

Jucimara Colombo

POLIMORFISMOS DOS GENES *GSTT1*, *GSTM1* E *CYP2E1*
EM CÂNCER GÁSTRICO E GASTRITE CRÔNICA



América Colombiana

FOUNDO FUNDOS DOA DEAES ODTT. ODTT E
CYPIER EN CÂNCER GASTRO E GASTRO
CRÔNICA

O Instituto de Física da Universidade de São Paulo

Introdução à Física da Universidade de São Paulo



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

1977



Jucimara Colombo

**POLIMORFISMOS DOS GENES *GSTT1*, *GSTM1* E
CYP2E1 EM CÂNCER GÁSTRICO E GASTRITE
CRÔNICA**

Orientador: Profa. Dra. Ana Elizabete Silva

**Dissertação apresentada para
obtenção do Grau de Mestre em
Genética.**



São José do Rio Preto - SP

2002

616.33

C718p

16/10/2007

DOAÇÃO

AUTOR

Colombo, Jucimara.

Polimorfismos dos genes *GSTT1*, *GSTM1* e *CYP2E1* em câncer gástrico e gastrite crônica / Jucimara Colombo. – São José do Rio Preto : [s.n.], 2002

102 f. ; 30 cm.

Orientadora: Ana Elizabete Silva

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Genética humana. 2. Estômago - Câncer. 3. Gastrite crônica. 4. Polimorfismo (Genética). 5. *GSTT1*. 6. *GSTM1*. 7. *CYP2E1*. I. Silva, Ana Elizabete. II. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 575:616.33



Jucimara Colombo

**Polimorfismos dos genes *GSTT1*, *GSTM1* e *CYP2E1* em
câncer gástrico e gastrite crônica**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTEÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador

2º Examinador.....

3º Examinador.....

São José do Rio Preto, __/__/__



Dedico este trabalho

*"Ao meu querido e inesquecível pai
Manoel Colombo (in memoriam), pelo seu
exemplo de vida demonstrado, por tudo*

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular, do Departamento de Biologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto - SP, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"- UNESP, com auxílio-bolsa CAPES.

Agradecimentos

A realização deste trabalho contou com a colaboração de várias pessoas, em especial agradeço:

Principalmente à minha orientadora, Profa. Dra. Ana Elizabete Silva, pela amizade, apoio e paciência sempre demonstrados ao longo desses anos e por ter acolhido as minhas ideias e me ajudado a lutar por elas.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron e à Profa. Dra. Cláudia Aparecida Rainha pela disponibilidade em participar como membros da banca, contribuindo para o aprimoramento e enriquecimento dessa dissertação.

Ao Profas. Dras. Nívea Dulce Tade **Dedico este trabalho**
Andréa Regina Baptista Rozit e Isabel Rosa Cabral pela colaboração irrestrita em todas as etapas.

Ao Profas. Dras. Fátima **"Ao meu querido e inesquecível pai**
Maria Elizabete Jorge Amorim **Manoel Colombo (in memorian), pelo seu**
Biologia Molecular deste **exemplo de vida demonstrado, por todo**
conhecimentos sempre com **seu amor a mim dedicado e por ter me**
ensinado que viver é uma conquista
diária"

Aos médicos Denis Albanese Borim e Dr. Alair Cautano, por possibilitar a coleta das amostras no Hospital de Base de São José do Rio Preto-SP.

A Dra. Scyllia Prata, diretora do Hospital do Câncer de Barretos, que nos abriu as portas desta instituição tão honrada, nos permitindo o término da coleta das amostras.

Ao Dr. Durval Wahnvath, médico do Hospital do Câncer de Barretos, exemplo de profissional e ser humano, que nos ajudou de forma incondicional durante a coleta das amostras.

Agradecimentos

A realização deste trabalho contou com a colaboração de várias pessoas, em especial agradeço:

Principalmente à minha orientadora, Profa. Dra. Ana Elizabete Silva, pela amizade, apoio e paciência sempre demonstrados ao longo desses anos e por ter acolhido os meus sonhos e me ajudado a lutar por eles.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron e à Profa. Dra. Cláudia Aparecida Rainho pela disponibilidade em participar como membros da banca, contribuindo para o aprimoramento e enriquecimento dessa dissertação.

À Profas. Dras. Nívea Dulce Tedeschi Conforti Fróes, Andréa Regina Baptista Rossit e Isabel Rosa Cabral pela colaboração irrestrita em todas as etapas desse trabalho, tornando-o possível.

À Profas Dras Paula Rahal, Eloiza Helena Tajara da Silva e Maria Elizabete Jorge Amaral, do Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular deste Instituto, pela amizade, atenção e conhecimentos sempre compartilhados.

Aos médicos Dr. Aldenis Albanese Borim e Dr. Alaor Caetano, por possibilitar a coleta das amostras no Hospital de Base de São José do Rio Preto-SP.

À Dra. Scylla Prata, diretora do Hospital do Câncer de Barretos, que nos abriu as portas desta Instituição tão honrada, nos permitindo o término da coleta das amostras.

Ao Dr. Durval Wohnrath, médico do Hospital do Câncer de Barretos, exemplo de profissional e ser humano, que nos ajudou de forma incondicional durante a coleta das amostras.

Às enfermeiras do Hospital do Câncer de Barretos, especialmente, Ana Cláudia e Alice, pela atenciosa colaboração enquanto lá estive.

À Profa. Adriana Barbosa dos Santos e ao Prof. Dr. José Antônio Manzato pela valiosa orientação na análise estatística.

A assistente Social Suzy Poaité pela atenciosa colaboração na classificação da ocupação profissional dos indivíduos participantes da pesquisa.

Ao Prof. Dr. Peter James Harris, do Departamento de Letras Modernas, pela tão gentil revisão do abstract.

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação em Genética que contribuíram para o meu crescimento, compartilhando seus conhecimentos com imensa dedicação.

Aos funcionários do Departamento de Biologia, em especial à secretária Simone Carvalho Fernandes e ao técnico acadêmico Josué Rodrigues dos Santos, que acompanham a minha formação desde a graduação.

Às enfermeiras Kikue Kamo de Oliveira e Maria Aparecida, que sempre com muita competência e carinho realizaram a coleta das amostras.

Aos funcionários da Biblioteca do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, em especial à Elza Mitiko Sato, pelo Serviço de Comutação Bibliográfica.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, em especial, Rosana Miguel Gomes Ferro e Oscar José Marques, pela simpatia e atenção com as quais sempre me receberam.

À direção do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto-SP, pelo fornecimento dos recursos materiais.

À CAPES pela concessão da bolsa de Mestrado.

Aos colegas do Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular Sylvia, Alessandra Trovó, Ulises, Janaína, Lucimari, Flávia, Fernanda, Mariângela, Melissa, Paola, Marcos, Alessandra Vidotto pela convivência agradável, tornando menos árduo este trabalho.

Aos colegas da Pós-Graduação em especial Alessandra Laranja, Ana Cláudia Maritan, Cláudia Aparecida Pacheco, Luís Gustavo Galego, Patrícia Ianela e Marcos de Lucca Júnior, pelos momentos de descontração passados juntos.

Às pós-graduandas Ana Cristina Gobo César, Giovana Mussi Polachini e Rosa Maria do Vale Bosso, pela grande amizade construída e pelo carinho e apoio sempre demonstrados nos momentos difíceis desse trabalho.

A todos os pacientes e amigos que voluntariamente e despretenciosamente doaram sangue, sem os quais este trabalho seria impossível.

Às grandes amigas Nancy e Camila, com as quais compartilhei meus momentos de angústia e alegria.

Às minhas tias Gentil, Alvina e Josefina e aos primos Mário, Bruno e Tatiana, pelas lembranças felizes de Campinas, que me dão forças para lutar, sempre.

À minha mãe Helena, pela sua admiração e apoio.

A Deus pela vida ... por tudo.



*"Ando devagar
Porque já tive pressa
Levo este sorriso
Porque já chorei demais
Hoje me sinto mais forte,
Mais feliz quem sabe,
Só levo a certeza que muito pouco eu sei,
Eu nada sei..."*

Renato Teixeira e Almir Sater

*"E ainda que tivesse o Dom da profecia, e
conhecesse todos os Mistérios e toda a
Ciência, e ainda que tivesse toda a Fé de
maneira tal que transportasse os
montes, e não tivesse Amor, nada seria."*

1 Coríntios 13:2

Sumário

I - Introdução.....	01
I.1 - Patologias gástricas e epidemiologia do câncer gástrico.....	01
I.2 - Fatores ecológicos do câncer gástrico.....	05
I.3 - Marcadores de suscetibilidade a câncer gástrico.....	09
I.4 - Objetivos.....	18
II - Material e Métodos.....	19
II.1 - Considerações éticas.....	19
II.2 - Casuística.....	19
II.3 - Técnicas moleculares.....	21
II.3.1 - Extração de DNA de leucócitos.....	21
II.3.2 - Determinação dos polimorfismos.....	22
II.4 - Análise estatística.....	25
III - Resultados.....	27
III.1 - Avaliação de alguns fatores relacionados à carcinogênese gástrica.....	27
III.2 - Frequências dos polimorfismos dos genes GSTT1, GSTM1 e CYP2E1 e associação entre eles.....	39
IV - Discussão.....	62
IV.1 - Fatores ambientais e hereditários.....	62
IV.2 - Associação entre CYP2E1 e câncer gástrico.....	70
V - Conclusões.....	80
VI - Resumo.....	82
VII - Abstract.....	84
VIII - Referências Bibliográficas.....	86
IX - Apêndice I.....	102

*"Para ser grande , sê inteiro: Nada
 teu exagera ou exclui. Sê todo em cada
 coisa. Pões quanto és no mínino que fazes.
 Assim, em cada lago a Lua toda brilha,
 porque alta vive"*

Fernando Pessoa

Sumário

I - Introdução.....	01
I.1 - Patologias gástricas e epidemiologia do câncer gástrico.....	01
I.2 - Fatores etiológicos do câncer gástrico.....	05
I.3 - Marcadores de suscetibilidade e câncer gástrico.....	09
I.4 - Objetivos.....	18
II - Material e Métodos.....	19
II.1 - Considerações éticas.....	19
II.2 - Casuística.....	19
II.3 - Técnicas moleculares.....	21
II.3.1 - Extração de DNA de leucócitos.....	21
II.3.2 - Determinação dos polimorfismos.....	22
II.4 - Análise estatística.....	25
III - Resultados.....	27
III.1 - Avaliação de alguns fatores relacionados à carcinogênese gástrica....	27
III.2 - Frequências dos polimorfismos dos genes <i>GSTT1</i> , <i>GSTM1</i> e <i>CYP2E1</i> e associação com fatores ambientais.....	39
IV - Discussão.....	62
IV.1 - Fatores ambientais e câncer gástrico.....	62
IV.2 - Associação entre os polimorfismos dos genes <i>GSTT1</i> , <i>GSTM1</i> e <i>CYP2E1</i> e câncer gástrico.....	70
V - Conclusões.....	80
VI - Resumo.....	82
VII - Abstract.....	84
VIII - Referências Bibliográficas.....	86
IX - Apêndice I.....	102

I – Introdução

I.1 – Patologias gástricas e epidemiologia do câncer de estômago

O estômago é um órgão do aparelho digestório que participa da digestão dos alimentos por meio de um processo mecânico, pela ação da sua túnica muscular, e de um processo químico, pela ação do suco gástrico, secretado por glândulas da mucosa gástrica. Anatomicamente, é dividido em cinco regiões: cárdia, fundo, corpo, antro e piloro (Rubin & Faber, 1994; Cotran *et al.*, 1999).

Do ponto de vista patológico, esse órgão é um segmento importante do trato alimentar. Dentre as anomalias congênitas do estômago destacam-se as hérnias diafragmáticas e a estenose pilórica. Contudo, lesões benignas como gastrite, úlcera, metaplasia, displasia e os tumores benignos e os malignos acometem o estômago de forma freqüente, sendo que muitas das lesões benignas conferem um risco maior de malignização (De Vita *et al.*, 1997; Cotran *et al.*, 1999).

A gastrite consiste em uma inflamação da mucosa gástrica que pode ser predominantemente aguda, com infiltração neutrofílica, ou crônica, com o predomínio de linfócitos e/ou plasmócitos. A gastrite aguda é um processo inflamatório agudo da mucosa, geralmente de natureza transitória, freqüentemente associada com o uso crônico de antiinflamatórios não-hormonais, particularmente a aspirina, consumo excessivo de álcool, fumo, tratamento com agentes quimioterápicos, uremia, infecções sistêmicas e estresse intenso. Devido a sua característica transitória é raramente observada em biópsia de rotina (Cotran *et al.*, 1999).

A gastrite crônica, por sua vez, engloba uma variedade de lesões que vão desde a gastrite superficial até a atrofia gástrica. Essas formas são precariamente delineadas umas das outras, pois perfazem um contínuo morfológico de infiltração inflamatória cada vez mais intensa da

mucosa, acompanhada por atrofia progressivamente mais acentuada das glândulas mucosas. A atrofia glandular é acompanhada freqüentemente por metaplasia, displasia e atrofia do epitélio superficial com maior predisposição ao carcinoma gástrico. Dessa forma, a gastrite crônica é conhecida como uma das lesões precursoras do câncer gástrico e está associada com a infecção crônica pelo bacilo *Helicobacter pylori*, o qual está presente em 90% dos pacientes com gastrite crônica afetando a região antral (Houben & Stockbrügger, 1995; Sipponen *et al.*, 1998; Cotran *et al.*, 1999).

As úlceras pépticas são lesões crônicas, geralmente solitárias, que ocorrem em qualquer local do trato gastrointestinal exposto à ação agressiva dos sucos pépticos ácidos. Cerca de 98 a 99% das úlceras pépticas ocorrem no duodeno ou no estômago, segundo uma relação de 4:1, respectivamente. Vários dados da literatura mostram que o seu aparecimento está relacionado com defeitos primários na resistência da mucosa ou deficiências quantitativas ou qualitativas do seu muco, além da presença de hiperacidez gástrica e de alguns fatores ambientais como a ingestão de medicamentos antiinflamatórios não esteróides, álcool e fumo (Anand & Graham, 1999; Cotran *et al.*, 1999).

Eventualmente, acompanhando uma gastrite ou durante o processo de cicatrização da mucosa gástrica, é observada a metaplasia intestinal, na qual tanto a mucosa antral quanto a corpo-fúndica tornam-se parcialmente substituídas por células absortivas colunares metaplásicas e células caliciformes de morfologia intestinal, ambas ao longo do epitélio superficial e nas glândulas rudimentares (Genta, 1995; Sipponen *et al.*, 1998). Ocasionalmente, projeções tipo vilosidades podem aparecer, dando à mucosa um aspecto aveludado. Na análise histológica e histoquímica, as alterações podem tomar diferentes formas, sendo que a metaplasia completa tipo I é constituída por células do intestino delgado totalmente formadas, incluindo células de absorção, caliciformes e de

Paneth. Na metaplasia incompleta tipo II e tipo III as células caliciformes misturam-se com as células gástricas (Sipponen *et al.*, 1998).

A displasia consiste em uma lesão neoplásica benigna, uma vez que não é invasora nem metastizante. Na displasia, o epitélio desenvolve alterações citológicas, incluindo alterações de tamanho, formato e orientação das células epiteliais e aumento com atipia do núcleo. Tais alterações não podem ser atribuídas a processo inflamatório regenerativo, sendo a displasia um marcador de uma estrutura em que é muito possível o desenvolvimento de um carcinoma (Kokkola *et al.*, 1996).

Os tumores gástricos benignos como os de células fusiformes (estromais), pólipos e lipomas, dentre outros, são geralmente assintomáticos. Contudo, os tumores malignos são os que mais acometem o estômago, principalmente o adenocarcinoma, que é o mais importante e mais comum, correspondendo a 90-95% dos casos. As demais neoplasias são constituídas pelos linfomas (4%), tumores carcinóides (3%) e tumores malignos de células estromais (2%) (Cotran *et al.*, 1999).

Os adenocarcinomas são classificados com base em aspectos histopatológicos e clínicos em dois tipos: intestinal e difuso (Lauren, 1965). As lesões tipo intestinal são as mais freqüentes, bem diferenciadas, dependentes de fatores ambientais e associadas com a presença de lesões pré-cancerosas. Uma série de mudanças tem sido identificadas como precursoras desse tipo de tumor, representando etapas subseqüentes dentro de um processo pré-canceroso: gastrite superficial, gastrite atrófica crônica, pequena metaplasia intestinal, metaplasia incompleta, displasia, carcinoma intramucoso e invasivo. Essas alterações seqüenciais podem ocorrer num período de muitos anos, como resultado da exposição a uma variedade de fatores endógenos e exógenos. O adenocarcinoma tipo intestinal tem melhor prognóstico, é a forma encontrada predominantemente em homens e em indivíduos mais idosos. O tipo difuso, por outro lado, é pouco



diferenciado, apresenta prognóstico reservado e não está associado com lesões pré-cancerosas, é um pouco mais freqüente nas mulheres e pacientes jovens e tem alta ocorrência familiar, principalmente, entre indivíduos com tipo sanguíneo A (De Vita *et al.*, 1997).

O câncer gástrico é uma doença de ocorrência mundial e embora sua incidência tenha declinado nos últimos 60 anos, ele ainda é o segundo tipo mais comum de neoplasia em incidência e mortalidade, sendo duas vezes mais freqüente no sexo masculino do que no feminino, principalmente entre idosos. A freqüência na população é baixa aos 40 anos e aumenta progressivamente com a idade até atingir seu valor mais elevado por volta dos 70 anos nos homens e um pouco mais tarde na mulheres (AIRC, 1997; De Vita *et al.*, 1997).

As estatísticas mundiais mostram uma distinta variação geográfica, sendo encontradas taxas elevadas no Japão, Chile, China, Portugal, Costa Rica, Colômbia e Rússia e menor incidência nos Estados Unidos, Reino Unido, Canadá, Austrália, França e Grécia (Cotran *et al.*, 1999).

No Brasil, o câncer gástrico ocupa o quinto lugar em incidência, sendo antecedido pelas neoplasias de pele, mama, próstata e pulmão. As estimativas para 2002 apontam 20.420 casos novos, correspondendo a 7% de todos os casos de câncer. Essa neoplasia apresenta taxa elevada de mortalidade, disputando com o de pulmão, a condição de principal causa de morte quando considera-se todos os tipos de câncer, com estimativa de 11.070 óbitos (INCA, 2002). Após o diagnóstico da doença, menos de 20% dos pacientes atingem uma sobrevida de 5 anos, demonstrando que o seu prognóstico é bastante reservado. Tal fato é consequência do diagnóstico ser realizado em estágios avançados na maioria dos casos e dessa afecção mostrar taxa de recorrência próxima a 80%, mesmo quando é realizada a gastrectomia. O prognóstico depende da extensão da invasão do tumor, do comprometimento das estruturas adjacentes e da presença ou ausência

de metástases em nódulos linfáticos e outros órgãos distantes (De Vita *et al.*, 1997; Brien *et al.*, 1998).

I. 2 – Fatores etiológicos do câncer gástrico

A etiologia do câncer de estômago é bastante diversificada com a participação de fatores genéticos e ambientais envolvidos em sua tumorigênese. Quanto aos primeiros, há indicações de que 4% dos casos são familiares. Além disso, certos grupos raciais e étnicos, como os negros, os índios americanos e os nativos havaianos nos Estados Unidos e os Maoris na Nova Zelândia, têm maior risco de desenvolver este tipo de neoplasia, o mesmo ocorrendo com os indivíduos do grupo sanguíneo A (Cotran *et al.*, 1999). Dentre os fatores ambientais destacam-se os dietéticos, principalmente o consumo elevado de sal, nitritos, nitratos e alimentos conservados em salmora e defumados; o tabagismo; baixo nível sócio-econômico; gastrectomia anterior e infecção pelo *Helicobacter pylori* (Neugut *et al.*, 1996).

Os fatores dietéticos são considerados como um dos principais no risco de câncer gástrico, pois o estômago ocupa um lugar crítico no trato digestório, já que os produtos ingeridos permanecem por um tempo significativo sob forma relativamente bruta. Desse modo, os carcinógenos e procarcinógenos ingeridos podem ter um papel importante na carcinogênese gástrica, pois o alimento pode conter um composto carcinogênico ou ser transformado durante o seu preparo, preservação, ou mesmo no estômago após a ingestão (Houben & Stockbrügger, 1995; INCA, 2002).

Alguns alimentos contém quantidades significativas de agentes carcinogênicos. Os nitritos usados para conservar alguns alimentos como picles, salsichas e alguns enlatados se transformam em nitrosaminas no estômago, com ação carcinogênica potente, pois atuam na inibição da vitamina C e de outros antioxidantes que protegem o DNA.



Além disso são capazes de provocar desaminação de purinas e pirimidinas do DNA, do mesmo modo que o óxido nítrico, responsável por mutações de ponto no gene supressor de tumor *TP53* (Poremba *et al.*, 1995, Hecht, 1997; INCA, 2002). Já os produtos defumados e churrascos são impregnados pelo alcatrão, encontrado também na fumaça do cigarro, com reconhecida ação carcinogênica (INCA, 2002).

Os alimentos conservados em sal, como carne de sol, charque e peixes salgados também estão relacionados com a carcinogênese gástrica, pois o sal, embora não seja um agente carcinogênico, promove aumento da replicação celular, potencializando a ação de carcinógenos e aumentando o índice de mutações causadas por agentes endógenos e exógenos (Kato *et al.*, 1996; INCA, 2002).

Como fatores protetores, têm sido demonstrado que a ingestão de vegetais verdes e folhosos e frutas cítricas, que contêm antioxidantes como ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E) e betacaroteno, correlaciona-se negativamente com o câncer gástrico (AICR, 1997).

O *Helicobacter pylori*, um bastonete Gram-negativo adaptado ao ambiente da mucosa gástrica, é considerado o principal agente etiológico em mais de 95% das gastrites crônicas, aumentando o risco de câncer gástrico em até nove vezes (Cotran *et al.*, 1999; Kuipers, 1999).

Aproximadamente 50% da população mundial está infectada pelo *H. pylori*, afetando na mesma proporção homens e mulheres. A infecção é mais prevalente em populações asiáticas do que em ocidentais, particularmente no Japão e na Coreia, onde o câncer gástrico é a neoplasia de ocorrência mais freqüente (Parsonnet, 1995; Minamoto *et al.*, 1999). A transmissão geralmente ocorre pelo contato pessoal e vários fatores como o baixo nível sócio econômico, a densidade populacional, as más condições de higiene, como ausência de água tratada. A predisposição genética, também parece ser um fator

determinante na infecção por este bacilo, havendo relato de concordância entre gêmeos monozigóticos de 66% (Mitchell *et al.*, 1992; Forman *et al.*, 1993; Malaty & Graham, 1994; Baker & Hegarty, 2001).

Todas as cepas de *H. pylori* causam algum tipo de inflamação persistente, quando residem no estômago de mamíferos e a sua presença tem sido relacionada principalmente com o desenvolvimento do adenocarcinoma tipo intestinal, por meio de uma sequência de eventos que começa como gastrite e progride para gastrite crônica, gastrite crônica atrófica, metaplasia intestinal, displasia e finalmente adenocarcinoma (Tompkins & Falkow, 1995; Pakodi *et al.*, 2000).

As hipóteses de como o *H. pylori* contribui para a etiopatogênese do câncer gástrico são múltiplas. Um dos modelos bioquímicos é via inibição do ácido ascórbico, um antioxidante, que converte o nitrito em óxido nítrico, atuando como um componente importante na prevenção de câncer gástrico por inibir a formação de compostos N-nitrosos reativos (Houben & Stockbrügger, 1995; Kuipers & Appelmek, 1997). Outra hipótese seria devido ao aumento da expressão da enzima óxido nítrico sintetase e portanto, à produção contínua de óxido nítrico por macrófagos e leucócitos polimorfonucleados, os quais estariam infiltrados na mucosa gástrica como parte da resposta à infecção. Dessa forma, tal infecção seria acompanhada pela formação de intermediários de nitrogênio reativos endógenos, que contribuem para o aumento dos índices de danos ao DNA (Mannick *et al.*, 1996; Kuipers & Appelmek, 1997). Além disso, o *H. pylori* também produz urease, uma enzima responsável pela hidrólise da uréia em amônia, cujo aumento de sua produção contribui para a atrofia da mucosa gástrica. A infecção também provoca aumento da proliferação celular, a ocorrência de apoptose nas células epiteliais gástricas e a produção de radicais livres com ação mutagênica (Pakodi *et al.*, 2000).

A patogenicidade dessa bactéria também é um outro fator importante que deve ser considerado. O gene *vacA*, presente em cerca de



50% das cepas, é responsável pela codificação de uma citotoxina vacuolizante de 140 KDa, que produz vacúolos em células gástricas cultivadas, semelhantes às lesões histológicas observadas em material de biópsia, causando portanto, destruição da integridade do epitélio gástrico e ulceração da parede do estômago. Este gene apresenta uma ampla diversidade alélica. A região *s*, codificadora do peptídeo sinal, está localizada na extremidade 5' do gene e apresenta dois alelos *s1* e *s2*. O alelo *s1* apresenta vários subtipos *s1a*, *s1b* e *s1c*, sendo *s1a* considerado o mais patogênico. A região *m* do gene também apresenta dois alelos *m1* e *m2*. A combinação dos alelos das regiões *s* e *m* determina a produção de uma citotoxina e está associada com a patogenicidade da bactéria. Dessa forma, cepas *vacA s1/m1* produzem grandes quantidades da toxina, enquanto que cepas *s1/m2* produzem quantidades moderadas e cepas *s2/m2* produzem pouca ou nenhuma toxina (Atherton *et al.*, 1995; van Doorn *et al.*, 1998).

Outro gene relacionado à patogenicidade, *cagA* (*cytotoxin-associated gene*), é responsável pela codificação de uma proteína com peso molecular de 120-128 KDa, que está presente em cerca de 60% das cepas de *H. pylori*. Este gene faz parte da chamada ilha de patogenicidade *cag*, cujos genes expressam proteínas do sistema de secreção tipo IV, capazes de transferir produtos bacterianos, incluindo a proteína *cagA*, para dentro das células do hospedeiro. Anticorpos para a proteína *cagA* têm sido associados com grau elevado de infiltração de leucócitos na mucosa gástrica e degeneração do epitélio celular. Dessa forma, a proteína *cagA* está relacionada ao processo inflamatório persistente da mucosa gástrica (Censini *et al.*, 1996; van Doorn *et al.*, 1998).

Mais recentemente foi descoberto o gene *ice A* (*induced by contact with epithelium*), com suas principais variantes alélicas *iceA1* e *iceA2*. A função do alelo *iceA1* ainda não está clara, mas sabe-se que existe uma significativa homologia com endonuclease de restrição do tipo

II. A expressão de *iceA1* é regulada pelo contato entre a *H. pylori* e as células epiteliais do hospedeiro. Esse subtipo tem sido associado com o desenvolvimento de úlcera péptica (Peek *et al.*, 1998; van Doorn *et al.*, 1998; Arents *et al.*, 2001).

1.3 – Marcadores de suscetibilidade e câncer gástrico

O desenvolvimento de uma neoplasia, com raras exceções, depende da complexa interação entre fatores genéticos e ambientais. Assim, Knudson (1985) propôs a teoria dos oncodemes, que permite classificar os indivíduos e as populações em quatro grupos quanto à participação dos fatores ambiental e genético e o risco de desenvolverem neoplasias. Esses oncodemes foram classificados como: (1) espontâneo, onde o câncer ocorreria por mutações casuais na população normal; (2) ambiental, pela ação exclusiva de carcinógenos ambientais, como produtos químicos, radiação e vírus, sobre o genoma da população normal; (3) ambiental/genético, quando há suscetibilidade genética a agentes ambientais; e (4) genético, quando há uma predisposição genética ao desenvolvimento do câncer.

Os indivíduos pertencentes ao quarto oncodeme são geneticamente predispostos a desenvolver um tipo particular de câncer em algum estágio de suas vidas, independente do ambiente. No entanto, a contribuição exclusivamente genética é responsável por apenas 5% de todos os tumores. Por outro lado, no terceiro oncodeme existe um grupo muito maior de pessoas, que comparativamente, têm menores chances para o desenvolvimento de neoplasias, mas seus riscos ainda são mais elevados do que os da população geral, pois respondem drasticamente à exposição ambiental e são denominados de suscetíveis (Perera, 1997; Sinha & Caporaso, 1999).

As pesquisas no campo da epidemiologia molecular têm fornecido evidências contundentes da contribuição efetiva do ambiente no



desenvolvimento do câncer e sobre as situações de risco fortemente influenciadas pela suscetibilidade genética. Os estudos nesta área aliam a metodologia molecular, principalmente a técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase), os modelos laboratoriais *in vitro* e *in vivo* e a bioquímica, aos dados da epidemiologia clássica, possibilitando não apenas o levantamento rápido dos riscos populacionais, mas também individuais no desenvolvimento de neoplasias. Para tanto, utiliza-se de biomarcadores, que podem ser definidos como métodos, estruturas ou processos que encontram-se na via causal, ou intimamente a ela ligados, entre o momento da exposição e o aparecimento do câncer, em qualquer etapa do processo carcinogênico (Shi *et al.*, 1996; Schork *et al.*, 1998; Bartsch *et al.*, 2000).

O Conselho Norte-Americano de Pesquisa, em 1987, definiu três tipos de marcadores disponíveis para os estudos em sistemas biológicos: marcadores de exposição, que fornecem informações sobre a quantidade de xenobióticos a que os indivíduos estão expostos; marcadores de efeito, que indicam a presença da doença ou sinais pré-clínicos da mesma e os marcadores de suscetibilidade, que indicam indivíduos ou populações com diferenças biológicas capazes de afetar a resposta do organismo aos agentes ambientais (Eubanks, 1994).

O princípio básico dos marcadores de suscetibilidade consiste na diferença interindividual que confere graus de suscetibilidade às doenças induzidas pelo ambiente. Entre os mais significativos encontram-se as diferenças genéticas na capacidade das células repararem danos no DNA, causadas por agentes ambientais e na capacidade de metabolização de xenobióticos. Muitos deles não são capazes de provocar por si mesmos seus efeitos prejudiciais, sendo alterados por enzimas cujas modificações podem aumentar ou diminuir os seus efeitos genotóxicos (Eubanks, 1994).

Já que a maioria dos agentes mutagênicos e carcinogênicos químicos requer ativação metabólica antes de se ligar ao DNA, variações



no fenótipo metabolizador oriundas das enzimas que atuam nos processos de ativação e destoxificação de compostos químicos e drogas, desempenham um papel crucial no desenvolvimento de neoplasias, a partir de fatores ambientais. Portanto, distúrbios no equilíbrio entre os processos de ativação e destoxificação podem explicar as variações individuais nas respostas à exposição a tais compostos. Essa variação fenotípica foi associada a polimorfismos genéticos, que podem ser definidos como traços mendelianos que existem numa população em no mínimo dois fenótipos, nenhum dos quais ocorre em frequência menor que 1%. Vários estudos para a avaliação de variações interindividuais na capacidade de metabolização de xenobióticos, já identificaram mais de cem diferentes polimorfismos. A maioria deles são de relevância clínica e envolvem enzimas responsáveis pela metabolização de drogas. A quantidade final efetiva de carcinógenos produzida depende da ação competitiva entre os mecanismos de ativação e destoxificação, envolvendo as enzimas que fazem parte dessas vias bioquímicas da célula (Idle, 1991; Nerbert, 1991; Murray *et al.*, 1994; Raunio *et al.*, 1995).

A variação interindividual na resposta aos agentes xenobióticos, aos quais os indivíduos podem ter sido expostos pela dieta, terapêutica e/ou ocupacionalmente e os seus efeitos carcinogênicos potenciais são mediados pela suscetibilidade herdada. Alguns indivíduos ou grupos populacionais podem apresentar risco significativamente maior de desenvolver câncer induzido quimicamente do que a média populacional, devido as diferenças expressivas nos processos de ativação e destoxificação dos xenobióticos (Ponder, 1990; Wormhoudt *et al.*, 1999).

A maquinaria de metabolização xenobiótica possui dois grupos principais de enzimas: as de metabolismo oxidativo presentes na Fase I e as enzimas de conjugação presentes na Fase II. Muitos compostos são convertidos a metabólitos altamente reativos pelas enzimas oxidativas da Fase I, que são principalmente enzimas da superfamília do citocromo P-450 (CYPs). Por outro lado, as reações da

Fase II envolvem a conjugação com um substrato endógeno (glutathiona, sulfato, glicose, acetato) por meio das glutathionas-S-transferases (GSTs), UDP-glucoroniltransferases e N-acetiltransferases (NATs), que agem como enzimas inativadoras dos produtos da Fase I, tornando os metabólitos mais hidrofílicos e passíveis de excreção (Nerbert *et al.*, 1996).

A superfamília de genes do citocromo P450 representa uma das principais classes de biotransformação da Fase I e compreende mais de duas dúzias de famílias, divididas de acordo com sua relação evolutiva, que é determinada pelo grau de homologia dos genes individuais e pela seqüência de aminoácidos das proteínas. O genoma humano contém mais de 50 diferentes genes P450, subdivididos em 10 diferentes famílias (Wormhoudt *et al.*, 1999; Autrup, 2000). O conjunto de enzimas codificadas por estes genes participa tanto da biossíntese como da degradação de hormônios esteróides, vitaminas, ácidos graxos, prostaglandinas, aminas, ferormônios e metabólitos vegetais (Nerbert, 1991). Metabolizam ainda inúmeras drogas, mutágenos e carcinógenos químicos, entre outros poluentes ambientais. Com o NADPH-P450 redutase como cofator, tais monoxigenases funcionam como uma oxidase terminal em uma cadeia transportadora de elétrons, transferindo um átomo de oxigênio a seus respectivos substratos, tornando-os eletrofílicos. O fígado é o principal órgão de expressão das enzimas CYPs, contudo existe expressão não hepática, em menor grau, por todo o organismo (Rogers, 1994; Autrup, 2000).

Membros das famílias CYP1, CYP2 e CYP3 apresentam um papel principal no metabolismo de xenobióticos e grande parte destas enzimas são polimorficamente expressas, resultando em distinta atividade metabólica. Variações nas suas atividades podem influenciar os efeitos tóxicos adversos provenientes de seus respectivos substratos (Autrup, 2000).

Devido à importância do seu papel na ativação metabólica de inúmeros procarcinógenos, pesquisas extensivas têm sido realizadas para verificar a relação entre a distribuição de variantes polimórficas das diferentes enzimas do citocromo P450 e a suscetibilidade ao câncer, tendo sido principalmente avaliados os genes *CYP1A1*, *CYP2D6* e *CYP2E1*.

O gene *CYP2E1*, localizado em 10q24.3-qter, tem sua transcrição induzida pelo etanol e o seu produto (desmetilase de dimetilnitrosamina) está envolvido na ativação metabólica do próprio etanol, bem como de drogas medicamentosas, como paracetamol e isoniazida e drogas não-medicamentosas como cocaína e de carcinógenos ambientais de baixo peso molecular como o cloreto de vinila, tetracloreto de carbono, solventes organoclorados e não clorados como o benzeno, nitrosaminas (N-nitrosodimetilamina e N-nitrosopirrolidina), sendo estas últimas consideradas importantes fatores para a carcinogênese gástrica e cuja exposição pode ocorrer pela dieta, do uso de tabaco e da ocupação profissional (Pavanello & Clonfero, 2000; Liu *et al.*, 2001).

Em relação a expressão do gene *CYP2E1*, tem sido observada grande variação interindividual e vários polimorfismos genéticos que podem explicar algumas dessas variações têm sido identificados por RFLPs (*Restriction Fragment Length Polimorphisms*) usando as enzimas de restrição *DraI*, *PstI*, *RsaI* e *TaqI*. Tais polimorfismos têm se mostrado associados com diferentes tipos de neoplasias (Raunio *et al.*, 1995).

O gene *CYP2E1* apresenta dois polimorfismos na sua região 5' flanqueadora, um deles resultante de uma transição $^{-1019}\text{C}\rightarrow\text{T}$, que insere um sítio para a enzima *PstI* e outro devido uma transversão $^{-1259}\text{G}\rightarrow\text{C}$, que remove um sítio para *RsaI*. Essas mutações encontram-se em completo desequilíbrio de ligação e promovem o mesmo efeito sobre a transcrição, ou seja, aumentam a atividade transcrricional do gene



CYP2E1 (Watanabe *et al.*, 1990). Baseados na presença ou ausência das seqüências de reconhecimento das enzimas *PstI* e *RsaI* nestes sítios polimórficos, dois alelos foram identificados, o tipo selvagem (*RsaI*[+]/*PstI*[-]), referido como *c1* e o alelo variante (*RsaI*[-]/*PstI*[+]), conhecido como *c2*. A prevalência do alelo *c2* tem sido relatada em cerca de 2-8% em populações caucasianas americanas e afro-americanas, no entanto, em populações asiáticas a freqüência deste alelo tem se mostrado mais elevada, variando de 17 a 26% (Persson *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2001). O alelo *c2* tem sido associado com risco aumentado para algumas neoplasias como câncer de pulmão, nasofaringe e oral (Persson *et al.*, 1993; Hildesheim *et al.*, 1995; Hung *et al.*, 1997; Le Marchand *et al.*, 1998). Por outro lado, o alelo selvagem, *c1*, também já foi associado com maior risco de desenvolvimento de câncer de esôfago (Li *et al.*, 1998). Em relação ao câncer gástrico, alguns estudos não encontraram correlação entre estes alelos e o desenvolvimento desta neoplasia (Kato *et al.*, 1995; Kato *et al.*, 1996; Kato *et al.*, 1997; Tsukino *et al.*, 2002). No entanto, outros já associaram o alelo variante *c2*, tanto com redução como aumento de risco ao câncer de estômago (Nishimoto *et al.*, 2000; Cai *et al.*, 2001; Gao *et al.*, 2002).

Um outro RFLP gerado pela perda de um sítio *DraI* no intron 6 de *CYP2E1* (⁻⁷⁷⁶⁶A→T), permite a identificação dos alelos *CYP2E1**D (selvagem) e *CYP2E1**C (raro). Análises específicas em portadores do alelo *CYP2E1**C não identificaram qualquer alteração estrutural ou funcional na enzima correspondente, mas há indícios de alteração na expressão gênica (Uematsu *et al.*, 1994). Vários estudos têm revelado diferenças étnicas na distribuição dos alelos polimórficos de *CYP2E1* identificados pela enzima *DraI*, sendo o alelo raro, *CYP2E1**C, mais freqüente em populações asiáticas. Assim, estudos epidemiológicos já associaram o alelo *CYP2E1**C com maior suscetibilidade ao câncer de pulmão em japoneses (Uematsu *et al.*, 1991; Uematsu *et al.*, 1994). No entanto, o mesmo não foi observado para populações finlandesas e

suecas, onde a frequência deste alelo variante é menor (Hirvonen *et al.*, 1993; Persson *et al.*, 1993).

Dentre as enzimas de Fase II envolvidas nos processos de destoxificação, destacam-se as N-acetiltransferases (NATs) e as glutationas-S-transferases (GSTs).

As glutationas-S-transferases catalizam a conjugação da glutationa com uma variedade de compostos eletrofílicos e hidrofóbicos, incluindo carcinógenos e drogas citosólicas, ou seja, atuam nos intermediários oxigenados produzidos na Fase I, gerando produtos extremamente hidrofílicos, que são facilmente excretados da célula (Wormhoudt *et al.*, 1999).

A superfamília gênica glutationa-S-transferase consiste de cinco subfamílias agrupadas de acordo com seu ponto isoelétrico em: α , μ , π , σ e θ (Pavanello & Clonfero, 2000).

A classe μ inclui cinco genes, que estão situados em tandem (5'-*GSTM4-GSTM2-GSTM1-GSTM5-GSTM3*-3'), em um *cluster* de 20 Kb, localizado em 1p13.3. O gene *GSTM1* é polimórfico na população, com três alelos variantes: *GSTM1*A*, *GSTM1*B* e *GSTM1*0*. Enquanto que, *GSTM1*A* e *GSTM1*B* diferem apenas por uma base no exon 7 e codificam monômeros que formam enzimas homo e heterodiméricas, com a mesma eficiência metabólica, *GSTM1*0*, quando deletado em homozigose não expressa proteína, sendo denominado genótipo *GSTM1* nulo. A prevalência do genótipo *GSTM1* nulo têm variado entre 35 a 60% nas diferentes populações investigadas (Strange *et al.*, 2001).

Indivíduos com genótipo *GSTM1* nulo mostram uma habilidade reduzida para destoxificar uma variedade de carcinógenos ambientais como compostos N-nitrosos, aflatoxina B1 e os metabólitos reativos do benzopireno e dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, que podem ser encontrados na fumaça do cigarro (Autrup, 2000; Pavanello & Clonfero, 2000).



Há evidências de que a urina de fumantes positivos para *GSTM1* apresenta menor potencial mutagênico quando comparada com a de indivíduos fumantes *GSTM1* nulo. Indivíduos portadores de *GSTM1* também têm apresentado menores níveis de adutos de DNA e de proteínas e menor proporção de mutações do tipo transversão, quando comparados a indivíduos que apresentam a deleção do gene. Além disso, a enzima *GSTM1* tem mostrado prevenir quebras cromossômicas em células incubadas com carcinógenos. O genótipo *GSTM1* nulo também já foi associado com instabilidade do gene supressor de tumor *TP53* (Brockmøller *et al.*, 1998; Conde *et al.*, 1999). Portanto, estudos epidemiológicos sugerem que indivíduos homozigotos nulos têm um risco aumentado para vários tipos de neoplasias como câncer de pulmão, bexiga, cólon, mama e tumores cutâneos (McWilliams *et al.*, 1995; Brockmøller *et al.*, 1998; Strange *et al.*, 1998).

Em relação ao câncer gástrico, alguns trabalhos têm encontrado associação do genótipo *GSTM1* nulo com o seu desenvolvimento (Harada *et al.*, 1992; Kato *et al.*, 1996; Ng *et al.*, 1998; Cai *et al.*, 2001; Saadat & Saadat, 2001), enquanto outros não observaram o mesmo (Deakin *et al.*, 1996; Kato *et al.*, 1996; Kato *et al.*, 1997; Martins *et al.*, 1998; Setiawan *et al.*, 2000; Lan *et al.*, 2001).

A classe θ , inclui dois genes *GSTT1* e *GSTT2*, localizados em 22q11.2 e separados por aproximadamente 50 Kb. Eles apresentam estrutura similar, sendo compostos por cinco exons com ligações intron/exon idênticas. O gene *GSTT1* também tem se mostrado polimórfico, apresentando um alelo selvagem *GSTT1*1* e um alelo nulo *GSTT1*0* (Landi, 2000; Strange *et al.*, 2001). A frequência de homozigotidade para *GSTT1*0*, varia em diferentes populações, tendo sido descrita em 16% para populações inglesas e em 38% para populações nigerianas. Indivíduos *GSTT1* nulo também mostram capacidade reduzida para destoxificar alguns carcinógenos ambientais como óxido de etileno, 1-3 butadieno, dialoalcanos, diclometano,

monoalometanos e vários outros compostos halogenados (Scarpato *et al.*, 1997; Landi, 2000; Pavanello & Clonfero, 2000).

A deficiência da enzima GSTT1, em consequência da deleção homozigota do gene *GSTT1* foi associada com aumento do risco de malignidades linfomatopoiéticas, de câncer de células basais e colorretal (Chen *et al.*, 1996a; Deakin *et al.*, 1998; Landi, 2000), como também com o desenvolvimento de câncer gástrico (Setiawan *et al.*, 2000; Lan *et al.*, 2001). Contudo outros autores não observaram tal relação (Deakin *et al.*, 1996; Katoh *et al.*, 1996; Saadat & Saadat, 2001).

As investigações de suscetibilidade individual ou de populações pela determinação das freqüências de diversos genes polimórficos podem auxiliar na caracterização de diferentes grupos quanto a capacidade de metabolização de compostos químicos, sendo possível identificar fatores de risco para muitas patologias e também auxiliar na compreensão dos mecanismos pelos quais se desenvolvem. Essa metodologia ainda poderá auxiliar o indivíduo a optar por um estilo de vida ou tipo e local de trabalho mais saudáveis e apropriados e deverá também contribuir com a clínica médica na prescrição de drogas. Assim constituem-se objetivos preeminentes à compreensão do modo pelo qual os genes que alteram a suscetibilidade podem modificar a fisiologia e a bioquímica das vias de sinalização celular e a otimização dessas informações na prática clínica, visando o desenvolvimento de recursos terapêuticos e preventivos.

Como o desenvolvimento do câncer gástrico está relacionado tanto com a ocorrência de lesões gástricas como a gastrite crônica e a atrofia gástrica, principalmente *H. pylori* positivas e a fatores ambientais, especialmente os dietéticos, variações interindividuais nos mecanismos de ativação e destoxificação de xenobióticos podem contribuir para o surgimento dessa patologia.

Até o momento, ainda são escassos e não conclusivos os estudos desenvolvidos na tentativa de correlacionar os polimorfismos dos



genes *GSTM1*, *GSTT1* e *CYP2E1* com o desenvolvimento de câncer gástrico.

Diante disso, torna-se interessante investigações que visem estabelecer uma melhor correlação entre esses parâmetros, principalmente na população brasileira, que tem por característica alta taxa de miscigenação racial, podendo apresentar frequências de polimorfismos genéticos distintas das demais populações caucasianas americanas ou européias. Os resultados advindos poderão ser relevantes no estabelecimento da relação entre os polimorfismos dos genes, ora propostos, com o maior risco de câncer gástrico.

I. 4- Objetivos

O presente trabalho teve por objetivos:

- a) investigar as frequências dos polimorfismos dos genes *GSTM1*, *GSTT1* e *CYP2E1* em indivíduos portadores de câncer gástrico;
- b) investigar esses mesmos parâmetros em indivíduos com gastrite crônica, que constitui uma lesão benigna que aumenta o risco de câncer gástrico;
- c) comparar os resultados obtidos com os encontrados em indivíduos saudáveis tentando, dessa forma, correlacionar esses polimorfismos genéticos com a suscetibilidade ao desenvolvimento de neoplasias gástricas; e
- d) investigar a associação dos polimorfismos observados com fatores ambientais, que possam estar envolvidas na etiologia do câncer gástrico.



II – Material e Métodos

II. 1 - Considerações éticas

O projeto referente ao presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do IBILCE-UNESP e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), parecer nº 174/2000.

Fizeram parte do estudo indivíduos adultos, de ambos os sexos e diferentes etnias que concordaram em participar após os devidos esclarecimentos e obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, efetuada pela pesquisadora responsável. De todos os indivíduos buscou-se informações como dados de identificação, história familiar de câncer ou lesões gástricas, tabagismo, etilismo e ocupação profissional, dentre outros, no entanto não foi possível a obtenção de todas essas informações em alguns indivíduos (Apêndice I). Todas as amostras foram referidas por código resguardando a identificação dos indivíduos.

II. 2 – Casuística

As amostras foram constituídas por 100 indivíduos com câncer gástrico (TUG), sendo 73 homens e 27 mulheres com idade entre 28 e 93 anos ($\bar{X} = 60,26$; $s = 12,88$); 100 indivíduos com gastrite crônica (GC), sendo 54 homens e 46 mulheres, cuja idade variou de 19 a 86 anos ($\bar{X} = 53,33$; $s = 16,59$) e 150 indivíduos saudáveis sem qualquer queixa clínica no sistema digestório ou história de algum tipo de câncer, que foram utilizados como controles (C), dos quais 90 eram homens e 60 mulheres com idade entre 20 e 93 anos ($\bar{X} = 54,31$; $s = 17,99$).

Os pacientes com gastrite crônica e câncer gástrico foram provenientes do Hospital de Base da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto-SP e do Hospital do Câncer de Barretos-SP.



A coleta de sangue dos pacientes com gastrite crônica foi realizada logo após o exame endoscópico, enquanto que nos pacientes com câncer gástrico, a coleta foi realizada durante a internação para cirurgia ou no Serviço de Oncologia, naqueles pacientes submetidos a quimioterapia. Em todos os casos foi obtido o diagnóstico histopatológico das lesões, realizado pelos Serviços de Patologia dos referidos hospitais. O diagnóstico de gastrite crônica foi realizado conforme a classificação de Sidney (1990) *q* *pud* Price (1991), considerando-se principalmente o infiltrado de linfócitos. Foram selecionados apenas aqueles indivíduos com gastrite crônica moderada ou acentuada, excluindo-se aqueles com gastrite superficial. Os casos de câncer gástrico foram diagnosticados como adenocarcinoma tipo intestinal e tipo difuso, segundo a classificação de Lauren (1965), já descrita na introdução. O diagnóstico histológico da presença da bactéria *H. pylori* foi realizado por meio da coloração com Giemsa.

Dos 150 indivíduos da amostra controle, 57 eram doadores de sangue dos Hemocentros de São José do Rio Preto-SP e Campinas-SP, 40 eram estudantes ou funcionários principalmente do IBILCE-UNESP de São José do Rio Preto-SP, e os 53 idosos eram provenientes do Asilo Geriátrico Engenheiro Schmidt, São José do Rio Preto-SP. Esses indivíduos foram pareados por sexo, idade e etnia com os pacientes das amostras de câncer gástrico e gastrite crônica. Os indivíduos da amostra controle não tinham diagnóstico histológico de infecção pelo *H. pylori*, pois trata-se de um exame invasivo, por meio de biópsia após endoscopia, tornando inviável a realização de tal exame nos indivíduos da amostra controle.

Quanto à etnia, os indivíduos foram classificados como caucasóides ou negróides, considerando-se principalmente a cor da pele, características faciais e textura do cabelo. Dentre os indivíduos avaliados, nenhum era de origem asiática.



As atividades ocupacionais apresentadas pelos indivíduos participantes da pesquisa foram agrupadas de acordo com a classificação apontada em: "Critérios de Avaliação para Classificação Sócio-Econômica - Elementos de Atualização" (Graciano *et al.*, 1995). Dessa forma, foram observadas sete classes de ocupação profissional: (1) Empresários, que corresponde a pecuarista; (2) Profissionais Liberais Autônomos e Ocupações de Nível Superior, que compreende médico, biólogo, psicólogo, dentista, farmacêutico, enfermeiro e advogado; (3) Trabalhadores Assalariados Administrativos, Técnicos e Científicos, que compreende auxiliar odontológico, técnico em radiologia, fiscal de caixa, auxiliar de enfermagem, auxiliar de tráfego, radialista, técnico de laboratório e professor; (4) Trabalhadores Assalariados, que refere-se a operador de máquina, ajudante geral, metalúrgico, prensista, auxiliar técnico, bancário, escriturário, secretário, telegrafista, industriário, ferroviário, inspetor, balconista, caixa e funcionário público; (5) Trabalhadores por Conta Própria, que engloba motorista, pedreiro, corretor, viajante, vendedor, representante comercial, mecânico, pintor, maquiadora, comerciante, encanador, funileiro, manicure, costureira, eletricista, chapa, açougueiro, sorveteiro e borracheiro; (6) Empregados Domésticos, que abrange auxiliar geral, do lar (dona de casa), guarda, vigia, guarda noturno, segurança, doméstica, merendeira, jardineiro, cozinheiro e porteiro; e (7) Trabalhadores Rurais Assalariados Volantes e Assemelhados, que engloba lavrador, servente, empregado em olaria e tratorista.

II. 3 – Técnicas moleculares

II. 3.1 – Extração de DNA de leucócitos

De cada indivíduo coletou-se cerca de 8 mL de sangue venoso periférico em tubo *vacutainer* contendo anticoagulante (EDTA). O



DNA genômico foi obtido segundo a técnica de extração *salting-out* descrita por Abdel-Rahman *et al.* (1993).

O sangue foi transferido para tubo de polipropileno com 6 mL de Ficolpaque e centrifugado a 1200 rpm por 30 minutos. A película de leucócitos formada entre as camadas de Ficolpaque e de plasma foi transferida para um novo tubo em que foi adicionado 1xPBS, até completar 14 mL e centrifugado a 1200 rpm por 15 minutos. Esse último procedimento foi repetido mais duas vezes e no final adicionou-se 1 mL de 1xPBS, 3 mL de tampão de lise (TrisHCl 10 mM, NaCl 400 mM, Na₂EDTA 2 mM), 200 µL de SDS 10%, 50 µL de proteinase-K (20mg/mL) e 40 µL de RNase-A (20 mg/mL). O material foi então incubado durante a noite em banho-maria a 37°C. Após, adicionou-se 1 mL de NaCl 6M e a solução foi homogeneizada e mantida no gelo por 15 minutos. Novamente, o material foi submetido a centrifugação a 2000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante transferido para outro tubo em que adicionou-se 10 mL de etanol absoluto gelado. O DNA precipitado foi transferido para um tubo tipo *ependorf* contendo 500 µL de etanol 70%, centrifugado a 12000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante descartado. Após secagem do DNA em estufa a 37°C por 10 minutos, adicionou-se 250 µL de água purificada autoclavada, sendo mantido em banho-maria a 37°C por três dias, para completa diluição.

Após esse período foi realizada a leitura da concentração e do grau de pureza do DNA em aparelho espectrofotômetro, sendo consideradas aceitáveis concentrações superiores a 50 µg/mL. O restante do DNA foi armazenado a -20°C para posteriormente ser submetido às técnicas moleculares.

II. 3.2– Determinação dos polimorfismos

a) GST

Os polimorfismos dos genes *GSTM1* e *GSTT1* foram determinados por amplificação gênica empregando-se a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) multiplex, descrita por Abdel-Rahman *et al.* (1996), com modificações. Além dos oligonucleotídeos (*primers*) dos genes *GSTM1* (Bell *et al.*, 1993) e *GSTT1* (Pemble *et al.*, 1994), abaixo discriminados, utilizou-se um segmento do gene *CYP1A1* (Abdel-Rahman *et al.*, 1996) como controle interno da amplificação.

GSTM1: 5'-GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC-3' e
5'-GTTGGGCTCAAATATACGGTGG-3'

GSTT1: 5'-TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC-3' e
5'-TCACCGGATCATGGCCAGCA-3'

CYP1A1: 5'-GAACTGCCACTTCAGCTGTCT-3' e
5'-CAGCTGCATTTGGAAGTGCTC-3'

No procedimento da reação de 25 μ L foram utilizados 150ng de DNA genômico, 12,5 pmol de cada um dos *primers* para os referidos genes, diluídos em 7,25 μ L de água purificada autoclavada, 2,5 μ L de tampão 10x (Tris-HCl KCl 10mM, pH 8.3), 0,5mM de dNTPs, 2,0 mM de $MgCl_2$ e 1,25 U de *Taq* DNA polimerase, sobre os quais adicionou-se 20 μ L de óleo mineral. O material foi processado em termociclador automático (MJ Research), inicialmente submetido a uma temperatura de 94°C por 4 minutos para pré-denaturação do DNA e, em seguida, por 40 ciclos, com parâmetros de denaturação a 94°C por 2 minutos, anelamento dos *primers* a 59°C por 1 minuto e extensão da cadeia a 72°C por 1

minuto. A extensão final foi realizada a 72°C por 10 minutos e o resfriamento a 4°C por tempo indefinido. Na reações de PCR realizadas sempre foi utilizado um controle negativo, que consistia em um tubo de reação com os reagentes, sem a presença do DNA.

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio (10mg/ml), juntamente com um marcador de tamanho molecular de 100 pb. O padrão de bandas correspondentes aos genes foi visualizado em transiluminador de luz ultravioleta e fotografado com câmera Polaróide. Esses produtos foram observados como fragmentos de 480 pb para o gene *GSTT1*, 215 pb para o gene *GSTM1* e 312 pb para o gene *CYP1A1*. Como a metodologia ora empregada não permite a identificação dos genótipos heterozigotos, a presença da banda correspondente ao gene *GSTT1* ou *GSTM1*, foi representado pelo sinal +, indicando a presença do alelo selvagem em homozigose ou heterozigose, enquanto, para o genótipo nulo foi utilizado o sinal 0.

b) *CYP2E1*

Para a pesquisa do alelo polimórfico *CYP2E1**c2 do gene *CYP2E1*, foi amplificada uma sequência de 410 pb da sua região promotora. Nesse procedimento foram utilizados os seguintes *primers* (Kato *et al.*, 1992):

CYP2E1: 5'- CCAGTCGACTCTACATTGTCA-3'

5'- TTCATTCTGTCTTCTAACTGG-3'

Na reação de 25 µL foram utilizados 200 ng de DNA genômico, 10 pmol de cada um dos *primers* diluídos em 15,05 µL de água purificada autoclavada, 2,5 µL de tampão 10x, 0,28mM de dNTPs, 1,5mM de MgCl₂, 1,5 U de *Taq* DNA polimerase e por último 20 µL de óleo

mineral. A solução de reação foi processada em termociclador automático (MJ Research) submetido inicialmente a uma temperatura de 94°C por 4 minutos para pré-denaturação do DNA, seguida por 35 ciclos com parâmetros de denaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento dos *primers* a 60°C por 30 segundos e extensão da cadeia a 72°C por 1 minuto. A extensão final foi realizada a 72°C por 4 minutos e o resfriamento a 4°C por tempo indefinido. Nas reações de PCR realizadas, também foi utilizado um controle negativo.

Para a determinação do alelo mutante *CYP2E1*c2*, o produto de amplificação foi submetido à restrição enzimática com a enzima *Pst*I. Para tanto, em uma alíquota de 15 µL do produto de PCR foram adicionados 0,75 µL de água purificada autoclavada, 1,25 µL de tampão React 2 10x (50mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl) e 2,5 U da enzima *Pst*I e a solução foi mantida em banho-maria a 37°C *overnight*. O alelo selvagem *CYP2E1*c1* é visualizado como um fragmento de 410 pb, enquanto que a presença do sítio de restrição no alelo mutante *CYP2E1*c2* produz dois fragmentos: 290 e 120 pb. No entanto, com a metodologia ora empregada a banda de 120 pb dificilmente era observada. A eletroforese foi realizada em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio (10 mg/ml) e as bandas visualizadas com a utilização de um transiluminador de luz ultravioleta e o gel fotografado com câmera Polaróide.

I.4 – Análise estatística

Nas variáveis quantitativas como idade, tempo de tabagismo, número de cigarros consumidos por dia, tempo de etilismo e de exposição a agrotóxico, foi realizada a estatística descritiva e para a determinação de similaridades entre as diferentes amostras segundo essas variáveis foi aplicado o teste t-Student, quando comparou-se duas amostras independentes e a análise de variância (ANOVA) por meio do teste F para comparação de três amostras independentes. Foram feitas



tabelas cruzadas envolvendo os grupos amostrais, as variáveis qualitativas como sexo, etnia, tabagismo, etilismo, exposição a agrotóxico, infecção pelo *H. pylori* e tipo histológico de adenocarcinoma, e os polimorfismos dos genes *GSTT1*, *GSTM1* e *CYP2E1* estudados. Para comparar as frequências genótípicas obtidas nas amostras avaliadas utilizou-se o teste de Qui-quadrado (χ^2) e ainda o teste exato de Fisher, quando o tamanho amostral ou a frequência do evento prejudicaria a aplicação do teste de Qui-quadrado. Calculou-se também o *odds ratio* (OR) com intervalo de confiança (IC) de 95% para as três amostras avaliadas, segundo as combinações dos polimorfismos genéticos com as variáveis qualitativas. Nas comparações entre grupos em que ocorreram frequências igual a zero, não foi possível calcular o *odds ratio*. O nível crítico de rejeição foi fixado em 5% em todos os testes. Para a realização da análise estatística foram utilizados os programas Statdisk Software by Password, Inc.; Statistica e Minitab Release 10.1. O *odds ratio* (OR), juntamente com o intervalo de confiança (IC) de 95% foi calculado utilizando-se o site:

http://www.watson.hgen.pitt.edu/~dweeks/odds_ratio.html.



III – Resultados

III.1- Avaliação de alguns fatores relacionados à carcinogênese gástrica

Os dados relativos as informações obtidas de cada indivíduo, nas amostras de pacientes com tumor gástrico (TUG), gastrite crônica (GC) e controles (C), quanto a identificação pessoal, estilo de vida, e história ocupacional e de saúde, foram agrupados e estão apresentados na Tabela 1 e os resultados relativos à estatística descritiva das três amostras, quanto as variáveis idade, tabagismo, etilismo e exposição a agrotóxicos, na Tabela 2.

A amostra de pacientes com câncer gástrico foi constituída por 100 indivíduos, dos quais 73 são do sexo masculino e 27 do sexo feminino, com idade variando de 28 a 93 anos ($\bar{X} = 60,26$; $s = 12,88$), sendo a maioria de origem caucasóide (87,0%). Em relação à ocupação profissional dos indivíduos com tumor gástrico, verificou-se que 42,0% tratavam-se de trabalhadores rurais; 26,0% exerciam atividades domésticas; 24,0% eram trabalhadores por conta própria; 5,0% eram trabalhadores assalariados; 2,0% trabalhadores assalariados com função administrativa ou técnica e apenas 1 (1,0%) indivíduo foi classificado como empresário. A grande maioria dos indivíduos eram fumantes ou ex-fumantes (73,0%) e etilistas (65,0%). O período de consumo do cigarro variou de 2 a 67 anos ($\bar{X} = 34,42$; $s = 16,06$), com consumo médio de 17 cigarros/dia e valores mínimo e máximo de 1 e 60 cigarros/dia, respectivamente. O período de consumo de bebida alcoólica também foi elevado, entre 6 a 67 anos ($\bar{X} = 27,63$; $s = 14,32$). Contudo, não investigou-se a quantidade de bebida alcoólica ingerida diariamente. Desses indivíduos, 62% (60/97) relataram exposição a agrotóxicos, devido atividade ocupacional, por um período variável de 1 a 40

Tabela 1. Descrição das amostras de indivíduos com tumor gástrico (TUG), gastrite crônica (GC) e controles (C) segundo sexo, idade, etnia, ocupação profissional, hábitos de tabagismo e etilismo, exposição a agrotóxico, infecção pelo *H. pylori* e tipo histológico de adenocarcinoma.

Variável	Amostra		
	TUG N (%)	GC N (%)	C N (%)
Sexo			
Masculino	73 (73,0%)	54 (54,0%)	90 (60,0%)
Feminino	27 (27,0%)	46 (46,0%)	60 (40,0%)
Total	100 (100,0%)	100 (100,0%)	150 (100,0%)
Faixa etária			
<30	3 (3,0%)	8 (8,0%)	16 (10,7%)
30-49	15 (15,0%)	38 (38,0%)	47 (31,3%)
50-69	58 (58,0%)	34 (34,0%)	49 (32,7%)
70-89	23 (23,0%)	20 (20,0%)	37 (24,7%)
>90	1 (1,0%)	0 (0,0%)	1 (0,6%)
Total	100 (100,0%)	100 (100,0%)	150 (100,0%)
Etnia			
Caucasóide	87 (87,0%)	87 (87,0%)	135 (90,0%)
Negróide	13 (13,0%)	13 (13,0%)	15 (10,0%)
Total	100 (100,0%)	100 (100,0%)	150 (100,0%)
Ocupação profissional			
(1) Empresários	1 (1,0%)	0 (0,0%)	1 (0,8%)
(2) Profissionais Liberais e Ocupações de Nível Superior	0 (0,0%)	2 (2,0%)	19 (15,7%)
(3) Trabalhadores Assalariados Administrativos, Técnicos e Científicos	2 (2,0%)	7 (7,0%)	15 (12,4%)
(4) Trabalhadores Assalariados	5 (5,0%)	3 (3,0%)	12 (9,9%)
(5) Trabalhadores por conta própria	24 (24,0%)	32 (32,0%)	20 (16,5%)
(6) Empregados Domésticos	26 (26,0%)	33 (33,0%)	37 (30,6%)
(7) Trabalhadores Rurais	42 (42,0%)	22 (22,0%)	13 (10,8%)
(8) Estudantes	0 (0,0%)	1 (1,0%)	4 (3,3%)
Total	100 (100,0%)	100 (100,0%)	121 (100,0%)
Tabagismo			
Não fumante	27 (27,0%)	42 (42,0%)	96 (64,9%)
Fumante	73 (73,0%)	58 (58,0%)	52 (35,1%)
Total	100 (100,0%)	100 (100,0%)	148 (100,0%)

Tempo de Tabagismo (anos)			
<10	4 (5,5%)	7 (12,1%)	8 (15,4%)
10-29	20 (27,4%)	19 (32,7%)	14 (26,9%)
30-49	33 (45,2%)	20 (34,5%)	13 (25,0%)
50-69	16 (21,9%)	12 (20,7%)	16 (30,8%)
>70	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (1,9%)
Total	73 (100,0%)	58 (100,0%)	52 (100,0%)
Número de cigarros/por dia			
<10	21 (29,6%)	14 (28,0%)	24 (46,1%)
10-29	41 (57,7%)	26 (52,0%)	22 (42,3%)
30-49	8 (11,3%)	9 (18,0%)	3 (5,8%)
50-69	1 (1,4%)	1 (2,0%)	3 (5,8%)
Total	71 (100,0%)	50 (100,0%)	52 (100,0%)
Etilismo			
Não etilista	35 (35,0%)	52 (52,0%)	128 (86,5%)
Etilista	65 (65,0%)	48 (48,0%)	20 (13,5%)
Total	100 (100,0%)	100 (100,0%)	148 (100,0%)
Tempo de etilismo			
<10	3 (4,6%)	5 (10,4%)	1 (5%)
10-29	35 (53,8%)	22 (45,8%)	8 (40%)
30-49	20 (30,8%)	16 (33,3%)	5 (25%)
50-69	7 (10,8%)	5 (10,4%)	5 (25%)
>70	0 (0%)	0 (0%)	1 (5%)
Total	65 (100,0%)	48 (100,0%)	20 (100,0%)
Exposição a agrotóxico			
Não exposto	37 (38,0%)	53 (63,0%)	36 (90,0%)
Exposto	60 (62,0%)	31 (37,0%)	4 (10,0%)
Total	97 (100,0%)	84 (100,0%)	40 (100,0%)
Tempo de exposição a agrotóxico			
<10	29 (51,8%)	11 (45,8%)	2 (50,0%)
10-29	20 (35,7%)	8 (33,4%)	2 (50,0%)
30-49	7 (12,5%)	2 (8,3%)	0 (0,0%)
>50	0 (0,0%)	3 (12,5%)	0 (0,0%)
Total	56 (100,0%)	24 (100,0%)	4 (100,0%)
Infecção pelo <i>H. pylori</i>			
<i>H. pylori</i> positiva	13 (30,2%)	60 (60,6%)	
<i>H. pylori</i> negativa	30 (69,8%)	39 (39,4%)	
Total	43 (100,0%)	99 (100,0%)	
Tipo histológico do tumor			
Intestinal	45 (51,1%)		
Difuso	43 (48,9%)		
Total	88 (100,0%)		

Tabela 2. Estatística descritiva das amostras de indivíduos com tumor gástrico (TUG), gastrite crônica (GC) e controles (C), segundo as variáveis idade, tempo de tabagismo, consumo diário de cigarros, tempo de etilismo e de exposição à agrotóxico, e resultado da análise de variância (ANOVA) e teste t-Student.

Variável	Estatística	Amostra		
		TUG	GC	C
Idade	N	100,00	100,00	150,00
	Média	60,26	53,33	54,31
	Mediana	62,00	52,00	52,00
	Desvio padrão	12,88	16,59	17,99
	Mínimo	28,00	19,00	20,00
	Máximo	93,00	86,00	93,00
Estatística/Probabilidade		$F_{(2,347)} = 5,33; p = 0,005$		
Tempo de tabagismo (anos)	N	73,00	58,00	52,00
	Média	34,42	30,55	33,63
	Mediana	32,00	30,00	32,5
	Desvio padrão	16,06	17,39	21,37
	Mínimo	2,00	3,00	2,00
	Máximo	67,00	68,00	73,00
Estatística/Probabilidade		$F_{(2,180)} = 0,78; p = 0,457$		
Consumo diário de cigarros (un/dia)	N	71,00	50,00	52,00
	Média	16,70	18,14	13,90
	Mediana	20,00	20,00	10,00
	Desvio padrão	11,92	13,28	13,46
	Mínimo	1,00	1,00	1,00
	Máximo	60,00	60,00	60,00
Estatística/Probabilidade		$F_{(2,170)} = 1,46; p = 0,234$		
Tempo de etilismo (anos)	N	65,00	48,00	20,00
	Média	27,63	26,06	31,95
	Mediana	23,00	20,50	30,00
	Desvio padrão	14,32	15,19	18,69
	Mínimo	6,00	2,00	8,00
	Máximo	67,00	65,00	73,00
Estatística/Probabilidade		$F_{(2,130)} = 1,04; p = 0,356$		
Tempo de exposição a agrotóxico	N	56,00	24,00	
	Média	12,32	17,12	
	Mediana	8,00	10,00	
	Desvio padrão	11,51	16,87	
	Mínimo	1,00	1,00	
	Máximo	40,00	60,00	
Estatística/Probabilidade		$t = -1,27; p = 0,215$		

anos ($\bar{X} = 12,32$; $s = 11,51$), mas em três deles não foi possível a obtenção desse dado. Procurou-se obter informações a respeito do tipo histológico dos tumores e da infecção pelo *H. pylori*, por meio dos Serviços de Patologia do Hospital de Base da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto e do Hospital do Câncer de Barretos. Todavia, não havia menção a esses dados nos prontuários de muitos pacientes, ou seja, em 12 faltavam a classificação histológica do tumor e em 57 o diagnóstico histológico de infecção pelo *H. pylori*. Nos casos em que tais informações estavam disponíveis, verificou-se que 51,1% (45/88) tratavam-se de adenocarcinomas do tipo intestinal e 48,9% (43/88) do tipo difuso, sendo que 30,2% (13/43) dos tumores em que obteve-se a informação eram *H. pylori* positivos.

Para a avaliação de polimorfismos em indivíduos com gastrite crônica, a amostra foi constituída também por 100 indivíduos, sendo 54 do sexo masculino e 46 do sexo feminino. A idade variou de 19 a 86 anos, ($\bar{X} = 53,33$; $s = 16,59$). Quanto a etnia, a maioria também é de origem caucasóide (87%) e o restante de origem negróide (13,0%). Tanto na amostra de pacientes com câncer gástrico como nessa de gastrite crônica não havia nenhum indivíduo de origem asiática. Em relação à ocupação profissional desses indivíduos, observou-se um número menor de trabalhadores rurais (22,0%) e um número mais elevado de trabalhadores domésticos (33,0%) e trabalhadores por conta própria (32,0%), quando comparados aos indivíduos com tumor gástrico. Além disso verificou-se que 3,0% eram trabalhadores assalariados, 7,0% trabalhadores assalariados administrativos, técnicos e científicos e apenas 2,0% exerciam ocupações de nível superior. Nesse grupo, um número menor de indivíduos relatou o hábito de fumar (58%), mas o tempo de tabagismo e o consumo médio de cigarros/dia foram semelhantes ao da amostra de pacientes com câncer gástrico sendo, respectivamente, de 3 a 68 anos ($\bar{X} = 30,55$; $s = 17,39$) e de 18 cigarros/dia. O mesmo ocorrendo quanto ao consumo de bebida alcoólica,

em que um número menor dos indivíduos (48%) eram etilistas, com período de consumo entre 2 a 65 anos ($\bar{X} = 26,06$; $s = 15,19$). Ainda nesse grupo, 37% dos indivíduos (31/84) relataram exposição ocupacional a agrotóxicos, cujo período variou de 1 a 60 anos ($\bar{X} = 17,12$; $s = 16,87$), entretanto em 16 indivíduos não foi possível a obtenção desse dado. O diagnóstico histológico de infecção pela bactéria *H. pylori* não foi obtido em apenas um caso, tendo sido diagnosticada positivamente em 61% (60/99) dos indivíduos com gastrite crônica.

Na amostra controle, composta por 150 indivíduos saudáveis, 90 são do sexo masculino e 60 do sexo feminino com idades entre 20 a 93 anos, ($\bar{X} = 54,31$; $s = 17,99$). Procurou-se parear os controles tanto com os pacientes da amostra de câncer gástrico como os de gastrite crônica, considerando-se como principais fatores a idade, o sexo e a etnia. Como na amostra de gastrite crônica muitos indivíduos eram da mesma faixa etária, sexo e etnia dos indivíduos da amostra de câncer gástrico, vários controles foram utilizados em conjunto para ambas as amostras. A maioria dos indivíduos, 90,0% (135/150) são de origem caucasóide. Obteve-se informação a respeito da ocupação profissional em 121 indivíduos da amostra controle, verificando-se que um número maior exerciam ocupações de nível superior (15,7%), eram trabalhadores assalariados administrativos, técnicos e científicos (12,4%) e trabalhadores assalariados (9,9%) e um menor número tratava-se de trabalhadores por conta própria (16,5%) e trabalhadores rurais (10,8%) quando comparados aos indivíduos com tumor gástrico e gastrite crônica. Além disso observou-se que 30,6% exerciam atividades domésticas, 3,3% eram estudantes e apenas 1 (0,8%) foi classificado como empresário. Todavia, apenas 35,1% (52/148) são tabagistas e 13,5% (20/148) etilistas, mas em dois indivíduos não foi possível a obtenção dos dados referentes ao tabagismo e etilismo. Nos indivíduos fumantes o período de consumo do cigarro variou de 2 a 73 ($\bar{X} = 33,63$; $s = 21,37$) com consumo



médio de 14 cigarros/dia, e valores mínimo e máximo de 1 e 60 cigarros/dia, respectivamente. Os etilistas relataram consumo de bebida alcóolica durante o período de 8 a 73 anos ($\bar{X} = 31,95$; $s = 18,69$). Em apenas 40 indivíduos da amostra controle (27,0%) foi obtida a informação sobre a exposição a agrotóxicos e dentre estes, apenas 4 (10,0%) relataram exposição por um período que variou de 1 a 20 anos ($\bar{X} = 8,50$; $s = 8,58$). Portanto, esses dados do grupo controle não foram utilizados para comparação entre as demais amostras.

As variáveis quantitativas como idade, tempo de tabagismo e de etilismo e consumo diário de cigarros foram comparadas entre as três amostras pela análise de variância (ANOVA) e o tempo de exposição a agrotóxicos, entre as amostras de câncer gástrico e de gastrite crônica, pelo teste "t" Student (Tabela 2). Na Tabela 3 estão apresentados os resultados do teste de χ^2 para comparações entre as amostras considerando-se as variáveis qualitativas como sexo, etnia, tabagismo, etilismo, exposição a agrotóxico e infecção pelo *H. pylori*.

A idade média dos pacientes com câncer gástrico (60 anos) foi estatisticamente maior que a dos indivíduos com gastrite crônica (53 anos) e dos controles (54 anos) ($F_{(2,347)} = 5,33$; $p = 0,005$). No entanto, esse fator não diferiu estatisticamente entre os grupos de indivíduos com gastrite crônica e controle, que apresentaram idade média semelhante. A amostra de pacientes com câncer gástrico apresentou uma frequência maior de indivíduos do sexo masculino, sendo observada diferença estatística entre as três amostras quanto ao fator sexo ($\chi^2 = 8,10$; $p = 0,0173$). Quanto a proporção de indivíduos caucasóides e negróides, também não observou-se diferença estatisticamente significativa entre as três amostras ($\chi^2 = 0,74$; $p = 0,688$), sendo a frequência de indivíduos caucasóides maior nos três grupos (Tabela 3).

Tabela 3. Resultados do teste de χ^2 para comparações entre as amostras de indivíduos com tumor gástrico (TUG), gastrite crônica (GC) e controles (C), considerando-se as variáveis sexo, etnia, tabagismo, etilismo, exposição a agrotóxico e infecção pelo *H. pylori*.

Variável	Amostras	Estatística/Probabilidade
Sexo	TUG x GC x C	$\chi^2 = 8,10$; p= 0,0173
Etnia	TUG x GC x C	$\chi^2 = 0,74$; p= 0,688
Tabagismo	TUG x GC x C	$\chi^2 = 35,96$; p= 0,000
Etilismo	TUG x GC x C	$\chi^2 = 72,68$; p= 0,000
Exposição a agrotóxico	TUG x GC	$\chi^2 = 11,21$; p= 0,000
Infecção pelo <i>H. pylori</i>	TUG x GC	$\chi^2 = 11,07$; p= 0,000

Considerando-se a proporção de indivíduos fumantes e não fumantes nas três amostras, verificou-se um número estatisticamente maior de fumantes no grupo com tumor gástrico ($\chi^2 = 35,96$; $p = 0,000$), e o contrário no grupo controle. No entanto, considerando-se apenas os indivíduos fumantes dos três grupos não houve diferenças significantes (Tabela 2) em relação ao tempo de tabagismo ($F_{(2;180)} = 0,78$; $p = 0,457$) e ao consumo diário de cigarros ($F_{(2;170)} = 1,46$; $p = 0,234$).

Ainda com relação ao tabagismo, quando considerou-se conjuntamente este fator associado ao sexo nas três amostras (Tabela 4), verificou-se que esse hábito era mais freqüente nos indivíduos do sexo masculino, tanto na amostra de indivíduos com câncer gástrico ($\chi^2 = 29,52$; $p = 0,000$), como de gastrite crônica ($\chi^2 = 18,85$; $p = 0,000$). No entanto tal diferença não foi observada nos controles ($\chi^2 = 3,17$; $p = 0,074$) (Tabela 4).

O etilismo foi freqüentemente relatado pelos indivíduos, tendo sido constatado uma proporção estatisticamente maior de etilistas em relação aos não etilistas (Tabela 3) entre os três grupos ($\chi^2 = 72,68$; $p = 0,000$), devido a esse hábito ser mais freqüente no grupo de indivíduos com tumor gástrico. Contudo, quando avaliou-se apenas os indivíduos etilistas nas três amostras (Tabela 2) não foram encontradas diferenças significantes quanto ao tempo de consumo de álcool ($F_{(2;130)} = 1,04$; $p = 0,356$). Da mesma forma que o tabagismo, a análise simultânea do sexo e etilismo (Tabela 4), evidenciou um número estatisticamente maior de etilistas do sexo masculino nos três grupos: tumor gástrico ($\chi^2 = 47,21$; $p = 0,000$), gastrite crônica ($\chi^2 = 31,97$; $p = 0,000$) e controles ($\chi^2 = 85,78$; $p = 0,000$).

Como um número elevado de pacientes com câncer gástrico relataram exposição a agrotóxicos associada principalmente a sua atividade ocupacional, esse fator também foi questionado no grupo com gastrite crônica. Todavia, essa variável não foi avaliada na amostra

Tabela 4. Comparações pelo teste de χ^2 nas amostras de indivíduos com tumor gástrico (TUG), gastrite crônica (GC) e controles (C) segundo o sexo, considerando-se as variáveis tabagismo, etilismo e exposição a agrotóxico.

	TUG		GC		C	
	Masculino	Feminino	Masculino	Feminino	Masculino	Feminino
Tabagismo						
Não fumante	9 (13,5%)	18 (62,9%)	12 (22,2%)	30 (65,2%)	52 (59,1%)	44 (73,3%)
Fumante	64 (86,5%)	9 (37,1%)	42 (77,8%)	16 (34,8%)	36 (40,9%)	16 (26,7%)
Total	73 (100,0%)	27 (100,0)	54 (100,0%)	46 (100,0%)	88 (100,0%)	60 (100,0%)
Estatística/ Probabilidade						
	$\chi^2 = 29,52$; p=0,000		$\chi^2 = 18,85$; p=0,000		$\chi^2 = 3,17$; p=0,074	
Etilismo						
Não Etilista	11 (22,2%)	24 (85,2%)	14 (25,0%)	38 (86,4%)	20 (22,7%)	60 (100,0%)
Etilista	62 (77,8%)	3 (14,8%)	40 (75,0%)	8 (13,6%)	68 (77,3%)	0 (0%)
Total	73 (100,0%)	27 (100,0%)	56 (100,0%)	44 (100,0%)	88 (100,0%)	60 (100,0)
Estatística/ Probabilidade						
	$\chi^2 = 47,21$; p=0,000		$\chi^2 = 31,97$; p=0,000		$\chi^2 = 85,77$; p=0,000	
Exposição a agrotóxico						
Não Exposto	15 (23,1%)	21 (77,8%)	21 (50,0%)	30 (71,4%)		
Exposto	55 (76,9%)	6 (22,2%)	21 (50,0%)	12 (28,6%)		
Total	70 (100,0%)	27 (100,0)	42 (100,0%)	42 (100,0%)		
Estatística/ Probabilidade						
	$\chi^2 = 26,51$; p=0,000		$\chi^2 = 4,04$; p=0,044			



controle, devido ao número reduzido de indivíduos em que esse dado estava disponível. A proporção de indivíduos expostos e não expostos a agrotóxicos (Tabela 3) diferiu estatisticamente entre as amostras de tumor gástrico e gastrite crônica ($\chi^2 = 11,21$; $p = 0,000$), pois o número de indivíduos expostos foi maior no primeiro grupo. Contudo, não houve diferença estatisticamente significativa (Tabela 2), em relação ao tempo de exposição ($t = -1,27$; $p = 0,215$), mas ficou evidente a ocorrência de um número estatisticamente maior de indivíduos expostos do sexo masculino (Tabela 4) em ambos os grupos (câncer gástrico: $\chi^2 = 26,51$; $p = 0,000$; gastrite crônica: $\chi^2 = 4,04$; $p = 0,044$).

A infecção pela bactéria *H. pylori* foi estatisticamente mais freqüente nos indivíduos do grupo de gastrite crônica, como pode ser observado na Tabela 3 pelo resultado do teste de χ^2 ($\chi^2 = 11,07$; $p = 0,000$).

Na amostra de indivíduos com câncer gástrico, quando considerou-se separadamente os tipos histológicos de adenocarcinoma (intestinal e difuso), conforme Tabela 5, verificou-se um número estatisticamente maior de homens com câncer gástrico tipo intestinal e um número maior de mulheres com o tipo difuso ($\chi^2 = 5,11$; $p = 0,023$). A proporção de indivíduos etilistas e não etilistas também diferiu estatisticamente segundo a histologia do tumor, encontrando-se um número maior de etilistas no grupo com o tipo intestinal e um número menor no grupo com o tipo difuso ($\chi^2 = 5,77$; $p = 0,016$), o mesmo sendo observado em relação a exposição a agrotóxico ($\chi^2 = 5,39$; $p = 0,020$). No entanto, tal diferença não foi observada quanto ao tabagismo ($\chi^2 = 1,18$; $p = 0,276$).



Tabela 5. Comparações pelo teste de χ^2 na amostra de tumor gástrico (TUG), segundo os tipos de adenocarcinomas (intestinal e difuso) considerando-se as variáveis sexo, tabagismo, etilismo e exposição a agrotóxico.

Variável	Adenocarcinoma		Total
	Intestinal	Difuso	
Sexo			
Masculino	37 (58,7%)	26 (41,3%)	63 (100,0%)
Feminino	8 (32,0%)	17 (68,0%)	25 (100,0%)
Estatística/Probabilidade	$\chi^2 = 5,11$; p= 0,023		
Tabagismo			
Não fumante	10 (41,7%)	14 (58,3%)	24 (100,0%)
Fumante	35 (54,7%)	29 (45,3%)	64 (100,0%)
Estatística/Probabilidade	$\chi^2 = 1,18$; p= 0,276		
Etilismo			
Não Etilista	10 (33,3%)	20 (66,7%)	30 (100,0%)
Etilista	35 (60,3%)	23 (39,7%)	58 (100,0%)
Estatística/Probabilidade	$\chi^2 = 5,77$; p= 0,016		
Exposição a agrotóxico			
Não Exposto	11 (34,4%)	21(65,6%)	53 (100,0%)
Exposto	32 (60,4%)	21 (39,6%)	32 (100,0%)
Estatística/Probabilidade	$\chi^2 = 5,39$; p= 0,020		

III. 2- Frequências dos polimorfismos dos genes *GSTT1*, *GSTM1* e *CYP2E1* e associação com fatores ambientais

As frequências genotípicas dos polimorfismos dos genes *GSTT1* e *GSTM1* estão apresentadas na Tabela 6. Pode-se observar que no grupo de indivíduos com câncer gástrico 43,0% deles apresentaram ambos os genes, 40,0% apenas o gene *GSTT1*, 10,0% apenas o gene *GSTM1* e 7,0% apresentaram deleção de ambos os genes. Essas frequências no grupo de gastrite crônica foram, respectivamente, 57,0%, 31,0%, 5,0% e 7,0%, enquanto, no grupo controle foram de 42,7%, 38,7%, 16,0% e 2,6%. Comparando-se as distribuições das frequências genotípicas entre as amostras pelo teste de χ^2 (Tabela 7), constatou-se que não haviam diferenças estatisticamente significantes entre as frequências do grupo de câncer gástrico com as do grupo de gastrite crônica ($\chi^2 = 4,76$; $p = 0,189$) e controle ($\chi^2 = 2,65$; $p = 0,448$). No entanto, tais frequências foram estatisticamente diferentes entre os grupo de gastrite crônica e controle ($\chi^2 = 10,85$; $p = 0,012$). Em relação ao genótipo *GSTT1* nulo, este foi observado em 17% dos indivíduos com tumor gástrico, 12% dos indivíduos com gastrite crônica e 18,6% dos controles (Tabela 6), no entanto essas frequências não diferiram estatisticamente entre si (Tabela 8). Quanto ao genótipo *GSTM1* nulo, as frequências observadas nas amostras de indivíduos com tumor gástrico, gastrite crônica e controles foram respectivamente, 47%, 38% e 41,3% (Tabela 6), também não diferindo estatisticamente (Tabela 8).

Nas Tabelas 9, 10 e 11 estão apresentadas, respectivamente, as porcentagens dos genótipos *GSTT1* e *GSTM1* positivo e nulo nas amostras de indivíduos com tumor gástrico, gastrite crônica e controles, em relação as variáveis sexo, etnia, tabagismo, etilismo, exposição a agrotóxico, infecção pelo *H. pylori* e tipo histológico do tumor, assim como o resultado do teste exato de Fisher ou

Tabela 6. Porcentagens de genótipos nulos para os genes *GSTT1* e *GSTM1* e suas possíveis combinações observadas nos indivíduos com tumor gástrico (TUG), gastrite crônica (GC) e controles (C) .

Amostra	N	<i>GSTT1</i>	<i>GSTM1</i>	<i>GSTT1/GSTM1</i>			
		nulo	nulo	+/+	+/0	0/+	0/0
TUG	100	17 (17,0%)	47 (47,0%)	43 (43,0%)	40 (40,0%)	10 (10,0%)	7 (7,0%)
GC	100	12 (12,0%)	38 (38,0%)	57 (57,0%)	31 (31,0%)	5 (5,0%)	7 (7,0%)
C	150	28 (18,6%)	62 (41,3%)	64 (42,7%)	58 (38,7%)	24 (16,0%)	4 (2,6%)

+/+ = presença de *GSTT1* e de *GSTM1*

+/0 = presença de *GSTT1* e deleção de *GSTM1*

0/+ = deleção de *GSTT1* e presença de *GSTM1*

0/0 = deleção de *GSTT1* e de *GSTM1*

Tabela 7. Resultado do teste de χ^2 para comparação das frequências das combinações genotípicas *GSTT1* e *GSTM1* nas amostras de indivíduos com tumor gástrico (TUG), gastrite crônica (GC) e controles (C).

Amostra	χ^2	gl	Probabilidade
TUG x GC	4,76	3	0,189
TUG x C	2,65	3	0,448
GC x C	10,85	3	0,012

Tabela 8. Resultado do teste de χ^2 para comparação das frequências dos genótipos *GSTT1* nulo e *GSTM1* nulo. Nas amostras de indivíduos com tumor gástrico (TUG), gastrite crônica (GC) e controles (C).

Amostra	<i>GSTT1</i> nulo			<i>GSTM1</i> nulo		
	χ^2	gl	Probabilidade	χ^2	gl	Probabilidade
TUG x GC	1,00	1	0,315	1,65	1	0,197
TUG x C	0,11	1	0,736	0,78	1	0,376
GC x C	1,98	1	0,158	0,27	1	0,598

Tabela 9. Porcentagens dos genótipos *GSTT1* e *GSTM1* na amostra de indivíduos com tumor gástrico (TUG) segundo as variáveis sexo, etnia, tabagismo, etilismo, exposição a agrotóxico, infecção pelo *H. pylori* e tipo de adenocarcinoma, e resultado do teste exato de Fisher.

Variável	Genótipo					
	<i>GSTT1</i> positivo	<i>GSTT1</i> nulo	Total	<i>GSTM1</i> positivo	<i>GSTM1</i> nulo	Total
Sexo						
Masculino	59 (80,8%)	14 (19,2%)	73 (100,0%)	38 (52,1%)	35(47,9%)	73 (100,0%)
Feminino	24 (88,9%)	3 (11,1%)	27 (100,0%)	15 (28,3%)	12 (25,5%)	27 (100,0%)
Probabilidade	p = 0,549			p = 0,823		
Etnia						
Caucasóide	73 (83,9%)	14 (16,1%)	87 (100,0%)	42 (46,3%)	45 (51,7%)	87 (100,0%)
Negróide	10 (76,9%)	3 (23,1%)	13 (100,0%)	11 (84,6%)	2 (15,4%)	13 (100,0%)
Probabilidade	p = 0,690			p = 0,017		
Tabagismo						
Não Fumante	24 (88,9%)	3 (11,1%)	27 (100,0%)	17 (62,9%)	10 (37,1%)	27 (100,0%)
Fumante	59 (80,8%)	14 (19,2%)	83 (100,0%)	36 (49,3%)	37 (50,7%)	73 (100,0%)
Probabilidade	p = 0,549			p = 0,263		
Etilismo						
Não Etilista	30 (85,7%)	5 (14,3%)	35 (100,0%)	18 (51,4%)	17 (48,6%)	35 (100,0%)
Etilista	53 (81,5%)	12 (18,5%)	65 (100,0%)	35 (53,8%)	30 (46,2%)	65 (100,0%)
Probabilidade	p = 0,781			p = 0,836		
Exposição a agrotóxico						
Não Exposto	34 (91,9%)	3 (8,1%)	37 (100,0%)	19 (51,4%)	18 (48,6%)	37 (100,0%)
Exposto	46 (76,7%)	14 (23,3%)	60 (100,0%)	33 (55,0%)	27 (45,0%)	60 (100,0%)
Probabilidade	p = 0,096			p = 0,834		
Infecção pelo <i>H. pylori</i>						
<i>H. pylori</i> +	9 (69,2%)	4 (30,8%)	13 (100,0%)	7 (53,8%)	6 (46,2%)	13 (100,0%)
<i>H. pylori</i> -	24 (80,0%)	6 (20,0%)	30 (100,0%)	18 (60,0%)	12 (40,0%)	30 (100,0%)
Probabilidade	p = 0,458			P = 0,746		
Adenocarcinoma						
Tipo intestinal	35 (77,8%)	10 (22,2%)	45 (100,0%)	23 (51,1%)	22 (48,9%)	45 (100,0%)
Tipo difuso	38 (88,4%)	5 (11,6%)	43 (100,0%)	24 (55,8%)	19 (44,2%)	43 (100,0%)
Probabilidade	P = 0,258			P = 0,675		

Tabela 10. Porcentagens dos genótipos *GSTT1* e *GSTM1* na amostra de indivíduos com gastrite crônica (GC) segundo as variáveis sexo, etnia, tabagismo, etilismo, exposição a agrotóxico e infecção pelo *H. pylori*, e resultado do teste exato de Fisher.

Variável	Genótipo					
	GSTT1 positivo	GSTT1 nulo	Total	GSTM1 positivo	GSTM1 nulo	Total
Sexo						
Masculino	45 (83,3%)	9 (16,7%)	54 (100,0%)	34 (62,9%)	20 (37,1%)	54 (100,0%)
Feminino	43 (48,9%)	3 (25,0%)	46 (100,0%)	28 (60,9%)	18 (39,1%)	46 (100,0%)
Probabilidade	p = 0,137			p = 0,839		
Etnia						
Caucasóide	75 (86,2%)	12 (13,8%)	87 (100,0%)	56 (64,4%)	31 (35,6%)	87 (100,0%)
Negróide	13 (100,0%)	0 (0,0%)	13 (100,0%)	6 (46,2%)	7 (53,8%)	13 (100,0%)
Probabilidade	p = 0,356			p = 0,232		
Tabagismo						
Não Fumante	36 (85,7%)	6 (14,3%)	42 (100,0%)	26 (41,9%)	16 (42,1%)	42 (100,0%)
Fumante	52 (89,7%)	6 (10,3%)	58 (100,0%)	36 (58,1%)	22 (57,9%)	58 (100,0%)
Probabilidade	p = 0,552			p = 1,000		
Etilismo						
Não Etilista	49 (94,2%)	3 (5,8%)	52 (100,0%)	33 (63,5%)	19 (36,5%)	52 (100,0%)
Etilista	39 (81,3%)	9 (18,7%)	48 (100,0%)	29 (60,4%)	19 (39,6%)	48 (100,0%)
Probabilidade	p = 0,647			p = 0,837		
Exposição a agrotóxico						
Não Exposto	46 (61,3%)	5 (55,6%)	51 (100,0%)	31 (60,8%)	20 (39,2%)	51 (100,0%)
Exposto	29 (38,7%)	4 (44,4%)	33 (100,0%)	19 (57,6%)	14 (42,4%)	33 (100,0%)
Probabilidade	p = 0,733			p = 0,822		
Infecção pelo <i>H. pylori</i>						
<i>H. pylori</i> +	54 (90,0%)	6 (10,0%)	60 (100,0%)	43 (71,7%)	17 (28,3%)	60 (100,0%)
<i>H. pylori</i> -	34 (87,2%)	5 (12,8%)	39 (100,0%)	19 (48,7%)	20 (51,3%)	39 (100,0%)
Probabilidade	p = 0,748			p = 0,032		

Tabela 11. Porcentagens dos genótipos *GSTT1* e *GSTM1* na amostra controle (C) segundo as variáveis sexo, etnia, tabagismo, etilismo, exposição a agrotóxico e infecção pelo *H. pylori*, e resultado do teste de χ^2 .

Variável	Genótipo					
	<i>GSTT1</i> positivo	<i>GSTT1</i> nulo	Total	<i>GSTM1</i> positivo	<i>GSTM1</i> nulo	Total
Sexo						
Masculino	70 (77,8%)	20 (22,2%)	90 (100,0%)	54 (60,0%)	36 (40,0%)	90 (100,0%)
Feminino	52 (86,7%)	8 (13,3%)	60 (100,0%)	34 (56,7%)	26 (43,3%)	60 (100,0%)
Estatística/ Probabilidade	$\chi^2 = 1,87$; p= 0,171			$\chi^2 = 0,16$; p= 0,684		
Etnia						
Caucasóide	114 (84,4%)	21 (15,6%)	135 (100,0%)	75 (55,6%)	60 (44,4%)	135 (100,0%)
Negróide	8 (53,3%)	7 (46,7%)	15 (100,0%)	13 (86,7%)	2 (13,3%)	15 (100,0%)
Estatística/ Probabilidade	$\chi^2 = 8,61$; p= 0,003			$\chi^2 = 5,39$; p= 0,020		
Tabagismo						
Não Fumante	84 (87,5%)	12 (12,5%)	96 (100,0%)	54 (56,3%)	42 (43,7%)	96 (100,0%)
Fumante	36 (69,2%)	16 (30,8%)	52 (100,0%)	33 (63,5%)	19 (36,5%)	52 (100,0%)
Estatística/ Probabilidade	$\chi^2 = 7,34$; p= 0,006			$\chi^2 = 0,72$; p= 0,304		
Etilismo						
Não Etilista	104 (81,3%)	24 (18,7%)	128 (100,0%)	73 (57,1%)	55 (42,9%)	128 (100,0%)
Etilista	16 (80,0%)	4 (20,0%)	20 (100,0%)	14 (70,0%)	6 (30,0%)	20 (100,0%)
Estatística/ Probabilidade	$\chi^2 = 0,02$; p= 0,894			$\chi^2 = 1,20$; p= 0,273		

Qui-quadrado (χ^2). Na amostra de indivíduos com tumor gástrico observou-se diferença estatisticamente significativa quanto a etnia e o polimorfismo do gene *GSTM1* ($p = 0,017$), devido uma frequência maior do genótipo *GSTM1* positivo nos negróides. No grupo de indivíduos com gastrite crônica houve diferença estatisticamente significativa quando considerou-se a infecção pelo *H. pylori* e o polimorfismo de *GSTM1* ($p = 0,032$), encontrando-se um número maior de indivíduos Hp+ com o gene *GSTM1*. Nos controles observou-se diferenças estatisticamente significantes entre a etnia e os polimorfismos de *GSTT1* ($\chi^2 = 8,61$; $p = 0,003$) e *GSTM1* ($\chi^2 = 5,39$; $p = 0,020$), havendo uma porcentagem maior de *GSTT1* positivo nos caucasóides e de *GSTM1* positivo nos negróides. O tabagismo foi outra variável que apresentou diferença significativa nos controles, em relação ao polimorfismo *GSTT1*, devido ao número maior de não fumantes com a presença desse gene.

As porcentagens genótípicas para os polimorfismos dos genes *GSTT1* e *GSTM1* positivo e nulo foram comparadas entre as amostras, considerando-se os fatores como sexo, etnia, tabagismo, etilismo, exposição a agrotóxico e infecção pelo *H. pylori* pelo teste de χ^2 e valor de *odds ratio* (OR) com intervalo de confiança (IC) de 95%.

Nas Tabelas 12 e 13 estão apresentados os resultados do teste de χ^2 e valores de *odds ratio* entre as amostras de tumor gástrico e gastrite crônica considerando-se, respectivamente, os genótipos *GSTT1* e *GSTM1* e as variáveis já descritas. Observou-se associação entre o genótipo *GSTT1* positivo e as variáveis sexo, etilismo, exposição a agrotóxico e infecção pelo *H. pylori*, pois esse genótipo foi mais frequente na amostra TUG em indivíduos do sexo masculino, etilistas e *H. pylori* negativo, e na amostra GC nos não expostos a agrotóxico. Da mesma forma, observou-se associação entre *GSTM1* positivo e as variáveis etilismo, exposição a agrotóxico e infecção pelo *H. pylori* em consequência da frequência mais elevada desse genótipo nos indivíduos da amostra TUG etilistas, expostos a agrotóxico e *H. pylori* negativo,

Tabela 12. Porcentagens dos genótipos *GSTT1* positivo e nulo nas amostras de indivíduos com tumor gástrico (TUG) e gastrite crônica (GC), segundo as variáveis sexo, etnia, tabagismo, etilismo, exposição a agrotóxico e infecção pelo *H. pylori*, e resultado do teste de χ^2 e valor de Odds Ratio (OR) com intervalo de confiança (IC) de 95%.

Variável	Genótipo							
	<i>GSTT1</i> positivo				<i>GSTT1</i> nulo			
	TUG	GC	Estatística Probabilidade	OR IC (95%)	TUG	GC	Estatística Probabilidade	OR IC (95%)
Sexo								
Masculino	59 (71,1%)	45 (51,1%)	$\chi^2 = 7,13$	2,34	14 (82,4%)	9 (75,0%)	$\chi^2 = 0,23$	1,55
Feminino	24 (28,9%)	43 (48,9%)	$p = 0,007$	(1,24-4,42)	3 (17,6%)	3 (25,0%)	$p = 0,630$	(0,25-9,46)
Total	83 (100,0%)	88 (100,0%)			17 (100,0%)	12 (100,0%)		
Etnia								
Caucasóide	73 (87,9%)	75 (85,2%)	$\chi^2 = 0,27$	1,26	14 (82,3%)	12 (100,0%)	$\chi^2 = 2,36$	
Negróide	10 (12,1%)	13 (14,8%)	$p = 0,601$	(0,52-3,06)	3 (17,6%)	0 (0,0%)	$p = 0,124$	
Total	83 (100,0%)	88 (100,0%)			17 (100,0%)	12 (100,0%)		
Tabagismo								
Não fumante	24 (28,9%)	36 (40,9%)	$\chi^2 = 2,70$	0,58	3 (17,6%)	6 (50,0%)	$\chi^2 = 3,44$	0,21
Fumante	59 (71,1%)	52 (59,1%)	$p = 0,100$	(0,31-1,11)	14 (82,4%)	6 (50,0%)	$p = 0,063$	(0,04-1,15)
Total	83 (100,0%)	88 (100,0%)			17 (100,0%)	12 (100,0%)		
Etilismo								
Não etilista	30 (36,1%)	49 (55,7%)	$\chi^2 = 6,56$	0,45	5 (29,4%)	3 (25,0%)	$\chi^2 = 0,07$	1,25
Etilista	53 (63,9%)	39 (44,3%)	$p = 0,010$	(0,24-0,83)	12 (70,6%)	9 (75,0%)	$p = 0,793$	(0,23-6,65)
Total	83 (100,0%)	88 (100,0%)			17 (100,0%)	12 (100,0%)		
Exposição a agrotóxico								
Não exposto	34 (42,5%)	46 (61,3%)	$\chi^2 = 5,50$	0,46	3 (17,6%)	5 (55,6%)	$\chi^2 = 2,97$	0,17
Exposto	46 (57,5%)	29 (38,7%)	$p = 0,019$	(0,24-0,88)	14 (82,4%)	4 (44,4%)	$p = 0,463$	0,02-1,05
Total	80 (100,0%)	75 (100,0%)			17 (100,0%)	9 (100,0%)		
Infecção pelo <i>H. pylori</i>								
<i>H. pylori</i> +	9 (27,3%)	54 (61,4%)	$\chi^2 = 11,18$	0,23	4 (40,0%)	6 (54,5%)	$\chi^2 = 0,44$	0,55
<i>H. pylori</i> -	24 (72,7%)	34 (38,7%)	$p = 0,008$	(0,09-0,56)	6 (60,0%)	5 (48,5%)	$p = 0,505$	(0,09-3,14)
Total	33 (100,0%)	88 (100,0%)			10 (100,0%)	11 (100,0%)		

Tabela 13. Porcentagens dos genótipos *GSTM1* positivo e nulo nas amostras de indivíduos com tumor gástrico (TUG) e gastrite crônica (GC), segundo as variáveis sexo, etnia, tabagismo, etilismo, exposição a agrotóxico e infecção pelo *H. pylori*, e resultado do teste de χ^2 e valor de Odds Ratio (OR) com intervalo de confiança (IC) de 95%.

Variável	Genótipo							
	<i>GSTM1</i> positivo				<i>GSTM1</i> nulo			
	TUG	GC	Estatística Probabilidade	OR IC (95%)	TUG	GC	Estatística Probabilidade	OR IC (95%)
Sexo								
Masculino	38 (71,7%)	34 (54,8%)	$\chi^2 = 2,99$	1,93	35 (74,5%)	20 (52,6%)	$\chi^2 = 4,39$	2,62
Feminino	15 (28,3%)	28 (45,2%)	p = 0,862	(0,88-4,25)	12 (25,5%)	18 (47,4%)	p = 0,036	(1,05-6,54)
Total	53 (100,0%)	62 (100,0%)			47 (100,0%)	38 (100,0%)		
Etnia								
Caucasóide	42 (79,2%)	56 (90,3%)	$\chi^2 = 2,78$	0,40	45 (95,7%)	31 (81,6%)	$\chi^2 = 4,45$	5,08
Negróide	11 (20,8%)	6 (9,7%)	p = 0,09	(0,14-1,19)	2 (4,3%)	7 (18,4%)	p = 0,034	(0,98-26,10)
Total	53 (100,0%)	62 (100,0%)			47 (100,0%)	38 (100,0%)		
Tabagismo								
Não fumante	17 (32,1%)	26 (41,9%)	$\chi^2 = 1,19$	0,65	10 (21,3%)	16 (42,1%)	$\chi^2 = 4,29$	0,37
fumante	36 (67,9%)	36 (58,1%)	p = 0,276	(0,30-1,40)	37 (78,7%)	22 (57,9%)	p = 0,038	(0,14-0,96)
Total	53 (100,0%)	62 (100,0%)			47 (100,0%)	38 (100,0%)		
Etilismo								
Não etilista	18 (33,9%)	33 (53,2%)	$\chi^2 = 4,30$	0,45	17 (36,2%)	19 (50,0%)	$\chi^2 = 1,65$	0,56
Etilista	35 (66,1)	29 (46,8%)	p = 0,038	(0,21-0,96)	30 (63,8%)	19 (50,0%)	p = 0,199	(0,23-1,35)
Total	53 (100,0%)	62 (100,0%)			47 (100,0%)	38 (100,0%)		
Exposição a agrotóxico								
Não exposto	19 (36,5%)	31 (62,0%)	$\chi^2 = 6,61$	0,35	18 (40,0%)	20 (58,8%)	$\chi^2 = 2,75$	0,46
Exposto	33 (63,5%)	19 (38,0%)	p = 0,001	(0,15-0,78)	27 (60,0%)	14 (41,2%)	p = 0,097	(0,18-1,15)
Total	52 (100,0%)	50 (100,0%)			45 (100,0%)	34 (100,0%)		
Infecção pelo <i>H. pylori</i>								
<i>H. pylori</i> +	7 (28,0%)	43 (69,4%)	$\chi^2 = 12,47$	0,17	6 (33,3%)	17 (45,9%)	$\chi^2 = 0,79$	0,58
<i>H. pylori</i> -	18 (72,0%)	19 (30,6%)	p = 0,004	(0,06-0,48)	12 (66,7%)	20 (54,1%)	p = 0,373	(0,18-1,90)
Total	25 (100,0%)	62 (100,0%)			18 (100,0%)	37 (100,0%)		

assim como entre *GSTM1* nulo e as variáveis sexo, etnia e tabagismo, também pela frequência maior na amostra TUG dos indivíduos do sexo masculino, caucasóides e tabagistas.

As tabelas 14 e 15 mostram, respectivamente, as porcentagens dos polimorfismos de *GSTT1* e *GSTM1* e os resultados do teste de χ^2 e valores de *odds ratio* entre as amostras de indivíduos com tumor gástrico e controles segundo as variáveis sexo, etnia, tabagismo e etilismo. Verificou-se associação entre *GSTT1* positivo na amostra TUG em relação aos controles quanto às variáveis sexo (masculino), tabagismo e etilismo e entre *GSTT1* nulo e etilismo. Da mesma forma, houve ainda associação entre *GSTM1* positivo e nulo com as variáveis tabagismo e etilismo.

Os resultados do teste de χ^2 e valores de *odds ratio* obtidos nas amostras de indivíduos com gastrite crônica e controles em relação aos polimorfismo de *GSTT1* e *GSTM1* combinados com as variáveis sexo, etnia, tabagismo e etilismo estão apresentados nas Tabelas 16 e 17, respectivamente. Observou-se associação de *GSTT1* e *GSTM1* positivos com as variáveis tabagismo e etilismo, devido esses fatores serem mais freqüentes na amostra GC, e entre *GSTT1* nulo com o etilismo, também mais comum na amostra GC, e ainda *GSTM1* nulo com as variáveis etnia (caucasóides), tabagismo e etilismo, nos indivíduos com gastrite crônica.

Na Figura 1 estão apresentados alguns exemplos dos polimorfismos dos genes *GSTT1* e *GSTM1* observados nos indivíduos das três amostras.

Tabela 14. Porcentagens dos genótipos *GSTT1* positivo e nulo nas amostras de indivíduos com tumor gástrico (TUG) e controles (C), segundo as variáveis sexo, etnia, tabagismo e etilismo, e resultado do teste de χ^2 e valor de *Odds Ratio* (OR) com intervalo de confiança (IC) de 95%.

Variável	Genótipo							
	GSTT1 positivo				GSTT1 nulo			
	TUG	C	Estatística Probabilidade	OR IC (95%)	TUG	C	Estatística Probabilidade	OR IC (95%)
Sexo								
Masculino	59 (71,1%)	70 (57,4%)	$\chi^2 = 3,98$	1,82	14 (82,4%)	20 (71,4%)	$\chi^2 = 0,68$	1,86
Feminino	24 (28,9%)	52 (42,6%)	p= 0,046	(1,00-3,31)	3 (17,6%)	8 (28,6%)	p= 0,408	(0,42-8,30)
Total	83 (100,0%)	122 (100,0%)			17 (100,0%)	28 (100,0%)		
Etnia								
Caucasóide	73 (87,9%)	114 (93,4%)	$\chi^2 = 1,86$	0,51	14 (82,4%)	21 (75,0%)	$\chi^2 = 0,33$	1,55
Negróide	10 (12,1%)	8 (6,6%)	p= 0,172	(0,19-1,35)	3 (17,6%)	7 (25,0%)	p= 0,565	(0,34-7,05)
Total	83 (100,0%)	122 (100,0%)			17 (100,0%)	28 (100,0%)		
Tabagismo								
Não fumante	24 (28,9%)	84 (70,0%)	$\chi^2 = 33,26$	0,17	3 (17,6%)	12 (42,8%)	$\chi^2 = 3,03$	0,28
Fumante	59 (71,1%)	36 (30,0%)	p= 0,000	(0,09-0,32)	14 (82,4%)	16 (57,2%)	p= 0,082	(0,06-1,22)
Total	83 (100,0%)	120 (100,0%)			17 (100,0%)	28 (100,0%)		
Etilismo								
Não etilista	30 (36,1%)	104 (86,7%)	$\chi^2 = 55,82$	0,08	5 (29,4%)	24 (85,7%)	$\chi^2 = 14,63$	0,06
Etilista	53 (63,9%)	16 (13,3%)	p= 0,000	(0,04-0,17)	12 (70,6%)	4 (14,3%)	p= 0,001	(0,01-0,30)
Total	83 (100,0%)	120 (100,0%)			17 (100,0%)	28 (100,0%)		

Tabela 15. Porcentagens dos genótipos *GSTM1* positivo e nulo nas amostras de indivíduos com tumor gástrico (TUG) e controles (C), segundo as variáveis sexo, etnia, tabagismo e etilismo, e resultado do teste de χ^2 e valor de *Odds Ratio* (OR) com intervalo de confiança (IC) de 95%.

Variável	Genótipo							
	<i>GSTM1</i> positivo				<i>GSTM1</i> nulo			
	TUG	C	Estatística Probabilidade	OR IC (95%)	TUG	C	Estatística Probabilidade	OR IC (95%)
Sexo								
Masculino	38 (71,7%)	54 (61,4%)	$\chi^2 = 1,56$	1,59	35 (74,5%)	36 (58,1%)	$\chi^2 = 3,17$	2,10
Feminino	15 (28,3%)	34 (38,6%)	p= 0,212	(0,76-3,32)	12 (25,5%)	26 (41,9%)	p= 0,075	(0,92-4,81)
Total	53 (100,0%)	88 (100,0%)			47 (100,0%)	62 (100,0%)		
Etnia								
Caucasóide	42 (79,2%)	75 (85,2%)	$\chi^2 = 0,84$	0,66	45 (95,7%)	60 (96,8%)	$\chi^2 = 0,08$	0,75
Negróide	11 (20,8%)	13 (14,8%)	p= 0,360	(0,27-1,60)	2 (4,3%)	2 (3,2%)	p= 0,777	(0,10-5,52)
Total	53 (100,0%)	88 (100,0%)			47 (100,0%)	62 (100,0%)		
Tabagismo								
Não fumante	17 (32,1%)	54 (62,1%)	$\chi^2 = 11,85$	0,28	10 (21,3%)	42 (68,9%)	$\chi^2 = 24,07$	0,12
Fumante	36 (67,9%)	33 (37,9%)	p= 0,006	(0,14-0,59)	37 (78,7%)	19 (31,1%)	p= 0,000	(0,05-0,29)
Total	53 (100,0%)	87 (100,0%)			47 (100,0%)	61 (100,0%)		
Etilismo								
Não etilista	18 (33,9%)	73 (93,9%)	$\chi^2 = 36,11$	0,09	17 (36,2%)	55 (90,2%)	$\chi^2 = 34,83$	0,06
Etilista	35 (66,1%)	14 (16,1%)	p= 0,000	(0,04-0,22)	30 (63,8%)	6 (9,8%)	p= 0,000	(0,02-0,17)
Total	53 (100,0%)	87 (100,0%)			47 (100,0%)	61 (100,0%)		



Tabela 16. Porcentagens dos genótipos *GSTT1* positivo e nulo nas amostras de indivíduos com gastrite crônica (GC) e controles (C), segundo as variáveis sexo, etnia, tabagismo e etilismo, e resultado do teste de χ^2 e valor de *Odds Ratio* (OR) com intervalo de confiança (IC) de 95%.

Variável	Genótipo							
	<i>GSTT1</i> positivo				<i>GSTT1</i> nulo			
	GC	C	Estatística Probabilidade	OR IC (95%)	GC	C	Estatística Probabilidade	OR IC (95%)
Sexo								
Masculino	45 (51,1%)	70 (57,4%)	$\chi^2 = 0,80$	0,77	9 (75,0%)	20 (71,4%)	$\chi^2 = 0,05$	1,20
Feminino	43 (48,9%)	52 (42,8%)	p= 0,770	(0,44-1,34)	3 (25,0%)	8 (28,6%)	p= 0,816	(0,25-5,61)
Total	88 (100,0%)	122 (100,0%)			12 (100,0%)	28 (100,0%)		
Etnia								
Caucasóide	75 (85,2%)	114 (93,4%)	$\chi^2 = 3,83$	0,40	12 (100,0%)	21 (75,0%)	$\chi^2 = 3,64$	
Negróide	13 (14,8%)	8 (6,6%)	p= 0,502	(0,16-1,02)	0 (0,0%)	7 (25,0%)	p= 0,056	
Total	88 (100,0%)	122 (100,0%)			12 (100,0%)	28 (100,0%)		
Tabagismo								
Não fumante	36 (40,9%)	84 (70,0%)	$\chi^2 = 17,00$	0,29	6 (50,0%)	12 (42,8%)	$\chi^2 = 0,17$	1,33
Fumante	52 (59,1%)	36 (30,0%)	p= 0,000	(0,16-0,52)	6 (50,0%)	16 (57,2%)	p= 0,677	0,34-5,17)
Total	88 (100,0%)	120 (100,0%)			12 (100,0%)	28 (100,0%)		
Etilismo								
Não etilista	49 (55,7%)	104 (86,7%)	$\chi^2 = 25,06$	0,19	3 (25,0%)	24 (85,7%)	$\chi^2 = 14,11$	0,05
Etilista	39 (44,3%)	16 (13,3%)	p= 0,000	(0,09-0,37)	9 (75,0%)	4 (14,3%)	p= 0,002	(0,01-0,29)
Total	88 (100,0%)	120 (100,0%)			12 (100,0%)	28 (100,0%)		

Tabela 17. Porcentagens dos genótipos *GSTM1* positivo e nulo nas amostras de indivíduos com gastrite crônica (GC) e controles (C), segundo as variáveis sexo, etnia, tabagismo e etilismo, e resultado do teste de χ^2 e valor de *Odds Ratio* (OR) com intervalo de confiança (IC) de 95%.

Variável	Genótipo							
	<i>GSTM1</i> positivo				<i>GSTM1</i> nulo			
	GC	C	Estatística Probabilidade	OR IC (95%)	GC	C	Estatística Probabilidade	OR IC (95%)
Sexo								
Masculino	34 (54,8%)	54 (61,4%)	$\chi^2 = 0,64$	0,82	20 (52,6%)	36 (58,1%)	$\chi^2 = 0,28$	0,80
Feminino	28 (45,2%)	34 (38,6%)	$p = 0,424$	(0,42-1,60)	18 (47,4%)	26 (41,9%)	$p = 0,595$	(0,35-1,80)
Total	62 (100,0%)	88 (100,0%)			38 (100,0%)	62 (100,0%)		
Etnia								
Caucasóide	56 (90,3%)	75 (85,2%)	$\chi^2 = 0,85$	1,61	31 (81,6%)	60 (96,8%)	$\chi^2 = 6,64$	0,14
Negróide	6 (9,7%)	13 (14,9%)	$p = 0,355$	(0,57-4,52)	7 (18,4%)	2 (3,2%)	$p = 0,010$	(0,02-0,75)
Total	62 (100,0%)	88 (100,0%)			38 (100,0%)	62 (100,0%)		
Tabagismo								
Não fumante	26 (41,9%)	54 (62,1%)	$\chi^2 = 5,90$	0,44	16 (42,1%)	42 (68,9%)	$\chi^2 = 6,90$	0,32
Fumante	36 (58,1%)	33 (37,9%)	$p = 0,015$	(0,22-0,85)	22 (57,9%)	19 (31,1%)	$p = 0,008$	(0,14-0,76)
Total	62 (100,0%)	87 (100,0%)			38 (100,0%)	61 (100,0%)		
Etilismo								
Não etilista	33 (53,2%)	73 (83,9%)	$\chi^2 = 16,60$	0,21	19 (50,0%)	55 (90,2%)	$\chi^2 = 20,01$	0,10
Etilista	29 (46,8%)	14 (16,1%)	$p = 0,000$	(0,10-0,46)	19 (50,0%)	6 (9,8%)	$p = 0,000$	(0,03-0,34)
Total	62 (100,0%)	87 (100,0%)			38 (100,0%)	61 (100,0%)		

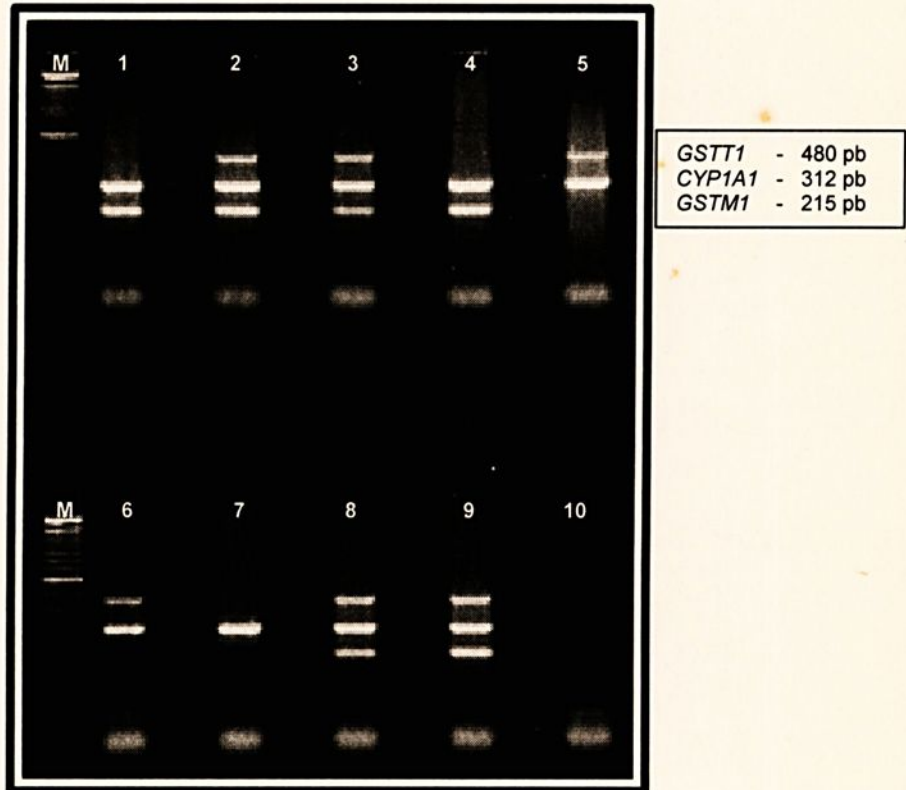


Figura 1. Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio, mostrando padrões de migração para os fragmentos amplificados dos genes polimórficos *GSTT1* (480 pb) e *GSTM1* (215 pb) e o marcador interno de amplificação *CYP1A1* (312 pb). M corresponde ao marcador de tamanho molecular (100 pb). Nas linhas 1 e 4 observa-se o genótipo 0/+ (casos TUG-03 e TUG-19); nas linhas 2, 3, 8 e 9, observa-se o genótipo +/+ (casos TUG-04, GC-99, GC-100 e C-27); nas linhas 5 e 6, o genótipo +/0 (casos TUG-12, C-38) e na linha 7 o genótipo 0/0 (casos TUG-80). A linha 10 corresponde ao controle negativo.

Todos os indivíduos também foram submetidos a investigação do polimorfismo do gene *CYP2E1/PstI*. O alelo polimórfico *CYP2E1*c2* foi observado somente em heterozigose (*c1/c2*), e está exemplificado na Figura 2. A Tabela 18 apresenta as frequências dos genótipos obtidos para o polimorfismo do gene *CYP2E1/PstI* nos três grupos e o resultado do teste de χ^2 . O genótipo *c1/c2* ocorreu em 11,0% dos pacientes com tumor gástrico, frequência essa similar àquelas observadas nos grupos com gastrite crônica (9,0%) e controles (10,7%). Portanto, a frequência do polimorfismo *CYP2E1*c2* não diferiu estatisticamente entre os três grupos estudados ($\chi^2 = 0,25$; $p = 0,878$). Investigou-se também alguma possível associação do polimorfismo do gene *CYP2E1/PstI* com algumas variáveis como sexo, etnia, tabagismo, etilismo, exposição a agrotóxico, infecção pelo *H. pylori* e tipo histológico de adenocarcinoma, porém não foi observada nenhuma dependência dessas variáveis em relação ao polimorfismo estudado nas amostras de indivíduos com tumor gástrico, gastrite crônica e controles, conforme dados apresentados nas Tabelas 19, 20 e 21, respectivamente.

As Tabelas 22, 23 e 24 apresentam os resultados do teste de χ^2 e valores do *odds ratio*, para comparações entre as porcentagens dos genótipos para o polimorfismo *CYP2E1/PstI* e os fatores sexo, etnia, tabagismo, etilismo, exposição a agrotóxico e infecção pelo *H. pylori*, nas amostras de indivíduos com tumor gástrico, gastrite crônica e controles. Encontrou-se associação entre o genótipo selvagem *c1/c1* e as variáveis sexo, tabagismo, etilismo, exposição a agrotóxico e infecção pelo *H. pylori*, em consequência da frequência mais elevada desse genótipo na amostra TUG, em indivíduos do sexo masculino, fumantes, etilistas, expostos a agrotóxico e *H. pylori* negativo. Entre os indivíduos da amostra com tumor gástrico e controles, verificou-se associação entre o genótipo *c1/c1* com as variáveis sexo, tabagismo e etilismo, também devido às porcentagens superiores na amostra de tumor gástrico e entre as amostras de gastrite crônica e controles, foram encontradas associações entre o genótipo *c1/c1* e as variáveis tabagismo e etilismo, sendo mais freqüente no grupo GC.

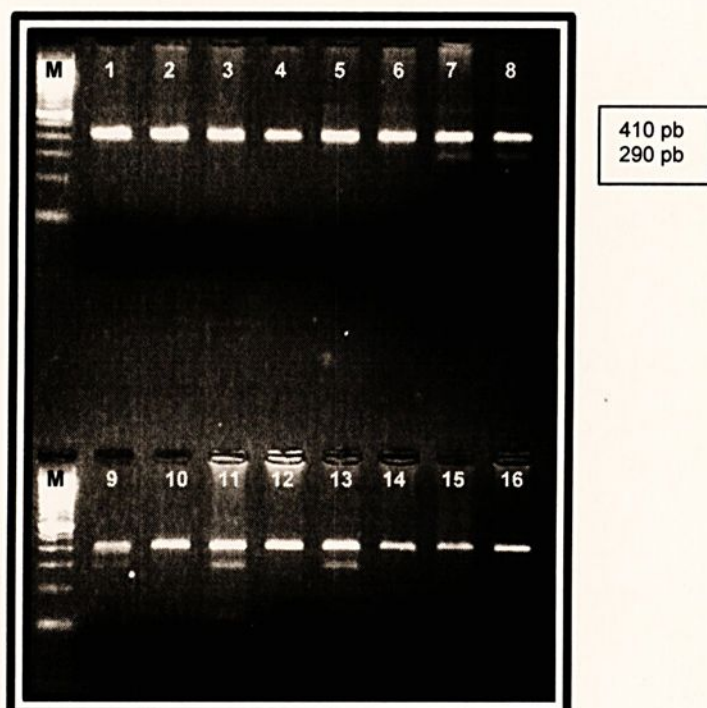


Figura 2. Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio, apresentando os genótipos observados para o gene *CYP2E1* após digestão com a enzima *Pst*I: *c1/c1* (410 pb) e *c1/c2* (410 pb e 290 pb). M corresponde ao marcador de tamanho molecular (100pb). Nas linhas 1 a 6, 10, 12 e 14 a 16 observa-se o genótipo *c1/c1* (casos TUG-09, TUG-47, TUG-79, TUG-90, GC-04, GC-23, GC-70, GC-82, C-11, C-31, C-127) e nas linhas 7 a 9, 11 e 13 observa-se o genótipo *c1/c2* (casos TUG-32, TUG-87, GC-81, GC-93 e C-39).

Tabela 18. Porcentagens dos genótipos para o polimorfismo *CYP2E1/PstI* na amostra de indivíduos com tumor gástrico (TUG) segundo as variáveis sexo, etnia, tabagismo, etilismo, exposição a agrotóxicos, infecção pelo *Helicobacter pylori* e tipo de adenocarcinoma e resultado do teste exato de Fisher.

Tabela 18. Porcentagens dos genótipos para o polimorfismo *CYP2E1/PstI* e resultado do teste de χ^2 nas amostras de indivíduos com tumor gástrico (TUG), gastrite crônica (GC) e controles (C).

Amostra	Genótipo	
	c1/c1	c1/c2
TUG	89 (89,0%)	11 (11,0%)
GC	91 (91,0%)	9 (9,0%)
C	134 (89,3%)	16 (10,7%)
Estatística/ Probabilidade	$\chi^2 = 0,25$; p= 0,878	
c1/c1 = homozigoto selvagem para o polimorfismo <i>CYP2E1/PstI</i>		
c1/c2 = heterozigoto para o polimorfismo <i>CYP2E1/PstI</i>		

Tabela 19. Porcentagens dos genótipos para o polimorfismo *CYP2E1/PstI* na amostra de indivíduos com tumor gástrico (TUG) segundo as variáveis sexo, etnia, tabagismo, etilismo, exposição a agrotóxico, infecção pelo *H. pylori* e tipo de adenocarcinoma, e resultado do teste exato de Fisher.

Variável	Genótipo		
	c1/c1	c1/c2	Total
Sexo			
Masculino	66 (90,4%)	7 (9,6%)	73 (100,0%)
Feminino	23 (85,2%)	4 (14,8%)	27 (100,0%)
Probabilidade	p = 0,481		
Etnia			
Caucasóide	77 (88,5%)	10 (11,5%)	87 (100,0%)
Negróide	12 (92,3%)	1(7,7%)	13 (100,0%)
Probabilidade	p = 1,000		
Tabagismo			
Não Fumante	23 (85,2%)	4 (14,8%)	27 (100,0%)
Fumante	66 (90,4%)	7 (9,6%)	73 (100,0%)
Probabilidade	p = 0,481		
Etilismo			
Não Etilista	29 (82,9%)	6 (17,1%)	35 (100,0%)
Etilista	60 (92,3%)	5 (7,7%)	65 (100,0%)
Probabilidade	p = 0,185		
Exposição a agrotóxico			
Não exposto	32 (86,5%)	5 (13,5%)	37 (100,0%)
Exposto	55 (91,7%)	5 (8,3%)	60 (100,0%)
Probabilidade	p = 0,498		
Infecção por <i>H. pylori</i>			
<i>H. pylori</i> +	12 (92,3%)	1 (7,7%)	13 (100,0%)
<i>H. pylori</i> -	27 (90,0%)	3 (10,0%)	30 (100,0%)
Probabilidade	p = 1,000		
Adenocarcinoma			
Tipo intestinal	41 (91,1%)	4 (8,9%)	45 (100,0%)
Tipo difuso	37 (86,1%)	6 (13,9%)	43 (100,0%)
Probabilidade	p = 0,516		

Tabela 20. Porcentagens dos genótipos para o polimorfismo *CYP2E1/PstI* na amostra de indivíduos com gastrite crônica (GC) segundo as variáveis sexo, etnia, tabagismo, etilismo, exposição a agrotóxico e infecção por *H. pylori*, e resultado do teste exato de Fisher.

Variável	Genótipo		
	c1/c1	c1/c2	Total
Sexo			
Masculino	50 (92,6%)	4 (7,4%)	54 (100,0%)
Feminino	41(89,1%)	5 (10,9%)	46 (100,0%)
Probabilidade	p =0,728		
Etnia			
Caucasóide	79 (90,8%)	8 (9,2%)	87 (100,0%)
Negróide	12 (92,3%)	1(7,7%)	13 (100,0%)
Probabilidade	p = 1,000		
Tabagismo			
Não Fumante	39 (92,9%)	3 (7,1%)	42 (100,0%)
Fumante	52 (89,6%)	6 (10,3%)	58 (100,0%)
Probabilidade	p = 0,730		
Etilismo			
Não Etilista	45 (86,5%)	7 (13,5%)	52 (100,0%)
Etilista	46 (95,8%)	2 (4,2%)	48 (100,0%)
Probabilidade	p = 0,162		
Exposição a agrotóxico			
Não exposto	46 (90,2%)	5 (9,8%)	51(100,0%)
Exposto	32 (96,9%)	1 (3,1%)	33 (100,0%)
Probabilidade	p =0,395		
Infecção por <i>H. pylori</i>			
<i>H. pylori</i> +	53 (88,3%)	7 (11,7%)	60 (100,0%)
<i>H. pylori</i>	37 (94,9%)	2 (5,1%)	39 (100,0%)
Probabilidade	p =0,476		

Tabela 21. Porcentagens dos genótipos para o polimorfismo *CYP2E1/PstI* na amostra controle (C) segundo as variáveis sexo, etnia, tabagismo e etilismo, e resultado do teste de Qui-quadrado (χ^2).

Variável	Genótipo		
	c1/c1	c1/c2	Total
Sexo			
Masculino	79 (87,8%)	11 (12,2%)	90 (100,0%)
Feminino	55 (91,7%)	5 (8,3%)	60 (100,0%)
Estatística/ Probabilidade	$\chi^2 = 0,55$; $p = 0,449$		
Etnia			
Caucasóide	121(89,6%)	14 (10,4%)	135 (100,0%)
Negróide	13 (86,7%)	2 (13,3%)	15 (100,0%)
Estatística/ Probabilidade	$\chi^2 = 0,12$; $p = 0,724$		
Tabagismo			
Não Fumante	85 (88,5%)	11 (11,4%)	96 (100,0%)
Fumante	48 (92,3%)	4 (7,7%)	52 (100,0%)
Estatística/ Probabilidade	$\chi^2 = 0,69$; $p = 0,406$		
Etilismo			
Não Etilista	113 (88,3%)	15 (11,7%)	128 (100,0%)
Etilista	20 (100,0%)	0 (0,0%)	20 (100,0%)
Estatística/ Probabilidade	$\chi^2 = 2,32$; $p = 0,127$		

Tabela 22. Porcentagens dos genótipos para o polimorfismo *CYP2E1/PstI* nas amostras de indivíduos com tumor gástrico (TUG) e gastrite crônica (GC), segundo as variáveis sexo, etnia, tabagismo, etilismo, exposição a agrotóxico e infecção pelo *H. pylori*, e resultado do teste de χ^2 e valor de Odds Ratio (OR) com intervalo de confiança (IC) de 95%.

Variável	Genótipo							
	c1/c1				c1/c2			
	TUG	GC	Estatística/ Probabilidade	OR IC (95%)	TUG	GC	Estatística/ Probabilidade	OR IC (95%)
Sexo								
Masculino	66 (74,2%)	50 (54,9%)	$\chi^2 = 7,25$	2,35	7 (63,6%)	4 (44,4%)	$\chi^2 = 0,74$	2,18
Feminino	23 (25,8%)	41 (45,1%)	$p = 0,007$	(1,25-4,41)	4 (36,4%)	5 (55,6%)	$p = 0,390$	(0,36-13,22)
Total	89 (100,0%)	91 (100,0%)			11 (100,0%)	9 (100,0%)		
Etnia								
Caucasóide	77 (86,5%)	79 (86,8%)	$\chi^2 = 0,00$	0,97	10 (90,9%)	8 (88,9%)	$\chi^2 = 0,02$	1,25
Negróide	12 (13,5%)	12 (13,2%)	$p = 0,953$	(0,41-2,30)	1 (9,1%)	1 (11,1%)	$p = 0,880$	(0,06-23,26)
Total	89 (100,0%)	91 (100,0%)			11 (100,0%)	9 (100,0%)		
Tabagismo								
Não fumante	23 (25,8%)	39 (42,8%)	$\chi^2 = 5,77$	0,46	4 (36,4%)	3 (33,3%)	$\chi^2 = 0,02$	1,14
Fumante	66 (74,2%)	52 (57,2%)	$p = 0,016$	(0,24-0,87)	7 (63,6%)	6 (66,7%)	$p = 0,887$	(0,17-7,28)
Total	89 (100,0%)	91 (100,0%)			11 (100,0%)	9 (100,0%)		
Etilismo								
Não etilista	29 (32,6%)	45 (49,5%)	$\chi^2 = 5,29$	0,49	6 (54,5%)	7 (77,8%)	$\chi^2 = 1,17$	0,34
Etilista	60 (67,4%)	46 (50,5%)	$p = 0,021$	(0,27-0,90)	5 (45,5%)	2 (22,2%)	$p = 0,278$	(0,04-2,45)
Total	89 (100,0%)	91 (100,0%)			11 (100,0%)	9 (100,0%)		
Exposição a agrotóxico								
Não exposto	32 (36,8%)	46 (58,9%)	$\chi^2 = 8,13$	0,40	5 (50,0%)	5 (83,3%)	$\chi^2 = 1,78$	0,20
Exposto	55 (63,2%)	32 (41,1%)	$p = 0,004$	(0,21-0,75)	5 (50,0%)	1 (16,7%)	$p = 0,182$	(0,01-2,38)
Total	87 (100,0%)	78 (100,0%)			10 (100,0%)	6 (100,0%)		
Infecção pelo <i>H. pylori</i>								
<i>H. pylori</i> +	12 (30,7%)	53 (58,8%)	$\chi^2 = 8,61$	0,31	1 (25,0%)	7 (77,8%)	$\chi^2 = 3,26$	0,09
<i>H. pylori</i> -	27 (69,2%)	37 (41,2%)	$p = 0,034$	(0,14-0,69)	3 (75,0%)	2 (22,2%)	$p = 0,071$	(0,06-1,49)
Total	39 (100,0%)	90 (100,0%)			4 (100,0%)	9 (100,0%)		

Tabela 23. Porcentagens dos genótipos para o polimorfismo *CYP2E1/PstI* nas amostras de indivíduos com tumor gástrico (TUG) e controles (C), segundo as variáveis sexo, etnia, tabagismo e etilismo, e resultado do teste de χ^2 e valor de *Odds Ratio* (OR) com intervalo de confiança (IC) de 95%.

Variável	Genótipo							
	c1/c1				c1/c2			
	TUG	C	Estatística Probabilidade	OR IC (95%)	TUG	C	Estatística Probabilidade	OR IC (95%)
Sexo								
Masculino	66 (74,2%)	79 (58,9%)	$\chi^2 = 5,43$	1,99	7 (63,6%)	11 (68,8%)	$\chi^2 = 0,08$	0,79
Feminino	23 (25,8%)	55 (41,1%)	p= 0,019	(1,11-3,59)	4 (36,4%)	5 (31,2%)	p= 0,781	(0,15-4,02)
Total	89 (100,0%)	134 (100,0%)			11 (100,0%)	16 (100,0%)		
Etnia								
Caucasóide	77 (86,5%)	121 (90,3%)	$\chi^2 = 0,77$	0,68	10 (90,9%)	14 (87,5%)	$\chi^2 = 0,08$	1,42
Negróide	12 (13,5%)	13 (9,7%)	p= 0,380	(0,29-1,58)	1 (9,1%)	2 (12,5%)	p= 0,781	(0,11-18,00)
Total	89 (100,0%)	134 (100,0%)			11 (100,0%)	16 (100,0%)		
Tabagismo								
Não fumante	23 (25,8%)	85 (63,9%)	$\chi^2 = 30,93$	0,19	4 (36,4%)	11 (73,3%)	$\chi^2 = 3,55$	0,20
Fumante	66 (74,2%)	48 (36,1%)	p= 0,000	(0,10-0,35)	7 (63,6%)	4 (26,7%)	p= 0,059	0,03-1,11
Total	89 (100,0%)	133 (100,0%)			11 (100,0%)	15 (100,0%)		
Etilismo								
Não etilista	29 (32,6%)	113 (84,9%)	$\chi^2 = 63,46$	0,08	6 (54,5%)	15 (100,0%)	$\chi^2 = 8,44$	
Etilista	60 (67,4%)	20 (15,1%)	p= 0,000	(0,04-0,16)	5 (45,5%)	0	p= 0,037	
Total	89 (100,0%)	133 (100,0%)			11 (100,0%)	15 (100,0%)		

Tabela 24. Porcentagens dos genótipos para o polimorfismo *CYP2E1/PstI* nas amostras de indivíduos com gastrite crônica (GC) e controles (C), segundo as variáveis sexo, etnia, tabagismo e etilismo, e resultado do teste de χ^2 e valor de *Odds Ratio* (OR) com intervalo de confiança (IC) de 95%.

Variável	Genótipo							
	c1/c1				c1/c2			
	GC	C	Estatística Probabilidade	OR IC (95%)	GC	C	Estatística Probabilidade	OR IC (95%)
Sexo								
Masculino	50 (54,9%)	79 (58,9%)	$\chi^2 = 0,36$	0,84	4 (44,4%)	11 (68,8%)	$\chi^2 = 1,42$	0,36
Feminino	41 (45,1%)	55 (41,1%)	p= 0,550	(0,49-1,45)	5 (55,6%)	5 (31,2%)	p= 0,233	(0,06-1,96)
Total	91 (100%)	134 (100%)			9 (100%)	16 (100%)		
Etnia								
Caucasóide	79 (86,8%)	121 (90,3%)	$\chi^2 = 0,67$	0,70	8 (88,9%)	14 (87,5)	$\chi^2 = 0,01$	0,36
Negróide	12 (13,2%)	13 (9,7%)	p= 0,414	(0,30-1,62)	1 (11,1%)	2 (12,5%)	p= 0,918	(0,02-4,50)
Total	91 (100%)	134 (100%)			9 (100%)	16 (100%)		
Tabagismo								
Não fumante	39 (42,9%)	85 (63,9%)	$\chi^2 = 9,69$	0,42	3 (33,3%)	11 (73,4%)	$\chi^2 = 3,70$	0,18
Fumante	52 (57,1%)	48 (36,1%)	p= 0,001	(0,24-0,73)	6 (66,7%)	4 (26,6%)	p= 0,054	(0,03-1,09)
Total	91 (100%)	133 (100%)			9 (100%)	15 (100%)		
Etilismo								
Não etilista	45 (49,4%)	113 (84,9%)	$\chi^2 = 32,79$	0,17	7 (77,8%)	15 (100,0%)	$\chi^2 = 3,64$	
Etilista	46 (50,6%)	20 (15,1%)	p= 0,000	(0,09-0,32)	2 (22,2%)	0 (0,0%)	p= 0,056	
Total	91 (100%)	133 (100%)			9 (100%)	15 (100%)		

IV - Discussão

IV.1 Fatores ambientais e câncer gástrico

O câncer de estômago apresentou nos últimos 60 anos acentuado declínio. Tal fato deve-se principalmente ao aumento da incidência de outros tipos de câncer, particularmente o de pulmão e também às mudanças nos hábitos alimentares ocorridas especialmente após a Segunda Guerra Mundial, quando aumentaram o consumo de vegetais e frutas frescas, assim como o uso da refrigeração para a preservação dos alimentos, substituindo as conservas em salmora. No entanto, mundialmente, ele permanece como o segundo tipo de câncer mais comum entre os homens e o terceiro entre as mulheres e devido ao seu diagnóstico tardio apresenta um prognóstico bastante reservado, disputando com o câncer de pulmão a principal causa de morte quando considera-se todos os tipos de neoplasias (Correa & Chen, 1994; Stadländer & Waterbor, 1999; INCA, 2002).

Vários fatores têm sido relacionados em sua etiologia, como o elevado consumo de sal, alimentos com conservantes como nitritos e nitratos, tabagismo, etilismo, infecção pelo *H. pylori*, gastrectomia anterior e lesões gástricas como gastrite crônica atrófica e metaplasia intestinal (AICR, 1997; De Vita *et al.*, 1997; Cotran *et al.*, 1999).

No presente trabalho, obteve-se informações sobre alguns fatores ambientais como tabagismo, etilismo, exposição a agrotóxicos e infecção pelo *H. pylori* em indivíduos com câncer gástrico e em indivíduos com gastrite crônica, uma lesão precursora do câncer gástrico, assim como em indivíduos saudáveis.

A idade média dos indivíduos com tumor gástrico foi cerca de 60 anos, sendo a faixa etária entre 50 a 69 anos a que apresentou maior número de indivíduos. Esses dados estão de acordo com a literatura que indica uma frequência baixa de câncer gástrico aos 40 anos,

mas aumentando progressivamente com a idade até atingir seu valor mais elevado por volta dos 70 anos (De Vita *et al.*, 1997). A idade média dos indivíduos com gastrite crônica e controles apresentou-se mais baixa, aproximadamente 54 anos.

A maioria dos indivíduos (73%) com tumor gástrico era do sexo masculino com uma relação de 2,7 homens:1 mulher. Conforme dados estatísticos, tanto em áreas com alta ou baixa incidência de câncer gástrico, a taxa de homens afetados é maior do que a taxa de mulheres em cerca de duas vezes (AICR, 1997). Uma possível explicação é que os homens apresentam uma maior exposição a fatores de risco como o tabagismo e o etilismo, além disso, as mulheres se mostram mais preocupadas com a saúde realizando exames periodicamente. No presente trabalho, o número de indivíduos do sexo masculino tabagistas, etilistas e expostos a agrotóxicos foi estatisticamente maior quando comparado ao das mulheres. Em relação a gastrite crônica a razão homem:mulher foi praticamente 1. Munoz *et al.* (1996), também não encontraram diferenças quanto ao sexo em relação à lesões gástricas benignas como a gastrite crônica.

Também tem sido relatada uma maior incidência de câncer gástrico em indivíduos negros e tal fato é atribuído principalmente à diferenças no nível sócio-econômico entre brancos e negros (Neugut *et al.*, 1996) Os indivíduos participantes desse trabalho foram classificados como negróides ou caucasóides, considerando-se a cor da pele, características faciais e textura do cabelo. Tal classificação parece ser mais adequada ao Brasil, pelo fato da miscigenação racial ser bastante comum na população dificultando a classificação em brancos e negros. Em relação aos indivíduos com câncer gástrico, 87% foram classificados como caucasóide e 13% como negróides, tendo o mesmo ocorrido em relação aos indivíduos com gastrite crônica. Provavelmente, devido às características regionais, onde observa-se uma prevalência de caucasóides.

A maioria dos indivíduos com tumor gástrico (73%) são fumantes ou ex-fumantes, com uma média de consumo de 17 cigarros por dia e por um tempo médio de 34 anos. Na amostra de gastrite crônica, uma porcentagem elevada dos indivíduos (58%) também são fumantes ou ex-fumantes (58%) com consumo médio de 30 anos e 18 cigarros por dia. Por outro lado, nos controles, observou-se uma menor porcentagem (35%) de indivíduos fumantes ou ex-fumantes, embora o tempo do hábito e a quantidade de cigarros consumida diariamente sejam similares às demais amostras. A participação do tabagismo na etiologia do câncer gástrico ainda é bastante discutida e poucos trabalhos têm sido realizados com o objetivo de estabelecer uma melhor correlação entre estes parâmetros. De acordo com o INCA (2002), o hábito de fumar apresenta uma relação causal direta com as neoplasias de pulmão, laringe, boca, lábio, faringe, esôfago, pâncreas e pelve renal, estando implicado em grau moderado com o câncer de estômago.

Na fumaça do cigarro são encontrados alguns compostos relacionados com a tumorigênese gástrica como nitrosaminas, especialmente a 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona, uma nitrosamina tabaco-específica e o catecol, o qual atua na inibição da síntese de DNA e interfere na eliminação de células transformadas pelas células normais. Já foi demonstrado que ele é indutor de adenocarcinomas gástricos em ratos (Standtländer & Waterbor, 1999).

Mizoue *et al.* (2000) encontraram um risco duas vezes maior de câncer gástrico em indivíduos fumantes quando comparados aos indivíduos que nunca haviam fumado, embora não tenham encontrado uma relação dose-resposta. Outros trabalhos também já tinham constatado que o tabagismo constitui um fator de risco para o desenvolvimento de câncer gástrico, apesar de não terem encontrado uma relação dose-resposta (Chyou *et al.*, 1990; Nomura *et al.*, 1990; Boeing *et al.*, 1991). De modo contrário, outros estudos encontraram um risco significativamente maior de câncer gástrico em indivíduos fumantes,

sendo o risco proporcional ao número de cigarros consumidos por dia e ao tempo de duração do hábito (Ji *et al.*, 1996; Ye *et al.*, 1999; Zaridze *et al.*, 2000).

Yuo *et al.* (2001) verificaram que o risco de progressão de infecções gástricas para lesões pré-neoplásicas como displasia ou câncer gástrico é moderadamente aumentado em indivíduos fumantes, sendo proporcional ao tempo de consumo do tabaco.

O consumo de álcool é outro fator cuja participação na etiologia do câncer gástrico permanece controversa. Nesse trabalho, o número de indivíduos etilistas com câncer gástrico foi estatisticamente maior quando comparado aos demais grupos, sendo relatado o consumo freqüente de bebidas fermentadas e destiladas.

De acordo com o IARC (*International Agency for Research on Cancer*), o consumo de álcool está fortemente relacionado com o desenvolvimento de câncer de boca, faringe, laringe, esôfago e fígado, no entanto sua participação na etiologia do câncer gástrico permanece não esclarecida (Longnecker & Enger, 1996). Os possíveis mecanismos pelos quais o álcool pode aumentar o risco geral de câncer inclui a carcinogenicidade do acetaldeído, um metabólito do álcool, que forma adutos de proteínas, resultando na produção de anticorpos, inativação de enzimas e prejuízos no sistema de reparo do DNA, além disso aumenta o índice de quebras no DNA; os conservantes presentes nas bebidas alcoólicas; seus efeitos na integridade da membrana celular; aumento da peroxidação de lipídios e conseqüentemente, a produção de radicais livres; alterações nos níveis hormonais, particularmente de estrógeno e prejuízos no metabolismo e aproveitamento de nutrientes (Lieber, 1991; Navasumrit *et al.*, 2000; Greenwald *et al.*, 2001).

Particularmente, em relação à mucosa gástrica, experimentos *in vitro* têm demonstrado que o etanol causa hiperemia, edema e necrose, especialmente das células epiteliais superficiais e também hemorragia da mucosa e submucosa. Dessa forma, o etanol



provoca destruição da integridade do epitélio gástrico, tornando-o mais suscetível a ação de carcinógenos derivados de metabolização do próprio etanol, assim como em outros compostos (Hummadi *et al.*, 1999).

De Stefani *et al.* (1998) encontraram um risco 2,4 vezes maior de câncer gástrico em homens etilistas, que consumiam bebidas destiladas e/ou fermentadas. Zaridze *et al.* (2000) verificaram que o consumo de álcool, principalmente de bebidas destiladas, estava relacionado com o aumento de risco de câncer gástrico na região da cárdia em homens, especialmente quando associado ao hábito de fumar, sugerindo um efeito sinérgico entre etilismo e tabagismo na tumorigênese gástrica. Enquanto, Ji *et al.* (1996) encontraram um risco moderadamente aumentado de câncer gástrico distal em indivíduos etilistas. Porém, outros estudos não sustentam a associação entre câncer gástrico e consumo de álcool (Choi *et al.*, 1991; Galanis *et al.*, 1998).

A exposição a agrotóxicos é outro fator ambiental muito pouco explorado em relação a etiologia do câncer gástrico. Uma grande parte dos indivíduos com tumor gástrico relataram exposição a agrotóxico devido atividade ocupacional, pois muitos são ou foram trabalhadores rurais. O número de indivíduos com câncer gástrico expostos a agrotóxicos diferiu estatisticamente do grupo com gastrite crônica, em que uma menor porcentagem relatou a prática de atividades rurais. Há indicações de associação entre um risco maior de câncer gástrico com mortalidade aumentada e a exposição ao ácido fenoxiacético, um composto presente em herbicidas (Axelson *et al.*, 1980; Ekström *et al.*, 1999). Todavia, Wesseling *et al.* (1999), estudando populações colombianas que apresentavam alto risco de câncer, verificaram uma associação positiva entre a exposição a agrotóxicos, especialmente pesticidas, com a ocorrência de determinados tipos de neoplasias como câncer de pulmão, mama e pele, mas não verificaram associação com câncer de estômago. Na região de São José do Rio Preto-SP, segundo informações da Casa da Agricultura, é comum a utilização de herbicidas e

pesticidas, em culturas de cana-de-açúcar e laranja, os quais apresentam compostos com possível ação carcinogênica.

Os agrotóxicos são formulações complexas, contendo além do princípio ativo, diversos outros componentes, tais como, solventes, agentes emulsificantes e aditivos. Além disso, é comum o uso de vários pesticidas contendo formulações diferentes, dependendo da fase de vida da planta. Desse modo, a exposição torna-se complexa e o biomonitoramento dos indivíduos expostos à substâncias específicas pode ser dificultado (Falk *et al.*, 1999). Quanto às vias de absorção destacam-se principalmente as vias dérmicas, digestória e respiratória. Os compostos organoclorados, por exemplo, são altamente lipossolúveis, sendo rápida e eficazmente absorvidos pelo trato digestório. A absorção ocorre principalmente em indivíduos que trabalham na aplicação dessas substâncias sob a forma de pulverização e nebulização. Os possíveis mecanismos envolvidos no processo de malignização pelos agrotóxicos são inúmeros e podem atingir direta ou indiretamente o material genético. Compostos químicos presentes nos agrotóxicos tendem a se acumular na parte lipídica da membrana celular e dessa forma, podem interferir nas *gap-junctions* e portanto na comunicação intercelular. Este fato poderia determinar a perda de transmissão de fatores reguladores de divisão e diferenciação e conseqüentemente da restrição ao crescimento impostos por células normais sobre células iniciadas, levando a uma proliferação desordenada dessas últimas. Um outro mecanismo pelo qual os defensivos agrícolas poderiam agir na malignização envolve danos diretos ao material genético. Diferentes estudos sobre a ação desses compostos têm revelado freqüências elevadas de aberrações cromossômicas em indivíduos ocupacionalmente expostos a tais compostos (De Ferrari *et al.*, 1991; Falk *et al.*, 1999; Au *et al.*, 1999).

A infecção pelo *H. pylori* tem sido um fator bastante investigado quanto a sua participação na tumorigênese gástrica. Um alto risco de desenvolvimento de câncer gástrico tem sido registrado em

indivíduos com testes sorológicos positivos para *H. pylori* (Correa *et al.*, 1990; Nomura *et al.*, 1991; Sipponen *et al.*, 1993; O'Connor *et al.*, 1996; Siman *et al.*, 1997; El-Omar *et al.*, 2000; Uemura *et al.*, 2001). O grupo de estudos *Eurogast*, em 1993, constatou uma associação estatisticamente significativa entre câncer gástrico e soropositividade para *H. pylori* em 70 populações de 13 países, levando a IARC, em 1994, a declarar que o *H. pylori* é carcinogênico para humanos e assim, classificando-o como um carcinógeno do grupo 1 (Valle & Gisbert, 2001). No entanto, outros estudos não apoiam tal associação (Huang *et al.*, 1999; Danesh *et al.*, 1999).

A infecção pelo *H. pylori* é considerada a principal causa de gastrite crônica. Cerca de 61% dos indivíduos com gastrite crônica nesse estudo foram classificados como Hp+, no entanto esse número pode ter sido subestimado, pois foi realizado apenas o diagnóstico histológico, podendo ocorrer resultados falsos negativos. Uma forma de minimizar tal condição seria a realização do diagnóstico molecular da bactéria. Em relação aos indivíduos com tumor gástrico, a maioria teve diagnóstico histológico negativo de *H. pylori*. Segundo alguns autores, essa subestimativa está relacionada com a própria característica da mucosa gástrica dos pacientes com câncer de estômago, pois geralmente apresentam uma mucosa severamente atrófica associada à metaplasia intestinal, assim aumentando a chance de uma subdetecção ou perda espontânea da infecção por esta bactéria (Asaka *et al.*, 1992; Fukuda *et al.*, 1995). Assim, para reduzir os riscos de um diagnóstico falso negativo, o ideal seria realizar a investigação molecular da bactéria em tecido adjacente ao tumor. Por isso, o diagnóstico histológico de *H. pylori* em tecido neoplásico não constitui uma prática habitual, pela alta frequência de resultados falsos negativos, justificando o motivo pelo qual a maioria dos indivíduos com tumor gástrico não apresentam diagnóstico de *H. pylori*.

Aproximadamente um terço dos indivíduos com gastrite crônica *H. pylori* positivos desenvolvem gastrite crônica atrófica e metaplasia intestinal, que pode ser do tipo I (completa), tipo II (incompleta, sem produção de sulfomicina) e tipo III (incompleta, com produção de sulfomicina, também chamada tipo colônica). Indivíduos com metaplasia intestinal tipo III têm um risco elevado de desenvolvimento de adenocarcinoma gástrico tipo intestinal, sendo que vários estudos moleculares têm demonstrado que este tipo de metaplasia compartilha algumas das características com o adenocarcinoma tipo intestinal, como instabilidade de microssatélites, super expressão de *bcl-2*, ativação de telomerase e expressão de um tipo colônico de mucina. Essas alterações, que também estão implicadas na carcinogênese de outros tecidos, sustentam o caráter pré-canceroso da metaplasia intestinal tipo III (Valle & Gisbert, 2001). Estudos genético moleculares suportam a teoria de transição de metaplasia intestinal a displasia gástrica, outra lesão pré-neoplásica. Estudos clínicos têm mostrado que a displasia de grau elevado é uma lesão não reversível e que metade dos casos evolui para câncer gástrico. Já a displasia de baixo grau tem um melhor prognóstico e apresenta regressão espontânea em um terço dos casos. Contudo, 20% das displasia de baixo grau progride para a de alto grau ou carcinoma (Rugge *et al.*, 1994).

As etapas de progressão do câncer gástrico tipo intestinal iniciando-se em gastrite crônica e passando por gastrite atrófica, metaplasia intestinal, displasia e finalmente adenocarcinoma foi primeiramente postulada por Correa (1988) sendo corroborada por outros autores (Craanen *et al.*, 1994; Stermmemann, 1994; Kuipers *et al.*, 1995; Parsonnet *et al.*, 1995; Sakaki *et al.*, 1995; Watanabe *et al.*, 1997; Sipponen, 1998; Cotran *et al.*, 1999).

Quanto aos tipos histológicos de adenocarcinomas, no presente estudo foi observada uma proporção igual entre os tipo intestinal e difuso. O declínio da incidência do câncer gástrico na população refere-

se principalmente ao tipo intestinal, cuja etiologia está mais relacionada a fatores ambientais. Como já mencionado anteriormente, as mudanças nos hábitos alimentares e forma de conservação dos alimentos contribuíram significativamente para o decréscimo desta neoplasia (Harrison *et al.*, 1997). No trabalho ora realizado, verificou-se um número estatisticamente maior de indivíduos do sexo masculino, etilistas e expostos a agrotóxicos com adenocarcinoma tipo intestinal, enquanto que o tipo difuso foi mais freqüente nas mulheres. Esses dados estão, portanto, de acordo com a literatura e reforçam a participação de tais fatores na etiologia do adenocarcinoma tipo intestinal.

IV.2 Associação entre os polimorfismos dos genes *GSTT1*, *GSTM1* e *CYP2E1* e câncer gástrico

A tumorigênese gástrica está relacionada, como já referido, principalmente a fatores ambientais, como os dietéticos e exposição a agentes químicos carcinogênicos, assim como a fatores genéticos envolvendo alterações em vários genes como ampliações em *c-ERBB2*, *c-MET*, *K-SAM* e *Ciclina E*, mutações em *K-RAS*; inativação do *APC* e do *TP53*, perda de heterozigozidade do *TP27* e redução na expressão da proteína p27 (Yasui *et al.*, 2001; Russo *et al.*, 2001; Wener *et al.*, 2001). Por outro lado, também devem ser consideradas diferenças individuais nos mecanismos celulares de ativação e destoxificação de compostos que poderiam conferir diferentes graus de suscetibilidade a essa doença. Dentre as diversas enzimas que participam desse processo, alguns estudos têm destacado os polimorfismos das glutationas-S-Transferases (GSTs), N-acetiltransferases (NATs) e citocromos P-450 (CYPs) com suscetibilidade ao câncer gástrico, principalmente em populações japonesas (Harada *et al.*, 1992; Kato *et al.*, 1996; Ng *et al.*, 1996; Kato *et al.*, 1997; Gao *et al.*, 2002). Apesar dos resultados que tentam correlacionar tais polimorfismos com o câncer do estômago serem

contraditórios, ainda não há informações na literatura, de tal estudo, investigando simultaneamente os polimorfismos dos genes *GSTT1*, *GSTM1* e *CYP2E1* em populações brasileiras com este tipo de neoplasia ou com lesões gástricas benignas como a gastrite crônica, que confere um maior risco de câncer gástrico. Portanto, o presente trabalho buscou trazer algumas contribuições para o esclarecimento do envolvimento dos polimorfismos desses genes em uma população miscigenada como a nossa, que apresenta características distintas das populações americana, européia e asiática.

Nesse estudo, as frequências de *GSTT1* e *GSTM1*, ou suas combinações, não diferiram entre as amostras de indivíduos com tumor gástrico e controles. Particularmente em relação ao grupo controle, verificou-se que as frequências dos genótipos *GSTT1* e *GSTM1* nulos foram, respectivamente, 18,6% e 41,3%. Dados que corroboram com o trabalhos realizados por Cabral (2000) e Rossit (2001), que estudando indivíduos cirróticos, em população brasileira, encontraram frequências similares em seu grupo controle, ou seja, cerca de 18% de deleção homozigota de *GSTT1* e 46% de deleção de *GSTM1*. No entanto, os indivíduos com gastrite crônica apresentaram uma frequência mais elevada dos genótipos selvagens para *GSTT1* e *GSTM1*, quando combinados e comparados às demais amostras, embora isoladamente as frequências de *GSTT1* e *GSTM1* nulos, encontradas nesses indivíduos, não tenham diferido dos demais grupos. Poucos estudos descritos na literatura investigaram a associação de polimorfismos de genes da superfamília glutational-S-transferase com gastrite crônica, não evidenciando relação entre os polimorfismos de *GSTT1* e *GSTM1* (Setiawan *et al.*, 2000) nem entre os polimorfismos do gene *GSTP1* associados com *GSTT1* e *GSTM1* em indivíduos com gastrite crônica quando comparados aos demais grupos experimentais (Setiawan *et al.*, 2001). A gastrite crônica, uma lesão precursora do câncer gástrico, aumenta em cerca de 10 vezes o risco de desenvolvimento dessa



neoplasia em um período de 15 anos. Indivíduos com esta lesão mas com uma constituição genética que favoreça uma maior destoxificação de xenobióticos poderiam estar mais protegidos de desenvolverem câncer gástrico ao longo dos anos.

No grupo com tumor gástrico, do presente estudo, cerca de 50% dos pacientes apresentaram adenocarcinoma do tipo intestinal, que é mais relacionado a fatores ambientais, sendo, portanto, mais crítico o papel realizado pelas enzimas de destoxificação de xenobióticos. O tipo difuso está mais associado com uma predisposição genética e ocorrência familiar. Contudo, não observou-se diferenças estatisticamente significantes entre as freqüências dos polimorfismos de *GSTT1* e *GSTM1* dos indivíduos com adenocarcinoma tipo intestinal quando comparados aos indivíduos com o tipo difuso.

Em câncer gástrico, os estudos que tentaram correlacionar as deleções homozigotas dos genes *GSTT1* e *GSTM1*, que participam da maquinaria de destoxificação de vários carcinógenos químicos são ainda bastante contraditórios.

Alguns trabalhos encontraram associação de *GSTM1* nulo, principalmente em populações asiáticas, com câncer gástrico (Harada *et al.*, 1992) e também combinada com a deleção de *GSTT1* (Saadat & Saadat *et al.*, 2001), observando-se freqüências maiores de *GSTM1* nulo em pacientes mais jovens, com menos de 50 anos e fumantes (Kato *et al.*, 1996; Cai *et al.*, 2001). Cai *et al.* (2001) sugeriram que o polimorfismo de *GSTM1* pode modular a carcinogênese gástrica quando relacionada ao uso de tabaco, pois sua enzima participa da destoxificação metabólica de vários compostos presentes na fumaça do cigarro, como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, os quais têm sido postulados na etiologia do câncer gástrico. Assim a ausência da enzima *GSTM1* poderia contribuir para o aumento dos efeitos genotóxicos produzidos pelos carcinógenos presentes na fumaça do cigarro.

Quanto à deleção homozigota de *GSTT1*, um número mais reduzido de estudos observaram associação com câncer gástrico. Setiawan *et al.* (2000), em uma população chinesa, avaliaram 143 casos de câncer gástrico, 166 de gastrite crônica e 433 controles e encontraram uma frequência estatisticamente maior de *GSTT1* nulo nos indivíduos com câncer quando comparados aos demais, não observando o mesmo em relação ao genótipo *GSTM1* nulo. Da mesma forma, Lan *et al.* (2001) em 304 pacientes com câncer gástrico poloneses e 427 controles observaram uma frequência estatisticamente maior de *GSTT1* nulo nos pacientes com tumor gástrico, mas nenhuma associação do genótipo *GSTM1* nulo e polimorfismo de *GSTP1*.

As consequências biológicas do polimorfismo de *GSTT1* tornaram-se difíceis de prever, pois estudos mais recentes têm mostrado que esta enzima apresenta tanto propriedades de destoxificação como de ativação. Além disso, estudos epidemiológicos não têm indicado uma associação evidente entre o genótipo *GSTT1* nulo e o desenvolvimento de neoplasias. Do ponto de vista genotóxico, a enzima *GSTT1* destoxifica monohalometanos como o brometo de metil, óxido de etileno e butadieno, mas ativa cloreto de metileno e agentes alquilantes bifuncionais, que também são compostos mutagênicos. Dessa forma, o genótipo *GSTT1* nulo pode conferir aumento ou diminuição do risco de câncer conforme o ambiente em que o indivíduo está exposto (Autrup, 2000; Landi, 2000; Pavanello & Clonfero, 2000).

Ainda com relação a associação dos genótipos *GSTT1* e *GSTM1* nulos e suscetibilidade ao câncer gástrico, outros trabalhos não sustentam tal relação. Deakin *et al.* (1996) estudaram as frequências de deleções homozigotas de *GSTT1* e *GSTM1* em pacientes ingleses com câncer de pulmão, oral, gástrico e colorretal, encontrando uma frequência estatisticamente maior de *GSTT1* nulo apenas nos pacientes com câncer colorretal quando comparado ao grupo controle. Kato *et al.* (1996) e Kato *et al.* (1997) também não encontraram associação do genótipo *GSTM1*



nulo com câncer gástrico em uma população japonesa, no entanto, o grupo controle utilizado foram pacientes com doenças gástricas benignas como úlcera e gastrite e os próprios autores admitiram que não se tratava de um grupo controle adequado. Estudos realizados por Martins *et al.* (1998) em uma população portuguesa, também não sustentam a associação de *GSTM1* nulo e câncer gástrico. Embora, Conde *et al.* (1999) também não tenham encontrado uma maior frequência de *GSTM1* nulo em pacientes portugueses com câncer gástrico, observaram que o genótipo *GSTM1* nulo pode influenciar a instabilidade do gene *TP53*, um gene supressor de tumor que está envolvido na tumorigênese da maior parte das neoplasias. Alguns estudos sustentam tal associação como os de McGlynn *et al.* (1995), Kawajiri *et al.* (1996) e Sarhanis *et al.* (1996). Particularmente no estudo de MacGlynn *et al.* (1995) constatou-se que os indivíduos com o genótipo *GSTM1* nulo apresentavam maiores índices de mutação de *TP53* causadas pelo hepatocarcinógeno aflatoxina B1. No entanto, outros autores não apoiam tal hipótese (Oshishima & Xu, 1997; Lazarus *et al.*, 1998).

A avaliação da expressão das enzimas GSTs em tecidos neoplásicos também é um aspecto interessante a ser investigado, com o intuito de verificar se a transformação maligna das células está relacionada com alteração de expressão tecidual dessas enzimas. Assim, De Bruin *et al.* (1999) estudaram a expressão das enzimas GSTT1 e GSTT2 em câncer gástrico e de cólon e verificaram que na mucosa normal de ambos os tecidos, essas enzimas apresentavam-se em níveis elevados, enquanto que nas lesões malignas expressavam-se em níveis reduzidos.

Em cada grupo do estudo ora realizado, quando procurou-se associar os fatores como sexo, etnia, tabagismo, etilismo, exposição a agrotóxico, infecção pelo *H. pylori* e tipo de adenocarcinoma com as frequências gênicas de *GSTT1* e *GSTM1*, verificou-se que a deleção homozigota de *GSTM1* foi mais freqüente entre os caucasóides nas

amostras de tumor gástrico e controles. Esses dados estão de acordo com os encontrados por Gatta & Soares-Vieira (2000), que observaram uma frequência estatisticamente maior do genótipo *GSTM1* nulo em caucasóides (60,2%) quando comparados aos negróides (41,9%) em uma população do Estado de São Paulo. Arruda *et al.* (1998) também tinham relatado frequência mais elevada desse genótipo em caucasóides (55%) em relação aos negróides (33%) do Estado da Bahia. Da mesma forma, em populações norte-americanas, Chen *et al.* (1996b), verificaram uma frequência maior de *GSTM1* nulo em brancos do que em negros. De modo contrário, no grupo controle, do presente estudo, foi encontrada uma frequência aumentada do genótipo *GSTM1* nulo nos indivíduos negróides quando comparado aos caucasóides. O estudo de Chen *et al.* (1996b), também revelou maior frequência desse genótipo em negros (24%), em relação aos brancos (15%).

Na amostra de pacientes com gastrite crônica, o genótipo *GSTM1* positivo foi detectado mais frequentemente nos indivíduos *H. pylori* positivos. A gastrite crônica associada ao *H. pylori* é um dos fatores que aumenta o risco de progressão da lesão, dessa forma, indivíduos com gastrite crônica Hp+, mas com a presença do gene *GSTM1*, poderiam estar sendo protegidos, por possuírem um sistema de destoxificação de xenobióticos mais eficiente, assim podendo contribuir para a redução dos efeitos prejudiciais da infecção pela bactéria. Estudos realizados por Ng *et al.* (1996) sugeriram que a infecção pelo *H. pylori* associada à deleção de *GSTM1* contribuiria para o processo multipasso da carcinogênese gástrica. Esses autores estudaram a frequência de deleção de *GSTM1* associada a infecção por esta bactéria em 59 indivíduos com tumor gástrico e 59 indivíduos controles, verificando que nos pacientes com o tumor a frequência de deleção homozigota de *GSTM1* foi mais comum naqueles infectados pelo *H. pylori*. Além disso, o genótipo *GSTM1* nulo foi mais comum nos pacientes *H. pylori* positivos do que nos controles *H.*

pylori positivos, sugerindo que a deleção de *GSTM1* juntamente com a infecção pela bactéria contribuiria para a carcinogênese gástrica.

A investigação de possíveis associações de fatores de risco como sexo, etnia, tabagismo, etilismo, exposição a agrotóxicos e infecção pelo *H. pylori* com os genótipos *GSTT1* e *GSTM1* entre os grupos de tumor gástrico, gastrite crônica e controles, evidenciou algumas diferenças estatísticas. Foram observadas associações do genótipo *GSTM1* nulo com frequências estatisticamente maiores com relação ao sexo masculino, etnia (caucasóide) e tabagismo, nos indivíduos do grupo de tumor gástrico quando comparados aos do grupo de gastrite crônica, assim como o tabagismo e etilismo entre os indivíduos do grupo com tumor gástrico ou gastrite crônica quando comparados aos controles. No entanto, o genótipo *GSTM1* positivo também foi observado mais freqüentemente entre os indivíduos fumantes e etilistas com tumor gástrico ou gastrite crônica quando comparados ao grupo controle, evidenciando que independente do genótipo *GSTM1* o número de indivíduos tabagistas e etilistas foi maior no grupo de tumor gástrico e gastrite crônica em relação ao grupo controle. Da mesma forma houve associação com o genótipo *GSTT1* nulo e etilismo, sendo maior a frequência de etilistas no grupo de tumor gástrico ou gastrite crônica em relação aos controles. No entanto, o genótipo *GSTT1* positivo nos etilistas também foram mais freqüentes nos indivíduos com tumor gástrico ou gastrite crônica em relação ao grupo controle, refletindo não associação entre o genótipo *GSTT1* e etilismo nestas amostras. Portanto, a única associação que pode ser estabelecida ocorreu entre o grupo de tumor gástrico e gastrite crônica em relação ao tabagismo e genótipo *GSTM1* nulo, sendo que análise multivariada revelou que o tabagismo não estava associado com aumento do OR's para câncer de estômago nos indivíduos *GSTM1* positivos, mas estava associado com aumento do OR's nos indivíduos *GSTM1* nulos.



O papel do polimorfismo do gene *CYP2E1/PstI* em câncer gástrico, assim como em outros tipos de neoplasias, é bastante discordante. O gene *CYP2E1* atua na ativação de vários compostos carcinogênicos de baixo peso molecular como as nitrosaminas, as quais apresentam importante papel na carcinogênese gástrica.

O alelo mutante *CYP2E1*c2* de *CYP2E1* ocorre devido uma transição, $-^{1019}\text{C}\rightarrow\text{T}$, na região 5' flanqueadora do referido gene e insere um sítio para a enzima *PstI*. Esse polimorfismo encontra-se em completo desequilíbrio de ligação com a transversão $-^{1259}\text{G}\rightarrow\text{C}$, que remove um sítio para *RsaI*. Ambos apresentam o mesmo efeito, ou seja, aumentam a atividade transcricional do gene *CYP2E1* (Watanabe *et al.*, 1990).

No presente trabalho, não foi observada diferença estatisticamente significativa na frequência do alelo *CYP2E1*c2* entre as amostras e também não observou-se nenhuma associação desse alelo com as variáveis como sexo, etnia, tabagismo, etilismo, exposição a agrotóxico, infecção pelo *H. pylori* e tipo de adenocarcinoma nas amostras de indivíduos com tumor gástrico, gastrite crônica e controles.

A frequência do heterozigoto para o polimorfismo *CYP2E1/PstI* (*c1/c2*) foi cerca de 10% nos indivíduos das três amostras, corroborando outros estudos em populações brasileiras que encontraram frequências similares do alelo *CYP2E1*c2* (Gattas & Soares-Vieira, 2000; Cabral, 2000; Rossit, 2001).

Apesar de não ter sido observada associação do alelo *CYP2E1*c2* com as variáveis já descritas, nas amostras ora estudadas, verificou-se um número estatisticamente maior de indivíduos do sexo masculino, fumantes e etilistas com o genótipo selvagem (*c1/c1*) na amostra de tumor gástrico em relação à amostra de gastrite crônica e controle, e em comparação apenas com a amostra de gastrite crônica, com exposição a agrotóxico e *H. pylori* negativo. Tais resultados devem ser consequência da frequência mais elevada desses fatores nos indivíduos do grupo com tumor gástrico, como já discutidos na

participação de fatores ambientais na carcinogênese gástrica, não refletindo portanto, uma associação dessas variáveis com o genótipo analisado.

Kato *et al.* (1995), Kato *et al.* (1996), Kato *et al.* (1997) e Tsukino *et al.* (2002) não encontraram correlação do polimorfismo *CYP2E1/RsaI* com câncer gástrico em populações japonesas, onde a frequência desse alelo polimórfico apresenta-se mais elevada do que em populações européias ou americanas. Nishimoto *et al.* (2000) estudaram a frequência do alelo *CYP2E1*c2* em brasileiros e brasileiros descendentes de japoneses com câncer gástrico na cidade de São Paulo, e seus respectivos controles. O alelo polimórfico *CYP2E1*c2* foi encontrado em uma frequência maior nos brasileiros descendentes de japoneses e contraditoriamente foi associado com redução no risco de câncer gástrico. Porém os próprios autores não justificaram como o aumento da expressão do gene *CYP2E1* poderia reduzir o risco desse tipo de câncer. Esses achados são consistentes com os de Li *et al.* (1998) ao estudarem indivíduos com câncer esofágico em áreas endêmicas da China.

Gao *et al.* (2002) realizaram um estudo com 93 pacientes com câncer de esôfago, 98 com câncer de estômago e 196 controles em uma área de alto risco para estas neoplasias na China, não sendo encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos, em relação a frequência do polimorfismo *CYP2E1/RsaI*. No entanto, verificaram uma interação positiva entre o alelo *CYP2E1*c2* e tabagismo nos pacientes com câncer gástrico, sugerindo que a associação desses fatores poderia contribuir para o desenvolvimento dessa neoplasia. Cai *et al.* (2001), estudando populações chinesas que apresentavam alto risco de câncer gástrico, verificaram que indivíduos expostos a fatores de risco como tabagismo e etilismo e portadores do alelo *CYP2E1*c2* apresentavam risco elevado de desenvolvimento de tumor gástrico, sugerindo assim, a associação entre variáveis ambientais e o gene *CYP2E1* na etiologia do câncer de estômago.

Em relação a neoplasia gástrica assim como em outros tipos de neoplasias, a grande maioria das pesquisas tem analisado individualmente cada um dos genes *GSTT1*, *GSTM1* e *CYP2E1*, não investigando a interação entre genes de ativação e destoxificação. Não há relato na literatura atual de outro trabalho que tenha investigado a participação simultânea dos genes *GSTT1*, *GSTM1* e *CYP2E1* na etiologia do câncer gástrico, assim como em sua lesão precursora, a gastrite crônica. Os resultados indicaram que tanto os genótipos *GSTT1* e *GSTM1* nulos como o alelo *CYP2E1**c2, não parecem aumentar o risco de câncer gástrico em indivíduos da população brasileira. No entanto, verificou-se que o tabagismo e o genótipo *GSTM1* nulo podem estar associados com aumento do OR's para câncer de estômago. Dessa forma, os resultados sugerem que a deficiência da enzima de destoxificação *GSTM1*, por afetar o metabolismo dos carcinógenos presentes no tabaco, pode aumentar o risco de câncer gástrico em indivíduos com o genótipo *GSTM1* nulo.

Na maior parte das neoplasias, os fatores ambientais exercem um papel preponderante e embora o processo carcinogênico seja muito complexo, variações interindividuais nos mecanismos de ativação e destoxificação dos xenobióticos podem conferir diferentes graus de suscetibilidade.

Como a concentração final de carcinógenos a que o indivíduo está exposto depende do balanço entre estes processos, torna-se importante o estudo simultâneo de um maior número de genes de ativação e destoxificação. O biometabolismo de xenobióticos é um processo bastante complexo, onde há participação e interação de vários genes, dessa forma o estudo de um número reduzido de genes pode não refletir o processo como um todo (Van Iersel *et al.*, 1999).

V - Conclusões

Através do presente trabalho foram obtidas as seguintes conclusões:

- a) indivíduos com tumor gástrico apresentam uma maior exposição a fatores de risco como tabagismo, etilismo e exposição a agrotóxicos, reforçando a participação desses fatores na sua etiologia;
- b) o adenocarcinoma tipo intestinal foi mais freqüente em indivíduos do sexo masculino, etilistas e expostos a agrotóxicos, enquanto que o tipo difuso ocorreu mais freqüentemente em mulheres, corroborando os dados da literatura;
- c) as porcentagens dos polimorfismos dos genes *GSTT1*, *GSTM1* e *CYP2E1* observadas no grupo controle em indivíduos oriundos das regiões de São José do Rio Preto-SP e Campinas-SP, são similares àquelas relatadas em outros estudos que avaliaram os mesmos genes em populações brasileiras;
- d) as freqüências dos polimorfismos dos genes *GSTT1*, *GSTM1* e *CYP2E1* encontradas nos indivíduos com tumor gástrico foram similares às do grupo com gastrite crônica e controle, indicando que esses polimorfismos não estão associados com risco aumentado de câncer gástrico em indivíduos da população brasileira;
- e) porém observou-se que o tabagismo e o genótipo *GSTM1* nulo podem estar associados com um aumento do OR's para câncer de estômago, sugerindo que indivíduos *GSTM1* nulos podem ser mais suscetíveis à ação dos carcinógenos presentes no tabaco e apresentar um maior risco de desenvolvimento deste tipo de neoplasia;



f) o estudo de um número reduzido de genes relacionados ao biometabolismo dos xenobióticos pode não refletir o processo como um todo, sendo necessário a investigação de um maior número de genes simultaneamente associados a variáveis ambientais.



VI - Resumo

O câncer gástrico destaca-se pela sua incidência e alta taxa de mortalidade. Em sua etiologia estão envolvidos tanto fatores ambientais como genéticos. Neste último inclui-se a participação de genes de suscetibilidade que atuam na ativação e destoxificação de xenobióticos. O alelo *CYP2E1**c2 que atua na ativação de xenobióticos, e as deleções homozigotas dos genes *GSTT1* e *GSTM1*, que participam da destoxificação de vários carcinógenos, têm sido associados com aumento de suscetibilidade ao câncer. Contudo a associação de tais polimorfismos em neoplasia gástrica é bastante controversa. Assim, investigamos as frequências de polimorfismos dos genes *GSTT1*, *GSTM1* e *CYP2E1* e suas associações com fatores etiológicos envolvidos na carcinogênese gástrica, em 100 pacientes com câncer gástrico, 100 com gastrite crônica, uma lesão que aumenta o risco de câncer gástrico em 10%, e em 150 controles pareados por sexo, idade e etnia aos demais grupos. O número de indivíduos tabagistas, etilistas e expostos a agrotóxicos foi estatisticamente maior no grupo com câncer gástrico, especialmente com o do tipo intestinal, quando comparado aos demais. Em relação as frequências genótípicas considerando-se as combinações entre os genes *GSTT1/GSTM1*, o teste de χ^2 não evidenciou diferenças estatisticamente significantes entre as amostras de câncer gástrico e gastrite crônica e entre câncer gástrico e controles, porém observou-se diferença significativa entre gastrite crônica e controles. A associação dos diferentes genótipos com alguns dos fatores etiológicos do câncer gástrico evidenciou que o genótipo *GSTT1* nulo ocorreu mais frequentemente nos negróides, e o genótipo *GSTM1* nulo nos caucasóides, enquanto o genótipo *GSTM1* positivo foi observado principalmente nos indivíduos com gastrite crônica infectados pelo *H. pylori*. A investigação desses mesmos fatores entre os grupos revelou que o tabagismo estava associado com aumento do OR's para câncer de estômago nos indivíduos

GSTM1 nulo. A frequência do alelo *CYP2E2**c2 nos grupos de câncer gástrico, gastrite crônica e controles não diferiram estatisticamente e não mostraram associação com os fatores etiológicos investigados. Dessa forma, o presente trabalho reforça a participação dos fatores ambientais na etiologia do câncer gástrico, especialmente o do tipo intestinal e indica que os polimorfismos genéticos, ora estudados, não parecem aumentar o risco de câncer gástrico em indivíduos da população brasileira. No entanto, indivíduos *GSTM1* nulos podem ser mais suscetíveis à ação do tabaco em relação ao câncer de estômago.

Palavras-chaves: câncer gástrico, gastrite crônica, polimorfismos genéticos, *GSTT1*, *GSTM1*, *CYP2E1*.

VII - Abstract

Gastric cancer is distinguished for its incidence and high rate of mortality. In its etiology are involved both environmental factors and genetics. The latter includes participation of susceptibility genes that act in the activation and detoxification of xenobiotics. The *CYP2E1**c2 allele that acts in the activation of xenobiotics, and the homozygous deletions of *GSTT1* and *GSTM1* genes, which participate in the detoxification of some carcinogens, has been associated with an increased susceptibility to cancer. However, the association of such polymorphisms in gastric neoplasia is still controversial. Thus, we investigated the frequencies of polymorphisms of *GSTT1*, *GSTM1* and *CYP2E1* genes and their association with etiological factors involved in gastric carcinogenesis, in 100 patients with gastric cancer, 100 with chronic gastritis, a lesion that increases the risk of gastric cancer by 10%, and in 150 controls matching for sex, age and ethnicity to the other groups. The number of smokers, abusers of alcohol and pesticide-exposed workers was statistically higher in the group with gastric cancer, especially of the intestinal type, when compared with the other groups. In relation to the genotype frequencies, considering the combinations between *GSTT1*/*GSTM1* genes, the χ^2 test did not show statistically significant differences between the samples of gastric cancer and chronic gastritis and between gastric cancer and the controls, however a significant difference between chronic gastritis and the controls was observed. The association of the different genotypes with some of the etiological factors of gastric cancer evidenced that the *GSTT1* null genotype occurred more frequently in the Negroid individuals, and the *GSTM1* null genotype in Caucasians, while the *GSTM1* positive genotype was observed mainly in individuals with chronic gastritis infected by the *H. pylori*. The inquiry into these same factors between the groups also revealed that smoking was associated with elevated OR's in the *GSTM1* null subjects. The frequency of the *CYP2E1**c2 allele in the gastric cancer,

chronic gastritis and control groups was not statistically different, nor was there any association with the investigated etiological factors. Thus, the present work strengthens the participation of the environmental factors in the etiology of gastric cancer, especially of the intestinal type and indicates that genetic polymorphisms do not seem to increase the risk of gastric cancer in individuals of the Brazilian population. However, *GSTM1* null carriers may be more susceptible to the action of tobacco with regard to stomach cancer.

Key words: gastric cancer, chronic gastritis, genetic polymorphisms, *GSTT1*, *GSTM1*, *CYP2E1*.

ARNTS, N.L., VAN ZWET, A. A., THUS, J.G., KOOISTRA-SMID, A.M., VAN SLOCHTEREN, K.R., DLGENER, J.E., KLAIBEUKER, J.H. VAN DOOR, L.J. The importance of *vacA*, *cagA*, and *icaA* genotypes of *Helicobacter pylori* infection in peptic ulcer disease and gastroesophageal reflux disease. *American Journal of Gastroenterology*, v.35, p.2603-2608, 2001.

ARFUDA, V.R., GRIGNOLI, C.E., CONCEIÇÕES, M.S., SOARES, M.C., MENEZES, R., SAAVO, S.T.O., COSTA, P.F. Prevalence for the deleted allele of glutathione S-transferase mu (*GSTM1*) and theta (*GSTT1*) among distinct ethnic groups from Brazil: relevance to environmental carcinogenesis. *Clinical Genetics*, v.54, p.210-214, 1998.

ATKINS, M., KIMURA, T., KUDO, M., TERADA, H., NITANI, S., MAZAKI, T., KATO, K., GRHAM, D.Y. Relevance of *Helicobacter pylori* to peptic ulcer in asymptomatic Japanese population. *Gastroenterology*, v.75, p.780-786, 1982.

ARMSTRONG, J.C., CAG, P., FEEK, R.M., TUMMURU, M.K.R., BLASER, M.J., COVER, T.L. Modeling the regulating cytokine roles of *Helicobacter pylori* association of specific *vacA* types with cytokine production and peptic ulceration. *Journal of Biological Chemistry*, v.270, p.17771-17777, 1995.

AU, W.W., SIERRA-TORRES, C.H., CAJAS-SALAZAR, N., SHIPP, B.R., LEGATOR, M.S. Cytogenetic effects from exposure to mixed pesticides and the influence from genetic susceptibility. *Environmental Health & Perspectives*, v.107, p.60-605, 1992.

VIII – Referências Bibliográficas

ABDEL-RAHMAN, S.Z.; NOURALDEEN, A.M.; AHMED, A.E. Molecular interaction of [2,3-¹⁴C] acrylonitrile with DNA in gastric tissue of rat. **Journal of Biochemical Toxicologies**, v.9, p.191-198, 1994.

ABDEL-RAHAMAN, S.Z.; EL-ZEIN, R.A.; ANWAR, W.A.; AU, W.W. A multiplex PCR procedure for genetic polymorphism of the *GSTM1* and *GSTT1* genes in human. **Cancer Letters**, v.107, p.229-233, 1996.

AICR - American Institute for Cancer Reserch. World Cancer Research Fund. **Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: a Global Perspective**. Washington: Banta Book Group, 1997. 670p.

ANAND, B.S.; GRAHAM, D.Y. Ulcer and Gastritis. **Endoscopy**, v.31, p.215-225, 1999.

ARENTS, N.L. VAN ZWET, A. A. THIJS, J.C.; KOOISTRA-SMID, A.M.; VAN SLOCHTEREN, K.R.; DEGENER, J.E.; KLEIBEUKER, J.H.; VAN DOOR, L.J. The importance of *vacA*, *cagA*, and *iceA* genotypes of *Helicobacter pylori* infection in peptic ulcer disease and gastroesophageal reflux disease. **American Journal of Gastroenterology**, v.96, p.2603-2608, 2001.

ARRUDA, V.R.; GRIGNOLLI, C.E.; GONÇALVES, M.S.; SOARES, M.C.; MENEZES, R.; SAAAD, S.T.O.; COSTA, F.F. Prevalence for the deleted alleles of glutathione S-transferase um (*GSTM1*) and theta (*GSTT1*) among distinct ethnic groups from Brazil: relevance to environmental carcinogenesis. **Clinical Genetics**, v.54, p.210-214, 1998.

ASAKA, M.; KIMURA, T.; KUDO, M.; TERADA, H.; MITANI, S.; MIAZAKI, T.; MIKI, K.; GRHAM, D.Y. Relationship of *Helicobacte pylori* to pepsinogen in asymptomatic japanese population. **Gastroenterology**, v.102, p760-766, 1992.

ATHERTON, J.C.; CAO, P.; PEEK, R.M.; TUMMURU, MK.R.; BLASER, M.J.; COVER, T.L. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*: association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. **Journal of Biological Chemistry**, v.270, p. 17771-17777, 1995.

AU, W.W.; SIERRA-TORRES, C.H.; CAJAS-SALAZAR, N.; SHIPP, B.K.; LEGATOR, M.S. Cytogenetic effects from exposure to mixed pesticides and the influence from genetic suscetibility. **Environmental Health & Perspectives**, v.107, p.501-505, 1999.



AUTRUP, H. Genetic polymorphisms in human xenobiotica metabolizing enzymes as suscetibility factors in toxic response. **Mutation Research**, v. 464, p.65-76, 2000.

AXELSON, O.; SUNDELL, L.; ANDERSSON, K.; EDLING, C.; HOGSTEDT, C.; KLING, H. Herbicide exposure and tumour mortality na updated epidemiologic investiogation on Swedish railroad workers. **Scandinavian Journal of Work Environmental & Health**, v.6, p.73-70, 1980.

BAKER, K.H.; HEGARTY, J.P. Presence of *Helicobacter pylori* in driking water is associated with clinical infection. **Scandinavian Journal Infections Diseases**, v.33, p.744-746, 2001.

BARTSCH, H. Studies on biomarkers in cancer etiology and prevention: a summary and challenge of 20 yers of interdisciplinary research. **Mutation Research**, v. 462, p.255-279, 2000.

BELL, D.A .; TAYLOR, F.; DAVID, F. Genetic risk and carcinogen exposure: a common inherited defect of the carcinogen-metabolism gene glutathione S-transferse M1 (GSTM1) that increases suscetibility to bladder cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v.85, p.1159-1164, 1993.

BOEING, H. FRENTZEL-BEYME, R.; BERGER, M. Case-control study on stomach cancer in Germany. **International Journal of Cancer**, v.47, p.858-864, 1991.

BRIEN, T.P.; DEPOWSKI, M.D.; SHEEHAN, C.E.; ROSS, J.S.; MCKENNA, B.J. Prognostic factors in gastric cancer. **Modern Pathology**, v.11, p.870-877, 1998.

BROCKMÖLLER, J. CARBORBI, I.; KERB, R.; SACHSE, C.; ROOTS, I. Polymorphisms in xenobiotic conjugation and disease predisposition. **Toxicology Letters**, v. 102-103, p.173-183, 1998.

CABRAL, I.R. Polimorfismos de genes relacionados ao metabolismo de xenobióticos e a suscetibilidade à cirrose alcoólica. 2000. 125f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) – Campinas (SP).

CAI, L.; YU, S.Z.; ZHAN, Z.F. Cytochrome P450 2E1 genetic polymorphism and gastric cancer in Changle, Fujian Province. **World Journal of Gastroenterology**, v.7, p.792-805, 2001.

CAI, L.; YU, S.Z.; ZHANG, Z.F. Glutathione S-transferase M1, T1 genotypes and the risk of gastric cancer: a case-control study. **World Journal of Gastroenterology**, v.7, p. 506-509, 2001.

CENSINI, S.; LANGE, C.; XIANG, Z.; CRABTREE, J.E.; GHIARA, P.; BORODOVSKY, M.; RAPPUOLI, R.; COVACCI, A. *cag*, a pathogenicity island of *helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v.93, p.14648-14653, 1996.

CHEN, H. SANDLER, D.P.; TAYLOR, J.A.; SHORE, D.L.; LIU, E.BLOOMFIELD, C.D.; BELL, D.A. Increased risk for myelodysplastic syndromes among those with glutathione transferase theta 1 (*GSTT1*) gene defect. **Lancet**, v.347, p.295-297, 1996a.

CHEN, C.L.; LIU, Q.; RELLING, W.V. Simultaneous characterization of glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms by polymerase chain reaction in American whites and blacks. **Pharmacogenetics**, v.6, p.187-191, 1996b.

CHOI, S.Y.; KAHIO, H. Effect of cigarette smoking and alcohol consumption in the etiology of cancers of the digestive tract. **International Journal of Cancer**, v.49, p.381-396, 1991.

CHYOU, P. NOMURA, A. HANKIN, J. A case-cohort study of diet and stomach cancer. **Cancer Research**, v.50, p.7501-7504, 1990.

CONDE, A. R.; MARTINS, G.; SARAIVA, C.; RUEFF, J.; MONTEIRO, C. Association of p53 genomic instability with the glutathione S-transferase null genotype in gastric cancer in the portuguese population. **Molecular Pathology**, v. 52, nº 3, p.131-134, 1999.

CORREA, P. A human model of gastric carcinogenesis. **Cancer Research**, vol. 48, p. 3554-3560, 1988.

CORREA, P.; FOX, J.; FONTHAM, E. *Helicobacter pylori* and gastric carcinoma: serum antibody prevalence in populations with contrasting cancer risks. **Cancer**, v.66, p.2569-2574, 1990.

CORREA, P.; CHEN, V.W. Gastric cancer. **Cancer Surveys**, v.19, p.55-76, 1994.

COTRAN, R. S.; ROBBINS, S. L.; KUMAR, V. **Pathologic Basis of Disease**. 6 ed., Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1999, 1425p.



CRAANEN, M.E.; BLOK, P.; DEKKER, W.; TYTGAT, G.N.J. *Helicobacter pylori* and early gastric cancer. **Gut**, v.35, p.1372-1374, 1994.

DANESH, J. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer: systematic review of the epidemiological studies. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v.13, p.851-856.

DEAKIN, M.; ELDER, J.; HENDRICKSE, C.; PECKHAM, D.; BALDWIN, D.; PANTIN, C.; WILD, N.; LEOPARD, P.; BELL, D. A.; JONES, P.; DUNCAN, H.; BRANNIGAN, K.; ALLDERSEA, J.; FRYER, A.; STRTANGE, R. C. Glutathione S-transferase GSTT1 genotypes and susceptibility to cancer: studies of interactions with GSTM1 in lung, oral, gastric and colorectal cancers. **Carcinogenesis**, v. 17, p.881-884, 1996.

De VITA, V. T. Jr.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S. A. **Câncer – Principles e Practice of Oncology**. 5 ed. (v.1) Philadelphia / New York: Lippincott-Raven, 1997, 1154p.

De BRUIN, W. C.C.; WAGENMANS, M. J. M.; BOAD, P. G.; PETERS, W.H.M. Expression of glutathione S-transferase class isoenzymes in human colorectal and gastric cancers. **Carcinogenesis**, v. 20, p.1453-1457, 1999.

De FERRARI, M.; ARTUSO, M.; BONASSI, S.; BONATTI, S.; CAVALIERI, Z.; PESCATORE, D.; MARCHINI, E.; PISANO, V.; ABBONDANDOLO, A. Cytogenetic biomonitoring of an Italian population exposed to pesticides: chromosome aberration and sister-chromatid exchange analysis in peripheral blood lymphocytes. **Mutation Research**, v.260, p.105-113, 1991.

De STEFANI, E.; BOFFETTA, P.; CARZOGLIO, J.; MENDILAHARSU, S.; DENEIO-PELLEGRINI. Tobacco smoking and alcohol drinking as risk factors for cancer: a case-control study in Uruguay. **Causes Control**, v.9, p.321-329, 1998.

EL-OMAR, E.M.; OIEN, K.; MURRAY, L.S.; EL-NUJUMI, A.; WIRZ, A.; GILLEN, D.; WILLIAMS, G.; FULLARTON, G.; MCCOLL, K.E.L. Increased prevalence of precancerous changes in relatives of gastric cancer patients: critical role of *H. pylori*. **Gastroenterology**, v.118, p.22-30, 2000.

EKSTRÖM, A.M.; ERIKSSON, M.; HANSSON, L.E.; LINDGREN, A.; SIGNORELLO, L.B.; NYRÉN, O.; HARDELL, L. Occupational exposures and risk of gastric cancer in a population-based case-control study. **Cancer Research**, v.59, p.5932-5937, 1999.

EUBANKS, M. Biomarkers: the clues to genetic susceptibility. **Environmental Health & Perspectives**, v.102, p.50-56, 1994.

FALCK, G.C.; HIRVONEN A.; SCARPATO, R.; SAARIKOSKI, S.T.; MIGLIORE, L.; NORPPA, H. Micronuclei in blood lymphocytes and genetic polymorphism for *GSTM1*, *GSTT1* and *NAT2* in pesticide-exposed greenhouse workers. **Mutation Research**, v. 441, p. 225-237, 1999.

FORMAN, D. An international association between *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer (The EUROGAST Study Group). **Lancet**, v.341, p.1359-1362, 1993.

FUKUDA, H.; SAITO, D.; HAYASHI, S.; HISAI, H.; ONO, ; YOSHIDA, S.; OGUTRO, Y.; NODA, T.; SATO, T.; KATOH, M.; TERADA, M.; SUGIMURA, T. *Helicobacter pylori* infection, serum pepsinogen level and gastric cancer: a case-control study in Japan. **Japanese Journal of Cancer**, v.86, p.64-71, 1995.

FUTUYMA, D.J. **Biologia Evolutiva**. 2. ed., Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética/CNPq, 1992, 646p.

GALANIS, D.J.; KOLONEL, L.N.; LEE, J.; NOMURA, A. Intakes of selected foods and beverages and the incidence of gastric cancer among the Japanese residents of Hawaii: a prospective study. **International Journal of Epidemiology**, v.27, p.173-180, 1998.

GAO, C.; TAKEZAKI, T.; WU, J.; LI, Z.; WANG, J.; DING, J.; LIU, Y.; HU, X.; TAJIMA, K.; SUGIMURA, H. Interaction between Cytochrome P-450 2E1 polymorphisms and environmental factors with risk of esophageal and stomach cancers in Chinese. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v.11, p.29-34, 2002.

GATTAS, G.J.; SOARES-VIERIRA, J.A. Cytochrome P450-2E1 and glutathione S-transferase polymorphisms among Caucasians and mulattoes from Brazil. **Occupational Medicine**, v.50, p.508-511, 2000.

GENTA, R.M. *Helicobacter pylori* as a promotor of intestinal metaplasia and gastric cancer: an alluring hypothesis in search of evidence. **European Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v.7, p.S25-S30, 1995.

GENTA, R.M. Gastric atrophy and atrophic gastritis – nebulous concepts in search of a definition. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v.12, p.17-23, 1998.



GRACIANO, M.I.G.; NEVES, A.F.; L, N. A.S. Critérios de avaliação para classificação sócio-econômica: Elementos de Atualização. **HPRLLP**, 1995, p.345.

GREENWALD, P.; CLINFFORD, MILNER, J. Diet and cancer prevention. **European Journal of Cancer**, v.37; p.948-965, 2001.

HARADA, S.; MISAWA, S.; NAKAMURA, T.; TANAKA, N.; UENO, ELI.; NOZOE, M. Detection of *GST1* gene deletion by the polymerase chain reation and its possible correlation with stomach cancer in japanese. **Human Genetics**, v.90, p. 62-64, 1992.

HARRISON, L.E.; ZHANG, Z.F.; KARPEH, M.S.; SUN, M.; KURTZ, R.C. The role of dietary facors in the intestinal and diffuse histologic subtypes of gastric adenocarcinima: a case-control study in the U.S. **Cancer**, v.80, p.1021-1028, 1997.

HECHT, S. S. Approaches to cancer prevention based on an understanding of N-nitrosamine carcinogenesis. **Proceendings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, vol. 216, p.181-191, 1997.

HILDESHEIM, A.; CHEN, C.J.; CAPORASO, N.E. CHENG, Y.J.; HOOVER, R.N.; HSU, M.M.; LEVINE, P.H.; CHEN, I.H.; CHEN, J.Y.; YANG, C.S.; DALY, A.K.; IDLE, J.R. Cytochrome P450IIIE1 genetic polymorphisms and risk of nasopharyngeal carcinoma, Results from a case-control study conducted in Taiwan. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v.4,p.607-610, 1995.

HIRVONEN, A.; HUSGAFVEL-PURSIANEN, K.; KARJASLAINEN, A.; ANTILLA, S.; VAINIO, H. The human *CYP2E1* gene and lung cancer: *DraI* and *RsaI* restriction lenght polymorphisms in a Finnish study population. **Carcinogenesis**, v.14, p.85-88, 1993.

HOUBEN, G. M. P. & STOCKBRÜGGER, R. W. Bacteria in the aetio-pathogenesis of gastric cancer: a review. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v.30, p. 13-18, 1995.

HUANG, J.Q.; SRIDHAR, S.; CHEN, Y.; HUNT, R.H. Meta-analysis of the relations between *Helicobacte pylori* seropositivity and gastric cancer. **Gastroenterology**, v.114, p.1169-1179, 1999.

HUMMADI, Y. M. A. NAJIM, R.A.; FARJOU, I. B. A new in vitro molde for ethanol-induced gastric mucosal damage. **Journal of Pharmacology Toxicologics**, v.41, p.167-172, 1999.

HUNG, H.C.; CHUANG, J.; CHIEN, Y.C.; CHERN, H.D.; CHIANG, C.P.; KUO, Y.S.; HIDESEHEIM, A.; CHEN, C.J. Genetic polymorphisms of *CYP2E1*, *GSTM1*, and *GSTY1*: environmental factors and risk of oral cancer. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Preventions**, v.6, p.901-905, 1997.

IDLE, J. R. Is environmental carcinogenesis modulated by host polymorphism? **Mutation Research**, v. 247, p.259-266, 1991.

INCA - Instituto Nacional do Câncer, Ministério da Saúde. **Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil**, Rio de Janeiro, 2002. Disponível em <http://www.inca.org.br>.

JI, B. T.; CHOW, W. H.; MACLAUGHLIN, J. K.; GAO, R. N.; SHU, X. O.; JIN, F.; ZHENG, W.; FRAUMENI, J.; F.; GAO, Y. T. The influence of cigarette smoking, alcohol, and green tea consumption on the risk of carcinoma of the cardia and distal stomach in shanghai, China. **Cancer**, v. 77, p. 2449-2457, 1996.

KATO, S.; SHIELDS, P.G.; CAPORASO, N.E.; HOOVER, R.N.; TRUMP, B.F.; SUGIMURA, H.; WESTON, A; HARRIS, C.C. Cytochrome P450IIE1 genetic polymorphisms, racial variation, and lung cancer risk. **Cancer Research**, v.52, p.6712-6715, 1992

KATO, S.; ONDA, M; MATSUKURA, N.; TOKUNAGA, A.; TAJIRI, T.; KIM, D. Y.; TSURUTA, H.; MATSUDA, N.; YAMASHITA, K.; SHIELDS, P. G. Cytochrome P4502E1 (*CYP2E1*) genetic polymorphism in a case-control study of gastric cancer and liver disease. **Pharmacogenetics**, v. 5, p 141-144, 1995.

KATO, S.; ONDA, M.; MATSUKURA, N.; TOKUNAGA, A.; MATSUDA, N.; YAMASHITA, K.; SHIELDS, G, P. Genetic polymorphisms of the cancer related gene and *Helicobacter pylori* infection in japanese gastric cancer patients: na age and gender matched case-control study. **Cancer**, v. 77, p. 1654-1661, 1996.

KATO, S.; ONDA, M.; MATSUKURA, N.; TOKUNAGA, A.; MATSUDA, N.; YAMASHITA, K.; SHIELDS, G, P. *Helicobacter pylori* infeccion and genetic polymorphisms to cancer related genes in gastric carcinogenesis. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 51, p. 145-149, 1997.

KATOH, T.; NAGATA, N.; KURODA, Y.; ITOH, H.; KAWAHARA, A.; KUROKI, N.; OOKUMA, R.; A'BELL, D. Glutathione S-transferase M1 (*GSTM1*) and T1 (*GSTT1*) genetic polymorphism and susceptibility to gastric and colorectal adenocarcinoma. **Carcinogenesis**, v. 17, p. 1855-1859, 1996.

KAWAJIRI, K.; EGUCHI, H.; NAKACHI, K. Association of *CYP1A1* germ line polymorphisms with mutation of *p53* in lung cancer. **Cancer Research**, v.56, p.72-76, 1996

KNUDSON, A.G. Hereditary cancer, oncogenes and antioncogenes. **Cancer Research**, v.45, p.1437-1443, 1985.

KOKKOLA, A.; HAAPIAINEN, R.; LAXEN, F.; PUOLAKKANINEN, P.; KIVILAKSO, E.; VIRTAMO, J.; SIPPONEN, P. Risk of gastric carcinoma in patients with mucosal dysplasia associated with atrophic gastritis: a follow-up study. **Journal of Clinical Pathology**, v.49, p.979-984, 1996.

KUIPERS, E.J. UYTERLINDE, A.M.; PEÑA, A.S.; Long-term sequelae of *Helicobacter pylori* gastritis. **Lancet**, v.345, p.1525-1528, 1995.

KUIPERS, E. J.; APPELMELK, B.J. *Helicobacter pylori* and atrophic gastritis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.51, p.150-155, 1997.

KUIPERS, E.J. Exploring the link between *Helicobacter pylori* and gastric cancer. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v.13, p.3-11, 1999.

LAN, Q.; CHOW, W.H.; LISSOWSKA, J.; HEIN, D.W.; BUETOW, K.; EMGEL, L.S.; JI, B.; ZATONSKI, W.; ROTHMAN, N. Glutathione S-transferase genotypes and stomach cancer in a population-based case-control study in Warsaw, Poland. **Pharmacogenetics**, v. 11, p. 655-661, 2001.

LANDI, S. Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review. **Mutation Research**, v.463, p. 247-283, 2000.

LAUREN, J. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal type carcinoma: an attempt at a histological classification. **Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica**, v. 64, p.31-49, 1965.

LAZARUS, P.; SHEIKH, S.N.; REN, Q. *p53*, but not *p16*, mutations in oral squamous cell carcinomas are associated with specific tobacco use. **Carcinogenesis**, v.19, p.509-514, 1998.

Le MARCHAND, L.L.; SIVARAMAN, L.; PIERCE, L.; SEIFRIED, A.; LUM, A.; WILKENS, L.R.; LAU, A.F. Association of *CYP1A1*, *GSTM1* and *CYP2E1* polymorphisms with lung cancer suggest cell type specificities to tobacco carcinogens. **Cancer Research**, v.58, p.4858-4863, 1998.

LI, D. X.; TANG, Y. M.; PENG, Q.; LU, S. X.; AMBROSONE, C. B.; KADLUBAR, F.F. Susceptibility to esophageal cancer and genetic polymorphisms in Glutathione S-Transferases T1, P1 and M1 and Cytochrome P4502E1. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v.7, p. 1013-1018, 1998.

LIEBER, C.S. Alcohol, liver, and nutrition. **Journal of the American College of Nutrition**, v.10,p.602-632, 1991.

LIU, S.; PARK, J.Y.; SCHANTZ, S.P.; STERN, J.C.; LAZARUS, P. Elucidation of *CYP2E1* 5'regulatory *RsaI/PstI* allelic variants and their role in risk for oral cancer. **Oral Oncology**, v.37, p.437-445, 2001.

LONGNECKER, M. P.; ENGER, S.M. Epidemiologic data on alcoholic beverage consumption and risk of cancer. **Clinica Chimica Acta**, v.246, p.121-142, 1996.

MALATY, H.M.; GRAHAM, D.Y. Importance of childhood socioeconomic status on the current prevalence of *Helicobacter pylori* infection. **Gut**, v.35, p.742-745, 1994.

MANNICK, E.; BRAVO, L. E.; ZARAMA, G.; REALPE, J.L.; ZHANG, X.J.; RUIZ, B.; FONTHAM, E.T.; MERA, R.; MILLER, M.; CORREA, P. Inducible nitric oxide syntase, nitrotyrosine and apoptosis in *Helicobacter pylori* gastritis: effect of antibiotics and antioxidants. **Cancer Research**, v. 56, p. 3238-3243, 1996.

MARTINS, G.; ALVES, M.; DIAS, J.; SANTOS, R.; COSTA-NEVES, J.; MAFRA, M.; MARINS, A . P.; RAMOS, S.; RAMOS, M.; MEXIA, J.; QUINA, M.; RUEFF, J.; MONTERO, C. Glutathione S-transferase mu polymorphism and gastric cancer in the portuguese population. **Biomarkers**, v.3, p. 441-447, 1998.

McGLYNN, K.A.; ROSVOLD, E.A.; LUSTBADER, E.D. Susceptibility to hepatocellular carcinoma is associated with genetic variation in the enzymatic detoxification of aflatoxin B1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v.92, p.2384-2387, 1995.

McWILLIAMS, J.E.; SANDERSON, B.J.S.; HARRIS, E.L.; RICHERT-BOE, K.E. HENNER, W.D. Glutathione S-transferase M1 deficiency is associated with a moderate increase in risk of developing lung cancer. **Proceedings of the American Association for Cancer Research**, v.36, p.121, 1995.

MINAMOTO, T.; MASAYOSHI, M.; RONAI, Z. Environmental factors as regulators and effectors of multistep cacinogenesis. **Carcinogenesis**, v.20, p.519-527, 1999.

MITCHELL, H.M.; LI, Y.Y.; LIU, Q.; CHEN, M.; DU, G.G.; WANG, Z.J.; LEE, A.; HAZELL, S.L. Epidemiology of *Helicobacter pylori* in Southern China: identification of early childhood as the critical period for acquisition. **Journal of Infectious Diseases**, v.166, p.149-153, 1992.

MIZOUE, T.; TOKUI, N.; NISHISAKA, K.; NISHISAKA, S.; OGIMOTO, I.; IKEDA, M.; YOSHIMURA, T. Prospective study on the relation of cigarette smoking with cancer of the liver and stomach in an endemic region. **International Journal of Epidemiology**, v.29, p.232-237, 2000.

MUNOZ, N.; KATO, I.; PERAZA, S.; LOPEZ, G.; CARRILLO, E.; RAMIREZ, H.; VIVAS, J.; CASTRO, D.; SANCHEZ, V.; ANDRADE, O.; BUIATTI, E.; OLIVER, W. Prevalence of precancerous lesions of the stomach in Venezuela. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v.5, p.41-46, 1996.

MURRAY, G. I.; SHAW, D.; WEAVER, R. J.; MACKAY, J. A.; EWEN, S. W. B.; MELVIN, W. T.; BURKE, M. D. Cytochrome P-450 expression in oesophageal cancer. **Gut**, vol.35, pp. 599-603, 1994.

NAVASUMRIT, P.; WARD, T.H.; DODD, N.J.F.; O'Connor, J. Ethanol-induced free radical and hepatic DNA strand breaks are prevented *in vivo* by antioxidants: effects of acute and chronic ethanol exposure. **Carcinogenesis**, v.21, p. 93-99, 2000.

NERBERT, D. W.; Role of genetics and drug metabolism in human cancer risk. **Mutation Research**, v. 247, p.267-281, 1991.

NERBERT, D. W.; MCKINNON R.A.; PUGA, A. Human drug-metabolizing enzyme polymorphisms: effects on risk of toxicity and cancer. **DNA and Cell Biology**, v.15, p.273-280, 1996.

NEUGUT, A. I.; HAYEK, M.; HOWE, G. Epidemiology of gastric cancer. **Seminars in Oncology**, v. 23, p. 281-291, 1996.

NG, E. K. W.; SUNG, J. J.Y.; LING, T. K. W.; IP, S. M.; LAU, J. Y. W.; CHAN, A. C. W.; LIEW, C. T.; SYDNEY-CHUNG, S. C. *Helicobacter pylori* and the null genotype of glutathione-S-transferase- μ in patients with gastric adenocarcinoma. **Cancer**, v. 82, p. 268-273, 1998.

NISHIMOTO, I. N.; HANAOKA, T.; SUGIMURA, H.; NAGURA, K.; IHARA, M.; LI, X. J.; ARAI, T.; HAMADA, G. S.; KOWALSKI, L. P.; TSUGANE, S. Cytochrome P450 2E1 polymorphism in gastric cancer in Brazil: case-control studies of Japanese Brazilians and non-Japanese Brazilians. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v.9, p. 675-680, 2000.

NOMURA, A.; GROVE, J.S.; STEMMERMANN, G.N.; SEVERSON, R.K. A prospective study of relation to diet, cigarettes, and alcohol consumption. **Cancer Research**, v.50, p.627-631, 1990.

NOMURA, A.; STEMMERMAN, G.N.; CHYOU, P.H.; KATO, I.; PEREZ-PEREZ, G.I.; BLASER, M.J. *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. **New England Journal of Medicine**, v.325, p.1132-1136, 1991.

O'CONNOR, F.; BUCKLEY, M.; O'MORAIN, C. *Helicobacter pylori*: the cancer link. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v.88, p.674-678, 1996.

OHSHIMA, S.; XU, Y. p53 gene mutations, and *CYP1A1* and *GSTM1* genotypes in pulmonary squamous cell carcinomas. **Journal of Clinical Pathology**, v.50, p.108-110, 1997.

PAKODI, F.; ABDEL-SALAM, O.M.E.; DEBRECENI, A.; MÓZSIK, G. *Helicobacter pylori*. One bacterium and a broad apectrum of human disease! An overview. **Journal of Phisiology**, v.94, p.139-158, 2000.

PARSONNET, J. Bacterial infection as a cause of cancer. **Environmental Health & Perspectives**, v. 103, p. 263-268, 1995.

PAVANELLO, S.; CLONFERO, E. Biological indicators of genotoxic risk and metabolic polymorphisms. **Mutation Research**, v. 463, p. 285-308, 2000.

PEEK, R.M.JR.; THOMPSON, S.A.; DONAHUE, J.P.; THAM, K.T.; ATHERTON, J.C.; BLASER, M.J.; MILLER, G.G. Adherence to gastric epithelial cells induces expression of a *Helicobacte pylori* gene *iceA*, that is associated with clinical outcomo. **Proceendings of the Association of Ameriacan Physicians**, v.110, p.531-544, 1998.

PEMBLE, S.; SCHROEDER, K.R.; SPENCER, S.R.; MEYER, D.J.; HALLIER, E.; BOLT, H.M.; KETTERER, B.; TAYLOR, J.B. Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a gentic polymorphism. **Biochemical Journal**, v.300, p.271-276, 1994.

PERERA, F.P. Environment and cancer: who are susceptible? **Science**, v.278, p.1068-1073, 1997.

PERSSON, I.; JOHANSSON, T.; BERGLING, H.; DAHL, M.L.; SEIDEGARD, J.; RYLANDER, R.; RANNUG, A.; HÖBERG, J.

SUNDBERG, M.I. Genetic polymorphism of cytochrome P450E1 in a Swedish population. Relationship to incidence of lung cancer. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v.319, p.207-211, 1993.

PERSSON, I.; JOHANSSON, I.; LOU, Y.C.; YUE, Q.Y.; DUAN, L.S.; BERTILSSON, L.; INGELMAN-SUNDBERG, M. Genetic polymorphism of xenobiotic metabolizing enzymes among Chinese lung Cancer patients. **International Journal of Cancer**, v.81, p.325-329, 1999.

PONDER, B. A. J. Inherited predisposition to cancer. **Trends in Genetics**, v.6, p. 213-218, 1990.

POREMBA, C.; UANDELL, D.W.; HUANG, Q.; LITTLE, J.B.; MELLIN, W.; SCHIMID, K.W.; BOCKER, W.; DOCKHORN-DWORNICZAK, B. Frequency and spectrum of p53 mutations in gastric cancer: a molecular genetic and immunohistochemical study. **Virchows Archiv a Pathological Anatomy and Histopathology**, v.426, p.447-455, 1995.

PRICE, A.B. The Sydney sistem: histological division. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v.6, p.209-222, 1991.

RAUNIO, H.; HUSGAFVEL-PURSIANEN, K.; ANTILLA, S.; HIETANEN, E.; HIRVONEN, A.; PELSKONEN, O. Diagnosis of polymorphisms in carcinogen-activating and inactivating enzymes and cancer susceptibility - a review. **Gene**, v.159, p. 113-121, 1995.

ROGERS, A.S. The role of cytochrome P450 in developmental pharmacology. **Journal of Adolescent Health Care**, v.15, p.635-640, 1994.

ROSSIT, A.R.B. Investigação molecular de polimorfismos em genes relacionados ao metabolismo de xenobióticos e ao reparo do DNA em populações brasileiras. 2001. 181f. Tese (Doutorado em Genética) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (UNESP) – São José do Rio Preto (SP).

RUBIN, E.; FARBER, J. L. **Pathology**. 2. ed., J. B. Lippincott Company, 1578p, 1994.

RUGGE, M.; FARINATI, F.; BAFFA, R. Gastric epithelial dysplasia in the natural history of gastric cancer: a multicenter prospective follow-up study. **Gastroenterology**, v.107, p.1288-1296, 1994

RUSSO, A.; BAZAN, V.; MIGLIAVACCA, M.; TUBIOLO, C.; MACALUSO, M.; ZANNA, I.; CORSALE, S.; LATTEI, F.; VALERIO, MR.; PANTUSO, G.; MORELLO, V.; DARDANONI, G.; LATTEI, M.A.; COLUCCI, G.

TOMASINO, R.M.; GEBBIA, N. DNA aneuploidy and high proliferative activity but not *K-ras-2* mutations as independent predictors of clinical in operable gastric carcinoma: results of a 5-year Gruppo Oncologico dell'Italia Meridionale (GDIM) prospective study. **Cancer**, v.92, p.294-302, 2001.

SAADAT, I.; SAADAT, M. Glutathione S-transferase M1 and T1 null genotypes and the risk of gastric and colorectal cancers. **Cancer Letters**, v.169, p.21-26, 2001.

SAKAKI, N.; MOMMA, K.; EGWA, N.; YAMAD, Y.; KAN, T.; ISHIWATA, J. The influence of *Helicobacter pylori* infection on the progression of gastric mucosal atrophy and occurrence of gastric cancer. **European Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v.7, p.S59-S62, 1995.

SARHANIS, P.; REDMAN, C.; PERRET, C. Epithelial ovarian cancer: influence of polymorphism at the glutathione s-transferase GSTM1 and GSTT1 loci on p53 expression. **British Journal of Cancer**, v.74, p.1757-1761, 1996.

SCARPATO, R.; HIRVONEN, A. MIGLIORE, L.; FALCK, G.; NORPPA, H. Influence of *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms on the frequency of chromosome aberrations in lymphocytes of smokers and pesticide-exposed greenhouse workers. **Mutation Research**, vol. 389, pp. 227-235, 1997.

SCHORK, N.J.; CARDON, L.R.; XU, X. The future of genetic epidemiology. **Trends in Genetics**, v.14, p.266-272, 1998.

SETIAWAN, V. W.; ZHANG, Z. F.; YU, G. P.; LI, M. L.; TSAI, C. J.; CORDOVA, D.; WANG, M. R.; GUO, C. R.; YU, S. Z.; KURTZ, R. C. GSTT1 and GSTM1 null genotypes and the risk of gastric cancer: a case-control study in a chinese population. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 9, p. 73-80, 2000.

SETIAWAN, V.W.; ZHANG, Z.F.; YU, G.P.; LU, Q.Y.; LI, Y.L.; LU, M.L.; WANG, M.R.; GUO, C.H.; YU, S.Z.; KURTZ, R.C.; HSIECH, C.C. *GSTP1* polymorphisms and gastric cancer in a high-risk chinese populations. **Cancer Causes Control**, v.12, p.673-681, 2001.

SHI, C.Y.; SEOW, A. ; LIN, Y.; CHIA, K.S.; ONG, C.N.; CHAN, S.H.; LEE, H.P. Biomarkers: a molecular approach to cancer epidemiology. **Annals of the Academy of Medicine Singapore**, v..25, p.49-54, 1996.

SHIBATA, T.; IMOTO, I.; GABAZZA, E.C. Detection of *Helicobacter pylori* in biopsy of patients with gastric carcinoma. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.51, p.22-28, 1997.

SIMAN, J.H.; FORSGREN, A.; BERGLUND, G.; FLOREN, C.H. Association between *Helicobacter pylori* and gastric carcinoma in the city of Malmö, Sweden – A prospective study. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v.32, p.1215-1221, 1997.

SINHA, R. & CAPORASO, N. Diet, genetic susceptibility to cancer. **Cancer**, v.72, p.991-995, 1993.

SIPPONEN, P.; HYVARINEN, H. Role of *Helicobacter pylori* in the pathogenesis of gastritis, peptic ulcer and gastric cancer. **Scandinavian Journal of Gastroenterology Supplement**, v.196, p.3-6, 1993.

SIPPONEN, P.; HYVÄRINEN, H.; SEPPÄÄLÄ, K.; BLASER, M.J. Review article: pathogenesis of transformation from gastritis to malignancy. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v.12, p.61-71, 1998.

STADTLÄNDER, C.T.K.H.; WATERBOR, J.W. Molecular epidemiology, pathogenesis and prevention of gastric cancer. **Carcinogenesis**, v.20, p.2195-2208, 1999.

STERMMERMANN, G.N. Intestinal metaplasia of the stomach. A status report. **Cancer (Phila)**, vol. 74, pp. 556-564, 1994.

STRANGE, R.C.; LEAR, J.T.; FRYER, A.A. Glutathione S-transferase polymorphisms: influence on susceptibility to cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v.111-112, p.351-364, 1998.

STRANGE, R.C.; SPITERI, M.A.; RAMACHANDRAN, S.; FRYER, A. A. Glutathione-S-transferase family of enzymes. **Mutation Research**, v.482, p.21-26, 2001.

VALLE, J.; GISBERT, J.P. *Helicobacter pylori* infecção and precancerous lesions of the stomach. **Hepato-Gastroenterology**, v.48, p.1548-1551, 2001.

VAN DOORN, L.; FIGUEIREDO, C.; SANNA, R.; PLAISIER, A.; SCHNEEBERGER, P.; BOER, W.; QUINT, W. Clinical relevance of the *cagA*, *vacA*, and *iceA* Statuts of *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology**, v.115, p. 58-66, 1998.

VAN IERSEL, M.L.P.S.; VERHAGEN, H.; VAN BLADEREN, P. J. The role of biotransformation in dietary (anti)carcinogenesis. **Mutation Research**, v.443, p. 259-270, 1999.

TOMPKINS, L. S. & FALKON, S. The new path to preventing ulcers. **Science**, v. 267, p. 1621-1622, 1995.

TSUKINO, H.; KURODA, Y.; QIU, D.; NAKAO, H. IMAI, H. KATOH, T. Effects of cytochrome P450 (CYP)2A6 gene deletion and CYP2E1 genotypes on gastric adenocarcinomas. **International Journal of Cancer**, v.100, p.425-428, 2002.

UEMATSU, F.; KIKUCHI, H.; MOTOMYA, M.; ABE, T.; SAGAMI, I.; OHMACHI, T.; WAKUI, A.; KANAMARU, R.; WATANABE, M. Association between restriction fragment length polymorphism of the human cytochrome P450IIE1 gene and susceptibility to lung cancer. **Japanese Journal of Cancer**, v.82, p.254-256, 1991.

UEMATSU, F.; IKAWA, S.; KIKUCHI, H.; ABE, T.; SAGAMO, I.; OHMACHI, T.; WAKUI, A.; KANAMARU, R.; WATANABE, M. Restriction fragment length polymorphism of the human CYP2E1 (cytochrome P450IIE1) gene and susceptibility to lung cancer: possible relevance to low smoking exposure. **Pharmacogenetics**, v. 4, p. 58-63, 1994.

UEMURA, N.; OKAMOTO, S.; YAMAMOTO, S.; MATSUMURA, N.; YAMAGUCHI, S.; YAMAKIDO, M.; TANIYAMA, K.; SASAKI, N.; SCHLEMPER, R.J. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. **New England Journal of Medicine**, vol.345, p.784-789, 2001.

WATANABE, J.; HAYASHI, S. I.; NAKACHI, K. IMAI, K.; SUDA, Y.; SEKINE, T.; KAWAJARI, K. *Pst*I and *Rsa*I RFLPs in complete linkage disequilibrium at the CYP2E1 gene. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 7149, 1990.

WATANABE, J.; KURATA, J.H.; MIZUNO, S.; MUKAI, M.; INOKACHI, H.; MIKI, K.; OZASA, K.; KAWAI, K. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. A nested case-control study in a rural area of Japan. **Diagnostic Disease Science**, v.42, p.1383, 1997.

WERNER, M.; BECKER, K.F.; KELLER, G.C.; HOFER, H. Gastric adenocarcinoma: pathomorphology and molecular pathology. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v.127, p.207-216, 2001.



T. 1675/07

WESSELING, C.; ANTICH, D.; HOGSTEDT, C.; RODRIGUEZ, A.C, AHLBOM, A. Geographical differences of cancer incidence in Costa Rica in relation to environmental and occupational pesticide exposure. **International Journal of Epidemiology**. V.28, p.365-374, 1999.

WORMHOUDT, L.W.; COMMANDEUR, J.N.M. VERMEULEN, N.P.E. Genetic polymorphisms of human N-acetyltransferase, cytochrome P450, glutathione S-transferase, and epoxide hydrolase enzymes: relevance to xenobiotic metabolism na toxicity. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 29, p. 59-124, 1999.

YASUI, W.; OUE, N.; KUNIYASU, H.; ITO, R.; TAHARA, E.; YOKOZAKI, H. Molecular diagnosis of gastric cancer: present and future. **Gastric Cancer**, v.4, p.113-121, 2001.

YE, W.; EKSTROM, A. M. HANSSON, L.E.; BERGSTROM, R.; NYREN, O. Tobacco, alcohol and the risk of gastric cancer by sub-site and histologic type. **International Journal of Cancer**, v.83, p.223-229, 1999.

YOU, W.; ZHANG, L.; GAIL, M.H.; CHANG, Y.; LIU, W.; MA, J.; LI, J.; JIN, M.; HU, Y.; YANG, C.; BLASER, M.; CORREA, P.; BLOT, W.J.; FRAUMENI, J.F.; XU, G. Gastric dysplasia and gastric cancer: *Helicobacter pylori*, serum vitamin C, and others risk factors. **Journal of the National Cancer Institute**, v.92, p.1607-1612, 2000

ZARIDZE, D.; BORISOVA, E.; MAXIMOVITCH, D.; CHKHIKVADZE, V. Alcohol consumption, smoking and risk of gastric cancer: case-control study from Moscow, Russia. **Cancer Causes Control**, v.11, p. 363-371, 2000.

IX - Apêndice I**QUESTIONÁRIO DO PROJETO: Polimorfismos dos genes *GSTT1*, *GSTM1* e *CYP2E1* em câncer gástrico e gastrite crônica.**

Responsáveis: Prof^a. Dr^a. Ana Elizabete Silva (Departamento de Biologia – IBILCE-UNESP / São José do Rio Preto-SP), Dr. Aldenis Albanese Borim (Chefe do Serviço de Cirurgia de Esôfago, Estômago e Duodeno do Departamento de Cirurgia) e Dr. Alaor Caetano (Chefe do Serviço de Endoscopia, do Hospital de Base de São José do Rio Preto-SP).

I. IDENTIFICAÇÃO

Nome:.....Prontuário....
 Data de nascimento:/...../..... Sexo () F () M
 Grupo étnico: () caucasóide () negróide () asiático
 Endereço:.....Fone.....
 Cidade:.....Estado.....
 Profissão atual.....tempo de atuação.....
 Profissão anteriortempo de atuação.....

II. DADOS PESSOAIS E FAMILIAIS

- Consumo de bebida alcoólica: () sim () não
 Há quantos anos:.....Tipo de bebida:.....

- Consumo de cigarro : () sim () não () ex-fumante
 Há quantos anos:.....Quatidade (un/dia):.....

- Doenças anteriores:
 () úlcera () gastrite () câncer (tipo:.....)
 () outras (tipo:.....)

- Tratamentos anteriores: () sim () não
 Tipo:

- Cirurgias anteriores: () sim () não
 Tipo:

Uso de medicamentos: () sim () não
 Tipo:.....

- História de câncer ou outras doenças na família (grau de parentesco)
 () câncer (tipo:.....) () úlcera () gastrite
 () outras (tipo:.....)

Data:...../...../..... Responsável pelo procedimento:.....



IX - Apêndice I
QUESTIONÁRIO DO PROJEITO: Polimorfismos nos genes GSTT1, GSTM1 e
CYP2E1 em cânceres de bexiga e sistema urinário.
Pacientes: Prof. Dr. Maria Elizabeth Silva (Departamento de Biologia - UNICEP)
Dr. SP / São José do Rio Preto - SP; Dr. Alexandre Abranches Bordin (Unidade de Serviço de
Urologia do Hospital de Referência e Unidade de Exatidão do Laboratório de Química e Dr. Alvaro
Cassiano (Unidade de Serviço de Endoscopia do Hospital de São José do Rio Preto - SP)

I. IDENTIFICAÇÃO

Nome: _____
Data de nascimento: ____/____/____ Sexo: () F () M
Grupo étnico: () caucasóide () negroide () asiático
Endereço: _____
Cidade: _____
Profissão atual: _____
Profissão anterior: _____
Tempo de atuação: _____
II. DADOS PESSOAIS E FAMILIAIS

- Consumo de bebida alcoólica: () sim () não
Há quantos anos: _____
- Consumo de cigarro: () sim () não
Há quantos anos: _____
- Consumo de fumo: () sim () não
Há quantos anos: _____

- Doenças anteriores:
() diabetes () hipertensão () câncer (tipo: _____)
() outras (tipo: _____)
- Tratamentos anteriores:
() sim () não
Tipo: _____

Autorizo a reprodução em fotocópia deste trabalho

São José do Rio Preto, 30 de Agosto de 2002.

Jucimara Colombo

