

Estudo do polimorfismo dos genes *GSTT1* e *GSTM1* em pacientes portadores de gliomas malignos¹

Study of GSTT1 and GSTM1 genes polymorphism in malignant glioma patients

Marcelo Soares da Mota e Silva², Maria da Glória da Costa Carvalho³, Clovis Orlando da Fonseca⁴, Thereza Quirico Santos⁵ Brenda Maiolino Bucco⁶

¹Os autores estão gratos às professoras Maria Christina Soares Rebello e Nathalie Henriques Silva Canedo pela revisão e críticas do texto. O suporte financeiro para o desenvolvimento deste trabalho veio da Fundação Ary Frauzino e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). ²Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

³Professora Adjunta; Chefe do Laboratório de Controle da Expressão Gênica – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – Centro de Ciências da Saúde – UFRJ. ⁴Professor Associado – Serviço de Neurocirurgia – Universidade Federal Fluminense. ⁵Professora Titular – Departamento de Biologia Celular e Molecular – Instituto de Biologia – UFF. ⁶Graduanda em Medicina – UFRJ; Aluna de Iniciação Científica.

Resumo

Polimorfismos são variações na sequência de nucleotídeos do DNA genômico tais como deleções, inserções e outras. Os polimorfismos podem provocar alteração na função proteica e no fenótipo. Eventualmente pode ocorrer a deleção de ambos os alelos de um determinado gene e, nesse caso, a proteína que seria codificada pelo gene não será expressa. Essa situação é bastante frequente para os genes *GSTT1* e *GSTM1* que codificam enzimas de detoxicação (glutathione S-transferase teta 1, e, glutathione S-transferase mu 1, respectivamente). Considerando que as enzimas de detoxicação têm um papel fundamental na biotransformação de xenobióticos, essa falta da expressão poderia acarretar uma menor proteção e, conseqüentemente, uma maior susceptibilidade ao desenvolvimento de doenças de perfil citotóxico, em especial o câncer. Este trabalho analisou o perfil genotípico de uma população de 30 pacientes portadores de gliomas malignos para os genes *GSTT1* e *GSTM1*. Os tipos tumorais foram: vinte e quatro glioblastomas multiformes, três astrocitomas anaplásicos grau II, dois oligodendrogliomas e um astrocitoma anaplásico grau III. Os objetivos deste estudo foram comparar o genótipo dos 30 pacientes para os genes *GSTT1* e *GSTM1* com o encontrado em uma população de 65 sujeitos-controle teoricamente saudáveis, bem como, nos pacientes, relacionar a presença ou deleção desses genes com o tempo de sobrevida. Os resultados sugerem que o genótipo *GSTT1* nulo poderia conferir uma maior proteção contra o desenvolvimento dessas malignidades cerebrais e também indicam uma possível relação entre o genótipo e o tempo de sobrevida para portadores desses gliomas.

Palavras-chave: Polimorfismo – Glutathione S-transferases – Genes de detoxicação – Xenobióticos – Gliomas.

Abstract

Polymorphisms are sequence variations in genomic DNA, including deletions, insertions and others and can cause change in protein function and in the phenotype. Eventually, deletion of both alleles of a gene can occur. In this case, the protein encoded by the gene would not be expressed. This situation is very frequent in GSTT1 and GSTM1 genes, which codify detoxification enzymes (glutathione S-transferase theta 1 and glutathione S-transferase mu 1 respectively). Considering the fundamental role of detoxification enzymes in xenobiotic biotransformation, the absence of these enzymes could result in reduced protection and consequently lead to a higher susceptibility to diseases with cytotoxic profile, cancer in special. This work analyzed the genotypic profile of 30 patients with malignant gliomas for the GSTT1 and GSTM1 genes and compared the patients' genotype for GSTT1 and GSTM1 genes with the genotype of 65 health controls. We also correlated the genotypic alterations with the survival in one year of follow-up. The tumor types were: twenty-four glioblastoma multiforme, three anaplastic astrocytoma grade II, two oligodendroglioma and one anaplastic astrocytoma grade III. The results suggest that the GSTT1 null genotype could lead to protection against brain malignancies development and increased survival for brain tumors patients.

Keywords: Polymorphism – Glutathione S-transferases – Detoxification genes – Xenobiotic – Gliomas.

INTRODUÇÃO

Os tumores cerebrais

Qualquer um dos diversos tipos celulares do cérebro pode sofrer mutações e dar origem a um tumor. Os

Recebido em 30 de março de 2010; revisado em 01 de dezembro de 2010.

Correspondência / Correspondence: Marcelo Soares da Mota e Silva. Laboratório de Controle da Expressão Gênica – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho. Centro de Ciências da Saúde – UFRJ. Bloco G, Avenida Carlos Chagas Filho, 373 - Cidade Universitária. 21941-902. Rio de Janeiro – RJ – Brasil. Tel.: (21) 2562-6511. E-mail: motamarc@biof.ufrj.br

tumores cerebrais são caracterizados pelo tipo celular afetado (ARMSTRONG et al., 2007). No cérebro, podem ocorrer tumores primários (os de origem cerebral), ou tumores secundários (os que se originam em outro sítio, mas formam metástase cerebral). Neste trabalho, foram incluídos trinta pacientes portadores de gliomas primários, que são tumores que se originam nas células da glia, as quais dão suporte aos neurônios, participam da sua nutrição, além de possuírem um papel de proteção. Desses trinta pacientes, vinte e quatro eram

portadores de glioblastoma multiforme (GBM), três apresentavam astrocitoma anaplásico (AA), e dois, oligodendroglioma (OD). Os tumores das células gliais correspondem a mais de 50% dos tumores do sistema nervoso central (HESS; BROGLIO; BONDY, 2004). Os glioblastomas multiformes são os gliomas mais agressivos e de pior prognóstico, sendo os astrócitos o tipo celular afetado. Os glioblastomas multiformes são os astrocitomas de alto grau (grau IV) de acordo com a classificação da Organização Mundial da Saúde. Os astrocitomas anaplásicos também se originam dos astrócitos, sendo bastante agressivos (porém menos que os glioblastomas multiformes), e são classificados como astrocitomas de grau III. Os oligodendrogliomas originam-se nos oligodendrócitos e, dos três tipos de tumor citados, são os menos agressivos e de melhor prognóstico (ARMSTRONG et al., 2007; (HESS; BROGLIO; BONDY, 2004).

Os xenobióticos

Xenobiótico é qualquer composto químico que seja estranho ao organismo. O contato continuado com determinados xenobióticos tem sido associado ao aumento do risco de desenvolvimento de câncer (BELPOMME et al., 2007).

A susceptibilidade individual ao câncer depende, em parte, da capacidade de biotransformar os xenobióticos de forma eficiente, sendo para isto relevante a atuação das enzimas de detoxicação, as quais se ligam a compostos carcinogênicos facilitando o seu metabolismo e excreção por parte do organismo (AUTRUP, 2000).

A Biotransformação dos Xenobióticos

A ativação metabólica e posterior detoxicação dos produtos genotóxicos acontecem respectivamente nas reações enzimáticas de fase I e II da biotransformação (JOSEPH et al., 2006). As enzimas glutatona S-transferases (GSTs) contribuem para a fase II da biotransformação de xenobióticos através da conjugação deles com a glutatona reduzida, o que facilita sua dissolução no meio aquoso intra e extracelular, e sua excreção do organismo (HAYES; PULFORD, 1995). Neste trabalho, são abordadas duas das classes de GSTs: a *GSTT1* (glutatona S-transferase teta 1), e a *GSTM1* (glutatona S-transferase mu 1), sendo codificadas pelos genes *GSTT1* e *GSTM1* respectivamente.

A ocorrência de polimorfismos em genes que codificam enzimas de detoxicação é bastante frequente. Quando o polimorfismo ocorre dentro de uma região codificante do gene (éxon), pode haver substituição de aminoácido naquela posição, resultando em mudança na atividade proteica (WORMHOUDT; COMMANDEUR; VERMEULEN, 1999). No caso dos genes *GSTT1* e *GSTM1*, ocorre o polimorfismo do tipo deleção homozigótica, no qual ambos os alelos do gene estão deletados e,

consequentemente, as respectivas enzimas não podem ser sintetizadas (EZER et al., 2002).

Trabalhos publicados na literatura científica apontam para o fato de que indivíduos incapazes de produzir enzimas de detoxicação mostram-se mais susceptíveis a desenvolver alguns tipos de câncer (HIRVONEN, 1999). Tanto o gene *GSTM1* quanto o gene *GSTT1* são altamente polimórficos nas diversas etnias já investigadas. Para o gene *GSTM1*, encontrou-se uma frequência de genótipo nulo de cerca de 50% em caucasianos nos EUA, enquanto que, para o gene *GSTT1*, a frequência de deleção homozigótica ficou em cerca de 15% (REBBECK, 1997). No Brasil, encontrou-se uma frequência de 48,9% para deleções homozigóticas do gene *GSTM1* e 25,1% para o gene *GSTT1* numa população de brancos (ROSSINI et al, 2002). Já foi descrito, na literatura científica, que fumantes com genótipo *GSTT1* nulo apresentam número significativamente maior de aberrações cromossômicas do que fumantes que expressam este gene (EL-ZEIN; CONFORTI-FROES; AU, 1997). Além disso, o genótipo nulo para *GSTT1* têm sido associado a um elevado risco para câncer de cólon (DEAKIN et al., 1996) e para carcinoma de células basais (STRANGE; LEAR; FRYER, 1998). Estudos epidemiológicos sugerem que indivíduos que sejam homozigotos nulos para o gene *GSTM1* apresentam um risco aumentado para câncer em diversos sítios, tais como, pulmão, bexiga, cólon e mama (D'ERICO et al., 1996).

Este trabalho tem como objetivos investigar o polimorfismo do tipo deleção dos genes *GSTT1* e *GSTM1* numa população de portadores de gliomas malignos e relacionar o genótipo desses pacientes para esses genes com o seu tempo de sobrevida.

MATERIAIS E MÉTODOS

Grupo de Estudo

O grupo de pacientes incluiu 30 portadores de gliomas primários, sendo 24 com glioblastoma multiforme (GBM), 3 com astrocitoma anaplásico (AA), e 2 com oligodendroglioma (OD). O grupo de controle era constituído de 65 indivíduos saudáveis. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética do Hospital Universitário Antônio Pedro, da Universidade Federal Fluminense, pelo CONEP (registro 9681 no. 124 25000.009267/2004-25), e os pacientes e os controles assinaram termo de consentimento livre e esclarecido para participarem do estudo.

Obtenção das células do sangue e da mucosa oral

O sangue periférico dos 30 pacientes portadores de gliomas malignos foi coletado, e os linfócitos foram separados por centrifugação para a extração do DNA genômico. Também foram coletadas, com o uso de *swab*, células da mucosa oral de 65 sujeitos-controle para obtenção do DNA.

Extração de DNA

As amostras foram tratadas com proteinase k n concentração de 0,3 µg/µl à temperatura de 55° overnight. E, seguida, foi acrescentado igual volume d fenol:clorofórmio (1:1), seguido de agitação vigorosa posterior centrifugação, sendo então separada a fas aquosa e o DNA precipitado com dois volumes de etanc absoluto a aproximadamente -20°C overnight. Após nov centrifugação e descarte do sobrenadante, as amostras foram então lavadas com etanol a 70% e o pellet de DNA ressuspenso em água milli-Q.

Determinação dos genes GSTM1 e GSTT1

As deleções dos genes GSTM1 e GSTT1 fora detectadas com o uso de PCR (Polymerase Cha Reaction) multiplex, e a mistura de reação usac continha iniciadores para esses genes e também para gene p53, o qual foi utilizado como um controle interr da reação. As sequências dos primers (iniciadore usados para a amplificação foram:

Gene	Primer	Amplifica
GSTM1	(D) 5'-GAACTCCTGAAAAGCTAAGC-3'	220 pt
	(R) 5'-GTTGGGCTCAAATATACG GTGG-3'	
GSTT1	(D) 5'-TTCCTTACTGGTCTCACATCTC-3'	450 pb
	(R) 5'-TCA CCGGATCATGCCAGCA-3'	
p53	(D) 5'-GCAACAGCCCTGTCGTGTCTCCA-3'	274 pb
	(R) 5'-GGAATTCTGTTCACTGTGCCCTGACTTTC AAC-3'	

As condições de amplificação foram realizadas segundo o descrito por Joseph e colaboradores (2006), com desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de: 95°C por 30 segundos, 64°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto. Para a extensão final, usou-se 72°C por 5 minutos.

Após a amplificação, o produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida e corado pelo método do nitrato de prata. Nesse método, inicialmente é feita uma etapa de fixação do DNA por 10 minutos numa solução de etanol a 10% e ácido acético a 0,8% em água destilada. Segue-se uma etapa de impregnação com nitrato de prata a 0,2% em água destilada por 10 minutos e, por fim, a revelação com uma solução de NaOH a 3% e formaldeído a 0,8% em água destilada pelo tempo suficiente para obter uma coloração satisfatória (de cinco a dez minutos) (REBELLO; CARVALHO, 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos géis, foram evidenciadas as bandas dos fragmentos de DNA amplificados, sendo a banda de 220 pb correspondente ao gene GSTM1, a banda de 274 pb ao gene p53, e a banda de 450 pb ao gene GSTT1 (Figura 1).

A partir da análise dos géis, foram estabelecidos os perfis genotípicos dos pacientes e dos sujeitos-controle para os genes GSTT1 e GSTM1, conforme mostra a Tabela 1.

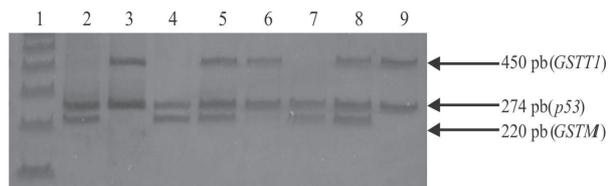


Figura 1 – Bandas dos fragmentos de DNA amplificados Nota: raia 1 - 100 bp ladder® (padrão de DNA); raias 2, 4 e 7 - deleção de GSTT1; raias 3,6 e 9 - deleção de GSTM1; raias 5 e 8 - ausência de deleção.

Tabela 1 - Genótipos dos 65 controles e dos 30 pacientes para os genes GSTT1 e GSTM1.

Genótipo	Controles n (%)	Pacientes (GBM, AA, OD) n (%)
GSTT1		
Presente	33 (50,8%)	25 (83,3%)
Nulo	32 (49,2%)	5 (16,7%)
GSTM1		
Presente	26 (40%)	11 (36,7%)
Nulo	39 (60%)	19 (63,3%)
GSTT1/GSTM1		
Nulo/Nulo	19 (29,2%)	4 (13,3%)
Presente/Presente	13 (20%)	10 (33,3%)
Presente/Nulo	20 (30,8%)	15 (50%)
Nulo/Presente	13 (20%)	1 (3,3%)

Nota: GBM = glioblastoma multiforme; AA = astrocitoma anaplásico; OD = oligodendroglioma

Tabela 2 – Sobrevida dos pacientes em meses em relação ao genótipo

Genótipo	0 a 6 meses n=11	7 a 11 meses n=8	= 12 meses n=11
GSTT1			
Presente	8 (72,7%)	8 (100%)	9 (81,8%)
Nulo	3 (27,3%)	0 (0%)	2 (18,2%)
GSTM1			
Presente	3 (27,3%)	2 (25%)	6 (54,5%)
Nulo	8 (72,7%)	6 (75%)	5 (45,5%)
GSTT1/GSTM1			
Nulo/Nulo	2 (18,2%)	0 (0%)	2 (18,2%)
Presente/Presente	2 (18,2%)	2 (25%)	6 (54,5%)
Presente/Nulo	6 (54,5%)	6 (75%)	3 (27,3%)
Nulo/Presente	1 (9,1%)	0 (0%)	0 (0%)

A Tabela 1 mostra que a frequência do genótipo nulo para GSTT1 é de apenas 16,7% nos pacientes, enquanto que a frequência é de 49,2% no grupo de controle. Trizna e colaboradores (1998), analisando o gene GSTT1, em estudo realizado nos EUA com portadores desses mesmos gliomas, encontraram 27,8% de genótipo nulo nos pacientes e 30% no grupo de controle saudável. Nossos resultados sugerem que o genótipo GSTT1 nulo, de alguma forma, poderia conferir proteção contra o desenvolvimento dos gliomas considerados, visto que, a frequência desse genótipo entre os controles saudáveis é bem maior do que nos pacientes. A Tabela 1

também mostra que a frequência do genótipo *GSTT1* nulo /*GSTM1* presente é de apenas 3,3% nos pacientes, contra 20% nos controles. Isso sugere que a ausência de atividade da enzima *GSTT1*, associada à concomitante presença da enzima *GSTM1* ativa, poderia também conferir proteção contra o desenvolvimento desses gliomas malignos.

A Tabela 2 apresenta os tempos de sobrevida dos pacientes relacionados com seus perfis genotípicos para os genes *GSTT1* e *GSTM1*.

Esta tabela mostra que, dentre os dez pacientes que apresentaram genótipo *GSTT1* presente / *GSTM1* presente, oito deles tiveram sobrevida igual ou superior a 7 meses. Isso sugere que esse genótipo poderia favorecer a uma sobrevida mais prolongada em pacientes portadores desses gliomas malignos.

CONCLUSÕES

Neste estudo, observou-se uma diferença importante entre a frequência de deleção do gene *GSTT1* no grupo de controle (49,3%) e no grupo de pacientes (16,7%), sugerindo que a ausência do gene *GSTT1* poderia representar um genótipo de proteção contra o desenvolvimento dos gliomas malignos considerados. Os resultados deste estudo também sugerem que a presença concomitante dos genes *GSTT1* e *GSTM1* poderia favorecer a um maior tempo de sobrevida para os pacientes portadores dos gliomas considerados, o que representaria um genótipo de melhor prognóstico.

REFERÊNCIAS

- ARMSTRONG, T.S. et al. **The essential guide to brain tumors**. San Francisco: National Brain Tumor Foundation, 2007. Disponível em: <<http://www.brainumor.org/BulkPublicationOrders/#3709>>. Acesso em: 6 nov. 2009.
- AUTRUP, H. Genetic polymorphisms in human xenobiotic metabolizing enzymes as susceptibility factors in toxic response. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v.464, p.65-76, 2000.
- BELPOMME, D. et al. The multitude and diversity of environmental carcinogens. **Environ. Res.**, New York, v.105, n.3, p.414-429, 2007.
- DEAKIN, M. et al. Glutathione S-transferase *GSTT1* genotypes and susceptibility to cancer: studies of interactions with *GSTM1* in lung, oral, gastric and colorectal cancers. **Carcinogenesis**, Oxford, v.17, n.4, p.881-884, 1996.
- D'ERICO, A. et al. Genetic metabolic polymorphisms and the risk of cancer: a review of literature. **Biomarkers**, London, v.1, p.149-173, 1996.
- EL-ZEIN, R.; CONFORTI-FROES, N.; AU, W.W. Interaction between genetic predisposition and environmental toxicants for development of lung cancer. **Environ. Mol. Mutagen**, New York, v.30, p.196-204, 1997.
- EZER, R. et al. Identification of glutathione S-transferase (*GST*) polymorphisms in brain tumors and association with susceptibility to pediatric astrocytomas. **J. Neurooncol.**, Dordrecht, v.59, p.123-134, 2002.
- HAYES, J.D.; PULFORD, D.J. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of *GST* and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.**, London, v.30, p.445-600, 1995.
- HESS, K.R.; BROGLIO, K.R.; BONDY, M.L. Adult glioma incidence trends in the United States, 1977-2000. **Cancer**, New York, v.101, n.10, p.2293-2299, 2004.
- HIRVONEN, A. Polymorphisms of xenobiotic- metabolizing enzymes and susceptibility to cancer. **Environ. Health Perspect.**, Research Triangle Park, v.107, p.37-47, 1999. Supl.1.
- JOSEPH, T. et al. Germline genetic polymorphisms of *CYP1A1*, *GSTM1* and *GSTT1* genes in Indian cervical cancer: associations with tumor progression, age and human papillomavirus infection. **Gynecol. Oncol.**, New York, v.101, p.411-417, 2006.
- REBBECK, T.R. Molecular epidemiology of human glutathione S-transferase genotypes *GSTM1* and *GSTT1* in cancer susceptibility. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, Philadelphia, v.6, p.733-743, 1997.
- REBELLO, A.S.; CARVALHO, M.G.C. Metodologia para estudo do polimorfismo do gene da enzima álcool desidrogenase. **R. Ci. Med. Biol.**, Salvador, v.7, p.163-168, 2008.
- ROSSINI, A. et al. Frequencies of *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* polymorphisms in a Brazilian population. **Genet. Mol. Res.**, Ribeirão Preto, v.1, n.3, p.233-240, 2002. Disponível em: <http://www.funpecrp.com.br/gmr/year2002/vol3-1/gmr0028_abstract.htm>. Acesso em: 10 nov. 2009.
- STRANGE, R.C.; LEAR, J.T.; FRYER, A.A. Glutathione S-transferase polymorphisms: influence on susceptibility to cancer. **Chem. Biol. Interact.**, Limerick, v.111/112, p.351-364, 1998.
- TRIZNA, Z. et al. Genetic polymorphisms in glutathione S-transferase μ and γ , N-acetyltransferase, and *CYP1A1* and risk of gliomas. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, Philadelphia, v.7, p.553-555, 1998.
- WORMHOUDT, L.W.; COMMANDEUR, J.N.; VERMEULEN, N.P. Genetic polymorphisms of human N-acetyltransferase, cytochrome P450, glutathione S-transferase, and epoxide hydrolase enzymes: relevance to xenobiotic metabolism and toxicity. **Crit. Rev. Toxicol.**, London, v.29, p.59-124, 1999.