSTM1 (classe μ) é altamente expressa no fígado. As variações inter-individuais na expressão da GSTM1 são devidas à deleção do gene (genótipo nulo) ou variação alélica. Aparentemente, o genótipo de GSTM1 influencia indiretamente a indução de CYP1A1 (Autrup, 2000). A enzima GSTT1 (classe θ) participa da detoxificação de óxidos de etileno e indivíduos com o genótipo GSTT1 nulo apresentam uma frequência maior de aberrações cromossômicas do que os indivíduos normais (Autrup, 2000).

Anormalidades no sistema dopaminérgico podem ser um dos fatores patogênicos que levam ao alcoolismo (Bowirrat e Oscar-Berman, 2005). O gene receptor de dopamina 2 (DRD2) tem sido associado a diversos estudos envolvendo alcoolistas e seus filhos (Furtado *et al.*, 2006). Este gene é considerado um forte candidato a elucidar os mecanismos que envolvem dependência ao álcool e outras drogas (Conner *et al.*, 2005).

Neste trabalho decidiu-se verificar a frequência dos genes CYP1A1, CYP2D6, CYP2E1, GSTM1 e GSTT1 em indivíduos alcoolistas e sua possível relação com o desenvolvimento de doenças no fígado e pâncreas. Foram coletadas amostras de sangue periférico de 125 indivíduos alcoolistas pesados (consumo de álcool > 60g/dia) subdivididos em alcoolistas com doenças no fígado (n = 72), alcoolistas com pancreatite (n = 27), alcoolistas com cirrose e pancreatite simultaneamente (n = 3) e alcoolistas sem evidência de doenças no fígado e pâncreas (n = 23) e 124 indivíduos controles. Também foi verificada a frequência do gene DRD2 nos indivíduos alcoolistas e sua possível relação com hábitos etilistas.

A enzima CYP1A1 é responsável pela catalisação da primeira etapa de metabolização dos hidrocarbonos policíclicos aromáticos (PAHs) em compostos eletrofílicos. O gene para esta enzima é induzido pela exposição a PAHs como benzopirenos (Ishigawa *et al.*, 2004). O polimorfismo CYP1A1-MspI é responsável pela expressão do gene CYP1A1. Este polimorfismo tem sido associado a um aumento na susceptibilidade de câncer de pulmão em asiáticos, mas resultados controversos foram encontrados em populações caucasianas e afro-americanas (Wenzlaff *et al.*, 2005). O polimorfismo MspI apresenta os genótipos homozigoto selvagem (m1/m1), heterozigoto (m1/m2) e homozigoto mutante (m2/m2). A forma variante do gene (com pelo menos um alelo mutado presente) resulta numa enzima com aumento de sua atividade, associada à formação de aductos no DNA e aumento no risco de carcinogênese (Aydin-Sayitoglu *et al.*, 2006).

Em nosso estudo foram encontradas diferenças nas frequências do genótipo m2/m2 entre os grupos estudados. O genótipo m2/m2 ocorreu com maior frequência nos alcoolistas com doenças no fígado (6%) e nos pancreáticos (3,6%) do que nos controles

(1,8%), porém essas diferenças não foram estatisticamente significativas. No entanto, quando comparados os grupos de alcoolistas entre si, verificou-se que o grupo formado por alcoolistas com doenças no fígado e alcoolistas pancreáticos apresentou uma maior frequência do genótipo m2/m2 (5,4%) do que os alcoolistas sem evidência de doenças no fígado e pâncreas ($p = 0,02$). A frequência do genótipo m1/m2 também foi maior no grupo de alcoolistas com doenças no fígado (20,9%), pâncreas (26,0%) e, cirrose e pancreatite (33,3%) do que nos alcoolistas sem evidência de doenças (14,3%) e controles (16%), apesar da falta de significância estatística. Esses dados sugerem um risco maior para o desenvolvimento de doenças no fígado e pâncreas para alcoolistas pesados que possuem o genótipo homozigoto mutante m2/m2. A presença do genótipo m2/m2 poderia aumentar a indução do gene, o que acarretaria num aumento do metabolismo da enzima, ou seja, a conversão de compostos químicos em metabólitos tóxicos.

A enzima CYP2D6 está envolvida no metabolismo de pelo menos, 20% dos medicamentos mais comumente administrados, como agentes cardiovasculares e antidepressivos, e sua ação ocorre principalmente nos hepatócitos (Komura e Iwaki, 2005). Esta enzima é altamente polimórfica, apresentando mais de 80 formas variantes que resultam em enzimas com capacidade de metabolização pobre, rápida e ultrarápida (Bogni *et al.*, 2005).

A expressão do mRNA de CYP2D6 ocorre, além do fígado, em vários tecidos extra hepáticos, como no epitélio, cérebro e células mononucleadas do sangue periférico (Carcillo *et al.*, 2003). Devido a sua importância no metabolismo de vários fármacos, o estudo de polimorfismos para a enzima CYP2D6 é de grande importância, uma vez que certas drogas, como o álcool, podem inibir a ação desta enzima.

O polimorfismo estudado neste trabalho foi o CYP2D6-BstN1. Este polimorfismo possui os genótipos homozigoto selvagem (w/w), heterozigoto (w/m) e homozigoto mutante (m/m). Os indivíduos com genótipo m/m são considerados metabolizadores pobres, uma vez que esta mutação causa a formação de uma proteína truncada.

Neste estudo o genótipo mutante m/m ocorreu apenas nos indivíduos alcoolistas com doenças no fígado (4,8%) e pancreáticos (4,0). No entanto, essas frequências não foram estatisticamente significativas apesar da frequência desse genótipo nos alcoolistas com doenças no fígado ter ficado próxima do nível de significância ($p = 0,07$).

Outro polimorfismo estudado neste trabalho foi o *CYP2E1-PstI*, localizado em regiões regularizadoras da transcrição e relacionado com a expressão gênica (Hayashi *et al.*, 1991). O etanol é principalmente oxidado para acetaldeído pela enzima álcool desidrogenase (ADH). No entanto, em alcoolistas crônicos o gene para a enzima CYP2E1 é induzido em até dez vezes após o consumo de bebidas alcoólicas, o que leva ao metabolismo do álcool via sistema microssomal de oxidação (MEOS) cujo componente principal é a enzima P450 (Lieber, 2003). Essa enzima também pode ser induzida pelo consumo de tabaco, mas vários estudos permanecem sem conclusão (Schoedel e Tyndale, 2003). O polimorfismo CYP2E1-PstI apresenta os genótipos homozigoto sem mutação c1/c1, heterozigoto c1/c2 e homozigoto mutante c2/c2. Acredita-se que a presença do alelo c2 aumenta a taxa de metabolização do álcool (Konishi *et al.*, 2003).

Pela importância da enzima CYP2E1 no metabolismo do álcool é possível existir uma associação entre os polimorfismos de CYP2E1 e ocorrência de doenças no fígado e pâncreas em alcoolistas crônicos.

Neste estudo não foram encontradas diferenças significativas nas ocorrências dos possíveis genótipos de risco c1/c2 e c2/c2 nos grupos de alcoolistas e grupo controle. No entanto, apesar da não significância estatística o genótipo c1/c2 ocorreu em 15% dos alcoolistas pancreáticos, 9,4% dos alcoolistas com doenças no fígado enquanto nos controles sua frequência foi de 7,4%. Além disso, o genótipo c2/c2 ocorreu apenas no grupo de alcoolistas pancreáticos (5%).

Resultados discrepantes são relatados em estudos com este polimorfismo. Verlaan *et al.* (2004) não encontraram associação do alelo c2 em alcoolistas com pancreatite enquanto Monzoni *et al.*, (2001) relataram uma associação entre o genótipo mutante c2/c2 e alcoolistas com doenças no fígado quando comparados com alcoolistas sem evidência de doenças.

O alelo c2 do polimorfismo *CYP2E1-PstI* tem uma frequência baixa na população caucasiana em geral (Burim, 2002; Raucy *et al.*, 1999) o que dificulta os cálculos estatísticos para se encontrar uma associação significativa. Para tanto, a amostra estudada tem que compreender um número bem maior de indivíduos dos que os que foram usados neste estudo.

Os genes *GSTM1* e *GSTT1* fazem parte do grupo de enzimas metabolizadoras de xenobióticos da fase II que são conhecidas como detoxificadoras devido a sua capacidade de neutralizar os compostos tóxicos produzidos pelas enzimas da fase I. A deleção em homozigose dessas enzimas (genótipos nulos) causa a formação de uma proteína não funcional.

Indivíduos com ambos os genótipos *GSTM1* ou *GSTT1* nulos apresentam aumento da sensibilidade dos efeitos citogenéticos de várias genotoxinas (Tuimala *et al.* 2002). Os genótipos nulos também estão relacionados com o aumento do risco de desenvolvimento de vários tipos de câncer.

Neste estudo não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos estudados que sugerissem um risco maior para o desenvolvimento de doenças no fígado e pâncreas de pacientes alcoolistas com os genótipos nulos para *GSTM1* e *GSTT1*. Da mesma forma, não foram encontradas diferenças significativas entre as frequências dos genes funcionais (genótipos *GSTM1+* e *GSTT1+*) que sugerissem alguma espécie de mecanismo protetor para o desenvolvimento dessas doenças decorrentes do consumo abusivo de etanol.

Assim como no caso de *CYP2E1*, vários estudos têm produzido resultados contraditórios para os polimorfismos de *GSTM1* e *GSTT1*, com a ressalva de que neste caso, a frequência dos genótipos nulos não é tão rara quanto o genótipo homozigoto mutante c2/c2 do gene *CYP2E1*. Brind *et al.* (2004) não conseguiu encontrar uma associação significativa entre os genótipos nulos de *GSTM1* e *GSTT1* e doenças do fígado em indivíduos alcoolistas, apesar de ter usado uma amostra grande (344 alcoolistas e 936 controles). Frenzer *et al.* (2002) também não conseguiu encontrar uma associação entre o genótipo nulo para *GSTT1* e pacientes com hepatite alcoólica. Entretanto, Harada

et al. (1993) e Baranov *et al.* (1996) encontraram um aumento no risco de desenvolvimento de cirrose alcoólica associada ao genótipo GSTM1 nulo.

O último polimorfismo estudado neste trabalho pertence a um gene neurotransmissor, o receptor 2 de dopamina. O polimorfismo TaqA1 do gene *DRD2* tem sido extensivamente alvo de estudos relacionados ao uso abusivo de álcool e outras substâncias, além de transtornos bipolares e comportamento anti-social (Szczepankiewicz *et al.*, 2006).

Neste estudo não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas em relação à frequência do genótipo mutante A1/A1 no grupo de alcoolistas e indivíduos controles. A frequência do genótipo A1/A1 é um motivo de controvérsias em vários trabalhos. Enquanto alguns estudos conseguem mostrar associações entre o genótipo A1/A1 e alcoolistas (Noble, 2003; Berggren *et al.* 2006; Connor *et al.*, 2007), outros apresentam resultados semelhantes aos obtidos neste estudo (Samochowiec *et al.*, 2006; Limosin *et al.*, 2002).

Quando a idade de início de consumo de álcool foi analisada, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos, que apresentaram uma idade de início de consumo de álcool bem semelhante. Kono *et al.* (1997) relataram uma associação entre a idade de início do consumo de álcool e o uso abusivo de álcool antes dos 25 anos em alcoolistas japoneses. Também não foram encontradas associações significativas entre a presença do alelo A1 e hábitos tabagistas, contrariando alguns estudos recentes (Connor *et al.*, 2007; Freire *et al.*, 2006).

Em relação ao tempo de consumo de bebidas alcoólicas foi encontrada uma associação significativa do genótipo heterozigoto A1/A2 e um maior tempo de consumo de álcool. Esses dados sugerem uma associação do alelo A1 com o tempo de exposição ao etanol. Curiosamente, o tempo de consumo de bebidas alcoólicas dos indivíduos A1/A1 não mostrou diferenças significativas com os indivíduos A2/A2, apesar do tempo de exposição dos indivíduos A1/A1 (tempo médio de consumo 30 anos) ter sido maior do que os indivíduos A2/A2. Este fato sugere que não há um efeito acumulativo do alelo A1 para um risco maior na questão tempo de consumo. Acredita-se que a presença de pelo

menos um alelo A1 já possa significar um aumento no risco para o álcool (Kono *et al.*, 1997; Connor *et al.*, 2007).

De acordo com os dados apresentados neste trabalho foram encontrados associações positivas entre os alcoolistas com doenças no fígado e os alcoolistas pancreáticos e a ocorrência do genótipo m2/m2. Também se obteve a sugestão de que o genótipo c2/c2 pode estar envolvido em um risco maior para o desenvolvimento de pancreatite e o alelo c2 para o desenvolvimento de doenças no fígado e pâncreas. Além disso, a possível associação da ocorrência do genótipo m/m para o gene CYP2D6 em alcoolistas com doenças no fígado. Além disso, obteve-se uma associação do genótipo heterozigoto A1/A2 do gene *DRD2* em indivíduos expostos há mais tempo ao consumo de álcool.

Este trabalho também correlacionou os diferentes polimorfismos com a frequência de células com micronúcleo, devido à importância de uma correlação entre marcadores citogenéticos de exposição e polimorfismos que conferem uma susceptibilidade maior ao desenvolvimento de doenças. Estudos sobre a relação entre genótipo e biomarcadores de efeito e exposição podem fornecer informações importantes sobre o risco da exposição humana a mutagênicos e carcinogênicos (Karahalil *et al.*, 2002).

Portanto, baseado nessas informações o presente estudo avaliou a possível relação entre o biomarcador micronúcleo e os diferentes polimorfismos CYP1A1, CYP2D6, CYP2E1, GSTM1 e GSTT1. Nenhum dos genótipos analisados apresentou uma diferença significativa na frequência de células com micronúcleo. Uma hipótese para este fato pode ter sido o tamanho da amostra de indivíduos alcoolistas sem evidência de doenças que foi muito pequena (apenas 6 indivíduos quando comparados aos 39 alcoolistas com doenças). Para descartar essa hipótese, um estudo está sendo realizado para aumentar o tamanho amostral.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi proposto avaliar os efeitos do consumo crônico e exagerado de bebidas alcoólicas sobre a frequência de aberrações cromossômicas em linfócitos de sangue periférico de alcoolistas, bem como verificar a possível associação de determinados polimorfismos para enzimas metabolizadoras de xenobióticos para o aumento da susceptibilidade ao desenvolvimento de cirrose hepática e pancreatite. Além disso, foi proposto avaliar a frequência do gene receptor de dopamina entre os alcoolistas. Os resultados apresentados permitem as seguintes conclusões:

1. Os alcoolistas não-fumantes apresentaram um valor de IM maior em relação aos controles não-fumantes.

2. O grupo de alcoolistas em abstinência apresentou uma frequência maior de ACs quando comparados aos controles, demonstrando a persistência dos danos causados pelo consumo abusivo de álcool mesmo após a interrupção do mesmo.

3. As frequências de ACs nos alcoolistas não sofreram variação dependente da quantidade de álcool consumida.

4. As frequências de ACs nos alcoolistas não se alteraram com o tempo de consumo de bebida alcoólica.

5. A associação entre os genótipos GSTM1 e GSTT1 nulos e o risco de desenvolvimento de cirrose hepática ou pancreatite não revelou aumento na susceptibilidade à estas doenças em alcoolistas.

6. Não foi encontrada associação significativa entre cirrose ou pancreatite e o alelo c2 para o gene *CYP2E1*.

7. Não foi encontrada associação significativa entre cirrose ou pancreatite e o alelo m para o gene *CYP2D6*.

8. O genótipo mutante para o gene *CYP1A1* foi associado ao desenvolvimento de cirrose hepática e pancreatite.

9. O alelo TaqA1 do gene DRD2 não foi encontrado numa maior frequência em alcoolistas.

10. O genótipo A1/A2 foi encontrado numa frequência significativamente maior em alcoolistas com maior tempo de consumo de bebidas alcoólicas.

11. Não foram encontradas associações entre a frequência de células com MN e os polimorfismos estudados.

7. RESUMO

O alcoolismo é uma doença multifatorial que consiste numa interação de influências genéticas e ambientais, sendo um dos principais causadores de danos à saúde. Deste modo, é muito importante a realização de estudos que envolvam a investigação de danos provocados ao material genético pelo consumo excessivo de bebidas alcoólicas bem como daqueles que investiguem a susceptibilidade individual às doenças causadas pelo alcoolismo. As aberrações cromossômicas e os polimorfismos para enzimas de metabolização de xenobióticos são importantes instrumentos para estes estudos. Neste trabalho foram investigados o possível efeito clastogênico do álcool e também a possível associação entre a ocorrência dos genótipos nulos GSTM1 e GSTT1 e dos polimorfismos CYP1A1-MspI, CYP2D6-BstNI e CYP2E1-PstI com o desenvolvimento de cirrose e pancreatite, além da frequência da mutação TaqA1 do gene DRD2 em alcoolistas. Os indivíduos analisados foram alcoolistas com consumo diário de álcool >60g. Para a análise de AC foram analisados 26 alcoolistas e 22 indivíduos controles. Para o estudo dos polimorfismos genéticos a amostra compreendeu 124 alcoolistas crônicos e 124 controles. Os alcoolistas não-fumantes apresentaram um valor de IM maior do que os controles não-fumantes ($p = 0,03$). As frequências de ACs nos alcoolistas não foram diferentes das do grupo controle. Não foram encontradas associações de risco entre os genótipos nulos dos genes GSTM1 e GSTT1, e os genótipos mutantes de CYP2D6 e CYP2E1, e o desenvolvimento de cirrose e pancreatite. O genótipo homozigoto mutante m2/m2 do gene CYP1A1 apresentou um risco significativo para o desenvolvimento de cirrose e pancreatite em alcoolistas. Não foram encontradas frequências significativas na ocorrência do alelo A1 do gene DRD2 em alcoolistas.

8. ABSTRACT

Alcoholism is a disease consisted of an interaction of genetic and environmental factors, being responsible for serious damage to human health. This way, studies that investigate damage caused by heavy consumption of alcohol as well those that investigate individual susceptibility originated by alcoholism are very important to our society. Chromosomal aberrations (CAs) and polymorphisms to xenobiotic metabolizing enzymes are important tools to these studies. In this work we investigated the possible clastogenic effect of alcohol and the possible association between the occurrence of null genotypes for GSTM1 and GSTT1 enzymes and polymorphisms CYP1A1-MspI, CYP2D6-BstNI and CYP2E1-PstI with the development of cirrhosis and pancreatitis. Furthermore, we investigate the possible association of TaqA1 polymorphism for DRD2 neurotransmitter in alcoholic. Our sample consisted of alcoholic classified as heavy consumers (>60g alcohol/day). For CA assay we have analysed 26 alcoholic and 22 healthy individuals as control group. For the polymorphism study, 124 alcoholic and 124 healthy individuals were genotyped using PCR and RFLP techniques. Non-smokers alcoholics showed higher mitotic index than non-smokers controls ($p=0,03$). Acs frequencies in alcoholics were similar to controls. No risk associations were found between null genotypes for GSTM1 and GSTT1 genes and mutant genotypes for CYP2D6 and CYP2E1 genes and the occurrence of cirrhosis or pancreatic disease. Homozygous mutant for CYP1A1 gene (m2/m2) presented significant risk to development of cirrhosis or pancreatic disease in alcoholic. No significant frequencies were found in the occurrence of A1 allele in alcoholic.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acar H, Ozturk K, Muslumanoglu MH, Yildirim MS, Cora T, Cilingir O, Ozer B. Relation of glutathione S-transferase genotypes (GSTM1 and GSTT1) to laryngeal squamous cell carcinoma risk. **Cancer Genet Cytogenet.** 169(2):89-93. 2006

Autrup, H. Genetic polymorphisms in human xenobiotica metabolizing enzymes as susceptibility factors in toxic response. **Mutat Res.** v. 464(1), p. 65-76, 2000.

Aydin-Sayitoglu M, Hatirnaz O, Erensoy N, Ozbek U. Role of CYP2D6, CYP1A1, CYP2E1, GSTT1, and GSTM1 genes in the susceptibility to acute leukemias. **Am J Hematol.** 81(3):162-70, 2006.

Berggren U, Fahlke C, Aronsson E, Karanti A, Eriksson M, Blennow K, Thelle D, Zetterberg H, Balldin J. The taqI DRD2 A1 allele is associated with alcohol-dependence although its effect size is small. *Alcohol Alcohol.* ;41(5):479-85. 2006.

Boffeta, P.; Hashibe, M.; La Vecchia, C.; Zatonski, W.; Rehm, J. The burden of cancer attributable to alcohol drinking. **Int J Cancer.** v. 119(4), p. 884-7, 2006.

Bogni, A.; Monshouwer, M.; Moscone, A.; Hidestrand, M.; Ingelman-Sundberg, M.; Hartung, T.; Coecke, S. Substrate specific metabolism by polymorphic cytochrome P450 2D6 alleles. **Toxicol in Vitro.** v. 19(5), p. 621-9, 2005.

Bonassi, S.; Au, W.W. Biomarkers in molecular epidemiology studies for health risk prediction. **Mutat Res.** v. 511(1), p. 73-86, 2002.

Bowirrat, A.; Oscar-Berman, M. Relationship between dopaminergic neurotransmission, Alcoholism and Reward-Deficiency Syndrome. **American Journal of Medical Genetics,** 132B:29-37, 2005.

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(4), p. 291-8, 2004.

Burim, R.V.; Canalle, R.; Takahashi, C.S.; Tavares, D.C.; Martinelli Ad Ade, L.; Sakamoto-Hojo, E.T. Clastogenic effect of ethanol in chronic and abstinent alcoholics. **Mutat Res.** v. 560(2), p. 187-98, 2004.

Burim, Regislaine Valéria. Estudo Citogenético e Molecular em Alcoólatras. 219pp. Ribeirão Preto, 2002.

Capoluongo, E.; Almadori, G.; Concolino, P.; Bussu, F.; Santonocito, C.; Vendittelli, F.; Galli, J.; Zuppi, C.; Ameglio, F.; Paludetti, G.; Giardina, B. GSTT1 and GSTM1 allelic polymorphisms in head and neck cancer patients from Italian Lazio Region. **Clin Chim Acta.** v. 376(1-2), p. 174-8, 2007.

Caporaso, N.E.; Lerman, C.; Audrain, J.; Boyd, N.R.; Main, D.; Issaq, H.J.; Utermahlan, B.; Falk, R.T.; Shields, P. Nicotine metabolism and CYP2D6 phenotype in smokers. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** v. 10(3), p. 261-3, 2001.

Carlini, D.B.; Chen, Y.; Stephan, W. The Relationship Between Third-Codon Position Nucleotide Content, Codon Bias, mRNA Secondary Structure and Gene Expression in the Drosophilid Alcohol Dehydrogenase Genes *Adh* and *Adhr*. **Genetics**, v. 159, p. 623-633, 2001.

Carstensen, U.; Alexandrie, A.K.; Hogstedt, B.; Rannug, A.; Bratt, I.; Hagmar, L. B-and T –lymphocyte micronuclei in chimery sweeps with respect to genetic polymorphism for CYP1A1 and GST1 (class Mu). **Mutat. Res.**, v.289, p.187-195, 1993.

Cashman, J.R.; Park, S.B.; Yanq, Z.C.; Wrighton, S.A.; Jacob, P 3rd.; Benowitz, N.L. Metabolism of nicotine by human liver microsomes: stereoselective formation of trans-nicotine N`-oxide. **Chem Res Toxicol.** v. 5(5), p. 639-46, 1992.

Casso, C.; Lalam, M.; Ghosh, S.; Timms, M. Endoscopic stapling diverticulotomy: an audit of difficulties, outcome, and patient satisfaction. **Otolaryngol Head Neck Surg.** v. 134(2), p. 288-93, 2006.

Conner BT, Noble EP, Berman SM, Ozkaragoz T, Ritchie T, Antolin T, Sheen C. DRD2 genotypes and substance use in adolescent children of alcoholics. **Drug Alcohol Depend.** 1;79(3):379-87.2005.

Connor JP, Young RM, Lawford BR, Saunders JB, Ritchie TL, Noble EP. Related Articles, Links Heavy nicotine and alcohol use in alcohol dependence is associated with D2 dopamine receptor (DRD2) polymorphism. *Addict Behav.*, 32(2):310-9. 2007

Covolo, L.; Gelatti, U.; Talamini, R.; Garte, S.; Trevisi, P.; Franceschi, S.; Franceschini, M.; Barbone, F.; Tagger, A.; Ribero, M.L.; Parrinello, G.; Donadon, V.; Nardi, G.; Donato, F. Alcohol dehydrogenase 3, glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms, alcohol consumption and hepatocellular carcinoma (Italy). **Cancer Causes Control.** v. 16(7), p. 831-8, 2005.

Cunha, R.M.; Mott, C.B.; Guarita, D.R.; Pedroso, M.R.; Jukemura, J.; Bacchela, T.; Cunha, J.E.; Machado, M.C.; Laudanna, A.A. Complications of chronic pancreatitis in São Paulo (Brazil). v. 52(6), p. 306-15, 1997.

Cunningham, C.C.; Van Horn, C.G. Energy availability and alcohol-related liver pathology. **Alcohol Res Health.** v. 27(4), p. 291-9, 2003.

Furtado EF, Laucht M, Schmidt MH. Gender-related pathways for behavior problems in the offspring of alcoholic fathers. **Braz J Med Biol Res.** 2006 May;39(5):659-69.

Gattás, G.J.; Saldanha, P.H. Chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes os abstinent alcoholics. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, v.21(2), p.238-243, 1997.

Goth-Goldstein, R.; Stampfer, M.R.; Erdmann, C.A.; Russell, M. Interindividual variation in CYP1A1 expression in breast tissue and the role of genetic polymorphism. **Carcinogenesis.** v. 21(11), p. 2119-22, 2000.

Griese EU, Ilett KF, Kitteringham NR, Eichelbaum M, Powell H, Spargo RM, LeSouef PN, Musk AW, Minchin RF. Allele and genotype frequencies of polymorphic cytochromes P4502D6, 2C19 and 2E1 in aborigines from western Australia. **Pharmacogenetics**, 11(1):69-76 2001

Hagmar L, Stromberg U, Bonassi S, Hansteen IL, Knudsen LE, Lindholm C, Norppa H. Impact of types of lymphocyte chromosomal aberrations on human cancer risk: results from Nordic and Italian cohorts. **Cancer Res.** 64(6):2258-63, 2004.

Hill, M.J.; Nutritional and metabolic aspects of gastrointestinal cancer. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care.** v. 1(5), p. 405-7, 1998.

Ingelman-Sundberg, M. Genetic variability in susceptibility and response to toxicants. **Toxicology Letters.** v. 120, p. 259-268, 2001.

Ingelman-Sundberg, M. Genetic susceptibility to adverse effects of drugs and environmental toxicants. The role of the CYP family of enzymes. **Mutat Res.** v. 482(1-2), p. 11-9, 2001.

Ishikawa H, Yamamoto H, Tian Y, Kawano M, Yamauchi T, Yokoyama K. Evidence of association of the CYP2E1 genetic polymorphism with micronuclei frequency in human peripheral blood. **Mutat Res.** 26;546(1-2):45-53. 2004

Jain, M.; Kumar, S.; Rastogi, N.; Lal, P.; Ghoshal, U.C.; Tiwari, A.; Panto, M.C.; Baiq, M.Q.; Mittal, B. GSTT1, GSTM1 and GSTP1 genetic polymorphisms and interaction with tobacco, alcohol and occupational exposure in esophageal cancer patients from North India. **Science Direct.** v. 242, p. 60-67, 2006.

Karahalil B, Sardas S, Kocabas NA, Alhayiroglu E, Karakaya AE, Civelek E. Chromosomal aberrations under basal conditions and after treatment with X-ray in human lymphocytes as related to the GSTM1 genotype. **Mutat Res.** 25;515(1-2):135-40, 2002.

Kirsh, B.M.; Lam, N.; Layden, T.J.; Wiley, T.E. Diagnosis and management of fulminant hepatic failure. **Compr Ther.** v. 21(4), p. 166-71, 1995.

Konishi T, Calvillo M, Leng AS, Feng J, Lee T, Lee H, Smith JL, Sial SH, Berman N, French S, Eysselein V, Lin KM, Wan YJ The ADH3*2 and CYP2E1 c2 alleles increase the risk of alcoholism in Mexican American men. **Exp Mol Pathol.** 74(2):183-9. 2003

Kono, Y.; Yoneda, H.; Sakai, T.; Nonomura, Y.; Inayama, Y.; Koh, J.; sakai, J.; Inada, Y.; Imamichi, H.; Asaba, H. Association between early-onset alcoholism and the dopamine D2 receptor gene. **American Journal of Medical Genetics.** , 74:179-182, 1997.

Ladero, J.M.; Martinez, C.; Garcia-Martin, E.; Fernandez-Arquero, M.; Lopez-Alonso, G.; de la Concha, E.G.; Diaz-Rubio, M.; Aquidez, J.A. Polymorphisms of the glutathione S-transferases um-1 (GSTM1) and theta-1 (GSTT1) and the risk of advanced alcoholic liver disease. **Scand J Gastroenterol.** v. 40(3), p. 348-53, 2005.

Landi, S. Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review. **Mutat Res.** v. 463(3), p. 247-83, 2000.

Lemos, M.C.; Cabrita, F.J.; Silva, H.S.; Vivan, M.; Plácido, F.; Regateiro, F.J. Genetic polymorphism of CYP2D6, GSTM1 and NAT2 and susceptibility to haematological neoplasias. **Carcinogenesis**. v. 20(7), p. 1225-9, 1999.

Lieber, C.S. Alcoholic liver injury: pathogenesis and therapy in 2001. **Pathol Biol (Paris)**. v. 49(9), p. 738-52, 2001.

Lieber, C.S. Gastric ethanol metabolism and gastritis: interactions with other drugs, *Helicobacter pylori*, and antibiotic therapy (1957-1997)--a review. **Alcohol Clin Exp Res**. v. 21(8), p. 1360-6, 1997.

Lieber, C.S. Hepatic and other medical disorders of alcoholism: from pathogenesis to treatment. **J. Stud. Alcohol**., v.59,p.9-25, 1998.

Lieber, C.S. Relationships between nutrition, alcohol use, and liver disease. **Alcohol Res Health**. v. 27(3), p. 220-31, 2003.

Lovlie, R.; Daly, A.K.; Matre, G.E.; Molven, A.; Steen, V.M. Polymorphisms in CYP2D6 duplication-negative individuals with the ultrarapid metabolizer phenotype: a role for the CYP2D6*35 allele in ultrarapid metabolism? **Pharmacogenetics**. v. 11, p. 45-55, 2001.

Lowenfels, A.B.; Maisonneuve, P. Epidemiology and risk factors for pancreatic cancer. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**. v. 20(2), p. 197-209, 2006.

Maffei F, Fimognari C, Castelli E, Stefanini GF, Forti GC, Hrelia P. Increased cytogenetic damage detected by FISH analysis on micronuclei in peripheral lymphocytes from alcoholics. **Mutagenesis**, 15(6):517-23. 2000.

Maffei, F.; Forti, G.C.; Castelli, E.; Stefanini, G.F.; Mattioli, S.; Hrelia, P. Biomarkers to assess the genetic damage induced by alcohol abuse in human lymphocytes. **Mutation Research**. v. 514, p. 49-58, 2002.

Maisonneuve, P.; Frulloni, L.; Mullhaupt, B.; Faitini, K.; Cavallini, G.; Lowenfels, A.B.; Ammann, R.W. Impact of smoking on patients with idiopathic chronic pancreatitis. **Pancreas**. v. 33(2), p. 163-8, 2006.

Mann, R.E.; Smart, R.G.; Govoni, R. The epidemiology of alcoholic liver disease. **Alcohol Res Health**. v. 27(3), p. 209-19, 2003.

Marsano, L.S.; Mendez, C.; Hill, D.; Barve, S.; McClain, C.J. Diagnosis and treatment of alcoholic liver disease and its complications. **Alcohol Res Health**. v. 27(3), p. 247-56, 2003.

Mateuca, R.; Lombaert, N.; Aka, P.V.; Decordier, I.; Kirsch-Volders, M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. **Biochimie**. v. 88(11), p. 1515-31, 2006.

Miller, M.C.; Mohrenweiser, H.W.; Bell, D.A. Genetic variability in susceptibility and response to toxicants. **Toxicology Letters**. v. 120, p. 269-280, 2001.

Moorhead, P.S.; Nowell, P.C.; Mellman, W.J.; Battips, D.M.; Hungerford, D.A. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. **Exp Cell Res.** v. 20, p. 613-6, 1960.

Muller, M.J. Alcohol and body weight. **Z. Gastroenterol.**, v.37(1), p. 33-43, 1999.

Noble, A. Review article: molecular signals and genetic reprogramming in peripheral T-cell differentiation. **Immunology.** v. 101(3), p. 289-99, 2000.

Norppa, H. Cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms. **Science Direct.** v. 149, p. 309-334, 2004.

Norppa, H.; Bonassi, S.; Hansteen, I.L.; Hagmar, L.; Strömberg, U.;

Obe, G.; Gobel, D.; Engeln, H.; Herha, J.; Natarajan, A.T. Chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of alcoholics. **Mutat Res.** v. 73(2), p. 377-86, 1980.

Ponce, G.; Jimenez-Arriero, M.A.; Rubio, G.; Hoenicka, J.; Ampuero, I.; Ramos, J.A.; Palomo, T. The A1 allele of the DRD2 gene (Taql A polymorphisms) is associated with antisocial personality in a sample of alcohol-dependent patients. **Eur Psychiatry.** v. 18(7), p. 356-60, 2003.

Poschl, G.; Seitz, H.K. Alcohol and cancer. **Alcohol Alcohol.** v. 39(3), p. 155-65, 2004.

Ratsma, J.E.; Van Der Stelt, O.; Gunning, W.B. Neurochemical markers of alcoholism vulnerability in humans. **Alcohol and Alcoholism.** v. 37(6), p. 522-533, 2002.

Rossini, A.; Lima, S.S.; Rapozo, D.C.; Faria, M.; Albano, R.M.; Pinto, L.F. CYP2A6 and CYP2E1 polymorphisms in a Brazilian population living in Rio de Janeiro. **Braz J Med Biol Res.** v. 39(2), p. 195-201, 2006.

Rössner, P.; Boffetta, P.; Lindholm, C.; Gundy, S.; Lazutka, J.; Cebulska-Wasilewska, A.; Fabiánová, E.; Srám, R.J.; Knudsen, L.E.; Barale, R.; Fucic, A. Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cancer risk. **Mutation Research.** v. 600, p. 37-45, 2006.

Samochowiec J, Kucharska-Mazur J, Grzywacz A, Jablonski M, Rommelspacher H, Samochowiec A, Sznabowicz M, Horodnicki J, Sagan L, Pelka-Wysiecka J. Family-based and case-control study of DRD2, DAT, 5HTT, COMT genes polymorphisms in alcohol dependence. **Neurosci Lett.** 13;410(1):1-5. 2006.

Schoedel, K.A.; Tyndale, R.F. Induction of nicotine-metabolizing CYP2B1 by ethanol and ethanol-metabolizing CYP2E1 by nicotine: summary and implications. **Biochim Biophys Acta.** v. 1619(3), p. 283-90, 2003.

Schoket, B.; Papp, G.; Levay, K.; Mrackova, G.; Kadlubar, F.F.; Vincze, I. Impact of metabolic genotypes on levels of biomarkers of genotoxic exposure. **Mutat Res.** v. 482(1-2), p. 57-69, 2001.

Smith, G.B.J.; Harper, P.A.; Wong, J.M.Y.; Lam, M.S.M.; Reid, K.R.; Petsikas, D.; Massey, T.E. Human lung microsomal cytochrome P4501A1 (CYP1A1) activities: Impact of smoking status and CYP1A1, Aryl Hydrocarbon Receptor, and Glutathione S-Transferase M1 Genetic Polymorphisms. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**. v. 10, p. 839-853, 2001.

Sram RJ, Rossner P, Beskid O, Bavorova H, Ocadlikova D, Solansky I, Albertini RJ Chromosomal aberration frequencies determined by conventional methods: Parallel increases over time in the region of a petrochemical industry and throughout the Czech Republic. **Chem Biol Interact**. 2006 Oct 26; [Epub ahead of print].

Swierenga, S.H.H.; Headle, J.A.; Sigal, E.A.; Gilman, J.P.W.; Brillinger, R.L.; Douglas, G.R.; Nestmann, E.R. Recommended protocols based on a survey of current practice in genotoxicity testing laboratories, IV. Chromosome aberration and sister chromatid exchange in Chinese hamster ovary, V79 Chinese hamster lung and human lymphocyte cultures. **Mutat. Res.**, v. 246, p.301-322, 1991.

Szczepankiewicz A, Dmitrzak-Weglarz M, Skibinska M, Slopian A, Leszczynska-Rodziewicz A, Czerski P, Hauser J. Study Of Dopamine Receptors Genes Polymorphisms In Bipolar Patients With Comorbid Alcohol Abuse. **Alcohol Alcohol**. 2006 Dec 8.

Tuimala, J.; Szekely, G.; Gundy, S.; Hirvonen, A.; Norppa, H. Genetic polymorphisms of DNA repair and xenobiotic-metabolizing enzymes: role in mutagen sensitivity. **Carcinogenesis**. v. 23(6), p. 1003-8, 2002.

Vanyukov, M.M.; Tarter, R.E. Genetic studies of substance abuse. **Drug Alcohol Depend**. v. 59(2), p. 101-23, 2000.

Verlaan, M.; te Morsche, R.H.; Pap, A.; Laheij, R.J.; Jansen, J.B.; Peters, W.H.; Drenth, J.P. Functional polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferases 1A1, 1A6 and 1A8 are not involved in chronic pancreatitis. **Pharmacogenetics**. v. 14(6), p. 351-7, 2004.

Wenzlaff, A.S.; Cote, M.L.; Bock, C.H.; Land, S.J.; Santer, S.K.; Schwartz, D.R.; Schwartz, A.G. CYP1A1 and CYP1B1 polymorphisms and risk of lung cancer among never smokers: a population-based study. **Carcinogenesis**. v. 26(12), p. 2207-12, 2005.

Wojda, A.; Zietkiewicz, E.; Mossakowska, M.; Pawlowski W.; Skrzypczak; Witt, M. Correlation between the level of cytogenetic aberrations in cultured human lymphocytes and the age and gender of donors. **Journal of Gerontology**, v61A(8), 763=772. 2006.

Wu, D.; Cederbaum, A.I. Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. **Alcohol Res Health**. v. 27(4), p. 277-84, 2003.

Zima, T. Ethanol metabolism and pathobiochemistry of organ damage-1992. I. Metabolism of ethanol by alcohol dehydrogenase, cytochrome P450IIE1 and catalase. **Sb. Lek.**, v.94, p.281-287, 1993.

ANEXO A

EU _____
R.G. nº: _____, abaixo assinado, tendo recebido as informações acima, e ciente dos meus direitos abaixo relacionados, concordo em participar.

1. A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida a cerca dos procedimentos , riscos e benefícios e outros relacionados com a pesquisa e tratamento a que serei submetido;
2. A liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo sem que isso traga prejuízo em relação ao meu tratamento;
3. A segurança de que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada com a minha privacidade;
4. O compromisso de me proporcionar informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar minha vontade de continuar participando;
5. A disponibilidade de tratamento médico e a indenização que legalmente teria direito, por parte da Instituição à Saúde, em caso de danos que a justifiquem, diretamente causados pela pesquisa e;
6. Que se existirem gastos adicionais estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Tenho ciência do exposto acima

Ribeirão Preto, _____ de _____ de _____ .

Assinatura do paciente

ANEXO B

FORMULÁRIO DE CADASTRO DE PACIENTES

1 - Dados de identificação

Nº do prontuário no hospital:..... Hospital:

Nome do Paciente:

Paciente: () internado () ambulatorial

Diagnóstico principal () controle

2 – Informações gerais

Data da entrevista:.....

Coleta de sangue: () sim () não

Sexo: () Feminino () Masculino

Meu nome é De início quero agradecer o(a) senhor(a) por participar neste estudo. Nós estamos conduzindo um estudo com a finalidade de esclarecer se determinadas características e hábitos de homens e mulheres podem ter relação com algumas doenças decorrentes do alcoolismo. Eu farei várias perguntas cujas respostas serão registradas neste caderno. Devo dizer que tudo que o(a) senhor(a) responder na entrevista será estritamente confidencial e as informações colhidas das inúmeras pessoas que irão participar do estudo serão usadas apenas em relatos científicos, sem nenhuma identificação pessoal.

Os possíveis benefícios deste estudo dependem de que as respostas sejam as mais reais (verdadeiras, sinceras) possíveis. Por favor, pergunte se não entender o significado de alguma questão. A qualquer momento o(a) senhor(a) pode se recusar a continuar ou a responder perguntas específicas. Além do questionário o estudo inclui a coleta de uma amostra de sangue. Se houver necessidade de entrar em contato com o(a) senhor(a), poderia fornecer seu endereço e telefone?

Endereço:

Bairro:

Cidade

CEP:

Telefone:

Podemos começar? O (A) Sr(a) poderia assinar essa folha de consentimento?

Data de nascimento:

Qual a sua idade?

Qual a sua profissão? (aquela que o(a) sr(a) exerceu por mais tempo)

Raça: ()branco ()mulato ()negro ()oriental ()índio ()outra:

Cidade e há quanto tempo o(a) Sr.(a) mora nessa cidade? (anos)

Em que cidade/estado/país o(a) Sr.(a) nasceu?

O(A) Sr.(a) estudou em escola? ()sim ()não

Selecione a opção mais elevada quanto ao grau de instrução:.....

()alfabetizado ()fundamental incompleto ()fundamental completo

()médio incompleto ()médio completo ()técnico ()universitário

3 – História de Tabagismo

O(A) Sr.(a) fuma ou já fumou em média 1 cigarro, charuto ou cachimbo, diariamente, pelo menos por 1 ano?

() sim, ainda fuma () nunca fumou () somente no passado

Idade de início:

Quantidade/dia:

Idade em que parou:

4 – História de Etilismo

O(A) Sr.(a) já tomou (ingeriu) bebidas alcoólicas pelo menos 1 vez por mês?

() Sim, ainda bebe () Nunca () Só no passado

Quando o(a) Sr.(a) costuma beber (ou bebia)?

() nas refeições () entre as refeições () aos finais de semana () não tinha horário

Idade de início:

Quantidade e tipo de bebida:

Idade em que parou:

Idade em que tomou o primeiro porre:

Quando começou a notar dependência alcoólica:

Tempo de consumo pesado de álcool:

Situações decorrentes por causa do consumo de álcool:

() foi atropelado

() acidente de carro/moto/bicicleta por estar embriagado

() queimou alguma coisa ao cozinhar

() perdeu o dia de trabalho

() machucou alguém

() entrou em uma discussão por estar embriagado

() perdeu documentos/dinheiro

() acordou sem saber onde estava ou como havia chegado lá

() fica deprimido

História familiar

Alguém na família possui problemas com álcool?

Filhos:

ANEXO C

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Campus Universitário Monte Alegre - Fone: 602-1000 - Fax: 633-1144

CEP 14048-900 RIBEIRÃO PRETO - SÃO PAULO

Mem. nº 103/2003

GS-3/LHBS

Ribeirão Preto, 16 de outubro de 2003

Ilustríssima Senhora

CARLA IVANE GANZ VOGEL

Depto. de Genética – Laboratório de Citogenética e Mutagênese

Em mãos

Prezada Senhora:

Atendendo solicitação do Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa, Prof. Dr. Sérgio Pereira da Cunha, encaminho a Vossa Senhoria Parecer nº 1640/2003 – CONEP, referente ao Projeto de Pesquisa intitulado **"CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA E MOLECULAR DE UMA POPULAÇÃO DE ALCÓOLATRAS"**, de acordo com o Processo HCRP nº 3253/2003.

O parecer informa que seu projeto encontra-se **APROVADO**.

Aproveito a oportunidade para renovar os protestos de estima e consideração.

Atenciosamente.

LAÍS HELENA BORGES DA SILVEIRA
Diretora do Serviço de Comunicações
Administrativas
R.F. nº 1373

ANEXO D

Trabalho realizado pela Doutoranda no período de 1º. de Outubro de 2004 à 31 de Março de 2005 no estágio de Doutorado de sanduíche, realizado no Central Institute of Mental Health em Mannheim na Alemanha.

Association of DRD4 exon III polymorphism with auditory P300 amplitude in 8-year-old children

C. I. G. Vogel¹, M. Laucht², E. F. Furtado³, K. Becker², M. H. Schmidt²

¹ Department of Genetics, Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

² Department of Child and Adolescent Psychiatry and Psychotherapy, Central Institute of Mental Health, Mannheim, Germany

³ Department of Neurology, Psychiatry and Medical Psychology, Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Received: September 4, 2005 / Accepted: January 31, 2006 / Published online: June 1, 2006

© Springer-Verlag 2006

Summary Objectives: The present study was designed to investigate the association between the DRD4 genotype and auditory P300 amplitudes in a high-risk community sample.

Methods: ERPs were elicited in 197 eight-year-olds (98 boys, 99 girls) using a passive and an active oddball task. Auditory stimuli of 60 dB HL were presented binaurally at 1000 (standard stimulus) and 2000 Hz (target stimulus), at a relative frequency ratio of 80:20. Two trial blocks of 250 stimuli each were collected. P300 amplitudes were analyzed from Fz, Cz and Pz. DNA was genotyped for the DRD4 exon III polymorphism.

Results: A pattern of significant interactions of the DRD4 genotype with gender and experimental conditions was obtained. In both the active and the passive task, boys with at least one copy of the DRD4 7-repeat allele displayed significantly lower P300 amplitudes during the second trial block than boys carrying other alleles.

Conclusions: This finding provides further evidence supporting a role of P300 amplitude reduction as an endophenotype for disinhibited psychopathology.

Keywords: Dopamine D4 receptor gene, P300, auditory evoked potentials, molecular genetics, children

Introduction

The dopamine receptor 4 (DRD4) gene is located on chromosome 11p15.5 and generates a 387 amino acids protein. This gene contains a remarkable number of polymorphic regions, and one of the most frequently studied of these is a variable nucleotide tandem repeat (VNTR) polymorphism of 48 bp in the third exon (Lichter et al., 1993). The number

of repeats varies from 2 to 10 in the human population (Ding et al., 2002), with the 4-repeat (4r) being the most common in Caucasians, followed by the 7-repeat (7r). The dopamine 7r has a 2- to 3-fold lower potency than the 4r and 2r receptors for coupling to adenylyl cyclase (Oak et al., 2000). D4 receptors are highly expressed in the amygdala and in the frontal cortex. They have a putative involvement in cognitive and attention functions in the brain (Roman et al., 2001). In experimental animals, dopamine was found to mediate exploratory behavior (Dulawa et al., 1999). DRD4-deficient mice presented reduced locomotion (Rubinstein et al., 1997) and cortical hyperexcitability as compared to controls (Rubinstein et al., 2001). In humans, DRD4 exon III alleles have been associated with social habits, psychiatric disorders and personality traits, including alcohol use (Muramatsu et al., 1996), attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD) (Faraone et al., 2001), and novelty seeking (Kluger et al., 2002).

The P300 component of the human event-related potential is a positive polarity brain wave observed 250 to 500 ms after the presentation of an infrequent but anticipated stimulus. Evoked P300 can be considered as a manifestation of CNS activity involved with the processing of new information when attention is engaged to update memory representations (Polich and Kok, 1995). Thus, the peak amplitude of P300 may reflect allocation of attention resources, cognitive processing needed for encoding new stimuli or updating of representations in working memory. Two variants of the P300 have been differentiated. The canonical P300, labeled P3b, is localized in the centro-

Correspondence: M. Laucht, PhD, Department of Child and Adolescent Psychiatry and Psychotherapy, Central Institute of Mental Health, P.O. Box 122120, 68072 Mannheim, Germany
e-mail: laucht@zi-mannheim.de

parietal region and is thought to be associated with suspense as the participant awaits the next relevant stimuli. The P3a is elicited in response to rare stimuli and appears to reflect novelty or surprise and has a more anterior scalp distribution. As Hill and Shen (2002) pointed out, this difference is important for studies searching for trait markers of psychiatric risk because diminished response to novelty and inefficient allocation of attentional resources may reflect different aspects of psychopathology.

Research over the past two decades has provided substantial evidence indicating that decrements in P300 amplitude are associated with various disinhibited behavioral phenotypes. Many studies have demonstrated lower amplitudes of P300 in alcoholics and their offspring (Porjesz et al., 1998; van der Stelt et al., 1998). This effect was detectable before alcohol exposition, suggesting that P300 may provide a trait marker for alcoholism. Accordingly, several studies have shown that youths who are at high risk for substance use disorder have attenuated P300 amplitude. Several other related phenotypes have been linked to reduction in P300 amplitude. In children of alcoholics, a small P300 amplitude was associated with high sensation-seeking, particularly high disinhibition (Ratsma et al., 2001), and externalizing behaviour, such as aggression and delinquency (van der Stelt et al., 1998). Decreased P300 amplitudes have been found in a number of psychopathological conditions, including antisocial personality disorder, conduct disorder, ADHD, and substance abuse (Anokhin et al., 2000). Thus, the hypothesis has been advanced that low P300 amplitude observed in high-risk individuals may reflect disrupted inhibitory mechanisms (Habeych et al., 2005).

Genetic studies have revealed that P300 components are impressively similar in monozygotic twins as compared to dizygotic twins, with heritability estimates ranging between 0.41 and 0.60 (Polich and Ochoa, 2004). Although an important genetic influence on P300 amplitude has been confirmed, considerably less progress has been made in delineating the mechanisms by which genetic differences between individuals ultimately give rise to differences in P300. Since dopaminergic neurotransmission may play an important role in the neurophysiological mechanisms that generate and/or modulate P300 (Anokhin et al., 2000), genes acting in the dopamine pathway have been proposed as plausible candidate genes. Research conducted to examine a possible association between P300 components and variations in dopamine genes has yielded conflicting results. In two earlier studies, P300 latency was found to be significantly prolonged in individuals homozygous for the allele A1 of the dopamine D2 receptor gene (Blum

et al., 1994; Noble et al., 1994), while no significant difference was observed in P300 amplitudes between DRD2 genotypes. Another study ascertained no significant increase in P300 latency, but a significant reduction of P300 amplitude in A1 carriers (Hill et al., 1998). In study of a Chinese population, neither P300 amplitude nor latency was associated with the DRD2 genotype (Lin et al., 2001). Similar inconsistent findings have been reported for the DRD4 genotype. While Tsai et al. (2003) failed to find a link between P300 components and the exon III polymorphism of DRD4, Strobel et al. (2004) observed an interactive effect of the DRD4 genotype and a measure of central dopamine activity on the novelty P300. The aim of the present study was to further investigate the significance of the DRD4 exon III polymorphism as a susceptibility factor in psychopathology by examining its association with the auditory P300 evoked potential in 8-year-old children from a high-risk community sample.

Material and methods

Participants

Participants in this investigation are members of the Mannheim Study of Risk Children, an ongoing prospective longitudinal study of the long-term outcome of early risk factors followed from birth to adolescence (Laucht et al., 2000). The sample consists of a cohort of originally 384 infants born between February 1, 1986, and February 28, 1988, who were recruited from two obstetric and six children's hospitals of the Rhine-Neckar Region of Germany. To be included in the study, parents and children had to meet well-defined criteria intended to enrich and to control the risk status of the sample. Depending on pregnancy and birth history and on family background, children were assigned to one of nine groups of a two-factorial design, with factor I representing the degree of obstetric risk (perinatal complications such as preterm birth or neonatal asphyxia) and factor II representing the degree of psychosocial risk (family adversity such as parental psychiatric disorder or chronic difficulties). Each factor was scaled as no risk, moderate risk or high risk. All groups were of roughly equal size, with a slight oversampling in the high-risk combinations and with sex evenly distributed in all subgroups. To control for confounding effects of family environment and infant medical status, only firstborn children with singleton births and German-speaking parents were enrolled in the study. Additionally, children with severe physical handicaps, obvious genetic defects, or metabolic diseases were excluded. The participation rate at the time of recruitment was 64.5%, with a slightly lower rate in families from psychosocially disadvantaged backgrounds. The participants were primarily Caucasians. Assessments were conducted at regular intervals from infancy into adolescence. Additional details on this sample have been reported previously (Laucht et al., 1997).

At age eight, a total of 370 children from the initial sample were followed up (i.e. retention rate = 96.4%). From the remaining 14 children, 4 were untraceable, 2 were subsequently excluded because they did not meet the inclusion criteria, and the parents of 8 children refused to participate. The current investigation included 197 children (98 males, 99 females) for whom both passive and active ERP data as well as genetic data were available. The ethics committee of the University of Heidelberg approved the study and the parents of all participants gave their written informed consent.

Assessments

ERP Tasks. All children participated in an auditory oddball paradigm using a passive and an active task condition. Stimuli were sinus tones (60 dB HL, 10 ms rise/fall, 80 ms plateau) presented binaurally through earphones with a randomized interstimulus interval (750–1,500 ms). The frequent or standard stimulus (1000 Hz tone) and the infrequent or target stimulus (2000 Hz tone) occurring at a relative frequency of 80:20 were presented in two trial blocks of 250 stimuli each. Passive and active task conditions were administered in a fixed order: First, children watched a TV film while stimuli were presented without any instruction (*passive* condition). Thereafter they were instructed to press a button to the rare stimulus (*active* condition). Participants did not receive any feedback on their performance. To establish that they understood the task, a short practice phase took place.

EEG recording and ERP analysis. During the EEG recording, the child sat in a comfortable reclining chair, in a dimly illuminated, sound-attenuated and partially electrically shielded chamber. The EEG activity was recorded according to the 10–20 System with 19 Ag–AgCl scalp electrodes with a lycra stretch cap, using a Schwarzer amplifier at a rate of 256 Hz. Data were digitally filtered (0.1–70 Hz band pass). Vertical and horizontal EOG was recorded with four electrodes placed above and below the left eye and in the outer canthi. Trials with performance errors, eye movements, or EEG artefacts were excluded from averaging. The mean (minimum in parenthesis) number of target trials accepted for averaging were 39 (19) in the first and 35 (10) in the second trial block for the active task, and 35 (9) in the first and 31 (8) in the second trial block for the passive task, respectively. Genotype groups did not significantly differ in number of artifact-free trials. ERPs were analyzed from three sites (Fz, Cz and Pz). P300 was defined as the maximum positive peak that occurred 250 to 500 ms after stimulus onset. Baseline-to-peak amplitudes (in μV) were computed by subtracting the baseline (average over 200 ms before the stimulus) from the peak amplitude of the P300 component.

Child psychological assessment. The German version of the Child Behavior Checklist (CBCL/4–18) (Achenbach, 1991) was used to measure children's behavior problems as reported by parents at age eight. Intelligence was measured by the Culture Fair Intelligence Test, Scale 1 (CFT 1; Weiß and Osterland, 1979). Assessments of fine and gross motor skills were obtained using a short form of the KTK (Kiphart and Schilling, 1974) and a standardized neurological examination according to Touwen and Prechtl (1970). Children with severe handicaps (MQ or IQ < 70 or neurological disorder) were excluded.

Genotyping. Genomic DNA was isolated from a 5-ml blood sample using a Qiaamp (Qiagen, Chatsworth, CA, USA) DNA extraction kit. DRD4 genotype was determined by polymerase chain reaction (PCR). The reaction products were loaded in a 2% gel with ethidium bromide and electrophoresis run for 2 hours at 120 V. After electrophoresis, bands were visualized by UV fluorescence. DRD4 exon III polymorphisms were categorized by the number of repeats as described previously (Lichter et al., 1993). DRD4 allele frequencies were 8.0% allele 2r, 3.6% allele 3r,

63.0% allele 4r, 1.2% allele 5r, 0.3% allele 6r, 23.9% allele 7r, and 0.0% alleles $\geq 8r$. Genotype frequencies corresponded to the Hardy-Weinberg equilibrium.

Statistical analysis

Based on previous results, DRD4 genotypes were classified into two groups according to the presence or absence of the 7r allele. Statistical analysis of P300 data was performed by repeated measures analysis of variance (SPSS Version 12.0), with the between-subject factors DRD4 group (7r, non-7r) and gender, and the within-subject factors electrode site (frontal, central and parietal) and trial block (first, second), using the Greenhouse-Geisser correction. Where the analysis of variance yielded significant effects, successive univariate and single comparisons were conducted. Analyses were performed separately for the active and the passive task condition. To examine differences between groups and control variables (e. g. intelligence, gender, psychopathology, early risk factors), comparisons of continuous variables were computed using *t*-tests and ANOVAS and comparisons of frequencies and ratios were conducted using Chi-Square and Fisher's Exact Tests.

Results

Sample characteristics

Demographic and clinical characteristics for boys and girls in the DRD4 7r groups are presented in Table 1. Results indicated that groups did not differ significantly regarding family adversity, obstetric risk score, and IQ, as well as externalizing and internalizing behavior problems. In addition, no significant differences according to gender were observed.

Event-related potentials

Table 2 presents means and standard deviations of P300 amplitudes for the *active* task condition as a function of DRD4 group, electrode site and trial block, separately by gender. There were no significant between-subjects main effects or interactions (all $p > 0.10$). However, the interaction group $\times$ gender $\times$ site $\times$ block ($F(2, 388) = 3.67$, $p = 0.033$) was significant, indicating that there was a gen-

Table 1. Sample characteristics in boys and girls grouped by the presence (7r) or absence (non-7r) of the DRD4 7-repeat allele

	Boys (n = 98)		Girls (n = 99)	
	7r (n = 39)	Non-7r (n = 59)	7r (n = 35)	Non-7r (n = 64)
Psychosocial risk score ¹ : mean (SD)	2.31 (2.12)	1.92 (2.09)	2.14 (2.22)	1.86 (2.02)
Obstetric risk score ² : mean (SD)	0.87 (0.95)	1.19 (1.09)	1.17 (1.12)	1.16 (1.12)
IQ: mean (SD)	100.6 (13.6)	102.9 (13.9)	104.1 (11.9)	102.7 (15.4)
CBCL externalizing problems: mean (SD)	55.0 (9.8)	53.1 (9.0)	51.6 (9.8)	51.7 (9.6)
CBCL internalizing problems: mean (SD)	53.9 (9.9)	53.8 (8.6)	50.4 (8.9)	53.3 (8.2)

¹ "Enriched" family adversity index as proposed by Rutter and Quinton (1977) measuring the presence of 11 adverse family factors covering characteristics of the parents, the partnership, and the family environment during a period of one year prior to birth

² Obstetric adversity score counting the presence of 9 adverse conditions during pregnancy, delivery, and postnatal period such as preterm labor, asphyxia or seizures (Laucht et al., 1997)

Table 2. Means and SD (in brackets) of P300 amplitudes (μV) in boys and girls grouped by the presence (7r) or absence (non-7r) of the DRD4 7-repeat allele as a function of electrode site and trial block (active task condition)

Electrode site	Boys ($n = 98$)		Girls ($n = 99$)	
	7r ($n = 39$)	Non-7r ($n = 59$)	7r ($n = 35$)	Non-7r ($n = 64$)
Block 1				
Fz	1.26 (6.72)	2.76 (6.61)	2.30 (6.33)	2.78 (6.75)
Cz	6.98 (7.12)	7.68 (6.48)	6.82 (7.16)	8.38 (8.09)
Pz	12.53 (6.16)	11.40 (6.52)	12.89 (5.82)	13.08 (6.94)
Block 2				
Fz	3.05 (8.78)	3.99 (7.55)	3.56 (5.87)	4.20 (6.91)
Cz	5.80 (8.89)	9.22 (8.73)	6.60 (7.14)	7.96 (7.65)
Pz	9.34 (7.34)	12.56 (8.55)	12.34 (6.21)	12.18 (6.44)

der-specific differential group effect on P300 amplitudes according to electrode site and trial block. Subsequent gender-specific analyses for the first and the second trial block showed the DRD4 effect only for boys and the second block, whereas no significant group differences were obtained in girls and for the first block (all $p > 0.30$). Single comparisons revealed that boys with the 7r allele displayed significantly lower amplitudes than boys carrying other alleles only at the parietal site ($t(97) = 2.19$, $p = 0.031$) and – approaching significance – at the central site ($t(97) = 1.90$, $p = 0.061$). Furthermore, a significant main effect of electrode site ($F(2, 388) = 297.77$, $p < 0.001$) emerged, with increasing amplitudes from frontal to parietal sites. In addition, a significant electrode site $\times$ trial block interaction was found ($F(2, 388) = 10.36$, $p < 0.001$), indicating larger differences between sites in the first trial block.

Table 3 presents means and standard deviations of P300 amplitudes for the *passive* task condition as a function of DRD4 group, electrode site and trial block, separately by gender. Again, no main effects or interactions of between-

Table 3. Means and SD (in brackets) of P300 amplitudes (μV) in boys and girls grouped by the presence (7r) or absence (non-7r) of the DRD4 7-repeat allele as a function of electrode site and trial block (passive task condition)

Electrode site	Boys ($n = 98$)		Girls ($n = 99$)	
	7r ($n = 39$)	Non-7r ($n = 59$)	7r ($n = 35$)	Non-7r ($n = 64$)
Block 1				
Fz	-0.08 (4.62)	-0.22 (5.18)	-0.77 (4.25)	0.86 (5.73)
Cz	0.21 (4.77)	-0.63 (4.88)	-0.61 (3.82)	1.14 (6.23)
Pz	2.67 (5.88)	1.29 (4.41)	3.82 (4.30)	2.95 (5.47)
Block 2				
Fz	-0.69 (4.76)	1.58 (4.72)	0.40 (4.97)	0.89 (5.25)
Cz	0.04 (5.04)	1.42 (4.84)	1.16 (4.86)	0.62 (5.08)
Pz	1.35 (4.73)	2.79 (4.31)	2.27 (3.90)	2.46 (4.95)

Table 4. Means and SD (in brackets) of P300 latencies (ms) in boys and girls grouped by the presence (7r) or absence (non-7r) of the DRD4 7-repeat allele as a function of electrode site and task condition

Electrode site	Boys ($n = 98$)		Girls ($n = 99$)	
	7r ($n = 39$)	Non-7r ($n = 59$)	7r ($n = 35$)	Non-7r ($n = 64$)
Active				
Fz	358.3 (40.8)	377.7 (46.2)	370.6 (46.2)	370.5 (49.3)
Cz	366.5 (44.3)	378.9 (43.3)	372.7 (43.5)	366.0 (51.2)
Pz	371.5 (45.2)	376.2 (46.7)	359.7 (40.9)	368.3 (49.4)
Passive				
Fz	337.1 (40.4)	338.2 (37.3)	366.9 (45.0)	361.6 (46.2)
Cz	346.2 (51.4)	330.5 (40.3)	358.2 (41.6)	353.3 (40.7)
Pz	337.7 (43.3)	335.1 (44.3)	345.8 (40.8)	347.2 (45.0)

subjects factors were observed (all $p > 0.10$). However, a pattern of significant interactions of DRD4 group and experimental conditions emerged. A significant DRD4 $\times$ electrode site interaction ($F(2, 388) = 3.58$, $p = 0.040$) indicated that differences between genotypes, with lower amplitudes among carriers of the 7r allele, were more pronounced at frontal ($p = 0.067$) as compared to central ($p = 0.447$) and parietal sites ($p = 0.874$). A significant DRD4 $\times$ gender $\times$ trial block interaction ($F(2, 388) = 4.57$, $p = 0.034$) revealed that P300 amplitudes of the 7r group were significantly lower only in boys and in the second trial block ($F(1, 97) = 3.97$, $p = 0.049$). A nearly significant interaction of DRD4 group with site and trial block ($F(2, 388) = 3.14$, $p = 0.053$) emphasized the finding that differences between groups were more marked at the frontal site and within the second trial block. Similar to the active task condition, a significant main effect of electrode site ($F(2, 388) = 57.60$, $p < 0.001$) and a significant electrode site $\times$ trial block interaction emerged ($F(2, 388) = 5.60$, $p = 0.006$). Finally, when P300 components were compared between task conditions, amplitudes in the active task were found to be substantially higher than in the passive task ($F(1, 776) = 262.61$, $p < 0.001$).

Table 4 presents means and standard deviations of P300 latencies for the *active* and the *passive* task condition as a function of DRD4 group and electrode site, separately by gender. There were no significant main effects or interaction effects of DRD4 genotype with task conditions on latency scores.

Discussion

The aim of the present study was to further investigate the significance of the DRD4 exon III polymorphism as a susceptibility factor in psychopathology by examining its

association with the auditory P300 evoked potential in 8-year-old children from a high-risk community sample. Our results revealed no direct effect of DRD4 exon III genotype on P300 amplitudes. Instead, a pattern of significant interactions of DRD4 genotype with gender and experimental conditions was obtained, indicating a differential effect of genotype on P300. Significant differences between genotype groups were evident only in boys and were confined to the second trial block. Under both task conditions, boys with the 7r allele displayed significantly lower P300 amplitudes than boys carrying other alleles. While in the active task, group differences were more marked at the parietal site, the passive task produced larger differences at the frontal site.

These results provide additional evidence supporting a role of P300 amplitude reduction as an endophenotype for disinhibited psychopathology. In this sense, our findings appear to fill the gap between neurophysiological studies reporting a relationship between a low P300 and behavioral disinhibition in children and adolescents, including externalizing psychopathology, novelty seeking and substance use disorders (Iacono et al., 2003), and molecular genetic research suggesting a link of DRD4 with ADHD and novelty seeking (Faraone et al., 2001; Kluger et al., 2002). Given that the presence of the 7r allele was frequently associated with ADHD and NS, our results are consistent with a possible higher risk for later substance abuse and antisocial psychopathology in this group. In line with evidence from earlier investigations on the present sample, this association could be confirmed in boys only (Becker et al., 2005; El-Faddagh et al., 2004). Gender-specific associations are quite common in molecular genetic research, although their interpretation is often not straightforward. Differences between genders have been investigated in several studies using P300 as an endophenotype for substance abuse. In a study with adults and adolescents, McGue et al. (2001) found that age at first drink was associated with lower P300 amplitudes in both genders. In contrast, van Beijsterveldt et al. (2001) concluded that genetic influences modulated P300 in males, while an environmental contribution was fundamental in females.

The finding that the reduction in P300 amplitude was more pronounced in later trials may point to a stronger habituation, i.e. decrement of the P300 amplitude over repeated stimulation, in boys with the 7r allele as compared to other groups. Psychophysiological research has provided substantial evidence indicating that autonomic hyporesponsiveness, such as a more rapid habituation to novel stimuli, is related to conduct problems and antisocial behavior (Raine, 1996). In this sense, this result is in agreement with

the interpretation of a possible higher risk for later disinhibited psychopathology reflected by lower P300 amplitude.

The auditory oddball paradigm used in the present study yielded reliable stimulus and condition effects. Consistent with the literature, the largest P300 amplitudes were observed in the parietal scalp location and the smallest in the frontal area (van Beijsterveldt et al., 2001). In addition, in the active task, amplitudes were found to be substantially higher than in the passive task, reflecting the higher task demands of the former condition (e.g. performing a motor response). In a study comparing passive and active task conditions, Zenker and Barajas (1999) established that P300 waveforms did not differ substantially between conditions. However, they suggested that task conditions might produce variable patterns of P300 amplitude as a function of age and scalp position. According to our results, differences between DRD4 genotypes depended on task conditions. The finding that the active task yielded a more marked P300 decrement in carriers of the 7r allele at the parietal site while in the passive task attenuation was more pronounced over the frontal area, suggests that different processes and components may underlie these conditions. One possible interpretation may relate to the differentiation of the P3a and P3b variants of P300. The former has a more anterior localization and has been interpreted as reflecting an initial orienting process, while the latter has a more parieto-central distribution which may be indicative of the capacity to use attentional resources. The finding that carriers of the 7r allele show both reduced involuntary responding to novelty and inefficient allocation of attentional resources fits well with phenotypical characteristics associated with this genotype (Lynn et al., 2005).

Although the results reported here are consistent, pointing to an influence of DRD4 7r allele in P300 amplitude and habituation in boys, several limitations have to be considered. First, since our sample is entirely based on Caucasians, our findings may not be generalized to other ethnic groups. Second, our groups of males and females with at least one copy of the 7r allele were rather small, thereby reducing statistical power to detect the involvement of genes of small effect such as DRD4. Third, our results leave open the question of the exact mechanisms underlying a (direct or indirect) genetic influence on the generation of P300 amplitudes. Finally, the finding of a gender-specific association between DRD4 and lower P300 amplitude raises the issue of gender differences in gene expression, which remains unresolved. Further studies are necessary to clarify whether the combination of the DRD4 7r allele and a reduction in P300 amplitude may

be considered a promising biomarker for risk of future disinhibited psychopathology such as substance abuse.

Acknowledgements

This study was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft, from the Federal Ministry for Education and Research – 01EB0110 – “Baden-Wuerttemberg Consortium for Addiction Research” and from the CAPES/PROBRAL/DAAD. We thank the parents and children for their participation in the study and Ingrid Hösch, Mahha El-Faddagh, Ruth Berg and Sabine Eichenherr for their work in the lab.

References

- Achenbach TM (1991) Manual for the Child Behavior Checklist/4–18 and 1991 Profile. University of Vermont, Department of Psychiatry, Burlington
- Anokhin AP, Vedeniapin AB, Sirevaag EJ, Bauer LO, O'Connor SJ, Kuperman S, Porjesz B, Reich T, Begleiter H, Polich J, Rohrbaugh JW (2000) The P300 brain potential is reduced in smokers. *Psychopharmacology (Berl)* 149: 409–413
- Becker K, Laucht M, El Faddagh M, Schmidt MH (2005) The dopamine D4 receptor gene exon III polymorphism is associated with novelty seeking in 15-year-old males from a high-risk community sample. *J Neural Transm* 112: 847–858
- Blum K, Braverman ER, Dinardo MJ, Wood RC, Sheridan PJ (1994) Prolonged P300 latency in a neuropsychiatric population with the D2 dopamine receptor A1 allele. *Pharmacogenetics* 4: 313–322
- Carlson SR, Iacono WG, McGue M (2002) P300 amplitude in adolescent twins discordant and concordant for alcohol use disorders. *Biol Psychol* 61: 203–227
- Ding YC, Chi HC, Grady DL, Morishima A, Kidd JR, Kidd KK, Flodman P, Spence MA, Schuck S, Swanson JM, Zhang YP, Moyzis RK (2002) Evidence of positive selection acting at the human dopamine receptor D4 gene locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 309–314
- Dulawa SC, Grandy DK, Low MJ, Paulus MP, Geyer MA (1999) Dopamine D4 receptor-knock-out mice exhibit reduced exploration of novel stimuli. *J Neurosci* 19: 9550–9556
- El Faddagh M, Laucht M, Maras A, Vohringer L, Schmidt MH (2004) Association of dopamine D4 receptor (DRD4) gene with attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) in a high-risk community sample: a longitudinal study from birth to 11 years of age. *J Neural Transm* 111: 883–889
- Faraone SV, Doyle AE, Mick E, Biederman J (2001) Meta-analysis of the association between the 7-repeat allele of the dopamine D(4) receptor gene and attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Psychiatry* 158: 1052–1057
- Habeych ME, Charles PJ, Scabassi RJ, Kirisci L, Tarter RE (2005) Direct and mediated associations between P300 amplitude in childhood and substance use disorders outcome in young adulthood. *Biol Psychiatry* 57: 76–82
- Hill SY, Locke J, Zezza N, Kaplan B, Neiswanger K, Steinhauer SR, Wipprecht G, Xu J (1998) Genetic association between reduced P300 amplitude and the DRD2 dopamine receptor A1 allele in children at high risk for alcoholism. *Biol Psychiatry* 43: 40–51
- Hill SY, Shen S (2002) Neurodevelopmental patterns of visual P3b in association with familial risk for alcohol dependence and childhood diagnosis. *Biol Psychiatry* 51: 621–631
- Iacono WG, Malone SM, McGue M (2003) Substance use disorders, externalizing psychopathology, and P300 event-related potential amplitude. *Int J Psychophysiol* 48: 147–178
- Kiphardt EJ and Schilling F (1974) Körperkoordinationstest für Kinder (KTK). Beltz, Weinheim
- Kluger AN, Siegfried Z, Ebstein RP (2002) A meta-analysis of the association between DRD4 polymorphism and novelty seeking. *Mol Psychiatry* 7: 712–717
- Laucht M, Esser G, Baving L, Gerhold M, Hoesch I, Ihle W, Steigleider P, Stock B, Stoehr RM, Weindrich D, Schmidt MH (2000) Behavioral sequelae of perinatal insults and early family adversity at 8 years of age. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 39: 1229–1237
- Laucht M, Esser G, Schmidt MH (1997) Developmental outcome of infants born with biological and psychosocial risks. *J Child Psychol Psychiatry* 38: 843–853
- Lichter JB, Barr CL, Kennedy JL, Van Tol HH, Kidd KK, Livak KJ (1993) A hypervariable segment in the human dopamine receptor D4 (DRD4) gene. *Hum Mol Genet* 2: 767–773
- Lin CH, Yu YW, Chen TJ, Tsai SJ, Hong CJ (2001) Association analysis for dopamine D2 receptor Taq1 polymorphism with P300 event-related potential for normal young females. *Psychiatr Genet* 11: 165–168
- Lynn DE, Lubke G, Yang M, McCracken JT, McGough JJ, Ishii J, Loo SK, Nelson SF, Smalley SL (2005) Temperament and character profiles and the dopamine D4 receptor gene in ADHD. *Am J Psychiatry* 162: 906–913
- McGue M, Iacono WG, Legrand LN, Malone S, Elkins I (2001) Origins and consequences of age at first drink. I. Associations with substance-use disorders, disinhibitory behavior and psychopathology, and P3 amplitude. *Alcohol Clin Exp Res* 25: 1156–1165
- Muramatsu T, Higuchi S, Murayama M, Matsushita S, Hayashida M (1996) Association between alcoholism and the dopamine D4 receptor gene. *J Med Genet* 33: 113–115
- Noble EP, Berman SM, Ozkaragoz TZ, Ritchie T (1994) Prolonged P300 latency in children with the D2 dopamine receptor A1 allele. *Am J Hum Genet* 54: 658–668
- Oak JN, Oldenhof J, Van Tol HH (2000) The dopamine D(4) receptor: one decade of research. *Eur J Pharmacol* 405: 303–327
- Polich J, Kok A (1995) Cognitive and biological determinants of P300: an integrative review. *Biol Psychol* 41: 103–146
- Polich J, Ochoa CJ (2004) Alcoholism risk, tobacco smoking, and P300 event-related potential. *Clin Neurophysiol* 115: 1374–1383
- Porjesz B, Begleiter H, Reich T, Van Eerdewegh P, Edenberg HJ, Foroud T, Goate A, Litke A, Chorlian DB, Stimus A, Rice J, Blangero J, Almasy L, Sorbell J, Bauer LO, Kuperman S, O'Connor SJ, Rohrbaugh J (1998) Amplitude of visual P3 event-related potential as a phenotypic marker for a predisposition to alcoholism: preliminary results from the COGA Project. Collaborative Study on the Genetics of Alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res* 22: 1317–1323
- Raine A (1996) Autonomic nervous system factors underlying disinhibited, antisocial, and violent behavior. Biosocial perspectives and treatment implications. *Ann N Y Acad Sci* 794: 46–59
- Ratsma JE, van der Stelt O, Schoffelemeier AN, Westerveld And A, Boudewijn Gunning W (2001) P3 event-related potential, dopamine D2 receptor A1 allele, and sensation-seeking in adult children of alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 25: 960–967
- Roman T, Schmitz M, Polanczyk G, Eizirik M, Rohde LA, Hutz MH (2001) Attention-deficit hyperactivity disorder: a study of association with both the dopamine transporter gene and the dopamine D4 receptor gene. *Am J Med Genet* 105: 471–478
- Rubinstein M, Phillips TJ, Bunzow JR, Falzone TL, Dziewczapolski G, Zhang G, Fang Y, Larson JL, McDougall JA, Chester JA, Saez C, Pugsley TA, Gershanik O, Low MJ, Grandy DK (1997) Mice lacking dopamine D4 receptors are supersensitive to ethanol, cocaine, and methamphetamine. *Cell* 90: 991–1001
- Rubinstein M, Cepeda C, Hurst RS, Flores-Hernandez J, Ariano MA, Falzone TL, Kozell LB, Meshul CK, Bunzow JR, Low MJ, Levine MS, Grandy DK (2001) Dopamine D4 receptor-deficient mice display cortical hyperexcitability. *J Neurosci* 21: 3756–3763

- Rutter M, Quinton D (1977) Psychiatric disorder – ecological factors and concepts of causation. In: McGurk M (ed) *Ecological factors in human development*. North Holland, Amsterdam, pp 173–187
- Strobel A, Debener S, Anacker K, Müller J, Lesch KP, Brocke B (2004) Dopamine D4 receptor exon III genotype influence on the auditory evoked novelty P3. *Neuroreport* 15: 2411–2415
- Touwen BCL, Prechtl HFR (1970) *The neurological examination of the child with minor nervous dysfunction*. Heinemann, London
- Tsai SJ, Yu WY, Chen TJ, Chen MC, Hong CJ (2003) Association analysis for dopamine D3 receptor, dopamine D4 receptor and dopamine transporter genetic polymorphisms and P300 event-related potentials for normal young females. *Psychiatr Genet* 13: 51–53
- van Beijsterveldt CE, van Baal GC, Molenaar PC, Boomsma DI, de Geus EJ (2001) Stability of genetic and environmental influences on P300 amplitude: a longitudinal study in adolescent twins. *Behav Genet* 31: 533–543
- Van der Stelt O, Geesken R, Gunning WB, Snel J, Kok A (1998) P3 scalp topography to target and novel visual stimuli in children of alcoholics. *Alcohol* 15: 119–136
- Wei R, Osterland RS (1979) *Grundintelligenztest CFT 1*. Westermann, Braunschweig
- Zenker F, Barajas JJ (1999) Auditory P300 development from an active, passive and single-tone paradigm. *Int J Psychophysiol* 33: 99–111