



2010



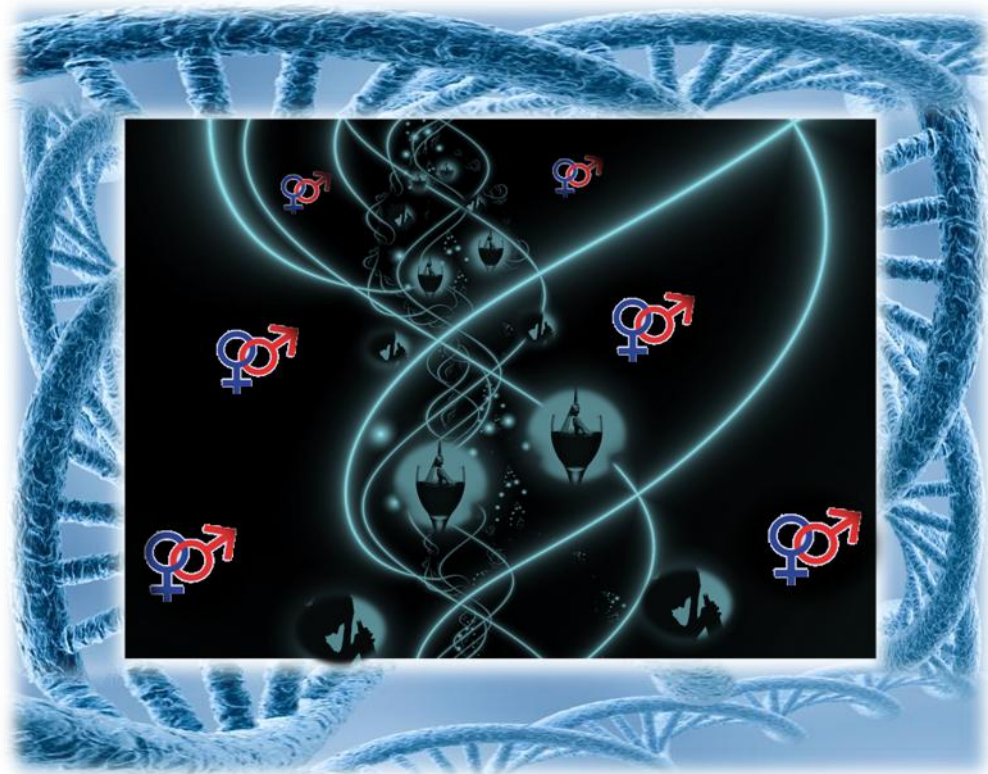
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Alcoolismo e violência doméstica: investigação de variantes genéticas em genes da família do citocromo P450

Andreia T. S. Marques

Alcoolismo e violência doméstica: investigação de variantes genéticas em genes da família do citocromo P450



Andreia Torres da Silva Marques

2010



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Alcoolismo e violência doméstica: investigação de variantes genéticas em genes da família do citocromo P450

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular. O trabalho foi realizado sob a orientação científica da Professora Doutora Alda Ambrósio (Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra) e supervisão do Professor Doutor Rui de Carvalho (Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra)

Andreia Torres da Silva Marques

2010

Agradecimentos

À Unidade de Genética Clínica e Molecular da Delegação de Centro do Instituto Nacional de Medicina Legal, instituição de acolhimento na qual se realizou este trabalho e ao Director do mesmo, Prof Duarte Nuno Vieira.

À Doutora Alda Ambrósio, a minha orientadora, pela amizade, pela partilha de conhecimentos e valores que foram essenciais para a realização desta tese, e que seguramente me serão úteis no futuro, ao longo de toda a carreira de investigação.

Ao Centro Regional de Alcoologia do Centro Maria Lucília Mercês de Mello, particularmente aos Drs Augusto Pinto, Maria Rosário Lameiras, Alexandra Almeida, Ana Feijão, os quais seleccionaram os doentes para a realização deste estudo. Um agradecimento especial aos doentes voluntários que aceitaram participar neste estudo.

Aos meus pais, a quem dedico este trabalho, pela motivação e apoio incondicional que sempre me transmitiram em todos os momentos. Obrigada pelo vosso exemplo de coragem, luta e optimismo, e por me mostrarem que apesar de todos os obstáculos que a nos vida apresenta nunca devemos baixar os braços. Vocês são uma fonte de inspiração na minha vida.

À minha irmã Carla, pelo apoio, pelas dicas sobre formatações e infinitas combinações de cores que se podem utilizar num único slide do *powerpoint*, e sobretudo pelos importantes momentos de descontração que me proporcionou.

À Mariana, minha colega de laboratório de todos os dias, pela amizade e momentos de companheirismo que me proporcionou ao longo de um ano muito intenso.

Aos meus amigos que, independentemente da distância ou fuso horário em que se encontrem, são um verdadeiro tesouro na minha vida.

Publicações

Andreia Marques, Augusto Pinto, Maria Rosário Lameiras, Alexandra Almeida, Ana Feijão, Duarte Nuno Vieira, Alda M Ambrósio. Association study between the CYP2E1 (-1053C>T) and CYP1A2 (C734A) gene polymorphisms and alcoholism in a sample of alcoholics with and without domestic violence in the Portuguese population. (submetido para publicação)

Índice

Abreviaturas	6
Resumo	7
Capítulo 1 – Introdução	9 - 25
1.1 – Alcoolismo e violência doméstica	10
1.2 – Fisiopatologia da doença	12
1.3 – Genética do alcoolismo	13
1.3.1 - Enzimas metabolizadoras de etanol	14
1.3.2 - A superfamília do citocromo P450	15
1.3.2.1 - Genes candidatos	18
1.3.2.1.1 - Gene CYP2E1	18
1.3.2.1.2 - Gene CYP1A2	20
1.4 - Breves considerações sobre genética humana	22
1.4.1 - Genoma humano e variações no DNA	22
1.4.2 - Metodologias para o estudo de doenças complexas	24
1.5 – Objectivos do estudo	25
Capítulo 2 – Materiais e Métodos	26 - 34
2.1 - Caracterização da amostra	27
2.2 - Extracção de DNA genómico	27
2.3 - Quantificação e análise do grau de pureza do DNA	29
2.4 – Amplificação de DNA, análise de restrição e electroforese	30
2.4.1 – Fundamentos teóricos	30
2.4.1.1 – Amplificação de DNA	30
2.4.1.2 – Análise com enzimas de restrição	31
2.4.1.3 – Electroforese em gel de agarose	32
2.4.2 – Genes do CYP450	32
2.4.2.1 – Polimorfismo –1053C>T localizado na região 5'UTR do gene CYP2E1	32
2.4.2.2 - Polimorfismo C734A localizado no intrão 1 do gene CYP1A2	33
2.5 – Análise estatística	34
Capítulo 3 – Resultados e discussão	35 - 46
3.1 – Gene CYP2E1	36

3.2 – Gene CYP1A2	41
Capítulo 4 – Conclusões e perspectivas futuras	47 - 51
4.1 – Conclusões finais	48
4.2 - Perspectivas futuras	48
Capítulo 5 – Referências bibliográficas	52 - 65

Abreviaturas

ADH	Álcool desidrogenase
ALDH	Aldeído desidrogenase
CNVs	<i>copy number variations</i>
CYP450	Cytochrome P450, Citocromo P450
CYP1A2	Citocromo P450, família 1, subfamília A, polipeptídeo 2
CYP2E1	Citocromo P450, família 2, subfamília E, polipeptídeo 1
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTPs	Desoxinucleótidos tri-fosfato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
MEOS	<i>Microsomal Ethanol Oxidizing System</i>
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
STR	<i>Short Tandem Repeat</i>
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TBE	Tris-borato EDTA
UTR	<i>Untranslated region</i>
VNTR	<i>Variable Number Tandem Repeat</i>

Resumo

O alcoolismo é um grave problema de saúde pública global, com implicações a nível social e económico. O consumo excessivo de álcool está associado à violência doméstica, que à semelhança do alcoolismo representa um problema social e de saúde pública igualmente preocupante na actualidade.

A dependência alcóolica é uma doença complexa e multifactorial, que resulta de interacções gene-gene e gene-ambiente, com uma hereditariedade estimada entre 40-60%. A identificação de factores genéticos associados ao alcoolismo poderá eventualmente ter um impacto determinante na diminuição do número de casos de violência doméstica.

Várias evidências têm implicado as enzimas metabolizadoras do etanol, nomeadamente do sistema enzimático do citocromo P450 (CYP450), na fisiopatologia do alcoolismo. Em particular a enzima CYP2E1, o principal componente do sistema microsomal hepático de oxidação do etanol (MEOS) no fígado, é responsável por cerca de 10% da metabolização total do etanol e, simultaneamente, pode ser induzida pelo consumo do mesmo. A enzima CYP1A2, que desempenha também funções ao nível do metabolismo do álcool, é altamente indutível pelo fumo do cigarro, podendo ser importante na interacção entre estas duas dependências que estão frequentemente associadas. Face às evidências, o estudo de variantes genéticas nas enzimas da família CYP450 poderá contribuir para o preenchimento da lacuna existente nesta área de investigação e, por outro lado, responder a algumas questões no âmbito da genética do alcoolismo, com eventuais repercussões na violência doméstica. Assim, neste trabalho investigou-se a associação entre os polimorfismos nos genes CYP2E1 (-1053C>T) e CYP1A2 (C734A) com o alcoolismo e/ou violência doméstica numa amostra de doentes da população Portuguesa bem caracterizada clinicamente, com e sem historial de violência doméstica.

No que se refere ao gene CYP2E1, os resultados obtidos não revelaram associação entre o polimorfismo -1053C>T e o alcoolismo na totalidade da amostra estudada. Na estratificação da amostra por género também não se observaram diferenças estatisticamente significativas, quer para o sexo feminino quer para o sexo masculino, quando comparadas com a amostra controlo. Além disso, com o intuito de se identificar genes de susceptibilidade que predisõem indivíduos alcóolicos para a violência doméstica, analisou-se o polimorfismo -1053C>T no gene CYP2E1, numa amostra de

doentes alcoólicos com e sem historial de violência doméstica, e os resultados obtidos não demonstraram associação entre o polimorfismo mencionado e a violência doméstica. Estes resultados no seu conjunto, parecem sugerir que o polimorfismo -1053C>T do gene CYP2E1 não desempenha um papel major na etiologia do alcoolismo e/ou da violência doméstica.

Em relação ao gene CYP1A2, a análise da distribuição dos genótipos obtidos para a amostra total não revelou associação entre o polimorfismo C734A e o alcoolismo, apesar de se verificar uma ligeira tendência de associação ($\chi^2 = 5,244$; $df = 2$; $p = 0,073$). A análise da distribuição alélica detectou diferenças estatisticamente significativas entre a amostra de doentes alcoólicos e os controlos ($\chi^2 = 4,197$; $df = 1$; $p = 0,040$). Por outro lado, não se obteve associação entre o polimorfismo C734A do gene CYP1A2 e o alcoolismo na amostra estratificada por género, e também ao comparar a amostra de doentes alcoólicos com e sem historial de violência doméstica. Apesar dos resultados obtidos carecerem de replicação em diferentes populações mundiais, os mesmos sugerem que o polimorfismo C734A poderá ser um factor de risco para a dependência alcoólica na população Portuguesa. No que se refere à violência doméstica, os resultados permitem inferir que o polimorfismo C734A do gene CYP1A2 não está directamente envolvido na violência doméstica.

Face aos resultados obtidos, e uma vez que este estudo é pioneiro na investigação do gene CYP1A2 na etiologia do alcoolismo, espera-se que o conhecimento adquirido possa contribuir, no futuro, para a prevenção, aplicação de terapêuticas individualizadas aos doentes alcoólicos e detecção precoce de indivíduos de risco, que no seu conjunto poderão conduzir a uma diminuição do número de vítimas.

Palavras-chave: Alcoolismo, Violência doméstica, Genética; CYP2E1, CYP1A2

Capítulo 1

Introdução

1 – Introdução

1.1 - Alcoolismo e violência doméstica

O alcoolismo constitui um grave problema de saúde pública, com repercussões a nível social e económico (Rehm et al., 2009). O abuso do consumo de álcool (etanol) está frequentemente associado ao aumento da criminalidade, suicídio, acidentes de viação, situações de desestruturação familiar e violência doméstica (Skog, 2001; Gmel and Rehm, 2003). Os custos envolvidos em tratamentos de desintoxicação e de patologias associadas ao alcoolismo, contribuem para um aumento dos encargos do sistema de saúde e para um impacto negativo na economia (Rehm et al., 2009).

Os cerca de 2 biliões de consumidores de álcool em todo o mundo (WHO, 2004) confirmam o estatuto desta substância como uma das drogas de abuso de utilização mais comum e culturalmente aceite (Figura 1). O consumo excessivo de álcool apresenta no entanto consequências dramáticas para o indivíduo, frequentemente superiores às de outras substâncias psicotrópicas e com um registo global estimado em cerca de 1,8 milhões de mortes por ano (WHO, 2004). Na Europa registam-se índices de consumo de álcool mais elevados, com graves implicações para a saúde, sendo os jovens e os indivíduos do sexo masculino os mais afectados (Rehm et al., 2006, 2007). Portugal apresenta um dos índices de consumo de álcool *per capita* mais elevados do mundo, sendo um dos maiores consumidores da União Europeia, com um milhão e oitocentos mil consumidores excessivos ou doentes alcoólicos crónicos (WHO, 2004). Estima-se que em Portugal a mortalidade ligada ao álcool seja a quarta causa de morte. O consumo de álcool é muito popular nas faixas etárias mais jovens, verificando-se que mais de 60% dos jovens com idades compreendidas entre os 12 e os 16 anos e mais de 70% acima dos 16 anos consomem bebidas alcólicas com regularidade. Apesar das estratégias de prevenção e tratamento actualmente disponíveis, estas apresentam uma eficácia moderada e altas taxas de recaídas, numa população em que cerca de 10% dos indivíduos acima de 15 anos são dependentes de álcool e 13% são consumidores excessivos (Rehm et al., 2001). Estes dados demonstram uma realidade com tendência para um agravamento, pelo que é fundamental a adopção de medidas de prevenção e combate ao alcoolismo e às suas consequências devastadoras.

Como referido anteriormente, o abuso do consumo de álcool está associado à violência doméstica, que representa um problema social e de saúde pública igualmente preocupante na actualidade. A violência doméstica pode ser definida como qualquer

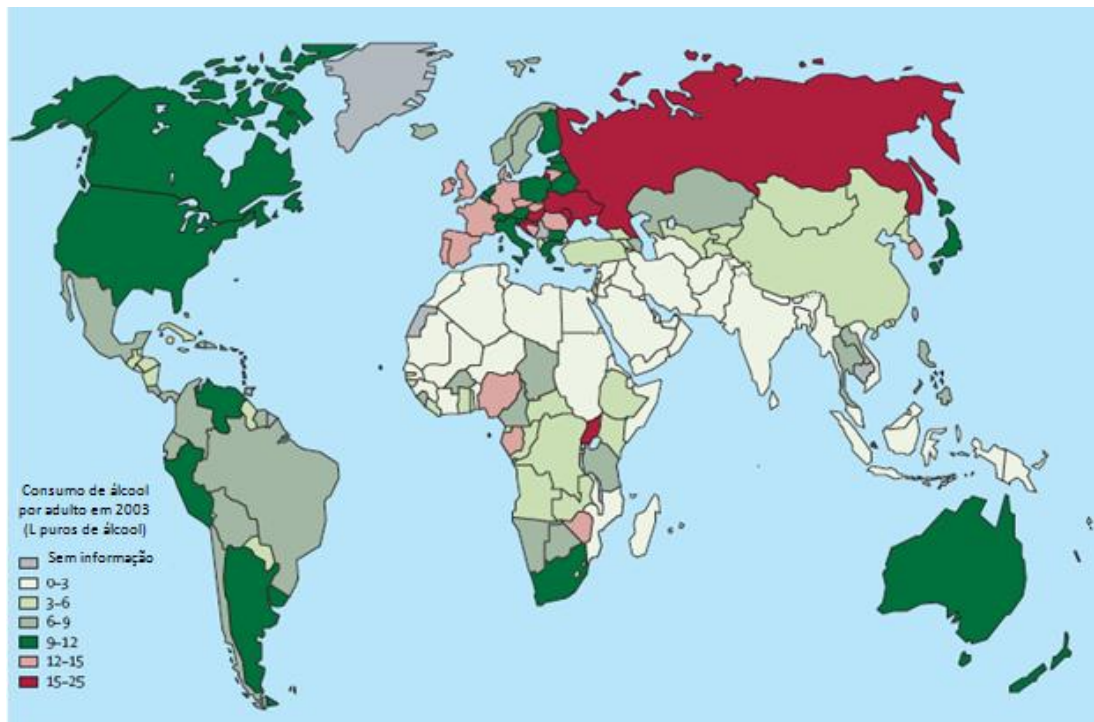


Figura 1 – Consumo de álcool no mundo. Adaptado de Rehm et al., 2009.

acto susceptível de causar danos físicos, sexuais, psicológicos ou económicos ao parceiro de uma relação íntima actual ou anterior (WHO, 1996). Num sentido mais amplo abrange qualquer indivíduo que resida no mesmo espaço doméstico, incluindo crianças e idosos. A violência doméstica atinge todas as classes sociais, faixas etárias, religiões e etnias, mas afecta sobretudo o sexo feminino, sendo o agressor geralmente do sexo masculino. Estima-se que na Europa a violência contra as mulheres no espaço doméstico constitui a maior causa de morte e invalidez entre mulheres dos 16 aos 44 anos (Council of Europe, 2002). Um estudo da Organização Mundial de Saúde (OMS) envolvendo vários países revelou que a proporção de mulheres que já experienciaram situações de violência física, sexual ou ambas por parte dos seus parceiros varia entre 15% a 71% (WHO, 2005). Em Portugal a violência doméstica é o quarto tipo de crime mais registado (7%), com um número de participações superior a 30 mil no ano de 2009, correspondendo a mais de um quarto dos crimes contra pessoas (28%) (Direcção Geral da Administração Interna, 2010).

A violência doméstica tem graves consequências para a saúde da vítima, que vão para além dos danos físicos, incluindo também problemas mentais tais como depressão, ansiedade, stress, comportamento suicida, entre outros (Ellsberg, 2006). Em situações extremas a violência pode mesmo conduzir à morte da vítima. Estima-se que em todo o mundo 40% a 70% dos homicídios de mulheres são cometidos pelos respectivos parceiros, geralmente no contexto de uma relação abusiva (Ellsberg, 2006). A dimensão e as graves consequências da violência doméstica na sociedade em geral, realçam a importância da aplicação de medidas de prevenção e combate contra este flagelo.

O consumo de álcool, nomeadamente o consumo pesado de bebidas alcólicas, tem sido um dos factores associados à violência doméstica (Foran e O'Leary, 2008). O álcool actua frequentemente como um catalizador da violência, verificando-se uma maior prevalência de casos de alcoolismo entre os agressores (Foran e O'Leary, 2008). Por outro lado, o tratamento do alcoolismo é frequentemente acompanhado por uma redução da violência (Stuart et al., 2009). Contudo, não é possível traçar uma relação causal directa entre alcoolismo e a violência doméstica, uma vez que esta última pode resultar de uma complexa interacção entre factores biológicos, psicológicos e sócio-culturais (Klostermann e Fals-Stewart, 2006).

1.2 - Fisiopatologia do alcoolismo

O alcoolismo abrange um vasto conjunto de alterações fisiológicas, cognitivas e comportamentais. Trata-se por definição de uma doença crónica e progressiva, de natureza multifactorial, caracterizada pelo desenvolvimento de dependência e tolerância ao álcool e pela incapacidade do indivíduo em controlar o seu consumo, apesar das consequências adversas. Existe geralmente um padrão inicial de consumo normal de álcool, que evolui mediante um aumento na frequência e quantidade da sua utilização, até se tornar incontrolável (Moussas et al., 2009). Estabelece-se assim um estado de dependência, com todos os problemas físicos e psicológicos associados e que podem ser fatais em situações extremas. A ausência do consumo leva ao aparecimento de sintomas de privação e episódios de *craving* que potenciam as recaídas (Becker, 2008).

Os efeitos agudos característicos do consumo inicial de álcool, que incluem uma sensação de bem-estar, euforia e efeitos sedativos, sofrem alterações com o aumento do tempo de exposição (Figura 2). O consumo prolongado de álcool desencadeia mecanismos de adaptação do organismo, desenvolvimento de tolerância e consequente

redução dos efeitos das doses iniciais de álcool. O consumo crónico de álcool causa danos severos em órgãos tão importantes como o fígado (Dey and Cederbaum, 2006), pâncreas (Apte et al., 2009), coração (Piano, 2002) e cérebro (Harper e Matsumoto, 2005). A sua acção no sistema nervoso central afecta funções motoras, cognitivas e comportamentais. Estes danos são também acompanhados por um aumento do stress oxidativo e um impacto negativo ao nível das funções imunitárias e metabólicas do organismo (Díaz et al., 2002; Albano, 2006), contribuindo para o agravamento dos efeitos patológicos do álcool. A dependência alcoólica apresenta comorbidades e conduz ao desenvolvimento de outras patologias, principalmente de neoplasias malignas, doenças cardiovasculares, obesidade, diabetes *mellitus*, cirrose hepática (Rehm et al., 2009).

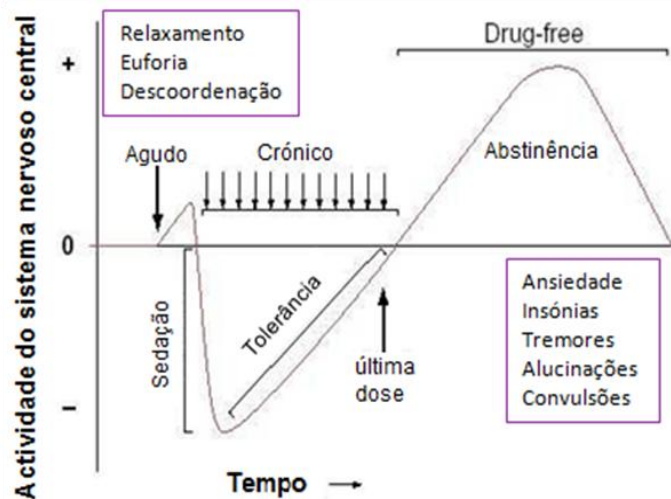


Figura 2 – Efeitos do álcool durante o período de exposição e de privação.

Adaptado de Finn e Crabbe, 1997.

1.3 - Genética do alcoolismo

A natureza complexa e multifactorial do alcoolismo resulta de interacções gene-gene e gene-ambiente (Köhnke, 2008). De facto, vários estudos familiares, de gémeos e de adopção demonstram a importância dos factores genéticos na susceptibilidade para a dependência alcoólica, com uma hereditariedade estimada entre os 40-60% (Mayfield, 2008).

A fisiopatologia do alcoolismo envolve múltiplos processos bioquímicos, durante os quais vários sistemas de neurotransmissores e enzimas metabolizadoras de

etanol podem ser afectados (Zakhari, 2006; Clapp et al., 2008). O álcool interfere na síntese, libertação e acção de vários neurotransmissores e seus receptores (Clapp et al., 2008), originando alterações nos níveis de neurotransmissores como o glutamato, GABA, dopamina ou mesmo no neuropeptídeo Y (Köhnke, 2008; Moussas et al., 2009). Os efeitos do álcool estendem-se ao sistema mesolímbico dopaminérgico, circuito envolvido nos mecanismos de recompensa e viciação. As enzimas metabolizadoras de álcool desempenham um papel igualmente importante no desenvolvimento do alcoolismo e na extensão dos seus efeitos no organismo (Zakhari, 2006). Deste modo, tem sido investigado o envolvimento de vários genes na etiologia do alcoolismo, nomeadamente de genes dos sistemas dopaminérgico, gabaérgico e glutamatérgico (Köhnke, 2008), e genes que codificam as enzimas responsáveis pelo metabolismo oxidativo do etanol (Zintzaras et al., 2006). Contudo, o papel dos genes envolvidos nos sistemas mencionados na etiologia do alcoolismo permanece por esclarecer, sendo necessária a realização de estudos adicionais com outros genes.

1.3.1 - Enzimas metabolizadoras de etanol

O metabolismo oxidativo do álcool é um processo que envolve a participação de vários sistemas enzimáticos (Zakhari, 2006). Este é inicialmente convertido em acetaldeído, numa reacção de oxidação geralmente catalizada por álcool desidrogenases (ADHs). Outras vias alternativas para a oxidação do álcool incluem a enzima catalase ou o sistema microsomal hepático de oxidação do etanol (MEOS), sendo a actividade deste último dependente do citocromo P450 (CYP450). O acetaldeído produzido nestas reacções é posteriormente metabolizado em acetato por acção da aldeído desidrogenase (ALDH).

A generalidade das enzimas envolvidas nas vias metabólicas mencionadas podem apresentar várias isoformas geneticamente determinadas e com actividade enzimática variável (Edenberg, 2007). A presença de isoformas com maior ou menor actividade é um factor determinante para a taxa de metabolização de álcool observada para cada indivíduo. Estas alterações metabólicas vão condicionar o grau de resposta ao álcool e a intensidade dos seus efeitos no organismo. No caso de indivíduos portadores de isoformas com maior actividade enzimática envolvidas na oxidação inicial do álcool, verifica-se uma maior formação e acumulação de acetaldeído. Por outro lado, a presença de isoformas com menor actividade enzimática de ALDH leva a uma oxidação mais

lenta de acetaldeído e uma maior acumulação deste composto tóxico no organismo após o consumo de álcool.

O papel fundamental desempenhado por estas enzimas no metabolismo do álcool e a sua influência no grau de resposta do organismo ao consumo do mesmo tornam estas enzimas um alvo de estudo interessante no âmbito da fisiopatologia do alcoolismo. Por outro lado, a grande variabilidade genética e funcional destas enzimas reforçam a importância do estudo dos respectivos genes que as codificam, como eventuais factores de risco para o alcoolismo (Zintzaras et al., 2006; Edenberg, 2007).

De facto, ainda não estão descritos com clareza genes específicos e os mecanismos envolvidos no risco para o desenvolvimento do alcoolismo. Assim, identificar e compreender os factores de susceptibilidade genética para o alcoolismo e a sua relação com os mecanismos envolvidos na dependência e recaídas, será determinante na prevenção, diagnóstico e desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

1.3.2 - A superfamília do citocromo P450

A superfamília CYP450 abranje um conjunto de hemeoproteínas presentes na generalidade dos seres vivos e com uma actividade catalítica muito diversificada (McLean et al., 2005; Guengerich, 2007). Geralmente efectuam a oxidação de substratos orgânicos, utilizando o NADPH como cofactor (Figura 3). A designação

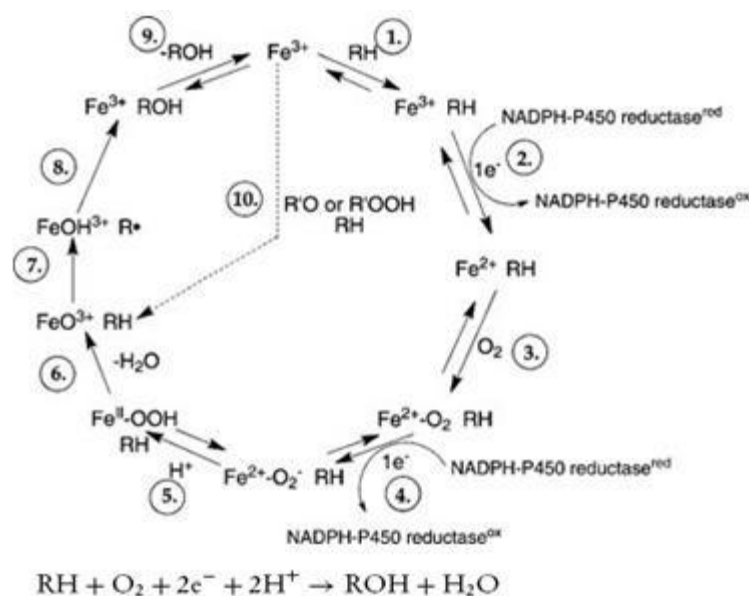


Figura 3- Ciclo da actividade catalítica do CYP450. Adaptado de Guengerich, 2007.

CYP450 deriva do facto de estas enzimas se ligarem às membranas ao longo da célula (cyto) e devido à presença de um grupo tiol-heme, responsável pela absorção de luz a comprimentos de onda próximos dos 450nm, quando na presença de monóxido de carbono (Hasler et al., 1999).

Este sistema enzimático desempenha um papel essencial não apenas ao nível da metabolização de substratos endógenos, tais como ácidos gordos e várias hormonas, mas também de xenobióticos, incluindo carcinogénios, álcool, fármacos e outros químicos (Sikka et al, 2005). Estas enzimas encontram-se ligadas à membrana do retículo endoplasmático das células de vários órgãos, sendo expressas principalmente no fígado e em menor extensão em outros órgãos como o intestino, pulmões ou cérebro (Hasler et al., 1999).

A multiplicidade de isoformas existente está de acordo com a variedade de mecanismos de regulação a que estas enzimas se encontram sujeitas a nível transcripcional, pós-transcripcional e pós-traducional (Figura 4). Estes mecanismos de regulação podem variar de acordo com o tipo de tecido resultando em variações ao nível da composição em isoformas e da actividade enzimática nos diferentes tecidos.

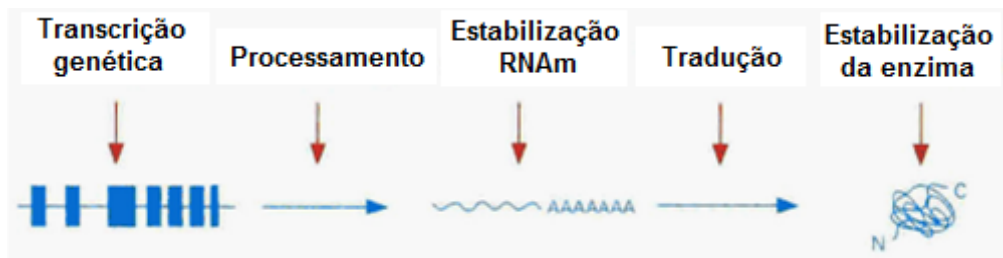


Figura 4 – Multiplicidade de mecanismos de regulação da expressão do CYP450.

Adaptado de Porter e Coon, 1991.

Foi desenvolvida uma nomenclatura baseada na homologia da sequência de aminoácidos dos diversos CYP450s (Nelson, 2006). Os genes e respectivas enzimas codificadas por estes recebem a designação de CYP (cytochrome P450), seguida da atribuição sequencial de um número árabe, letra e número árabe, correspondendo à família (>40% identidade), subfamília (>55% de identidade) e gene específico dentro da subfamília respectivamente (Figura 5-A). Segundo os dados mais recentes, estão identificadas 18 famílias de genes em humanos, 44 subfamílias, 58 pseudogenes (sequências de DNA genómico semelhantes aos genes normais, mas sem capacidade funcional) e 57 genes funcionais sequenciados (Nelson et al., 2004).

Apesar da diversidade de genes P450 existente em humanos, apenas um grupo restrito codifica as enzimas responsáveis pela metabolização de cerca de 90% dos compostos: CYP1A2, CYP2C9, CYP3A4, CYP2D6 e CYP3A5, incluídas nas famílias 1,2 e 3 (Bibi, 2008) (Figura 5-B). A distribuição de isoformas com maior ou menor actividade enzimática na população permite classificar os indivíduos como metabolizadores lentos, rápidos ou ultra-rápidos.

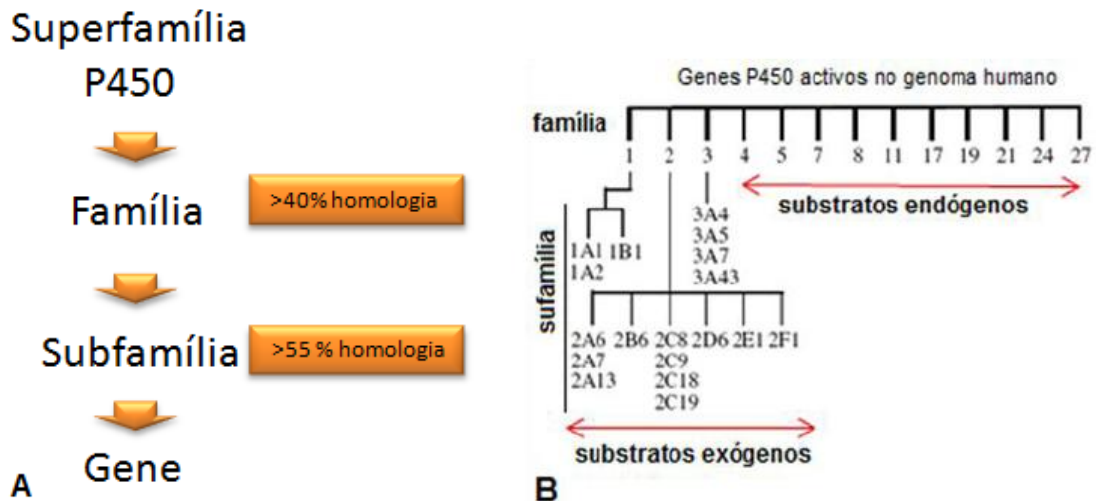


Figura 5 – Diversidade genética no sistema P450. **(A)** Sistema de nomenclatura utilizado para agrupar os diferentes genes P450 com base no grau de homologia da sequência de aminoácidos. **(B)** Genes P450 funcionais no genoma humano, incluindo as famílias 1-3, contendo as principais enzimas envolvidas no metabolismo de xenobióticos. Adaptado de Ingelman-Sundberg e Rodriguez-Antona 2005.

As diferenças que se observam no metabolismo devem-se essencialmente à grande variabilidade genética que caracteriza as enzimas CYP450. A variabilidade existente é de extrema importância uma vez que vai influenciar a resposta de doentes a determinados fármacos e outros xenobióticos (entre os quais o álcool), a interacção destes com outros compostos, eventuais efeitos secundários e grupos de risco (Lynch and Price, 2007; Bibi, 2008). A importância farmacológica e toxicológica destas enzimas tem por isso despertado o interesse de vários grupos de investigação, devido às potenciais aplicações clínicas e terapêuticas (Bibi, 2008).

1.3.2.1 - Genes candidatos

1.3.2.1.1 - Gene CYP2E1

A subfamília CYP2E1 apenas descrita em mamíferos contém uma única isoforma identificada em humanos, CYP2E1 (Citocromo P450, família 2, subfamília E, polipeptídeo 1). Várias evidências sugerem um papel importante da enzima CYP2E1 na etiologia do alcoolismo. Esta é constitutivamente expressa no fígado, órgão onde atinge níveis máximos de expressão, em particular nas regiões mais vulneráveis aos danos causados por etanol (Lieber, 2004). Esta isoforma representa 7% do conteúdo total de P450 no fígado (Omiecinski et al., 1999) sendo também expressa, em menor extensão, em outros locais severamente afectados pelo consumo de etanol como o tracto gastrointestinal (Thörn et al., 2005) ou o cérebro (Upadhyia et al., 2000). A isoforma CYP2E1 é o principal constituinte do MEOS, uma das vias envolvidas no metabolismo oxidativo do etanol e outros xenobióticos e que actua independentemente da ADH (Lieber, 2004). Por outro lado, altas concentrações de etanol exercem um forte efeito indutor na actividade catalítica da CYP2E1, levando a um aumento da transcrição e da estabilidade da enzima através de mecanismos transcripcionais, pós-transcripcionais e pós-traducionais (Lieber, 2004). O efeito indutor do etanol na actividade da enzima pode impedir a entrada de quantidades excessivas de álcool em circulação, exercendo um efeito protector. No entanto, os subprodutos resultantes do aumento desta actividade catalítica favorecem a acumulação de acetaldeído e radicais livres, responsáveis pela ocorrência de danos oxidativos em vários órgãos, principalmente ao nível do fígado (Albano, 2006). Verifica-se portanto uma dualidade de efeitos em que, por um lado, a actividade da CYP2E1 promove a activação de carcinogénios e outros compostos tóxicos e, por outro lado, desempenha funções importantes ao nível do metabolismo, nomeadamente na gluconeogénese, e na destoxificação de uma grande variedade de xenobióticos, entre os quais o etanol (Figura 6).

Para além do consumo de etanol, vários outros compostos endógenos ou exógenos podem actuar como substratos e, simultaneamente, induzir a actividade da enzima (Ingelman-Sundberg, 2004). Factores como o estado nutricional e metabólico do organismo, obesidade ou diabetes participam também nos complexos mecanismos de regulação da actividade desta enzima (Koop, 2006). A variabilidade considerável nos padrões de expressão e actividade interindividual podem igualmente reflectir o

envolvimento de factores genéticos.

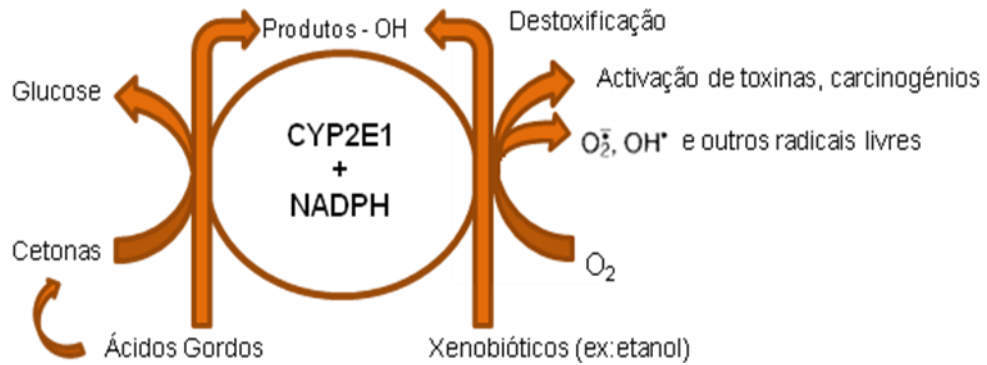


Figura 6 – Funções fisiológicas da enzima CYP2E1. Adaptado de Lieber, 1999.

O gene CYP2E1 humano, localizado no cromossoma 10 (Umeno et al., 1988), é constituído por 9 exões e 8 intrões (figura 7). A presença de várias regiões polimórficas neste gene e a influência que a respectiva enzima por este codificada exerce, ao nível do metabolismo do etanol (Zintzaras et al., 2006), têm estimulado a investigação no sentido de desvendar o eventual papel de polimorfismos do gene CYP2E1 na etiologia do alcoolismo.



Figura 7 – Representação esquemática do gene CYP2E1

O polimorfismo $-1053C>T$, situado na região reguladora 5' do gene CYP2E1, constitui um local de restrição identificável pela enzima RsaI (Hayashi et al., 1991). Este origina os alelos CYP2E1*1 (c1) e CYP2E1*2 (c2), sendo este último a forma mutante responsável pelo aumento da transcrição e actividade catalítica da enzima (Hayashi et al., 1991). Vários grupos de investigação têm analisado uma eventual associação deste polimorfismo com o consumo excessivo de álcool (Sun et al., 1999; Sun et al., 2002) e com o alcoolismo (Carr et al., 1995; Parsian et al., 1998; Wong et al., 2000; Konishi et al., 2003; Konishi et al., 2004; Loza et al., 2006; Cichoz-Lach et al., 2008; Khan et al., 2009) mas os resultados obtidos não são consensuais. O fígado representa o local de maior expressão da isoforma CYP2E1, e simultaneamente o órgão mais severamente afectado pelos efeitos adversos do metabolismo do etanol. Deste

modo, vários estudos têm investigado o efeito de polimorfismos no gene CYP2E1 nos níveis de expressão e actividade da enzima e no aparecimento de danos hepáticos (Savolainen et al., 1997; Burim et al., 2004; Vidal et al., 2004; Khan et al., 2009). Também nestes casos se verifica uma grande inconsistência nos resultados dos vários estudos e nas diferentes populações estudadas.

Constata-se uma grande discrepância nos resultados obtidos em estudos de associação entre polimorfismos no gene CYP2E1 e o alcoolismo. Factores como as diferenças étnicas entre as populações, efeitos resultantes da interacção com outros genes ou combinações de vários polimorfismos podem contribuir para esta diversidade de resultados. São ainda escassos os estudos que demonstram uma associação destes polimorfismos com uma maior susceptibilidade para a dependência alcoólica.

1.3.2.1.2 - Gene CYP1A2

A subfamília CYP1A é constituída por CYP1A1, expressa principalmente em tecidos extrahepáticos, e por CYP1A2, sendo esta última predominantemente expressa no fígado (Ingelman-Sundberg, 2004). A isoforma CYP1A2 (Citocromo P450, família 1, subfamília A, polipeptídeo 2) representa cerca de 13% do conteúdo total de P450 no fígado, local onde é constitutivamente expressa e altamente indutível através da via mediada pelo receptor aril de hidrocarbonetos (Kimura et al., 1986; Shimada et al., 1994). Esta enzima é responsável pelo metabolismo oxidativo de substratos endógenos, fármacos e ainda pela activação de carcinogénios e consequente produção de intermediários reactivos que podem causar danos no DNA (Ingelman-Sundberg, 2004). A cafeína é predominantemente metabolizada pela CYP1A2, sendo frequentemente utilizada como marcador *in vivo* para a medição da actividade metabólica desta isoforma (Kot e Daniel, 2008). Com base na concentração urinária ou salivar de metabolitos derivados da cafeína é possível determinar o grau de actividade da CYP1A2. A sua actividade enzimática pode ser induzida por fenobarbital, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) e outros químicos, muitos dos quais presentes no fumo do cigarro (Sikka et al., 2005). Este último actua como um forte indutor da actividade enzimática. O aumento da actividade da enzima CYP1A2 e consequente exposição a compostos tóxicos tem sido associado a uma maior susceptibilidade para determinados tipos de cancro, particularmente em fumadores (Ma e Lu, 2007). Factores ligados à dieta, diferenças entre sexos, determinados tipos de medicação (por exemplo os

contraceptivos orais) ou a exposição a químicos ambientais têm sido também apontados como sendo responsáveis por alterações na actividade da enzima CYP1A2 (Ingelman-Sundberg, 2004; Sikka et al., 2005; Franconi et al., 2007). A variabilidade na actividade catalítica desta enzima tem consequências ao nível do metabolismo de fármacos, afectando a sua eficácia e segurança, para além de potenciar a acção de procarcinogénios e uma maior incidência de cancro.

Algumas evidências sugerem uma relação entre a actividade da CYP1A2 e o metabolismo do álcool. Existem outras isoformas, para além da CYP2E1 envolvidas na oxidação do etanol (Lieber, 2004). A CYP1A2 contribui para a oxidação do etanol em microsomas de ratos e provavelmente desempenhará funções semelhantes no MEOS de humanos. O seu envolvimento na oxidação do álcool poderá eventualmente contribuir para o desenvolvimento de hepatopatologia alcóolica.

À semelhança do que se verifica para a isoforma CYP2E1, alguns autores propõem que o consumo de álcool influencie a expressão e actividade da CYP1A2. Com efeito, Roberts e colaboradores verificaram que a privação de etanol resultou num decréscimo de cerca de 30-40% no conteúdo em CYP1A2 em ratos dependentes, ao contrário de outras isoformas (Roberts et al., 1994). Um estudo efectuado em humanos, revelou uma redução da actividade enzimática em doentes alcóolicos crónicos, mesmo após um período de abstinência superior a 2 semanas (Kukongviriyapan et al., 2004).

Um outro aspecto de interesse reside na particularidade desta isoforma ser indutível pelo fumo do cigarro. De facto, o consumo de tabaco associado ao alcoolismo é uma situação frequente, estimando-se que cerca de 80% dos indivíduos com dependência alcóolica são também fumadores (Hughes, 1996). Aparentemente a dependência de nicotina tem um maior grau de severidade e impacto na saúde em indivíduos com um historial de consumo crónico de álcool, sugerindo a existência de um efeito sinérgico entre as duas drogas de abuso (Gulliver et al., 2006). A actividade da CYP1A2 poderá eventualmente desempenhar um papel importante nesta interacção.

As implicações clínicas, farmacológicas e toxicológicas da actividade da enzima CYP1A2 são factores que têm estimulado a investigação no sentido de avaliar o efeito de factores genéticos na variabilidade da actividade enzimática.

O gene CYP1A2, localizado no cromossoma 15, é constituído por 7 exões e 6 intrões (Jaiswal et al., 1987; Ikeya et al., 1989) (Figura 8). Este gene possui várias regiões polimórficas ao longo da sua sequência, tendo sido por exemplo identificada a

presença de vários polimorfismos ao longo das regiões reguladoras da transcrição (Sachse et al., 2003).

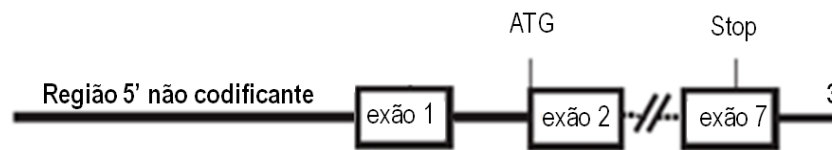


Figura 8 – Representação esquemática da estrutura do gene CYP1A2.

O polimorfismo C734A, localizado no intrão 1 do gene CYP1A2, tem sido associado a um aumento da actividade catalítica da enzima em fumadores (Chida et al., 1998; Sachse et al., 1999; Sachse et al., 2003; Ghobti et al., 2007; Gunes et al., 2009). Especula-se que uma alteração num eventual domínio de ligação do intrão 1 estará na origem de uma maior indutibilidade do CYP1A2 pelos componentes presentes no fumo do tabaco (Sache et al., 1999). Não existem no entanto estudos de associação que relacionem a presença de polimorfismos no gene CYP1A2 com o alcoolismo, constituindo uma linha de investigação ainda em aberto.

1.4 - Breves considerações sobre genética humana

1.4.1 - Genoma humano e variações no DNA

O genoma humano representa a totalidade da informação genética contida no núcleo de uma célula, ou seja, aproximadamente 6 milhões de pares de bases (pb) de DNA distribuídas por 23 pares de cromossomas. O conjunto desta informação é codificado pelo ácido desoxirribonucleico (DNA), uma molécula com uma estrutura em dupla hélice e constituída por sequências de nucleótidos (Watson e Crick, 1953). Os segmentos de DNA localizados num determinado *locus* e que codificam proteínas são designados de genes. Genericamente os genes apresentam na sua estrutura regiões codificantes, que determinam a sequência de aminoácidos da proteína (exões), regiões não codificantes, que são removidas após o processo de splicing (intrões) e sequências reguladoras 5'UTR (*untranslated region*) e 3' UTR que flanqueiam o gene (Ellsworth e Manolio, 1999)

As variações que ocorrem nas sequências genómicas tornam único o genoma de cada indivíduo. Na origem dessas variações estão vários mecanismos que incluem substituições de nucleótidos, inserções/delecções de nucleótidos ou repetições de um ou

vários nucleótidos. Estas variações genéticas estão na base da ocorrência simultânea numa população de duas ou mais formas alternativas de um gene (alelos) para um mesmo *locus* (Burton et al., 2005). Alterações permanentes na sequência de DNA podem originar mutações frequentemente associadas a patologias.

Existe um subgrupo de variações genéticas ao qual se atribui a designação de polimorfismos, sempre que a sua frequência numa determinada população seja significativa, geralmente igual ou superior a 1% segundo alguns autores (Burmeister, 1999). Estas sequências polimórficas de DNA podem ser utilizadas como marcadores genéticos, desde que apresentem localização genómica conhecida e um grau de heterozigotia significativo (Burton, 2005). Os polimorfismos podem ser classificados em vários tipos: *restriction fragment length polymorphisms* (RFLPs), minisatélites ou *variable number of tandem repeats* (VNTRs), microsátélites ou *short tandem repeats* (STRs), *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) e *copy number variations* (CNVs) (Nakamura, 2009).

Os RFLPs foram os primeiros marcadores utilizados com sucesso em estudos genéticos e consistem na alteração de um par de bases (Botstein et al., 1980). Estes constituem locais de clivagem para enzimas de restrição que reconhecem locais específicos na sequência de DNA, efectuando ou não o corte da sequência de acordo com o alelo presente. A substituição de bases no local de restrição reconhecido pela endonuclease podem originar diferenças no tamanho dos segmentos de DNA digeridos, que se reflectem posteriormente em diferentes padrões de migração, quando sujeitos a uma electroforese. Relativamente aos VNTRs, estes correspondem a repetições sucessivas de nucleótidos (6-90) ao longo da cadeia de DNA. São marcadores altamente polimórficos, mas com uma frequência mais reduzida no genoma (Nakamura, 2009). Por outro lado, os STRs consistem em curtas sequências repetitivas de nucleótidos (2-5) que estão presentes em regiões que abrangem grande parte do genoma (Weber e May, 1989). No entanto os marcadores actualmente mais utilizados no mapeamento de genes de susceptibilidade de doenças complexas são os SNPs (Nakamura, 2009). Estes consistem na substituição de um único nucleótido, originando dois alelos para o mesmo *locus*. Uma das grandes vantagens dos SNPs reside no facto de estes serem as variações genéticas mais comuns no genoma humano (90%), com uma ocorrência média de 1 SNP/1000 pb, estimando-se que existam cerca de 11 milhões de SNPs (Kruglyak e Nickerson, 2001). A sua localização e abundância no genoma, bem como a possibilidade da sua análise poder ser efectuada com recurso às mais recentes

tecnologias, nomeadamente com a automação das técnicas de genotipagem (LaFramboise, 2009), tornam os SNPs os marcadores mais promissores e com maior potencial para o estudo de doenças complexas. Mais recentemente foram descobertas as CNVs, ou seja, variações estruturais que se reflectem em diferenças no número de cópias de uma determinada região genómica (Nakamura, 2009).

As variações genéticas desempenharam desde sempre um papel central na evolução da genética, nomeadamente na concretização de dois grandes marcos da história da genética humana: o Projecto do Genoma Humano (PGH) e o projecto HapMap. O Projecto Genoma Humano envolveu essencialmente 16 laboratórios de 6 países num esforço internacional para o mapeamento e determinação das sequências que compõem o DNA humano e marcou o início de uma nova era na investigação de doenças complexas (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001). Concluiu-se que apenas cerca de de 1,5% do genoma é responsável pela codificação de proteínas, sendo o restante constituído por sequências reguladoras ou com função desconhecida (International Human Genome Sequencing Consortium, 2004). Posteriormente surgiu o projecto HapMap, com o objectivo principal de identificar e comparar padrões comuns de diversidade genética em diferentes populações mundiais (The International HapMap Consortium, 2003). O conhecimento adquirido permitiu o desenvolvimento de mapas destes padrões no genoma e a identificação de haplotipos, combinações de alelos que são herdados em conjunto e que permitem caracterizar a variabilidade genética da região cromossómica em que se localizam. Cerca de 4 milhões de SNPs foram identificados, estudados e comparados entre as diferentes populações, permitindo o desenvolvimento de novas ferramentas para estudos genéticos de associação (The International HapMap Consortium, 2007).

1.4.2 - Metodologias para o estudo de doenças complexas

Algumas patologias raras são monogénicas, ou seja, são causadas por variações num único gene e obedecem a um padrão de transmissão mendeliano. Nestes casos, a estratégia preferencial para identificação do gene responsável pela doença é a análise de *linkage* (Botstein e Risch, 2003). Contudo, a grande maioria das patologias obedece a um modo de transmissão não mendeliano (doenças complexas), envolvendo vários genes cuja contribuição individual para a doença é reduzida (Lander e Schork, 1994). Os estudos de *linkage* são importantes para a identificação de genes major, enquanto

que os estudos de associação possibilitam a detecção de genes de efeito reduzido (Risch e Merikangas, 1996) sendo portanto a estratégia mais utilizada no estudo de doenças complexas.

Os estudos de associação investigam variações nas frequências alélicas ou genotípicas numa população de indivíduos sem relações de parentesco entre si, comparando um grupo de indivíduos afectados pela doença com um grupo controlo. Este tipo de estudos não requer o conhecimento prévio do modo de transmissão familiar da doença, no entanto a escolha criteriosa do grupo controlo e uma caracterização rigorosa do fenótipo são factores cruciais para a identificação de genes de susceptibilidade do alcoolismo (Healy, 2006). Os estudos de associação investigam polimorfismos em genes candidatos, cuja escolha é geralmente baseada na existência de evidências biológicas, que relacionem o referido gene com a patologia, ou em evidências provenientes de estudos de *linkage*, que tenham localizado esse gene num *locus* relacionado com a doença (Healy, 2006).

1.5 – Objectivos do estudo

O alcoolismo está associado à violência doméstica e ambos representam um grave problema de saúde pública a nível mundial. As enzimas metabolizadoras do álcool, nomeadamente as enzimas CYP450, têm sido implicadas na etiopatogenia do alcoolismo. Contudo, o papel de variantes genéticas de genes do CYP450, em particular dos genes CYP2E1 e CYP1A2, na etiologia do alcoolismo permanece por esclarecer. Após uma revisão exhaustiva da literatura, constatou-se ainda que não existem estudos genéticos efectuados com genes do CYP450 na população Portuguesa, bem como a nível mundial no âmbito da genética do alcoolismo com e sem historial de violência doméstica. Salienta-se ainda que não existem estudos genéticos que relacionem o gene CYP1A2 com os fenótipos mencionados.

Face ao exposto, este estudo teve como objectivos estudar o envolvimento de polimorfismos nos genes CYP2E1 (-1053C>T) e CYP1A2 (C734A) na etiologia do alcoolismo e/ou violência doméstica e investigar uma eventual associação entre os polimorfismos mencionados e o alcoolismo numa amostra estratificada por género.

Capítulo 2

Materiais e métodos

2 - Materiais e métodos

2.1 – Caracterização da amostra

A amostra de doentes alcóolicos foi seleccionada no Centro Regional de Alcoologia do Centro Maria Lucília Mercês de Mello após a obtenção do consentimento informado por escrito dos participantes. O diagnóstico foi realizado de acordo com os critérios internacionais de diagnóstico para a dependência alcoólica da *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV)* (APA, 1994) e *International Classification of Diseases (ICD-10)* da OMS (WHO, 1992). É importante salientar que do ponto de vista clínico a amostra está muito bem caracterizada, o que representa uma mais valia para os estudos genéticos a realizar.

No estudo incluíram-se 616 indivíduos Caucasianos da população portuguesa de ambos os sexos com idades compreendidas entre 22 e 69 anos (doentes alcóolicos com e sem historial de violência doméstica = 331; controlos = 285). Para a amostra de doentes alcóolicos a distribuição por sexos e idade é a seguinte: 267 indivíduos são do sexo masculino com idades compreendidas entre 22 e 68 anos; 64 elementos são do sexo feminino com idades compreendidas entre 25 e 68 anos.

O grupo controlo foi seleccionado na população geral e inclui indivíduos sem historial de alcoolismo, consumo de drogas, doenças psiquiátricas e violência. A amostra controlo é constituída por 285 indivíduos, sendo 168 do sexo masculino com idades compreendidas entre 20 e 69 anos, e 117 do sexo feminino com idades compreendidas entre 22 e 68 anos.

O projecto de investigação foi aprovado pela Comissão de Ética do Centro Regional de Alcoologia do Centro Maria Lucília Mercês de Mello.

2.2 - Extracção de DNA genómico

A extracção de DNA genómico pode ser efectuada a partir de qualquer tecido ou fluído biológico contendo células nucleadas. No entanto, a utilização de sangue periférico possibilita a obtenção de DNA de uma forma eficaz e rentável, com a vantagem de simplificar o processo de recolha da amostra (Dickinson et al., 2001).

Os métodos tradicionais de extracção de DNA envolvem a utilização de solventes orgânicos tóxicos, como o método do fenol-clorofórmio (Chomczynski e

Sacchi, 1987), e implicam a realização de múltiplos passos de lavagem e extração que aumentam o risco de perdas e de contaminação das amostras.

Miller et al. (1988) propôs um método enzimático de alto rendimento que permite obter DNA de elevado peso molecular e boa qualidade envolvendo o *salting out* de proteínas com uma solução saturada de NaCl. A utilização de Proteinase K confere várias vantagens pois para além de efectuar a digestão proteica e de inactivar enzimas hidrolíticas (DNAses) que poderiam degradar o DNA, apresenta actividade para uma vasta gama de pH e temperatura e não é afectada pela presença de agentes quelantes ou desnaturantes. O método referido evita a utilização de solventes orgânicos tóxicos que poderiam interferir com as reacções enzimáticas posteriores, nomeadamente com a acção da DNA polimerase ou no emparelhamento de *primers* durante a reacção de *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

Neste contexto, para a extração de DNA foram recolhidos 10 mL de sangue para tubos contendo anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) para posterior extração segundo o método descrito por Miller et al. (1988), com algumas alterações. Em cada tubo de Falcon de 50 mL adicionou-se uma solução de lise de eritrócitos (NH_4Cl 155 mM, KHCO_3 10 mM, $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 mM; pH = 7,4) numa quantidade correspondente a três vezes o volume da amostra de sangue e após a homogeneização, estas foram incubadas em gelo durante 20 minutos. As amostras foram depois submetidas a uma centrifugação a 2500 rpm, a 4°C, durante 15 minutos numa centrífuga refrigerada (Rotanta 460R, Hettich). O sobrenadante foi desprezado e repetiu-se o passo anterior. Ao *pellet* obtido, rico em glóbulos brancos e aglomerados proteicos, adicionaram-se 5 mL de tampão de lise nuclear (Tris-HCl 10 mM, NaCl 400 mM, $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2 mM; pH = 8) (Sigma), 350 μL de detergente iónico dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% (Sigma) e 30 μL de Proteinase K a 20 mg/mL (Roche). O SDS promove a disrupção das membranas celulares, a solubilização dos lípidos e a desnaturação de proteínas de modo a facilitar a acção da Proteinase K. Efectuou-se uma incubação a 37°C durante a noite sob agitação constante no *shaker* (Forma Orbital Skaker, Thermo). Para precipitar o DNA das amostras adicionaram-se 3 mL de uma solução saturada de NaCl 6 M, cuja elevada concentração de sais permite a precipitação de proteínas e a neutralização das cargas negativas do DNA, que permanece assim solúvel em solução. Procedeu-se a uma centrifugação a 3750 rpm, durante 30 minutos, à temperatura ambiente, e ao sobrenadante contendo o DNA adicionou-se duas vezes o volume de etanol absoluto frio. Este é extremamente importante pois quanto menor a

temperatura, menor será a solubilidade do DNA, facilitando a sua separação. Após a lavagem do DNA em etanol a 70 %, adicionou-se tris-EDTA (Tris-HCl 10 mM, Na₂EDTA.2H₂O 1 mM; pH = 7,4) para a solubilização do DNA.

2.3 - Quantificação e análise do grau de pureza do DNA

A leitura das absorvâncias em determinadas zonas do espectro electromagnético permite quantificar e avaliar a pureza do DNA presente na amostra de uma forma simples (Nicklas e Buel, 2003). A lei de Beer Lambert estabelece que a absorvância é directamente proporcional ao percurso óptico e concentração da amostra: $A = -\log(I/I_0) = \epsilon lc$; A - absorvância, I₀ - intensidade da luz incidente; I - intensidade da luz após atravessar a amostra; ϵ - coeficiente de extinção molar (M⁻¹ cm⁻¹); c - concentração (M); l - percurso óptico (cm). A partir dos valores das absorvâncias e utilizando uma curva padrão, é possível obter as concentrações de DNA para cada amostra. As bases azotadas dos ácidos nucleicos apresentam um pico máximo de absorção de radiação UV aos 260 nm que, numa amostra de DNA pura, corresponde a 1. Nesse caso a concentração de DNA é aproximadamente 50 µg/ml (Sambrook et al., 1989), o que permite estabelecer a seguinte relação derivada da lei de Beer Lambert: [DNA](µg/mL) = (DO₂₆₀) x (factor de diluição) x (50 µg DNA/ml)/(1 unidade OD₂₆₀). Para além da quantificação do DNA, este procedimento permite ainda avaliar a pureza do DNA através da razão das absorvâncias 260/280, cujos valores se devem situar no intervalo 1,5 – 2. Valores abaixo deste intervalo indicam contaminação com proteínas, cujos grupos aromáticos dos aminoácidos triptofano e tirosina absorvem maximamente aos 280 nm. Por outro lado, valores superiores a 2 apontam para uma contaminação com RNA.

Efectuou-se a leitura dos valores de absorvância das amostras a 260nm e 280nm, respectivas concentrações de DNA e razões das absorvâncias 260/280 obtidas no espectrofotómetro (*SmartSpecTM Plus Spectrophotometer, Bio-Rad®*).

2.4 – Amplificação de DNA, análise de restrição e electroforese

2.4.1 – Fundamentos teóricos

2.4.1.1 - Amplificação de DNA

A técnica de PCR desenvolvida nos anos 80 por Kary Mullis veio revolucionar a investigação científica em áreas como a biologia molecular, genética, biomedicina, entre outras (Mullis, 1990). Esta técnica baseada na amplificação exponencial de um segmento de DNA *in vitro* permite a obtenção de milhões de cópias a partir de uma quantidade reduzida.

Um ciclo de PCR inclui três etapas (Figura 9): desnaturação da cadeia de DNA molde a altas temperaturas (~95°C), hibridização dos primers a uma temperatura inferior (temperatura de *annealing*) e extensão do DNA (a 72°C). Na fase de desnaturação a temperatura elevada promove a separação das cadeias de dupla hélice de DNA, de modo a permitir o emparelhamento dos *primers forward* e *reverse* que flanqueiam a sequência de interesse. Os *primers* são desenhados de modo a que se liguem às extremidades opostas de cada uma das cadeias de DNA molde que se pretende amplificar, o que confere selectividade ao processo. O emparelhamento dos *primers* permite então a extensão da cadeia de DNA, sob a acção da enzima Taq polimerase. A utilização desta DNA polimerase proveniente de *Thermus aquaticus* (Saiki et al., 1988), termo-estável e que resiste às elevadas temperaturas que se verificam ao longo dos ciclos de PCR, confere grande eficácia ao processo. Assim, após n ciclos existem 2^n vezes mais cópias do que inicialmente.

Os componentes básicos para a reacção de PCR incluem, para além do DNA molde, desoxinucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), *primers*, Taq polimerase, tampão e magnésio. A concentração de magnésio é particularmente crítica, uma vez que este componente é necessário para a activação e correcto funcionamento da Taq polimerase que vai efectuar a ligação dos dNTPs ao DNA molde. A concentração de magnésio e a temperatura de *annealing* correctamente optimizadas são factores determinantes para o sucesso da amplificação.

O PCR é uma técnica de simples e rápida execução, eficaz e muito versátil contudo apresenta também algumas limitações (Brown, 2006): o conhecimento da sequência de DNA a amplificar é um pré-requisito para a síntese e utilização dos

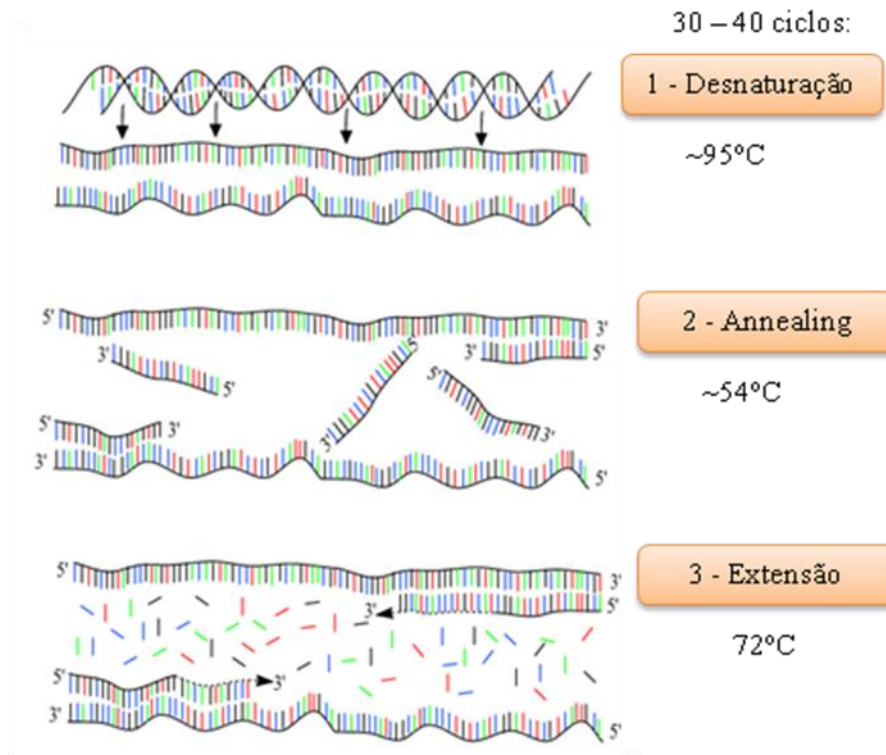


Figura 9 – Representação esquemática das etapas do PCR Adaptado de Vierstraete (1999).

primers específicos; trata-se de uma técnica com grande sensibilidade, em que facilmente podem ocorrer contaminações da amostra por DNA exógeno; existe um limite de tamanho da sequência a amplificar, geralmente não se amplificam sequências de tamanho superior a 5 kilobases; ocasionalmente durante a replicação pode ocorrer incorporação incorrecta de bases.

2.4.1.2 - Análise com enzimas de restrição

A análise de RFLPs é uma técnica em que se examinam os padrões de clivagem de DNA submetido à acção de enzimas de restrição. Os RFLPs constituem locais de clivagem para enzimas de restrição (Botstein et al., 1980). Como já foi referido anteriormente, estas enzimas reconhecem sequências específicas de DNA, efectuando ou não o corte da sequência. Variações nos locais de clivagem originam fragmentos de comprimento distinto, resultando em diferentes padrões de migração facilmente observáveis através de uma electroforese.

2.4.1.3 – Electroforese em gel de agarose

Após a reacção de PCR, a realização de uma electroforese em gel de agarose permite confirmar se houve de facto amplificação e detectar eventuais contaminações. Devido à sua carga negativa a pH neutro, o DNA migra sob acção de um campo eléctrico em direcção ao pólo positivo (ânodo). A electroforese permite a separação de fragmentos de DNA de diferentes tamanhos através de uma migração diferencial em que a posição relativa dos fragmentos vai depender das suas dimensões: os fragmentos de menor tamanho ultrapassam com maior facilidade a rede de poros da agarose e vão migrar mais rapidamente, percorrendo assim uma maior distância.

A preparação do gel e a separação dos fragmentos de DNA é efectuada em tampões com pH e força iónica constantes, sendo o Tris-borato-EDTA (TBE) ou o Tris-Acetato-EDTA (TAE) os mais frequentemente utilizados.

Aos produtos de amplificação ou de digestão adiciona-se uma solução de *loading buffer* contendo dois corantes (azul de bromofenol 0,25% e xileno cianol 0,25%) e glicerol a 30%, que permitem a visualização do DNA no gel e simultaneamente conferem densidade às amostras (Sambrook et al., 1989). Estas são corridas em gel de agarose, contendo brometo de etídio (10mg/mL, BioRad) e sob aplicação de uma corrente eléctrica. A utilização de brometo de etídio, que se intercala no DNA de cadeia dupla gerando fluorescência, permite a detecção das bandas de DNA quando estas são expostas à luz ultravioleta (UV) (Sambrook et al., 1989). Os produtos de amplificação ou de digestão são submetidos a electroforese em tampão TBE 1X (Tris base 89 mM, Ácido Bórico 89 mM, Na₂EDTA.2H₂O 2mM).

Por comparação entre as distâncias percorridas pelos fragmentos e um padrão de peso molecular, determinam-se os respectivos pesos moleculares.

2.4.2 – Genes do CYP450

2.4.2.1 - Polimorfismo -1053C>T localizado na região 5'UTR do gene CYP2E1

A análise do polimorfismo -1053C>T (rs2031920) localizado na região 5'UTR do gene CYP2E1 foi efectuada por PCR-RFLP, utilizando um protocolo adaptado de Wang et al. (1999). Para um volume final de 25 µL utilizaram-se 100 ng de DNA,

buffer 1X, MgCl₂ 2 mM, dNTPs (Invitrogene) 0,2 mM, 0,2 μM de cada *primer* (Invitrogene) e 0,04 U/μL de enzima Taq Polimerase (Invitrogene). Após um passo prévio de desnaturação durante 5 minutos a 95°C, o DNA foi amplificado através de 35 ciclos a 95°C (30 segundos), 56°C (30 segundos) e 72°C (45 segundos), finalizando com um passo de extensão final a 72°C (7 minutos) (PCR System 9700 Applied Biosystems).

De modo a testar o sucesso da reacção de amplificação, utilizaram-se 5 μL de produto amplificado num gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo (10mg/mL, BioRad®).

O produto de amplificação foi incubado *overnight* com a enzima de restrição RsaI (New England BioLabs) a 37°C.

Aos produtos resultantes da digestão adicionou-se o corante (azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 0,25%) com glicerol a 30% e efectuou-se a electroforese num sistema horizontal (Bio-Rad®), em gel de agarose a 2,5% corado com brometo de etídeo (10 mg/ml, Biorad®) e tampão TBE 1X (Tris base 89mM, Ácido Bórico 89 mM, Na₂EDTA.2H₂O 2 mM), a 110 V. Terminada a electroforese, o gel foi visualizado no sistema *Gel Doc* (Bio-Rad®) e determinaram-se os pesos moleculares dos fragmentos de digestão por comparação com o marcador de peso molecular *Gene RulerTM 100 bp DNA ladder* (MBI Fermentas®).

2.4.2.2 - Polimorfismo C734A localizado no intrão 1 do gene CYP1A2

O PCR para amplificação do DNA referente ao polimorfismo C734A (rs762551), localizado no intrão 1 do gene CYP1A2 foi realizado segundo as condições descritas por Basile et al. (2000), com algumas adaptações. A reacção de PCR decorreu num volume final de 25 μL ao qual se adicionaram 100 ng de DNA, buffer 1x, MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs (Invitrogene) 0,05 mM, 1,5 ng/uL de cada primer (Invitrogene) e 0,025 U/μL de enzima Taq polimerase (Invitrogene). Procedeu-se à desnaturação do DNA de cadeia dupla a 95°C durante 5 minutos, seguindo-se o passo de amplificação que consistiu em 30 ciclos a 94°C (60 segundos), 57°C (60 segundos) e 72°C (60 segundos) (PCR MyCycler, Bio-Rad®).

No sentido de se avaliar a existência ou não de amplificação de DNA, utilizaram-se 5 μL de produto de amplificação e efectuou-se uma electroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo (10mg/mL, BioRad®).

Ao DNA amplificado adicionou-se a enzima de restrição Bsp120I (MBI Fermentas®) e a digestão decorreu a 37°C, durante a noite.

Para separação dos fragmentos de digestão, aos quais se adicionou o corante constituído por azul de bromofenol e 0,25% e glicerol a 30%, procedeu-se a uma electroforese num sistema horizontal (Bio-Rad®). Assim, utilizou-se um gel de agarose a 2,5% previamente corado com brometo de etídio (10 mg/ml, Biorad) e a electroforese decorreu em tampão TBE 1X (Tris base 89 mM, Ácido Bórico 89 mM, Na₂EDTA.2H₂O 2mM), a 100V. A visualização dos fragmentos de digestão foi efectuada no sistema de imagem *Gel Doc* (Bio-Rad®) e os respectivos pesos moleculares foram obtidos por comparação com o marcador de peso molecular *Gene RulerTM 100 bp DNA ladder* (MBI Fermentas®).

2.5 Análise estatística

A comparação da distribuição dos genótipos e dos alelos dos polimorfismos estudados, entre os doentes alcoólicos com e sem historial de violência doméstica e os indivíduos controlo foi efectuada com o Qui-quadrado. Para valor de $p < 0,05$ os resultados foram considerados estatisticamente significantes.

Capítulo 3

Resultados e discussão

3 – Resultados e Discussão

3.1 – Gene CYP2E1

O gene CYP2E1 codifica uma das principais enzimas envolvidas nas vias metabólicas do etanol. O polimorfismo $-1053C>T$ localizado na região 5'UTR do gene CYP2E1 (Figura 10) é responsável por alterações na actividade catalítica da enzima.

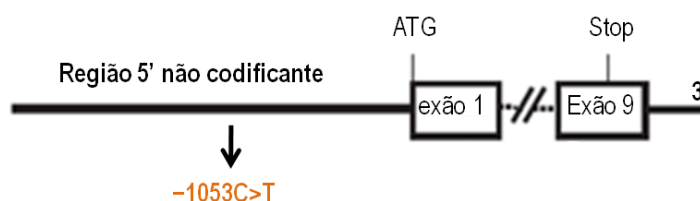


Figura 10 – Representação esquemática da estrutura do gene CYP2E1 com a localização do polimorfismo $-1053C>T$.

Deste modo, investigou-se o polimorfismo referido segundo a metodologia descrita em 2.4.2.1 do Capítulo 2 de Materiais e métodos na etiologia do alcoolismo. O segmento de 410 pb contendo a região de interesse foi amplificado por PCR e visualizado em gel de agarose a 2,5% (Figura 11).

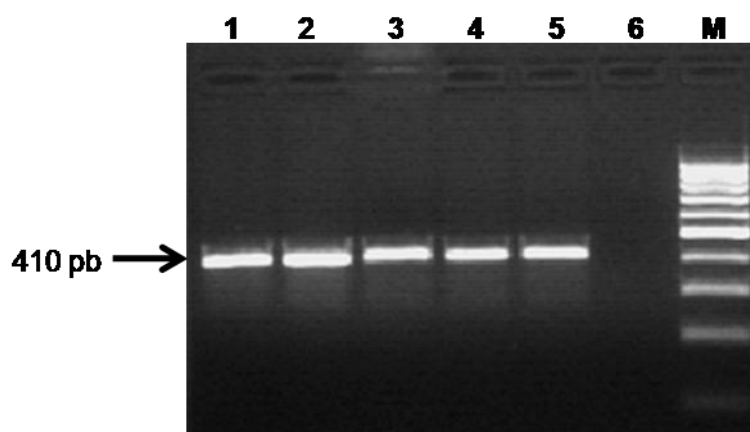


Figura 11 – Electroforese em gel de agarose a 2,5% dos produtos de amplificação, segundo os métodos descritos em 2.4.2.1 do Capítulo 2 de Materiais e métodos. Legenda da figura: 1 a 5 - produtos de amplificação de 410 pb; 6 - controlo negativo; M - marcador de peso molecular *Gene Ruler™ 100 bp DNA ladder* (MBI Fermentas®).

A digestão com a enzima de restrição RsaI permitiu distinguir entre indivíduos homocigóticos wild-type (c1/c1), homocigóticos para o alelo mutante (c2/c2) e heterocigóticos (c1/c2) (Figura 12). A variante c1/c1 apresenta locais de restrição para a enzima RsaI, originando fragmentos de 360 pb e 50 pb. A variante c1/c2 inclui fragmentos de 410, 360 e 50 pb. Na amostra em estudo a variante c2/c2, caracteriza-se pela ausência de local de restrição para a enzima RsaI e fragmentos de 410pb.

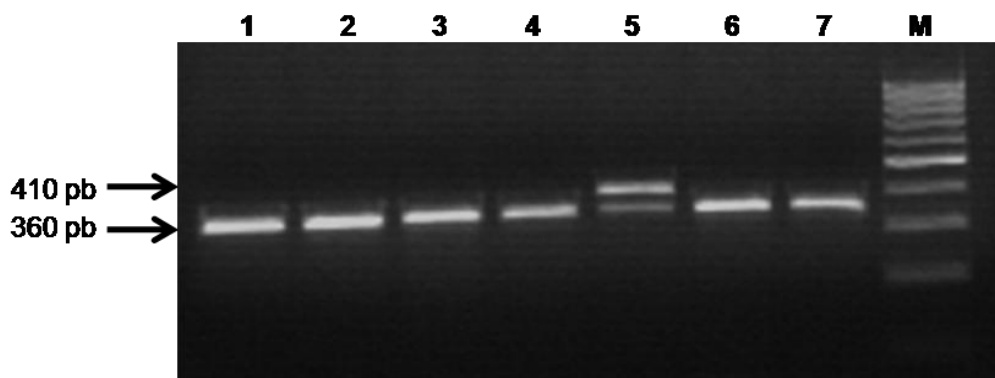


Figura 12 – Electroforese em gel de agarose a 2,5% dos produtos de digestão obtidos com a enzima RsaI (New England BioLabs), segundo a metodologia mencionada em 2.4.2.1 do Capítulo 2 de Materiais e métodos. Legenda da figura: 1,2,3,4, 6 e 7 - homocigóticos wild-type (c1/c1); 5 - heterocigótico (c1/c2); M - marcador de peso molecular *Gene Ruler™ 100 bp DNA ladder* (MBI Fermentas®).

O genótipos e as frequências alélicas do gene CYP2E1 obtidas na amostra total de doentes alcoólicos e controlos estão representados na Tabela I. Comparando a amostra de doentes alcoólicos com os controlos, não se detectaram diferenças estatisticamente significativas na distribuição dos genótipos ($\chi^2 = 2,835$; $df = 2$; $p = 0,242$) e na distribuição dos alelos ($\chi^2 = 1,139$; $df = 1$; $p = 0,286$). Detectou-se um ligeiro aumento do alelo c2 (T) em doentes alcoólicos (4,2%) comparativamente aos controlos (2,9%). No entanto, este estudo não revelou associação entre o polimorfismo -1053C>T do gene CYP2E1 e o alcoolismo, à semelhança de outros estudos realizados em populações caucasianas (Carr et al., 1995; Parsian et al., 1998; Wong et al., 2000; Pastorelli et al., 2001; Vidal et al., 2004; Cichoz-Lach et al., 2008).

Verificou-se também que a frequência do alelo c2 é muito baixa na população portuguesa (2,9% nos controlos), estando de acordo com as frequências obtidas em estudos realizados na população caucasiana (Wong et al., 2000). A frequência do alelo

c2 é muito superior na população asiática (17-28%) comparativamente às populações caucasianas e africanas (1-3%) (Stephens et al. 1994; Wong et al., 2000). Nas

Tabela I – Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo –1053C>T do gene CYP2E1 em doentes alcoólicos e controlos.

	Genótipos (%)			Alelos (%)	
	CC	CT	TT	C	T
Alcoólicos	305 (92,1)	23 (6,9)	3 (1,0)	632 (95,8)	28 (4,2)
Controlos	258 (94,2)	16 (5,8)	0 (0,0)	532 (97,1)	16 (2,9)
	$\chi^2 = 2,835$; df = 2; p = 0,242			$\chi^2 = 1,139$; df = 1; p = 0,286	

populações asiáticas e latino-americanas, nas quais o alelo c2 apresenta maiores frequências, este alelo tem sido considerado um factor de risco para o consumo excessivo de álcool (Sun et al., 1999; Sun et al., 2002) e para o alcoolismo (Yoshihara et al., 2000; Konishi et al., 2003, 2004; Khan et al., 2009). Factores como o tamanho reduzido da amostra, a baixa frequência da variante c2 e as diferenças entre grupos étnicos têm sido apontados, como causas possíveis para estas discrepâncias (Parsian et al., 1998; Wong et al., 2000; Vidal et al., 2004).

O presente estudo, foi o primeiro realizado na população Portuguesa a investigar uma eventual associação entre o polimorfismo –1053C>T do gene CYP2E1 e o alcoolismo. Apesar de não se ter detectado associação entre o polimorfismo –1053C>T do gene CYP2E1 e o alcoolismo, detectou-se uma maior percentagem do alelo c2 em doentes alcoólicos, pelo que seria interessante a realização de estudos adicionais numa amostra maior da população Portuguesa, que é considerada relativamente homogénea comparativamente a outras populações mundiais (Arnaiz-Villena, 1997; Schindler et al., 1999).

No sentido de analisar eventuais diferenças entre o sexo masculino e feminino, estratificou-se a amostra e os resultados obtidos estão representados na Tabela II. Não se detectaram diferenças estatisticamente significativas nas frequências genotípicas e alélicas, quer na amostra da população masculina (genótipos: $\chi^2 = 2,251$; df = 2; p = 0,324; alelos: $\chi^2 = 1,709$; df = 1; p = 0,191), quer na amostra da população feminina (genótipos: $\chi^2 = 3,578$; df = 2; p = 0,167; alelos: $\chi^2 = 0,319$; df = 1; p = 0,572). Verificou-se no entanto uma maior percentagem do alelo c2 na amostra de indivíduos

alcoólicos do sexo masculino (3,9%) e feminino (6,2%), comparativamente aos controlos.

Apesar de os índices de consumo de álcool na população masculina serem geralmente superiores aos da população feminina, as mulheres são mais vulneráveis aos

Tabela II – Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo -1053C>T do gene CYP2E1 numa amostra estratificada por género

	Genótipos (%)			Alelos (%)	
	CC	CT	TT	C	T
M					
Alcoólicos	247 (92,5)	19 (7,1)	1 (0,4)	513 (96,1)	21 (3,9)
Controlos	161 (95,8)	7 (4,2)	0 (0,0)	329 (97,9)	7 (2,1)
	$\chi^2 = 2,251; df = 2; p = 0,324$			$\chi^2 = 1,709; df = 1; p = 0,191$	
F					
Alcoólicos	58 (90,6)	4 (6,3)	2 (3,1)	120 (93,8)	8 (6,2)
Controlos	97 (91,5)	9 (8,5)	0 (0,0)	203 (95,7)	9 (4,3)
	$\chi^2 = 3,578; df = 2; p = 0,167$			$\chi^2 = 0,319; df = 1; p = 0,572$	

Legenda: M – indivíduos do sexo masculino; F – indivíduos do sexo feminino.

efeitos adversos do consumo excessivo de álcool (Ceylan-Isik et al., 2010). O menor índice de massa corporal (Kwo et al., 1998), as hormonas sexuais (Dettling et al., 2008), e a menor actividade da ADH na mucosa gástrica (Seitz et al., 1993), são alguns dos factores que podem explicar esta maior vulnerabilidade. No entanto, são ainda escassos na população feminina os estudos genéticos que investigam a relação entre polimorfismos dos genes que codificam enzimas metabolizadoras do etanol e o alcoolismo (Whitfield et al., 1998; Borràs et al., 2000; Pastorelli et al., 2001; Lorenzo et al., 2006). O estudo de associação mais recente, envolvendo uma população feminina espanhola, não detectou associação entre dois polimorfismos (Dra-I e Pst-I) localizados na região 5' do gene CYP2E1 e o alcoolismo (Lorenzo et al., 2006). Nesse mesmo estudo o autor refere a importância de se estudar separadamente o papel de factores genéticos em ambos os sexos, de modo a evitar que a maior vulnerabilidade das mulheres ao álcool possa “mascarar” o efeito de eventuais factores genéticos de predisposição ou de protecção para o alcoolismo (Lorenzo et al., 2006). Até à data que tenhamos conhecimento, o nosso estudo é o primeiro a investigar uma possível

associação entre o polimorfismo -1053C>T do gene CYP2E1 na etiologia do alcoolismo, numa amostra composta exclusivamente por indivíduos do sexo feminino.

Considerando a natureza complexa e multifactorial do alcoolismo, alguns investigadores têm explorado a hipótese dos genótipos do gene CYP2E1 estarem associados a várias características clínicas de pacientes alcoólicos, nomeadamente com os padrões de consumo, comportamentos antisociais, violência e alguns traços de personalidade (Parsian et al., 1998; Sun et al., 2002; Nakamura et al., 2003). Por exemplo, o estudo de Nakamura et al. (2003) obteve uma associação entre o sentimento de culpa em alcoólicos e os genótipos c1/c2 (CT) e c2/c2 (TT) do gene CYP2E1, sugerindo que este gene pode influenciar determinados traços de personalidade. Assim, no presente estudo analisou-se uma eventual repercussão do polimorfismo -1053C>T do gene CYP2E1 numa amostra de pacientes alcoólicos com um historial de violência doméstica. Analisando os dados referentes aos casos de alcoolismo sem violência doméstica e alcoolismo com violência doméstica representados na Tabela III, não se detectaram diferenças estatisticamente significativas na distribuição genotípica ($\chi^2 =$; df = 2; p = 0,674) e alélica ($\chi^2 = 0,002$; df = 1; p = 0.961).

Tabela III – Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo -1053C>T do gene CYP2E1 em pacientes alcoólicos com e sem historial de violência doméstica.

	Genótipos (%)			Alelos (%)	
	CC	CT	TT	C	T
M					
Alcoólicos	42 (93,3)	3 (6,7)	0 (0,0)	87 (96,7)	3 (3,3)
Alcoólicos + VD	45 (95,7)	2 (4,3)	0 (0,0)	92 (97,9)	2 (2,1)
	df = 1; p = 0,674			$\chi^2 = 0,002$; df = 1; p = 0.961	

Legenda: M – Indivíduos do sexo masculino; VD - violência doméstica.

Estes resultados parecem sugerir que o polimorfismo -1053C>T do gene CYP2E1 não está associado à violência doméstica. De salientar que uma amostra de doentes alcoólicos, bem caracterizada fenotipicamente e sem registo de doenças psiquiátricas, dependência de drogas e violência foi utilizada como controlo, eliminando assim a interferência de outros factores.

Apesar dos resultados obtidos neste estudo não terem revelado uma associação entre o polimorfismo $-1053C>T$ do gene CYP2E1 e o alcoolismo e/ou violência doméstica, não se pode excluir em definitivo o envolvimento deste gene na etiologia do alcoolismo e da violência doméstica. De facto, a enzima CYP2E1 tem um papel determinante no metabolismo do etanol via MEOS e a sua actividade enzimática é indutível pelo álcool. Assim, variantes genéticas no gene CYP2E1 localizadas em particular na região reguladora, poderão causar alterações nos níveis de expressão da enzima, aumentando a susceptibilidade dos indivíduos para o alcoolismo, com repercussões também ao nível da violência doméstica.

3.2 – Gene CYP1A2

O gene CYP1A2 é responsável pela expressão da enzima CYP1A2, cuja actividade catalítica é importante não só ao nível do metabolismo do etanol, mas eventualmente também na interacção entre o tabagismo e o alcoolismo. Neste contexto, polimorfismos que modulem a actividade desta enzima poderão desempenhar um papel importante na etiologia do alcoolismo. Assim, analisou-se o polimorfismo C734A localizado no intrão 1 do gene CYP1A2 (Figura 13), utilizando os métodos referidos em 2.4.2.2 do Capítulo 2 de Materiais e métodos. A reacção de amplificação por PCR originou um fragmento de 370 pb (Figura 14).

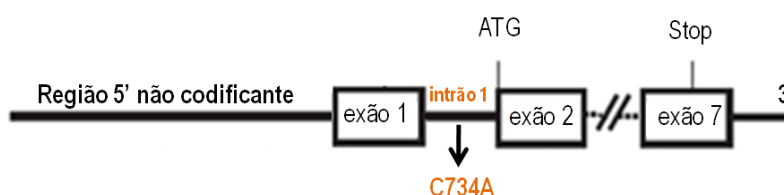


Figura 13 – Representação esquemática da estrutura do gene CYP1A2 com a localização do polimorfismo C734A.

O produto de amplificação foi incubado com a enzima Bsp120I e a electroforese dos produtos de digestão em gel de agarose está representada na Figura 15. A variante *wild-type* é constituída por fragmentos de 130pb e 240 pb, enquanto que a presença do alelo mutante resultou na ausência de locais de restrição e na consequente presença de uma única banda aos 370 pb.

A análise da distribuição dos genótipos obtidos para a amostra total não

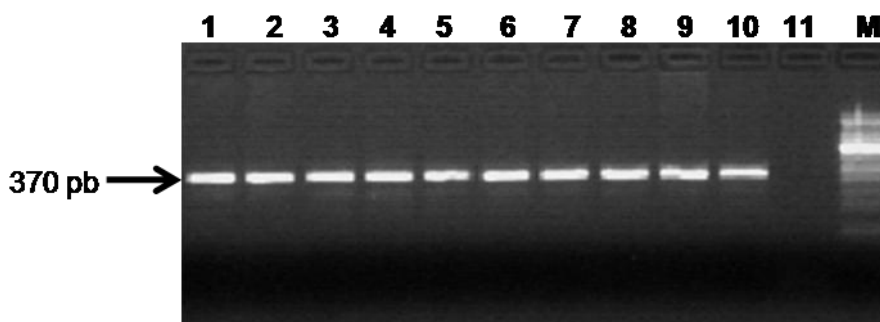


Figura 14 – Produtos de amplificação visualizados em gel de agarose a 2,5%, segundo os métodos referidos em 2.4.2.2 do Capítulo 2 de Materiais e Métodos. Legenda da figura: 1 - 10 produtos de amplificação de 370 pb; 11 controlo negativo; M marcador de peso molecular *Gene Ruler™ 100 bp DNA ladder* (MBI Fermentas®).

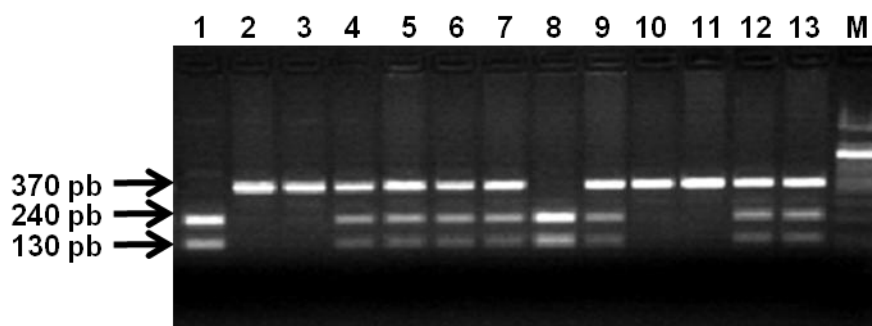


Figura 15 – Electroforese em gel de agarose a 2,5% dos produtos de digestão obtidos com a enzima Bsp120I (MBI Fermentas®), utilizando a metodologia mencionada em 2.4.2.2 do Capítulo 2 de Materiais e Métodos. Legenda da figura: 2, 3, 10 e 11 - homocigóticos para o alelo mutante; 1 e 8 - homocigóticos wild-type; 4, 5, 6, 7, 9, 12 e 13 - heterocigóticos; M - marcador de peso molecular *Gene Ruler™ 100 bp DNA ladder* (MBI Fermentas®).

revelou associação entre o polimorfismo C734A do gene CYP1A2 e o alcoolismo ($\chi^2=5,244$; $df = 2$; $p = 0,073$), apesar de se verificar uma ligeira tendência de associação (Tabela IV). A percentagem de indivíduos com o genótipo AC e CC é superior no grupo de doentes alcoólicos comparativamente aos controlos. Relativamente à distribuição alélica, detectaram-se diferenças estatisticamente significativas entre a amostra de doentes alcoólicos e os controlos ($\chi^2=4,197$; $df = 1$; $p = 0,040$). O alelo C tem uma percentagem superior no grupo de pacientes alcoólicos (33,3%) relativamente ao grupo controlo (27,5%). Apesar dos resultados obtidos carecerem de replicação em diferentes

populações mundiais, no sentido de se obter conclusões mais definitivas, os mesmos sugerem uma associação entre o alelo C e o alcoolismo na população portuguesa.

O polimorfismo C734A é um dos polimorfismos do gene CYP1A2 mais comuns na população humana, apresentando uma elevada frequência em populações caucasianas (Sachse et al., 2003; Ghobti et al., 2009; Djordjevic et al., 2010). Os indivíduos homocigóticos para o alelo A são considerados ‘metabolizadores rápidos’, enquanto que os portadores do alelo C são classificados como “metabolizadores lentos” de determinados substratos, nomeadamente da cafeína (Sachse et al., 1999). De facto, em vários estudos efectuados, foi detectada uma maior actividade da enzima CYP1A2 em

Tabela IV – Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo C734A do gene CYP1A2 em pacientes alcoólicos e controlos

	Genótipos (%)			Alelos (%)	
	AA	AC	CC	A	C
Alcoólicos	134 (42,3)	155 (48,9)	28 (8,8)	423 (66,7)	211 (33,3)
Controlos	137 (51,7)	110 (41,5)	18 (6,8)	384 (72,5)	146 (27,5)
	$\chi^2 = 5,244; df = 2; p = 0,073$			$\chi^2 = 4,197; df = 1; p = 0,040$	

fumadores portadores do genótipo AA (Chida et al., 1998; Sachse et al., 1999; Sachse et al., 2003; Ghobti et al., 2007; Gunes et al., 2009). Além disso, um estudo recente, envolvendo uma amostra de indivíduos com elevados índices de consumo de cafeína, demonstrou que o polimorfismo C734A é um forte indutor da actividade catalítica da enzima CYP1A2 (Djordjevic et al., 2010). Este polimorfismo pode ser uma causa directa para um aumento da actividade enzimática da CYP1A2, ou estar em *linkage desequilibrium* com outros SNPs no gene CYP1A2, que promovam um aumento da indutibilidade da enzima.

Apesar da investigação efectuada relativamente ao efeito de potenciais indutores na actividade catalítica da enzima CYP1A2, são praticamente inexistentes os estudos que tenham avaliado os efeitos do consumo de álcool. Um estudo efectuado em humanos revelou uma redução da actividade enzimática da CYP1A2 em alcoólicos crónicos (Kukongviriyapan et al., 2004). Até ao momento não existem estudos genéticos que tenham investigado o papel do polimorfismo C734A do gene CYP1A2 na etiologia do alcoolismo. Face aos dados existentes na literatura e aos resultados obtidos neste estudo, pode-se inferir que a presença do alelo C em doentes alcoólicos poderá

conferir uma maior vulnerabilidade para o alcoolismo, devido a uma menor actividade enzimática e conseqüentemente, uma metabolização mais lenta do álcool. Por outro lado, os indivíduos portadores do genótipo AA (51, 7% no grupo controlo e 42, 3% no grupo de pacientes alcoólicos), poderão ser menos vulneráveis aos efeitos nefastos do álcool e da sua ingestão excessiva, devido a uma maior actividade catalítica da enzima CYP1A2. Deste modo, a ausência de estudos de associação que investiguem a relação entre o polimorfismo C734A e o alcoolismo em outras populações mundiais, bem como o papel do referido polimorfismo na interacção entre o alcoolismo e o tabagismo, reforçam a necessidade de prosseguir a investigação nesta área.

Entre os vários factores já mencionados anteriormente, que podem influenciar a actividade da enzima CYP1A2, encontra-se também as diferenças relacionadas com o género que têm repercussões geralmente ao nível da metabolização de vários fármacos (Franconi et al., 2007). Na população feminina a actividade da enzima CYP1A2 é frequentemente menor, comparativamente ao que se verifica na população masculina (Franconi et al., 2007). Aparentemente as hormonas sexuais desempenham um papel importante na variação da actividade da enzima CYP1A2 em mulheres, tendo-se observado que a toma de contraceptivos orais (Granfors et al., 2005), variações hormonais ou a gravidez (Tracy et al., 2005) podem influenciar a actividade desta enzima.

No presente estudo, a estratificação da amostra por género não revelou diferenças estatisticamente significativas na distribuição dos genótipos e alelos na amostra de população masculina (genótipos: $\chi^2 = 2,491$; $df = 2$; $p = 0,288$; alelos: $\chi^2 = 0,632$; $df = 1$; $p = 0,427$) e feminina (genótipos: $\chi^2 = 0,721$; $df = 2$; $p = 0,697$; alelos: $\chi^2 = 0,000$; $df = 1$; $p = 0,987$) (Tabela V).

No entanto, é importante referir que a actividade da enzima CYP1A2 é influenciada por uma grande diversidade de factores ambientais e genéticos, o que frequentemente dificulta a análise dos efeitos de cada factor isoladamente, nomeadamente no género.

Apesar da inexistência de estudos ou evidências que relacionem o gene CYP1A2 com comportamentos violentos e outras características clínicas em doentes alcoólicos, a enzima CYP1A2 poderá desempenhar um papel indirecto, ao influenciar a resposta dos doentes a determinados fármacos utilizados para o tratamento do alcoolismo. Como já foi referido anteriormente, são frequentes as situações em que o tratamento do

alcoolismo é acompanhado por uma redução da violência (Stuart et al., 2009). Assim, o presente estudo analisou as eventuais repercussões do polimorfismo C734 do gene

Tabela V – Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo C734A do gene CYP1A2 numa amostra estratificada por género

	Genótipos (%)			Alelos (%)	
	AA	AC	CC	A	C
M					
Alcoólicos	106 (41,4)	128 (50,0)	22 (8,6)	340 (66,4)	172 (33,6)
Controlos	80 (48,2)	70 (42,2)	16 (9,6)	230 (69,3)	102 (30,7)
	$\chi^2 = 2,491$; df = 2; p = 0,288			$\chi^2 = 0,632$; df = 1; p = 0,427	
F					
Alcoólicos	28 (46,7)	26 (43,3)	6 (10,0)	82 (68,3)	38 (31,7)
Controlos	18 (41,9)	22 (51,2)	3 (6,9)	58 (67,4)	28 (32,6)
	$\chi^2 = 0,721$; df = 2; p = 0,697			$\chi^2 = 0,000$; df = 1; p = 0,987	

Legenda: M – indivíduos do sexo masculino; F – indivíduos do sexo feminino.

CYP1A2 na violência doméstica, comparando uma amostra de doentes alcoólicos sem historial de violência doméstica com uma amostra de doentes alcoólicos com historial de violência doméstica. Analisando os dados relativos aos casos de alcoolismo sem violência doméstica e alcoolismo com violência doméstica representados na tabela VI, não se detectaram diferenças estatisticamente significativas na distribuição genotípica ($\chi^2 = 3,063$; df = 2; p = 0,216) e alélica ($\chi^2 = 0,106$; df = 1; p = 0,0745). Obteve-se no entanto uma maior percentagem do alelo C na amostra de doentes alcoólicos com historial de violência doméstica (41,7 %), comparativamente à amostra de doentes alcoólicos sem historial de violência doméstica (38,3%). Estes resultados parecem sugerir que o polimorfismo C734A do gene CYP1A2 não está directamente envolvido com a violência doméstica.

Em suma, é importante prosseguir a investigação no sentido de avaliar os efeitos de polimorfismos do gene CYP1A2 no alcoolismo. Não apenas devido ao papel da enzima CYP1A2 no metabolismo do álcool, mas também devido à sua importância farmacológica, nomeadamente na resposta a fármacos que possam ser usados no tratamento de doentes alcoólicos. Por outro lado, seria interessante investigar o efeito

Tabela VI – Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo C734A do gene CYP1A2 em pacientes alcoólicos com ou sem historial de violência doméstica.

	Genótipos (%)			Alelos (%)	
	AA	AC	CC	A	C
M					
Alcoólicos	14 (29,8)	30 (63,8)	3 (6,4)	58 (61,7)	36 (38,3)
Alcoólicos + VD	16 (33,3)	24 (50)	8 (16,7)	56 (58,3)	40 (41,7)
	$\chi^2 = 3,063$; df = 2; p = 0,216			$\chi^2 = 0,106$; df = 1; p = 0,0745	

Legenda: M – Indivíduos do sexo masculino; VD - violência doméstica

funcional do polimorfismo C734A em alcoólicos fumadores, à semelhança do que tem sido efectuado em fumadores. A elevada frequência de casos de consumo de tabaco associado ao alcoolismo parece sugerir que a actividade da enzima CYP1A2 (altamente indutível pelo fumo do cigarro) poderá ser importante na interacção entre as duas dependências.

Capítulo 4

Conclusões finais e perspectivas futuras

4 – Conclusões finais e perspectivas futuras

4.1 – Conclusões finais

O presente estudo foi pioneiro na investigação do papel de variantes genéticas em genes do CYP450 na etiologia do alcoolismo na população Portuguesa. Foi também o primeiro estudo genético a investigar uma eventual associação entre o gene CYP1A2 e a dependência alcoólica, bem como o papel dos genes CYP2E1 e CYP1A2 na violência doméstica.

Relativamente ao gene CYP2E1, os resultados obtidos neste estudo não revelaram associação entre o polimorfismo –1053C>T e o alcoolismo numa amostra da população Portuguesa, tanto na amostra total como na amostra estratificada por género. De igual modo, não se observou associação entre o polimorfismo –1053C>T e a violência doméstica numa amostra de doentes alcoólicos com e sem historial de violência doméstica. No seu conjunto, estes dados parecem sugerir que o polimorfismo –1053C>T do gene CYP2E1 não desempenha um papel directo na etiologia do alcoolismo e/ou violência doméstica.

No que se refere ao polimorfismo C734A do gene CYP1A2 numa amostra de doentes alcoólicos da população Portuguesa, os resultados permitem inferir que este polimorfismo poderá ser um factor de risco na dependência alcoólica. No entanto, não se detectou associação entre o polimorfismo C734A do gene CYP1A2 numa amostra de alcoólicos estratificada por género e numa amostra de alcoólicos com e sem historial de violência doméstica.

O conhecimento adquirido com o estudo de factores genéticos envolvidos na etiologia do alcoolismo poderá ser decisivo para o diagnóstico, prevenção, aplicação de terapêuticas individualizadas aos doentes alcoólicos e detecção precoce de indivíduos em risco, o que no seu conjunto poderá também contribuir para uma diminuição do número de vítimas de violência doméstica.

4.2 – Perspectivas futuras

No seguimento deste estudo seria importante a realização de estudos posteriores numa amostra maior e efectuar a análise de novos polimorfismos nos genes CYP2E1, CYP1A2 e em outros genes candidatos do sistema CYP450. Esta é uma área de

investigação que carece da realização de mais estudos em diferentes populações, nomeadamente na população Portuguesa. É possível que genes que codificam outras enzimas da superfamília CYP450 possam estar também implicados na etiologia do alcoolismo, existindo alguns estudos que demonstram alterações na actividade enzimática de outras isoformas em doentes alcoólicos (Miksys et al., 2002; Miksys et al., 2003; Yue et al., 2009).

Seria igualmente interessante efectuar um estudo de haplotipos nos genes CYP2E1, CYP1A2 e em outros genes candidatos do referido sistema. Ao contrário da análise individual de SNPs, a análise de haplotipos poderia detectar um eventual efeito combinado de vários SNPs no mesmo gene (The International HapMap Consortium, 2005). De facto, os polimorfismos analisados neste estudo podem estar em *linkage disequilibrium* com outros SNPs que por sua vez poderão desempenhar um papel directo na etiologia do alcoolismo. Por exemplo, vários estudos têm-se focado na investigação de haplótipos ao longo do gene CYP2E1, no sentido de avaliar eventuais repercussões na etiologia do alcoolismo (Parsian et al., 1998; Yang et al., 2007; Khan et al., 2009). Relativamente ao gene CYP1A2, têm sido investigados em diferentes populações os efeitos de combinações de vários SNPs na actividade catalítica da enzima CYP1A2 (Aklillu et al., 2003; Sachse et al., 2003; Ghotbi et al., 2007; Djordjevic et al., 2010).

Nas últimas décadas tem-se assistido a um rápido desenvolvimento tecnológico nas áreas da genética de doenças complexas, nomeadamente na automatização das técnicas de genotipagem e *softwares* cada vez mais poderosos, com capacidade para processar maior número de dados obtidos na genotipagem (LaFramboise, 2009). Paralelamente ao grande desenvolvimento tecnológico, o conhecimento adquirido com o projecto HapMap tem sido igualmente determinante. Um dos grandes avanços proporcionados pelo projecto HapMap foi a possibilidade de utilização de tagSNPs, um conjunto restrito de SNPs em *linkage disequilibrium* com outros SNPs localizados no mesmo bloco de haplotipos (The International HapMap Consortium, 2005). Os tagSNPs capturam a maior diversidade genética possível numa determinada região genómica, fornecendo informação sobre os restantes SNPs presentes ao longo dessa região (The International HapMap Consortium, 2005). A utilização de um número limitado de SNPs permitiu uma redução significativa dos custos de genotipagem, tornando financeiramente viáveis os estudos genéticos de associação que abrangem a totalidade do genoma humano, designados por *Genome Wide Association Studies*

(GWAS) (Manolio e Collins, 2009). Por exemplo, GWAS recentes têm obtido resultados promissores ao detectarem associações significativas entre determinadas regiões cromossômicas e o alcoolismo (Treutlein et al., 2009; Bierut et al., 2010; Edenberg et al., 2010). A utilização das novas abordagens e ferramentas disponíveis é um passo importante para a identificação dos genes de susceptibilidade para doenças complexas, nomeadamente o alcoolismo.

A identificação de variantes genéticas em genes da família CYP450 na população Portuguesa, poderá também ser direccionado para aplicação de uma terapêutica individualizada aos doentes alcoólicos, com base no seu património genético. A farmacogenética estuda a relação entre o genótipo de um indivíduo e a sua capacidade individual para metabolizar uma determinada substância exógena. Um dos objectivos consiste na identificação de polimorfismos em genes que codificam proteínas e enzimas envolvidas nas vias de transporte e metabolização de substâncias, e que possam prever a resposta e eficácia de um determinado fármaco. As variações interindividuais no metabolismo de fármacos podem ser responsáveis pelo insucesso da terapêutica ou causar graves problemas de toxicidade. Apenas 30-60% das terapias comuns têm sucesso, ao mesmo tempo que 7% das admissões em hospitais são causadas por reacções adversas a fármacos (Ingelman-Sundberg, 2004). Como já foi referido anteriormente, as enzimas CYP450 das famílias 1-3 são responsáveis por cerca de 90% do metabolismo de substratos endógenos e xenobióticos (Bibi, 2008). Estima-se ainda que cerca de 15-20% dos tratamentos farmacológicos são influenciados pela presença de polimorfismos em genes do CYP450 (Ingelman-Sundberg e Rodriguez-Antona, 2005). Assim, a farmacogenética de enzimas do CYP450 e as suas implicações no metabolismo de fármacos e na dependência de substâncias têm suscitado grande interesse (Ingelman-Sundberg e Sim, 2010). No caso particular do alcoolismo, a informação obtida na farmacogenética poderá oferecer um importante contributo para a identificação de grupos de risco susceptíveis à dependência alcóolica e aos seus efeitos adversos, e ainda para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais eficazes, seguras e adequadas para cada indivíduo.

Uma outra área de investigação ainda pouco explorada a nível mundial, mas não menos relevante, é a genética associada ao comportamento violento de indivíduos alcoólicos. Apesar de ser um tema polémico, estudos com modelos animais e estudos de adopção e de gémeos em humanos sugerem que os factores genéticos têm uma contribuição significativa em comportamentos violentos e agressivos (Janssen et al.,

2005). Num estudo de revisão recente são descritos vários polimorfismos que têm sido relacionados com actos de violência extrema (Ferguson e Beaver, 2009). A violência direccionada contra as mulheres, na qual se enquadra a violência doméstica, é mais frequente e as suas consequências são devastadoras (Ellsberg, 2006), sendo por isso urgente o desenvolvimento de estratégias preventivas que visem o agressor ou potencial agressor. Os factores genéticos não devem ser considerados como um factor de despenalização do agressor, mas sim como como factores de prevenção e intervenção contra a violência. Nas próximas décadas haverá uma necessidade cada vez maior de expandir as fronteiras da genética de doenças complexas, nomeadamente o alcoolismo, investigando novos genes candidatos e mecanismos moleculares associados à predisposição para a violência, assim como o papel das interacções gene-ambiente na etiologia do comportamento violento.

Em suma, o alcoolismo tem sido frequentemente associado a situações de violência doméstica (Foran e O'Leary, 2008), pelo que será importante a realização outros estudos a nível mundial, no sentido de identificar genes de susceptibilidade para o alcoolismo e violência doméstica.

Espera-se que o conhecimento adquirido possa contribuir para que, num futuro próximo, a detecção precoce de indivíduos em risco e o desenvolvimento de terapias que aliviem os sintomas ou causas do comportamento violento possam vir a ser uma realidade.

Capítulo 5

Referências bibliográficas

5 - Referências bibliográficas

- Aklillu E., Carrillo J.A., Makonnen E., Hellman K., Pitarque M., Bertilsson L. & M. Ingelman-Sundberg (2003). Genetic polymorphism of CYP1A2 in Ethiopians affecting induction and expression: characterization of novel haplotypes with single-nucleotide polymorphisms in intron 1. *Mol Pharmacol.* 2003 Sep;64(3):659-69.
- Albano E. (2006). Alcohol, oxidative stress and free radical damage. *Proc Nutr Soc* 65:278-90.
- American Psychiatric Association (1994). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Ed.*, Washington DC, American Psychiatric Association.
- Apte M.V., Pirola R.C. & J.S. Wilson (2009). Pancreas: alcoholic pancreatitis--it's the alcohol, stupid. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 6:321-2.
- Arnaiz-Villena A., Martínez-Laso J., Gómez-Casado E., Díaz-Campos N., Santos P., Martinho A. & H. Breda-Coimbra (1997). Relatedness among Basques, Portuguese, Spaniards, and Algerians studied by HLA allelic frequencies and haplotypes. *Immunogenetics* 1997; 47: 37-43.
- Basile V.S., Ozdemir V., Masellis M., Walker M.L., Meltzer H.Y., Lieberman J.A., Potkin S.G., Alva G., Kalow W., Macciardi F.M. & J.L. Kennedy (2000). A functional polymorphism of the cytochrome P450 1A2 (CYP1A2) gene: association with tardive dyskinesia in schizophrenia. *Mol Psychiatry* 5(4):410-7.
- Becker H.C. (2008). Alcohol dependence, withdrawal, and relapse. *Alcohol Res Health* 31: 348-61.
- Bibi Z. (2008). Role of cytochrome P450 in drug interactions. *Nutr Metab (Lond)* 5:27.
- Bierut L.J., Agrawal A., Bucholz K.K., Doheny K.F., Laurie C., Pugh E., Fisher S., Fox L., Howells W., Bertelsen S., Hinrichs A.L., Almasy L., Breslau N., Culverhouse R.C., Dick D.M., Edenberg H.J., Foroud T., Gruzza R.A., Hatsukami D., Hesselbrock V., Johnson EO., Kramer J., Krueger R.F., Kuperman S., Lynskey M., Mann K., Neuman R.J., Nöthen M.M., Nurnberger J.I.Jr., Porjesz B., Ridinger M., Saccone N.L., Saccone S.F., Schuckit M.A., Tischfield J.A., Wang J.C., Rietschel M., Goate A.M. & J.P. Rice; Gene, Environment Association Studies Consortium (2010). A genome-wide association study of alcohol dependence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(11):5082-7.

- Borràs E., Coutelle C., Rosell A., Fernández-Muixi F., Broch M., Crosas B., Hjelmqvist L., Lorenzo A., Gutiérrez C., Santos M., Szczepanek M., Heilig M., Quattrocchi P., Farrés J., Vidal F., Richart C., Mach T., Bogdal J., Jörnvall H., Seitz H.K., Couzigou P. & X. Parés (2000). Genetic polymorphism of alcohol dehydrogenase in europeans: the ADH2*2 allele decreases the risk for alcoholism and is associated with ADH3*1. *Hepatology* 31(4):984-9.
- Botstein D. & N. Risch (2003). Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nat Genet* 33 Suppl:228-37.
- Botstein D., White R.L., Skolnick M. & R.W. Davis (1980). Construction of a genetic linkage map using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32:314-331.
- Brown T.A. (2006). *Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction*. Fifth Edition. Blackwell Publishing, Oxford.
- Burim R.V., Canalle R., Martinelli Ade L. & C.S. Takahashi (2004). Polymorphisms in glutathione S-transferases GSTM1, GSTT1 and GSTP1 and cytochromes P450 CYP2E1 and CYP1A1 and susceptibility to cirrhosis or pancreatitis in alcoholics. *Mutagenesis* 19(4):291-8.
- Burmeister M. (1999). Basic concepts in the study of diseases with complex genetics. *Biological Psychiatry* 45: 522-532.
- Burton P.R., Tobin M.D. & J.L. Hopper (2005). Key concepts in genetic epidemiology. *Lancet* 366: 941-51.
- Carr L.G., Hartleroad J.Y., Liang Y., Mendenhall C., Moritz T. & H. Thomasson (1995). Polymorphism at the P450IIE1 locus is not associated with alcoholic liver disease in Caucasian men. *Alcohol Clin Exp Res* 19(1):182-4.
- Ceylan-Isik A.F., McBride S.M. & J. Ren (2010). Sex difference in alcoholism: Who is at a greater risk for development of alcoholic complication? *Life Sciences*, Article in press. (doi:10.1016/j.lfs.2010.06.002)
- Chida M., Yokoi T., Fukui T., Kinoshita M., Yokota J. & T. Kamataki (1999). Detection of three genetic polymorphisms in the 5'-flanking region and intron 1 of human CYP1A2 in the Japanese population. *Jpn J Cancer Res* 90: 899 – 902.
- Chomczynski P. & N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction". *Anal. Biochem.* 162: 156–159.

- Cichoz-Lach H., Celiński K.. & M. Słomka (2008). Alcohol-metabolizing enzyme gene polymorphisms and alcohol chronic pancreatitis among Polish individuals. *HPB (Oxford)* 10(2):138-43.
- Clapp P., Bhave S.V. & P.L. Hoffman (2008). How Adaptation of the Brain to Alcohol Leads to Dependence. A pharmacological perspective. *Alcohol Res Health* 31:310-39.
- Council of Europe (2002). Report from the Committee on Equal Opportunities for Women and Men in the Council of Europe. Rapporteur: Mrs Olga Keltošová, Slovakia, European Democratic Group (Doc. 9525 17 July 2002).
- Detting A., Skopp G., Graw M. & H.T. Haffner (2008). The influence of sex hormones on the elimination kinetics of ethanol. *Forensic Sci Int* 177(2-3):85-9.
- Dey A. & A.I. Cederbaum (2006). Alcohol and oxidative liver injury. *Hepatology*. 43:S63-74.
- Díaz L.E., Montero A., González-Gross M., Vallejo A.I., Romeo J. & A. Marcos (2002). Influence of alcohol consumption on immunological status: a review. *Eur J Clin Nutr*.56 Suppl 3:S50-3.
- Dickinson J.L., Sale M.M., Craig J.E. & D.A. Mackey (2001). Laboratory methods in ophthalmic genetics: obtaining DNA from patients. *Ophthalmic Genet*. 22(1):49-60.
- Direcção Geral da Administração Interna (2010). Violência doméstica. Análise das ocorrências participadas às Forças de Segurança durante o ano de 2009. Portugal.
- Djordjevic N., Ghotbi R., Jankovic S. & E. Aklillu (2010). Induction of CYP1A2 by heavy coffee consumption is associated with the CYP1A2 -163C>A polymorphism. *Eur J Clin Pharmacol* 66(7):697-703.
- Edenberg H.J. (2007). The Genetics of Alcohol Metabolism. Role of Alcohol Dehydrogenase and Aldehyde. Dehydrogenase Variants. *Alcohol Res Health* 30:5-13.
- Edenberg H.J., Koller D.L., Xuei X., Wetherill L., McClintick J.N., Almasy L., Bierut L.J., Bucholz K.K., Goate A., Aliev F., Dick D., Hesselbrock V., Hinrichs A., Kramer J., Kuperman S., Nurnberger J.I.Jr., Rice J.P., Schuckit M.A., Taylor R., Todd W.B., Tischfield J.A., Porjesz B & T. Foroud (2010). Genome-wide association study of alcohol dependence implicates a region on chromosome 11. *Alcohol Clin Exp Res* 34(5):840-52.

- Ellsberg M. (2006). Violence against women and the Millennium Development Goals: facilitating women's access to support. *Int J Gynecol Obstet* 94(3):325-32.
- Ellsworth D.L. & T.A. Manolio (1999). The emerging importance of genetics in the epidemiologic research. I. Basic concepts in human genetics and laboratory technology. *Annals of Epidemiology*. 9(1):1-16.
- Ferguson C.J. & K.M. Beaver (2009). Natural born killers: The genetic origins of extreme violence. *Aggress Violent Behav* 14(5), 286-294.
- Finn D.A. & J.C. Crabbe (1997). Exploring alcohol withdrawal syndrome. *Alcohol Health Res World* 21:149-56.
- Foran H.M. & K.D. O'Leary (2008). Alcohol and intimate partner violence: A meta-analytic review. *Clin Psychol Rev* 28(7):1222-34.
- Franconi F., Brunelleschi S., Steardo L. & V. Cuomo (2007). Gender differences in drug responses. *Pharmacol Res* 55(2):81-95.
- Ghotbi R., Christensen M., Roh H.K., Ingelman-Sundberg M., Aklillu E. & L. Bertilsson (2007). Comparisons of CYP1A2 genetic polymorphisms, enzyme activity and the genotype-phenotype relationship in Swedes and Koreans. *Eur J Clin Pharmacol* 63:537-46.
- Gmel G. & J. Rehm (2003). Harmful alcohol use. *Alcohol Res Health* 27:52-62.
- Granfors M.T., Backman J.T., Laitila J. & P.J. Neuvonen (2005). Oral contraceptives containing ethinyl estradiol and gestodene markedly increase plasma concentrations and effects of tizanidine by inhibiting cytochrome P450 1A2. *Clin Pharmacol Ther* 78(4):400-11.
- Guengerich F.P. (2007). Mechanisms of cytochrome P450 substrate oxidation: MiniReview. *J Biochem Mol Toxicol* 21:163-8.
- Gulliver S.B., Kamholz B.W. & A.W. Helstrom (2006). Smoking cessation and alcohol abstinence: what do the data tell us? *Alcohol Res Health* 29(3):208-12.
- Gunes A., Ozbey G., Vural E.H., Uluoglu C., Scordo M.G., Zengil H. & M.L. Dahl (2009). Influence of genetic polymorphisms, smoking, gender and age on CYP1A2 activity in a Turkish population. *Pharmacogenomics* 10:769–778.
- Harper C. & I. Matsumoto (2005). Ethanol and brain damage. *Curr Opin Pharmacol* 5:73-8.
- Hasler J.A., Estabrook R., Murray M., Pikuleva I., Waterman M., Capdevila J., Holla V., Helvig C., Falck J.R., Farrell G., Kaminsky L.S., Spivack S.D., Boitier E. &

- P. Beaune (1999). Human cytochromes P450. *Mol Aspects Med* 20:12-24, 25-137.
- Hayashi S., Watanabe J. & K. Kawajiri (1991). Genetic polymorphisms in the 5'-flanking region change transcriptional regulation of the human cytochrome P450IIE1 gene. *J Biochem* 110:559-65.
- Healy D.G. (2006). Case-control studies in the genomic era: a clinician's guide. *Lancet Neurology*. 5:701-707.
- Hughes J.R. (1996). Treating smokers with current or past alcohol dependence. *Am J Health Behav* 20: 286-290.
- Ikeya K., Jaiswal A.K., Owens R.A., Jones J.E., Nebert D.W. & S. Kimura (1989). Human CYP1A2: sequence, gene structure, comparison with the mouse and rat orthologous gene, and differences in liver 1A2 mRNA expression. *Mol Endocrinol* 3:1399-408.
- Ingelman-Sundberg M. (2004). Human drug metabolizing cytochrome P450 enzymes: Properties and polymorphisms. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 369:89–104.
- Ingelman-Sundberg M. & C. Rodriguez-Antona (2005). Pharmacogenetics of drug-metabolizing enzymes: Implications for a safer and more effective drug therapy. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360:1563-70.
- Ingelman-Sundberg M. & S.C. Sim (2010). Pharmacogenetic biomarkers as tools for improved drug therapy; emphasis on the cytochrome P450 system. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 May 21;396(1):90-4.
- International Human Genome Sequencing Consortium (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-920.
- International Human Genome Sequencing Consortium (2004). Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431: 931-945.
- Jaiswal A.K., Nebert D.W., McBride W.O. & F.J. Gonzalez (1987). Human P-3-450: cDNA and complete protein sequence, repetitive Alu sequences in the 3' nontranslated region, and localization of gene to chromosome 15. *J Exp. Pathol* 3:1-17.
- Janssen P.A., Nicholls T.L., Kumar R.A., Stefanakis H., Spidel A.L. & E.M Simpson (2005). Of mice and men: will the intersection of social science and genetics create new approaches for intimate partner violence? *J Interpers Violence* 20(1):61-71.

- Khan A.J., Ruwali M., Choudhuri G., Mathur N., Husain Q. & D. Parmar (2009). Polymorphism in cytochrome P450 2E1 and interaction with other genetic risk factors and susceptibility to alcoholic liver cirrhosis. *Mutat Res* 664:55-63.
- Kimura S., Gonzalez F.J. & D.W. Nebert (1986). Tissue-specific expression of the mouse dioxin-inducible P1450 and P3450 genes: differential transcriptional activation and mRNA stability in liver and extrahepatic tissues. *Mol Cell Biol* 6:1471-1477.
- Klostermann K.C. & W. Fals-Stewart (2006). Intimate partner violence and alcohol use: Exploring the role of drinking in partner violence and its implications for intervention. *Aggress Violent Behav* 11(6):587–597
- Köhnke M.D. (2008). Approach to the genetics of alcoholism: A review based on pathophysiology. *Biochem Pharmacol* 75:160-177.
- Konishi T., Calvillo M., Leng A.S., Feng J., Lee T., Lee H., Smith J.L., Sial S.H., Berman N., French S., Eysselein V., Lin K.M. & Y.J. Wan (2003). The ADH3*2 and CYP2E1 c2 alleles increase the risk of alcoholism in Mexican American men. *Exp Mol Pathol* 74:183-9.
- Konishi T., Luo H.R., Calvillo M., Mayo M.S., Lin K.M. & Y.J. Wan (2004). ADH1B*1, ADH1C*2, DRD2 (-141C Ins), and 5-HTTLPR are associated with alcoholism in Mexican American men living in Los Angeles. *Alcohol Clin Exp Res* 28(8):1145-52.
- Koop D.R. (2006). Alcohol metabolism's damaging effects on the cell: a focus on reactive oxygen generation by the enzyme cytochrome P450 2E1. *Alcohol Res Health* 29:274-80.
- Kot M. & W.A. Daniel (2008). Caffeine as a marker substrate for testing cytochrome P450 activity in human and rat. *Pharmacol Rep* 60:789-97.
- Kruglyak L. & D.A. Nickerson (2001). Variation is the spice of life. *Nature Genetics* 27: 234-236.
- Kukongviriyapan V., Senggunprai L., Prawan A., Gaysornsiri D., Kukongviriyapan U. & J. Aiemsard (2004). Salivary caffeine metabolic ratio in alcohol-dependent subjects. *Eur J Clin Pharmacol* 60:103-7.
- Kwo P.Y., Ramchandani V.A., O'Connor S., Amann D., Carr L.G., Sandrasegaran K., Kopecky K.K. & T.K. Li (1998). Gender differences in alcohol metabolism: relationship to liver volume and effect of adjusting for body mass. *Gastroenterology* 115(6):1552-7.

- LaFramboise T. (2009). Single nucleotide polymorphism arrays: a decade of biological, computational and technological advances. *Nucleic Acids Res* 37(13):4181-93.
- Lander E.S. & N.J. Schork (1994). Genetic dissection of complex traits. *Science* 265: 2037-2047.
- Lieber C.S. (1999). Microsomal ethanol-oxidizing system (MEOS): The first 30 years (1968-1998) - a review. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 23:991-1007.
- Lieber C.S. (2004). The discovery of the microsomal ethanol oxidizing system and its physiologic and pathologic role. *Drug Metab Rev* 36:511-29.
- Lorenzo A., Auguet T., Vidal F., Broch M., Olona M., Gutiérrez C., López-Dupla M., Sirvent J.J., Quer J.C., Santos M. & C. Richart (2006). Polymorphisms of alcohol-metabolizing enzymes and the risk for alcoholism and alcoholic liver disease in Caucasian Spanish women. *Drug Alcohol Depend* 84(2):195-200.
- Loza A.J.M., Iglesias M.T.R., Diaz I.P., Castellanos S.C., Andrade C.G., Mora M.E.M., Díaz G.R., Kershenobich D. & G.G. Reyes (2006). Association of alcohol-metabolizing genes with alcoholism in a Mexican Indian (Otomi) population. *Alcohol* 39:73-9.
- Lynch T. & A. Price (2007). The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects. *Am Fam Physician* 76:391-6.
- Ma Q. & A.Y. Lu (2007). CYP1A induction and human risk assessment: an evolving tale of in vitro and in vivo studies. *Drug Metab Dispos* 35:1009-16.
- Manolio T.A. & F.S. Collins (2009). The HapMap and genome-wide association studies in diagnosis and therapy. *Annu Rev Med* 60:443-56.
- Mayfield R.D., Harris R.A. & M.A. Schuckit (2008). Genetic factors influencing alcohol dependence. *Br J Pharmacol* 154:275-87.
- McLean K.J., Sabri M., Marshall K.R., Lawson R.J., Lewis D.G., Clift D., Balding P.R., Dunford A.J., Warman A.J., McVey J.P., Quinn A.M., Sutcliffe M.J., Scrutton N.S. & A.W. Munro (2005). Biodiversity of cytochrome P450 redox systems. *Biochem Soc Trans* 33:796-801.
- Miksys S., Lerman C., Shields P.G., Mash D.C. & R.F. Tyndale (2003). Smoking, alcoholism and genetic polymorphisms alter CYP2B6 levels in human brain. *Neuropharmacology* 45(1):122-32.

- Miksys S., Rao Y., Hoffmann E., Mash D.C. & R.F. Tyndale (2002). Regional and cellular expression of CYP2D6 in human brain: higher levels in alcoholics. *J Neurochem* 82(6):1376-87.
- Miller S.A., Dykes D.D. & H.F. Polesky (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16(3):1215.
- Moussas G., Christodoulou C. & A. Douzenis (2009). A short review on the aetiology and pathophysiology of alcoholism. *Ann Gen Psychiatry* 8:10.
- Mullis K.B. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am.* 26(4):56-61, 64-5.
- Nakamura Y. (2009). DNA variations in human and medical genetics: 25 years of my experience. *Journal of Human Genetics.* 54: 1-8.
- Nakamura K., Iwahashi K., Ameno K., Sekine Y., Suzuki K., Minabe Y. & N. Mori (2003). CYP2E1 and clinical features in alcoholics. *Neuropsychobiology* 47(2):86-9.
- Nelson D.R. (2006). Cytochrome P450 nomenclature, 2004. *Methods Mol Biol* 320:1-10.
- Nelson D.R., Zeldin D.C., Hoffman S.M., Maltais L.J., Wain H.M. & D.W. Nebert (2004). Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. *Pharmacogenetics* 14:1-18.
- Nicklas J. A. & E. Buel (2003). Quantification of DNA in forensic sample. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 376: 1160-7.
- Omicinski C.J., Rimmel R.P. & V.P. Hosagrahara (1999). Concise review of the cytochrome P450s and their roles in toxicology. *Toxicol Sci* 48:151-6.
- Parsian A., Cloninger C.R. & Z.H. Zhang (1998). Association studies of polymorphisms of CYP2E1 gene in alcoholics with cirrhosis, antisocial personality, and normal controls. *Alcohol Clin Exp Res* 22(4):888-91.
- Pastorelli R., Bardazzi G., Saieva C., Cerri A., Gestri D., Allamani A., Airoidi L. & D. Palli (2001). Genetic determinants of alcohol addiction and metabolism: a survey in Italy. *Alcohol Clin Exp Res* 25:221–227.
- Piano M.R. (2002). Alcoholic cardiomyopathy: incidence, clinical characteristics, and pathophysiology. *Chest* 121:1638-50.
- Porter T.D. & M.J. Coon (1991). P-450. Multiplicity of isoforms, substrates, and catalytic and regulatory mechanisms. *J Biol Chem* 25;266:13469-72.

- Rehm J., Mathers C., Popova S., Thavncharoensap M., Teerawattananon Y. & J. Patra (2009). Global burden of disease and injury and economic cost attributable to alcohol use and alcohol-use disorders. *The Lancet* 373:2223 – 33.
- Rehm J., Sulowska U., Mańczuk M., Boffetta P., Powles J., Popova S. & W. Zatoński (2007). Alcohol accounts for a high proportion of premature mortality in central and eastern Europe. *Int J Epidemiol* 36(2):458-67.
- Rehm J., Taylor B. & Patra J. (2006). Volume of alcohol consumption, patterns of drinking and burden of disease in the European region 2002. *Addiction* 101:1086-95.
- Rehn N., Room R. & G. Edwards (2001). *Alcohol in the European Region: consumption, harm and policies*. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe, Denmark.
- Risch N. & K. Merikangas (1996). The future of genetics studies of complex human diseases. *Science*. 273:1516-1517.
- Roberts B.J., Shoaf S.E. & B.J. Song (1994). Rapid changes in cytochrome P4502E1 (CYP2E1) activity and other P450 isozymes following ethanol withdrawal in rats. *Biochem Pharmacol* 49:1665-73.
- Sachse C., Bhambra U., Smith G., Lightfoot T.J., Barrett J.H., Scollay J., Garner R.C., Boobis A.R., Wolf C.R., & N.J. Gooderham; Colorectal Cancer Study Group (2003). Polymorphisms in the cytochrome P450 CYP1A2 gene (CYP1A2) in colorectal cancer patients and controls: allele frequencies, linkage disequilibrium and influence on caffeine metabolism. *Br J Clin Pharmacol* 55:68-76.
- Sachse C., Brockmüller J., Bauer S & I. Roots (1999). Functional significance of a C>A polymorphism in intron 1 of the cytochrome P450 CYP1A2 gene tested with caffeine. *Br J Clin Pharmacol* 47(4):445-9.
- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B. & H.A. Erlich (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 239(4839):487-91.
- Sambrook J., Fritsch E.F. & T. Maniatis (1989). *Molecular cloning, A laboratory manual*. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Savolainen V.T., Pajarinen J., Perola M., Penttilä A. & P.J. Karhunen (1997). Polymorphism in the cytochrome P450 2E1 gene and the risk of alcoholic liver disease. *J Hepatol* 26:55-61.

- Schindler, K., Torre, C. D., Bauer, A., Medeiros, H., Carvalho, C., Fernandes, L. F., Pato, M. T. & C.N. Pato (1999). Identification of a highly homogenous population for genetic study of psychiatric disorders. *CNC Spectrums* 4(5): 22-24.
- Seitz H.K., Egerer G., Simanowski U.A., Waldherr R., Eckey R., Agarwal D.P., Goedde H.W. & J.P. von Wartburg (1993). Human gastric alcohol dehydrogenase activity: effect of age, sex, and alcoholism. *Gut* 34(10):1433-7.
- Shimada T., Yamazaki H., Mimura M., Inui Y. & F.P. Guengerich (1994). Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther.* 270:414-23.
- Sikka R., Magauran B., Ulrich A. & M. Shannon (2005). Bench to bedside: Pharmacogenomics, adverse drug interactions, and the cytochrome P450 system. *Acad Emerg Med* 12:1227-35.
- Skog O.J. (2001). Alcohol consumption and mortality rates from traffic accidents, accidental falls, and other accidents in 14 European countries. *Addiction* 96 Suppl 1:S49-58.
- Stephens E.A., Taylor J.A., Kaplan N., Yang C.H., Hsieh L.L., Lucier G.W. & D.A. Bell (1994). Ethnic variation in the CYP2E1 gene: polymorphism analysis of 695 African-Americans, European-Americans and Taiwanese. *Pharmacogenetics* 4(4):185-92.
- Stuart G.L., O'Farrell T.J. & J.R. Temple (2009). Review of the association between treatment for substance misuse and reductions in intimate partner violence. *Subst Use Misuse* 44(9-10):1298-317.
- Sun F., Tsuritani I., Honda R., Ma Z.Y. & Y. Yamada (1999). Association of genetic polymorphisms of alcohol-metabolizing enzymes with excessive alcohol consumption in Japanese men. *Hum Genet* 105:295-300.
- Sun F., Tsuritani I. & Y. Yamada (2002). Contribution of genetic polymorphisms in ethanol-metabolizing enzymes to problem drinking behavior in middle-aged Japanese men. *Behav Genet* 32(4):229-36.
- The International HapMap Consortium (2003). The International HapMap Project. *Nature* 426: 789-796.

- The International HapMap Consortium (2005). A haplotype map of the human genome. *Nature*. 437(7063): 1299-1320.
- The International HapMap Consortium (2007). A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature* 449: 851-861.
- Thörn M., Finnström N., Lundgren S., Rane A. & L. Lööf (2005). Cytochromes P450 and MDR1 mRNA expression along the human gastrointestinal tract. *Br J Clin Pharmacol* 60:54-60.
- Tracy T.S., Venkataramanan R., Glover D.D. & S.N. Caritis; National Institute for Child Health and Human Development Network of Maternal-Fetal-Medicine Units (2005). Temporal changes in drug metabolism (CYP1A2, CYP2D6 and CYP3A Activity) during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 192(2):633-9.
- Treutlein J., Cichon S., Ridinger M., Wodarz N., Soyka M., Zill P., Maier W., Moessner R., Gaebel W., Dahmen N., Fehr C., Scherbaum N., Steffens M., Ludwig K.U., Frank J., Wichmann H.E., Schreiber S., Dragano N., Sommer W.H., Leonardi-Essmann F., Lourdasamy A., Gebicke-Haerter P., Wienker T.F., Sullivan P.F., Nöthen M.M., Kiefer F., Spanagel R., Mann K. & M. Rietschel (2009). Genome-wide association study of alcohol dependence. *Arch Gen Psychiatry* 66(7):773-84.
- Umeno M., McBride W., Yang C.S., Gelboin H.V. & F.J. Gonzalez (1988). Human ethanol-inducible P450IIE1: complete gene sequence, promoter characterization, chromosome mapping, and cDNA-directed expression *Biochemistry* 27:9006-9013.
- Upadhy S.C., Tirumalai P.S., Boyd M.R., Mori T. & V. Ravindranath (2000). Cytochrome P4502E (CYP2E) in brain: constitutive expression, induction by ethanol and localization by fluorescence in situ Hybridization. *Arch Biochem Biophys* 373: 23-34.
- Vidal F., Lorenzo A., Auguet T., Olona M., Broch M., Gutiérrez C., Aguilar C., Estupiñá P., Santos M. & C. Richart (2004). Genetic polymorphisms of ADH2, ADH3, CYP4502E1 Dra-I and Pst-I, and ALDH2 in Spanish men: lack of association with alcoholism and alcoholic liver disease. *J Hepatol* 41:744–750.
- Wang S.L., Lee H., Chen K.W., Tsai K.J., Chen C.Y. & P. Lin (1999). Cytochrome P4502E1 genetic polymorphisms and lung cancer in a Taiwanese population. *Lung Cancer* 26(1):27-34.

- Watson J.D. & F.H. Crick (1953). Genetical implications of the structure of Deoxyribonucleic Acid. *Nature* May 171: 964-967.
- Weber J.L. & P.E. May (1989). Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet* 44(3):388-96.
- Whitfield J.B., Nightingale B.N., Bucholz K.K., Madden P.A., Heath A.C. & N.G. Martin (1998). *Alcohol Clin Exp Res* 22(7):1463-9.
- Wong N.A., Rae F., Simpson K.J., Murray G.D. & D.J. Harrison (2000). Genetic polymorphisms of cytochrome p4502E1 and susceptibility to alcoholic liver disease and hepatocellular carcinoma in a white population: a study and literature review, including meta-analysis. *Mol Pathol* 53(2):88-93.
- World Health Organization (1992). *The ICD 10 Classification of mental and Behavioural Disorders, Clinical descriptions and diagnostic Guidelines*. WHO, Geneva, Switzerland.
- World Health Organization (1996). *Violence against women: WHO Consultation*. Geneva, Switzerland.
- World Health Organization (2004). *Global Status Report on Alcohol 2004*. Department of Mental Health and Substance Abuse. Geneva, Switzerland.
- World Health Organization (2005). *WHO multi-country study on women's health and domestic violence against women: summary report of initial results on prevalence, health outcomes and women's responses*. Geneva, Switzerland.
- Yang M., Tsuang J. & Y.J. Yvonne Wan (2007). A haplotype analysis of CYP2E1 polymorphisms in relation to alcoholic phenotypes in Mexican Americans. *Alcohol Clin Exp Res*. 2007 Dec;31(12):1991-2000
- Yoshihara E., Ameno K., Nakamura K., Ameno M., Itoh S., Ijiri I. & K. Iwahashi (2000). The effects of the ALDH2*1/2, CYP2E1 C1/C2 and C/D genotypes on blood ethanol elimination. *Drug Chem Toxicol* 23(2):371-9.
- Yue J., Khokhar J., Miksys S. & R.F. Tyndale (2009). Differential induction of ethanol-metabolizing CYP2E1 and nicotine-metabolizing CYP2B1/2 in rat liver by chronic nicotine treatment and voluntary ethanol intake. *Eur J Pharmacol* 1;609(1-3):88-95.
- Zakhari S. (2006). Overview: how is alcohol metabolized by the body? *Alcohol Res Health* 29:245-54.

Zintzaras E., Stefanidis I., Santos M. & F. Vidal (2006). Do alcohol-metabolizing enzyme gene polymorphisms increase the risk of alcoholism and alcoholic liver disease? *Hepatology* 43:352-61.