



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU  
MESTRADO EM GENÉTICA

**ANALISE DE POLIMORFISMOS NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE  
*CITOCROMO P4502E1 (CYP2E1)* EM INDIVÍDUOS ALCOOLISTAS DO  
MUNICÍPIO DE GOIÂNIA-GO**

**JHENEFFER SONARA AGUIAR RAMOS**

Goiânia-Goiás  
2016



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU  
MESTRADO EM GENÉTICA

**ANALISE DE POLIMORFISMOS NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE  
*CITOCROMO P4502E1 (CYP2E1)* EM INDIVÍDUOS ALCOOLISTAS DO  
MUNICÍPIO DE GOIÂNIA-GO**

**JHENEFFER SONARA AGUIAR RAMOS**

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Daniela de Melo e Silva

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Genética, da Pró-reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Genética.

Goiânia-Goiás  
2016

R175a Ramos, Jheneffer Sonara Aguiar

Análise de polimorfismos na região promotora do gene citocromo P4502E1 (CYP2E1) em indivíduos alcoolistas do município de Goiânia-GO [manuscrito] / Jheneffer Sonara Aguiar Ramos.-- 2016.

76 f. : il. : 30 cm

Texto em português com resumo em inglês.

Dissertação (mestrado) -- Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Programa de Pós-Graduação STRICTO SENSU em Genética, Goiânia, 2016

Inclui referências

1. Alcoolatras - Goiânia (GO). 2. Polimorfismo (Genética). 3. Substâncias - Abuso - Goiânia (GO). 4. Alcool. 5. Metabolismo. I. Silva, Daniela de Melo e. II. Pontifícia Universidade Católica de Goiás. III. Título.

CDU: 364.692:663.51:615.015.6(043)



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

Av. Universitária, 1069 • Setor Universitário  
Caixa Postal 86 • CEP 74605-010  
Goiânia • Goiás • Brasil  
Fone: (62) 3946.1070 • Fax: (62) 3946.1070  
www.pucgoias.edu.br • prope@pucgoias.edu.br

ATA COMPLEMENTAR Nº 118/2016

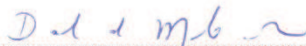
MESTRADO EM GENÉTICA DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS

DISCENTE: JHENEFFER SOANARA AGUIAR RAMOS

DEFENDIDA EM 14 DE MARÇO DE 2016 E APROVADA COM CONCEITO...A.....

O título foi alterado  não  sim \_\_\_\_\_

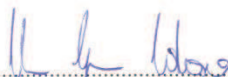
BANCA EXAMINADORA



.....  
Profa Daniela de Melo e Silva / PUC Goiás  
(presidente-orientador)



.....  
Profa. Dra. Flávia Melo Rodrigues / PUC Goiás  
(Membro interno)



.....  
Prof. Dr. Clever Gomes Cardoso/UFG  
(membro externo)

## INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES

Para o desenvolvimento da presente dissertação houve a colaboração das seguintes instituições: Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-GO) – Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Genética; Núcleo de Pesquisas Replicon do Departamento de Biologia da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-GO); Laboratório de Radiobiologia e Mutagênese (LabMut) da Universidade Federal de Goiás (UFG); Laboratório de Genética e Biodiversidade (LGBio) da Universidade Federal de Goiás (UFG); Centro de Atenção Psicossocial – Álcool e drogas (CAPS/Ad Casa) e Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG).

Dedico este estudo aos meus pais e irmãos pelo incentivo, amor e apoio ao longo do período de elaboração e execução desse trabalho.

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela minha vida, saúde, força e de todos que me cercaram e de forma positiva acrescentaram no meu crescimento e no desenvolvimento desse estudo.

Aos meus pais, Joaquim Pereira Ramos e Elenilce Aguiar Ramos e aos meus irmãos Felipe Kemerson Aguiar Ramos e Stefany Linara Aguiar Ramos por todo incentivo, apoio, paciência e compreensão.

A minha Orientadora, Profa. Dra. Daniela de Melo e Silva, pelos seus conselhos, incentivo, generosidade, confiança, disposição e paciência ao longo dos últimos anos. Minha admiração, respeito e gratidão pelos ensinamentos, sugestões, por acreditar em mim e pela oportunidade que me concedeu ao participar desse projeto, contribuindo para aprofundar o meu conhecimento científico e intelectual.

Ao grupo de graduandos, mestrandos, doutorandos e doutores do Laboratório de Radiobiologia e Mutagênese (LabMut) da Universidade Federal de Goiás por todo auxílio, suporte e disposição no desenvolvimento e padronização da metodologia utilizada nesse trabalho, sem vocês esse trabalho não teria se construído.

Ao Núcleo de Pesquisas Replicon do Departamento de Biologia da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-GO) e o Laboratório de Genética e Biodiversidade (LGBio) da Universidade Federal de Goiás (UFG) em especial a MSc. Thais Guimarães de Castro, por cederem o espaço físico e pelo suporte oferecido para a execução de parte da metodologia;

Ao MSc. Leandro de Prado Felício do Laboratório de Farmacologia Bioquímica e Molecular da Universidade Federal de Goiás pelo auxílio com as análises dos dados gerados.

Aos amigos e companheiros do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Genética da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-GO) que tornaram as aulas mais produtivas ao compartilharem suas experiências e conhecimento.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás – FAPEG, pela Bolsa de Extensão, que possibilitou a realização desse mestrado e por fomentar o projeto de pesquisa que originou essa dissertação.

Ao Professor Dr. Aparecido Divino da Cruz, PhD e a Dra. Juliana Santos de Souza Hannum, pelo apoio e confiança profissional.

Aos profissionais e pacientes do Centro de Atenção Psicossocial – Álcool e drogas (CAPS/Ad Casa) e aos voluntários que tornaram esse projeto possível.

Aos membros da banca avaliadora pelas contribuições e participação na banca de avaliação deste trabalho.

Aos professores do mestrado em genética da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, que me ensinaram e compartilharam seu conhecimento de forma generosa e incentivadora, sendo importante no meu aprendizado em genética e biologia molecular.

A Alessandra Malta de Oliveira, secretária do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Genética da PUC-GO, por sua disposição, paciência e apoio nas questões burocráticas.



“Conhecimento não é aquilo que você sabe,  
mas o que você faz com aquilo que você  
sabe.”

Aldous Huxley

## RESUMO

RAMOS, J. S. A. **Análise de polimorfismos na região promotora do gene *citocromo P4502E1 (CYP2E1)* em indivíduos alcoolistas do município de Goiânia-GO.** 2016. 76 p. Dissertação de Mestrado em Genética, Pontifícia Universidade Católica de Goiás.

O gene *citocromo P4502E1 (CYP2E1)* codifica uma enzima que é a principal constituinte do Sistema microsomal de oxidação do etanol. Variações genéticas presentes no gene *CYP2E1* resultam em diferenças significativas na atividade enzimática, entretanto o significado funcional dessas variações no metabolismo do etanol permanece controverso, uma vez que ainda não existe uma correlação evidente com diferenças na atividade catalítica da enzima. No presente estudo, a variabilidade da região promotora do gene *CYP2E1* foi analisada em amostras de alcoolistas de um Centro de Atenção Psicossocial (CAPS) do Estado de Goiás, da cidade de Goiânia e os resultados foram comparados com os dados obtidos pelo projeto 1000 Genomas. Foi realizado um estudo de associação entre polimorfismos da região promotora do *CYP2E1* e o dano genotóxico em alcoolistas, para isso foram realizados a reação de sequenciamento e o ensaio cometa. Nas nossas análises não houve relação dos dados de polimorfismos encontrados com o dano genotóxico. Entretanto, a análise de genotoxicidade dos grupos analisados mostrou maior dano genotóxico no grupo caso (alcoolistas) em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). Considerando todas as populações avaliadas, 17 pontos de variação foram encontrados. Estes pontos de variação estão arranjados em 22 haplótipos diferentes. Um elevado desequilíbrio de ligação foi observado entre as variantes nas posições -1295 e -1055, nos grupos caso e controle e nas populações americana, europeia e asiática. Considerando a complexa interação entre fatores genéticos e ambientais na resposta interindividual ao uso de bebidas alcoólicas, é desejável a realização de estudos acerca dessa interação em populações com características genéticas distintas.

**Palavras-chave:** *CYP2E1*; etanol; metabolismo; polimorfismos.

## ABSTRACT

RAMOS, J. S. A. **Analysis of polymorphisms in the promoter region of the gene cytochrome P4502E1 (CYP2E1) in alcoholics of the municipality of Goiânia-GO.** 2016. 76 p. Dissertation Master in Genetic. Pontifícia Universidade Católica de Goiás.

The *Cytochrome P4502E1 (CYP2E1)* gene encodes an enzyme which is the main constituent of microsomal ethanol oxidizing system. Genetic variation present in the *CYP2E1* gene result in significant differences in enzyme activity, however the functional significance of these variations in the metabolism of ethanol remains controversial, since there is not yet a clear correlation with differences in catalytic activity of the enzyme. In this study, the variability of the promoter region of the *CYP2E1* gene was analyzed in samples of alcoholics of a Psychosocial Attention Center (CAPS) in the state of Goiás, in the city of Goiânia and the results were compared with the data obtained by the 1000 Genomes project. We conducted a study of association between polymorphisms of the promoter region of the *CYP2E1* and genotoxic damage in alcoholics, for this sequencing reaction and the comet assay were performed. In our analysis there was no correlation of data polymorphisms found with genotoxic damage. However, genotoxicity analysis of the groups showed greater genotoxic damage in the case group (alcoholic) compared to the control group ( $p < 0,05$ ). Considering all populations evaluated, 17 points of variation were found. These points of variation are arranged in 22 different haplotypes. A high linkage disequilibrium was observed between the variants at positions -1295 and -1055, in the case and control groups and the American, European and Asian populations. Considering the complex interaction between genetic and environmental factors in response of interindividual alcoholic beverages, it is desirable to conduct studies about this interaction in populations with different genetic characteristics.

**Keywords:** *CYP2E1*; ethanol; metabolism, polymorphism.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1. Metabolismo do etanol.....	19
2.2. Aspectos moleculares.....	21
2.2.1. Superfamília <i>Citocromo P450 (CYP)</i> .....	21
2.2.2. Subfamília <i>Citocromo P4502E1 (CYP2E1)</i> .....	22
2.2.3. Polimorfismos do gene <i>CYP2E1</i> .....	25
2.3. Ensaio cometa e avaliação do dano genotóxico.....	27
2.4. Projeto 1000 Genomas.....	28
2.5. Aspectos epidemiológicos.....	29
2.6. Centro de atenção psicossocial – Álcool e drogas.....	31
3. OBJETIVOS.....	32
3.1. Objetivo geral.....	32
3.2. Objetivos específicos.....	32
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1. Casuística.....	33
4.2. Coleta e processamento da amostra.....	33
4.3. Ensaio cometa.....	34
4.4. Extração e quantificação do DNA.....	35
4.5. Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	36
4.6. Eletroforese em gel de agarose.....	37
4.7. Reação de sequenciamento.....	37
4.8. Análise dos dados do projeto 1000 Genomas.....	39
4.9. Análise estatística.....	40
5. RESULTADOS.....	42
5.1. Caracterização geral dos grupos caso e controle.....	42
5.2. Danos no DNA detectados pelo ensaio cometa.....	43
5.3. Frequências alélicas, genótípicas e aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	44

5.4. Desequilíbrio de ligação.....	47
5.5. Diversidade, frequência e relações entre os haplótipos.....	49
5.6. Danos no DNA detectados pelo ensaio cometa nos grupos caso e controle distribuídos de acordo com as variantes na região promotora do gene <i>CYP2E1</i> .....	53
6. DISCUSSÃO.....	54
7. CONCLUSÕES.....	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	59

## ANEXO

ANEXO A – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás

## APÊNDICES

APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido

APÊNDICE B – Questionário de estilo de vida

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática das vias oxidativas do metabolismo do etanol.....20
- Figura 2.** Representação esquemática (ideograma) do cromossomo 10.....24
- Figura 3.** Consumo mundial per capita de bebidas, em litros de álcool puro, 2010.....29
- Figura 4.** Proporção de pessoas de 18 anos ou mais de idade que costumam consumir bebida alcoólica uma vez ou mais por semana, com indicação do intervalo de confiança de 95%, segundo o sexo e os grupos de idade – Brasil – 2013.....30
- Figura 6.** Desequilíbrio de ligação entre os pares de SNPs no gene *CYP2E1*.....48
- Figura 7.** Rede de haplótipos ilustrando as relações entre os 22 haplótipos (Tabela 8) encontrados em populações mundiais.....52

### QUADRO

- Quadro 1. Fatores que influenciam a absorção gastrointestinal do etanol.....19

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Nomenclatura dos alelos do gene <i>CYP2E1</i> .....	25
<b>Tabela 2.</b> Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores e suas respectivas temperaturas de desnaturação.....	36
<b>Tabela 3.</b> Protocolo de termociclagem para amplificação por PCR convencional.....	36
<b>Tabela 4.</b> Protocolo de termociclagem para a genotipagem do primer <i>CYP2E1</i> .....	36
<b>Tabela 5.</b> SNPs da região promotora do gene <i>CYP2E1</i> identificados nesse estudo.....	39
<b>Tabela 6.</b> Características sócio demográficas dos grupos caso e controle.....	42
<b>Tabela 7.</b> Valores médios $\pm$ desvio padrão (DP) do Tail Length (TL), da porcentagem de DNA na cauda (% DNA) e do Olive Tail Moment (OTM) obtidos pelo ensaio do cometa para os grupos caso e controle.....	43
<b>Tabela 8.</b> Estimativas da correlação dos parâmetros do ensaio cometa entre os hábitos tabagista e alcoolista para o grupo caso.....	43
<b>Tabela 9.</b> Pontos de variação na região promotora do gene <i>CYP2E1</i> e suas frequências em diferentes populações do projeto 1000 Genomas e em uma amostra brasileira.....	45
<b>Tabela 10.</b> Aderência das frequências dos genótipos a o Equilíbrio de Hardy-Weinberg considerando as populações do projeto 1000 Genomas e as amostras Brasileiras.....	46
<b>Tabela 11.</b> Haplótipos encontrados considerando os pontos de variação presentes na região promotora do gene <i>CYP2E1</i> .....	50
<b>Tabela 12.</b> Frequência relativa dos 22 haplótipos encontrados para a região promotora do gene <i>CYP2E1</i> considerando-se dados do projeto 1000 Genomas e as amostras brasileiras.....	51
<b>Tabela 13.</b> Estimativas da correlação dos parâmetros do ensaio cometa (média $\pm$ desvio padrão) e os genótipos individuais entre os alcoolistas.....	53

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
ADH	Álcool Desidrogenase
ALDH	Aldeído Desidrogenase
C	Citosina
CAPS Ad	Centro de Atenção Psicossocial – Álcool e drogas
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CYP	Citocromo- P450
CYP2E1	Isoforma do Citocromo- P4502E1, Família 2, Subfamília E, Polipeptídio 1
Ct	<i>Cycle Threshold</i> (Ciclo limiar)
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i> (Dimetilsulfóxido)
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido Desoxirribonucleico)
dNTP	Desoxinucleotideo trifosfato
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (Ácido etilenodiamino tetra-acético)
G	Guanina
HNF-1	<i>Hepatocyte nuclear factor 1</i> (Fator nuclear de hepatócitos 1)
IC	Intervalo de confiança
MAF	<i>Minimum allele frequency</i> (Frequência Alélica Mínima)
MEOS etanol)	<i>Microsomal Ethanol Oxidizing System</i> (Sistema microsossomal de oxidação do etanol)
NaCl	Cloreto de Sódio
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NaOH	Hidróxido de Sódio
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> ( <b>Tampão</b> fosfato-salino)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
pH	Potencial hidrogênio iônico
PUC-GO	Pontifícia Universidade Católica de Goiás
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> (Polimorfismo de nucleotídeo único)
ROS	<i>Reactive Oxygen Specie</i> (Espécie reativa de oxigênio)
T	Timina
TBE	Tris-Borato-EDTA



TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
Tris	<b>Tris</b> -hidroximetilaminometano
UFG	Universidade Federal de Goiás
VCF	<i>Variant Call Format</i> (Formato Chamada Variante)
WHO	<i>World health organization</i> (Organização mundial de saúde)

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
$\infty$	Infinito
$\geq$	Maior ou igual a
$\mu\text{L}$	Micro Litro
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
M	Molar
mA	Miliampères
mM	Milimolar
ml	Mililitro
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
pb	pares de bases
rcf	Força centrífuga relativa
rpm	Rotações por minuto
V	Volts
U	Unidade

## 1. INTRODUÇÃO

O álcool é uma substância psicoativa com propriedades que podem levar a dependência e que ao longo dos séculos tem sido amplamente utilizada em diversas culturas. A difusão do consumo de bebidas alcoólicas está associada a uma ampla variedade de problemas sociais e de saúde, além de impor um alto custo financeiro para a sociedade (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2015).

O consumo nocivo de bebidas alcoólicas se tornou um problema de saúde pública que tem aumentado progressivamente e atingido pessoas cada vez mais jovens, sendo responsável pela morte de aproximadamente 3,3 milhões (5,9%) de pessoas no mundo anualmente. Mais de 200 tipos de doenças e lesões físicas e psíquicas possuem relação causal com o consumo nocivo do álcool. Câncer, cirrose, distúrbios mentais e comportamentais são frequentemente associados ao consumo do álcool. No entanto, uma proporção importante da carga de doença atribuível ao álcool é decorrente de lesões não intencionais e intencionais, incluindo-se aquelas devidas a acidentes de trânsito, violências e suicídios (GARCIA E FREITAS, 2015).

Com os recentes avanços das técnicas em biologia molecular, novos métodos vêm sendo incorporados ao estudo da etiologia do alcoolismo. A força dos achados de estudos epidemiológicos, que comprovam a existência da participação genética nos transtornos de dependência alcoólica faz com que pesquisadores invistam nos estudos moleculares para identificar a etiologia do uso crônico e da dependência ao álcool. (MESSAS E VALLADA FILHO, 2004).

Variações genéticas nas enzimas que atuam no metabolismo do álcool como a álcool desidrogenase (ADH) e a citocromo P4502E1 (CYP2E1) determinam diferenças interpopulacionais na prevalência do alcoolismo, e constituem os únicos genes que possuem um papel confirmado na susceptibilidade ou resistência ao alcoolismo (VIEIRA, 2012).

Diversos são os genes candidatos relacionados ao metabolismo do etanol que, de alguma forma, estejam envolvidos com a ação do álcool no organismo, mas, devido à contribuição dos fatores ambientais na origem da dependência alcoólica, tem sido difícil estabelecer, precisamente, que alelos participariam desse processo. Estudos genéticos sobre a dependência alcoólica sugerem que o meio ambiente tanto pode aumentar ou diminuir a expressão genética de predisposição ao alcoolismo (REBELLO E CARVALHO, 2008).

Nesse contexto, o gene *CYP2E1* participa de uma das vias envolvidas no metabolismo

oxidativo do etanol e atinge níveis máximos de expressão após o consumo crônico de álcool, em particular nas regiões mais vulneráveis aos danos causados pelo etanol (por exemplo, o fígado). A presença de diversos pontos de variação neste gene e a influência que a respectiva enzima por este codificada exerce, em nível do metabolismo do etanol, têm estimulado a investigação no sentido de desvendar o eventual papel de polimorfismos do gene *CYP2E1* na etiologia do alcoolismo (MARQUES, 2010).

A região promotora do gene *CYP2E1* possui alguns pontos de variação importantes, que foram descritos em outros trabalhos. Os polimorfismos na região promotora do *CYP2E1* estão localizados em um sítio putativo de ligação para o fator de transcrição *Hepatocyte Nuclear Factor* (HNF-1) e tem sido associado ao aumento de transcrição do gene. A transição C>T na posição -1055 e a transversão G>C na posição -1295 são exemplos de polimorfismos que estão localizados no sítio de ligação do fator de transcrição HNF-1 e podem estar relacionados com a variação na expressão gênica do *CYP2E1* (CARVALHO, 2012). Os dois polimorfismos citados são relatados em literatura associados com uma atividade de transcrição quase dez vezes maior, quando comparados com os não portadores dos polimorfismos e que este fenômeno estaria associado ao aumento da produção de acetaldeído endógeno em alcoolistas (TAKAMORI, 2012).

A produção científica que envolve a relação entre o consumo nocivo de álcool e a gênese desse distúrbio ainda é insuficiente e configura-se em um campo de investigação a ser descoberto (MANGUEIRA, 2015). Assim, o presente estudo tem por objetivo avaliar a variabilidade dos polimorfismos de base única (SNPs) presentes na região promotora do gene *citocromo P4502E1 (CYP2E1)* em indivíduos alcoolistas do município de Goiânia-Goiás, Brasil e associá-los com o dano genotóxico avaliado pelo ensaio cometa. Concomitantemente a isso procuraremos identificar se os polimorfismos da região promotora do gene *CYP2E1*, estão em desequilíbrio de ligação e se são herdados em conjunto na forma de haplótipos.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Metabolismo do etanol

O etanol ou álcool etílico ( $C_2H_5OH$ ) é uma molécula de baixo peso molecular e componente principal de bebidas alcoólicas, podendo ser obtido através do processo de fermentação de açúcares (sacarose, maltose, glicose ou frutose) e ao ser metabolizado fornece ao organismo energia com cerca de 7,1 kcal/g (GARCIA, 2009; TAKAMORI, 2012; VIEIRA, 2012).

A absorção do etanol no trato gastrointestinal, após ser ingerido, dependerá de vários fatores (Quadro 1) (SEITZ E MUELLER, 2010). No organismo humano o etanol é absorvido de forma rápida por difusão passiva simples e não sofre processos de digestão (CEDERBAUM, 2012; RAMCHANDANI, 2013).

**Quadro 1.** Fatores que influenciam a absorção gastrointestinal do etanol.

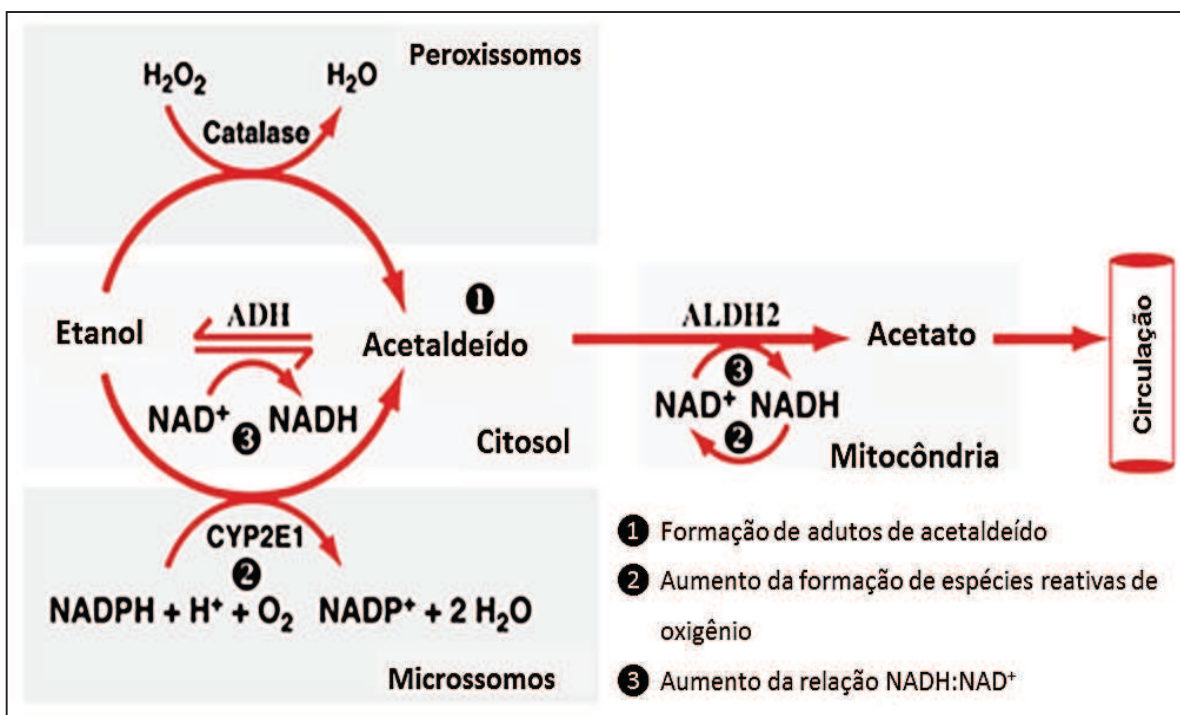
<p>Volume e concentração do etanol          Perfusão sanguínea no estômago e duodeno          Ingestão simultânea de alimentos          Taxa de esvaziamento gástrico          Temperatura Corporal          Ciclo Menstrual</p>
--

Fonte: Adaptado de Seitz e Mueller, 2010.

Oitenta por cento do álcool ingerido é absorvido no intestino delgado superior e vinte por cento é absorvido no estômago. Cerca de 2-10% do etanol administrado via oral é absorvido e excretado de forma inalterada através dos pulmões, pele e rins. O etanol restante absorvido entra no fígado através da veia porta para então ser oxidado em acetaldeído e deste em acetato que posteriormente será convertido a acetil-CoA (ZAKHARI, 2006; SEITZ E MUELLER, 2010; VIEIRA, 2012).

Várias reações que ocorrem nos hepatócitos participam da biotransformação do etanol, principalmente reações de oxidação/redução envolvendo várias enzimas e resultando produtos que podem ter toxicidade maior ou não em relação ao composto original e que podem interagir com moléculas-alvo (DNA, RNA, proteínas) (DRUMMOND, 2005; KOOP, 2006; VOGEL, 2007).

A oxidação do álcool nos hepatócitos ocorre através de três sistemas enzimáticos distintos que geram produtos específicos na qual está o acetaldeído, uma substância tóxica ao organismo humano e altamente reativo que pode contribuir para uma lesão tecidual (ZAKHARI, 2006). As três vias enzimáticas de oxidação são: via desidrogenase alcoólica, sistema microsossomal de oxidação do etanol (MEOS) e catalase (Figura 1). O acetaldeído produzido é oxidado para acetato predominantemente por ação da enzima aldeído desidrogenase-2 (ALDH2) que está localizada principalmente na mitocôndria hepática (TSENG, 2007; SEITZ E MUELLER, 2010).



**Figura 1.** Representação esquemática das vias oxidativas do metabolismo do etanol.  
Fonte: Adaptado de Zakahari, 2006.

Em indivíduos cujo consumo de álcool ocorre em um nível moderado e/ou ocasional, grande parte do álcool ingerido é quebrado pela enzima álcool desidrogenase (ADH) e convertido em acetaldeído. Durante esta reação, um próton de hidrogênio ( $\text{H}^+$ ) é removido do álcool e transferido para uma molécula chamada nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD), que por sua vez, é reduzida a NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida). Esta reação fornece um alto valor energético proveniente da NADH que também participa de outras reações metabólicas passando o  $\text{H}^+$  para outros compostos (KOOP, 2006; GARCIA, 2009; VIEIRA, 2012).

O sistema microsossomal de oxidação do etanol assume um papel importante no

metabolismo do álcool, particularmente quando os níveis de consumo são elevados e de forma crônica. A principal componente do MEOS é a enzima citocromo P450, que converte o álcool em acetaldeído, porém à custa de gasto de energia (ATP) (VIEIRA, 2012; RAMCHANDANI, 2013). Na reação mediada pela citocromo P450 ocorre a liberação de um oxigênio e uma molécula reduzida, a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) que resulta em calor e na formação de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP) e água (KOOP, 2006; VOGEL, 2007; CEDERBAUM, 2015).

Estas reações geram como bioprodutos moléculas contendo oxigênio, chamadas de radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (ROS) que contribuem para o estresse oxidativo observado após o consumo de álcool. As ROS podem interagir com lipídios, proteínas e DNA em um processo chamado de peroxidação, que pode ter consequências nocivas como a inativação de proteínas e danos no DNA levando a morte celular (KOOP, 2006; VOGEL, 2007; PLEMENTAS, 2015).

Outra via de metabolização do etanol é mediada pela enzima catalase que sob condições fisiológicas é responsável por menos de 2% do metabolismo do etanol ingerido (CEDERBAUM, 2012; VIEIRA, 2012). A participação deste sistema na oxidação do etanol ocorre com o consumo de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), posteriormente transformado em água e assim como no MEOS, não há formação de ATP (WEBB et al., 2011; RAMCHANDANI, 2013).

Na fase final do metabolismo do etanol o acetato é convertido em acetil coenzima A (acetil CoA) com o desdobramento de ATP para AMP (adenosina monofosfato). A acetil CoA poderá entrar no ciclo do ácido cítrico (Ciclo de Krebs) transformando-se em dióxido de carbono e água (ZAKHARI, 2006; CEDERBAUM, 2012; VIEIRA, 2012).

## **2.2 Aspectos moleculares**

### **2.2.1 Superfamília *Citocromo P450 (CYP450)***

A superfamília CYP450 é um grupo formado por enzimas classificadas como hemoproteínas e estão presentes em uma variedade de plantas e animais e com uma atividade catalítica muito diversificada (CEDERBAUM, 2008; CEDERBAUM, 2015). A designação

CYP450 deriva do fato de estas enzimas se ligarem às membranas ao longo da célula (*cyto*) e devido à presença de um grupamento tiol-heme, responsável pela absorção de luz a comprimentos de onda próximos dos 450nm, quando na presença de monóxido de carbono (CO) (DRUMMOND, 2005; MARQUES, 2010; CEDERBAUM, 2015).

As CYP450 encontram-se ligadas à membrana do retículo endoplasmático das células de vários órgãos e participam no metabolismo de ácidos graxos, esteroides e xenobióticos, sendo expressas principalmente no fígado e em menor extensão em outros órgãos como o intestino, pulmões ou cérebro (CARTMELL et al. 2005; DRUMMOND, 2005; CEDERBAUM, 2008).

As diversas CYP450 possuem uma nomenclatura baseada na homologia da sequência de aminoácidos. Os genes e as enzimas codificadas por estes recebem a designação de CYP (citocromo P450), seguida da atribuição sequencial de um número árabe, letra e número árabe, correspondendo à família (>40% similaridade), subfamília (>55% de similaridade) e gene específico dentro da subfamília respectivamente (CEDERBAUM, 2008; DRUMMOND, 2005; MARQUES, 2010).

De acordo com os dados mais recentes, estão identificadas 18 famílias genicas em humanos, 44 subfamílias, 58 pseudogenes e 57 genes funcionais sequenciados. Os membros das subfamílias *CYP1*, *CYP2* e *CYP3* são descritos como sendo os mais envolvidos com o metabolismo de xenobióticos e participam da fase I dessa biotransformação, chamada também de ativação (HINES, 2008; ZANGER & SCHWAB, 2013).

### **2.2.2 Subfamília Citocromo P4502E1 (CYP2E1)**

O gene *CYP2E1* está localizado no cromossomo 10q24.3-qter, é constituído por 9 exons, 8 introns (Figura 2) e codifica uma proteína de aproximadamente 57 KDa (DRUMMOND, 2005; TAKAMORI, 2012). A enzima CYP2E1 está envolvida na oxidação de uma série de componentes orgânicos de baixo peso molecular, incluindo benzeno, N-nitrosamina e etanol (VOGEL, 2007; ZENG et al., 2013).

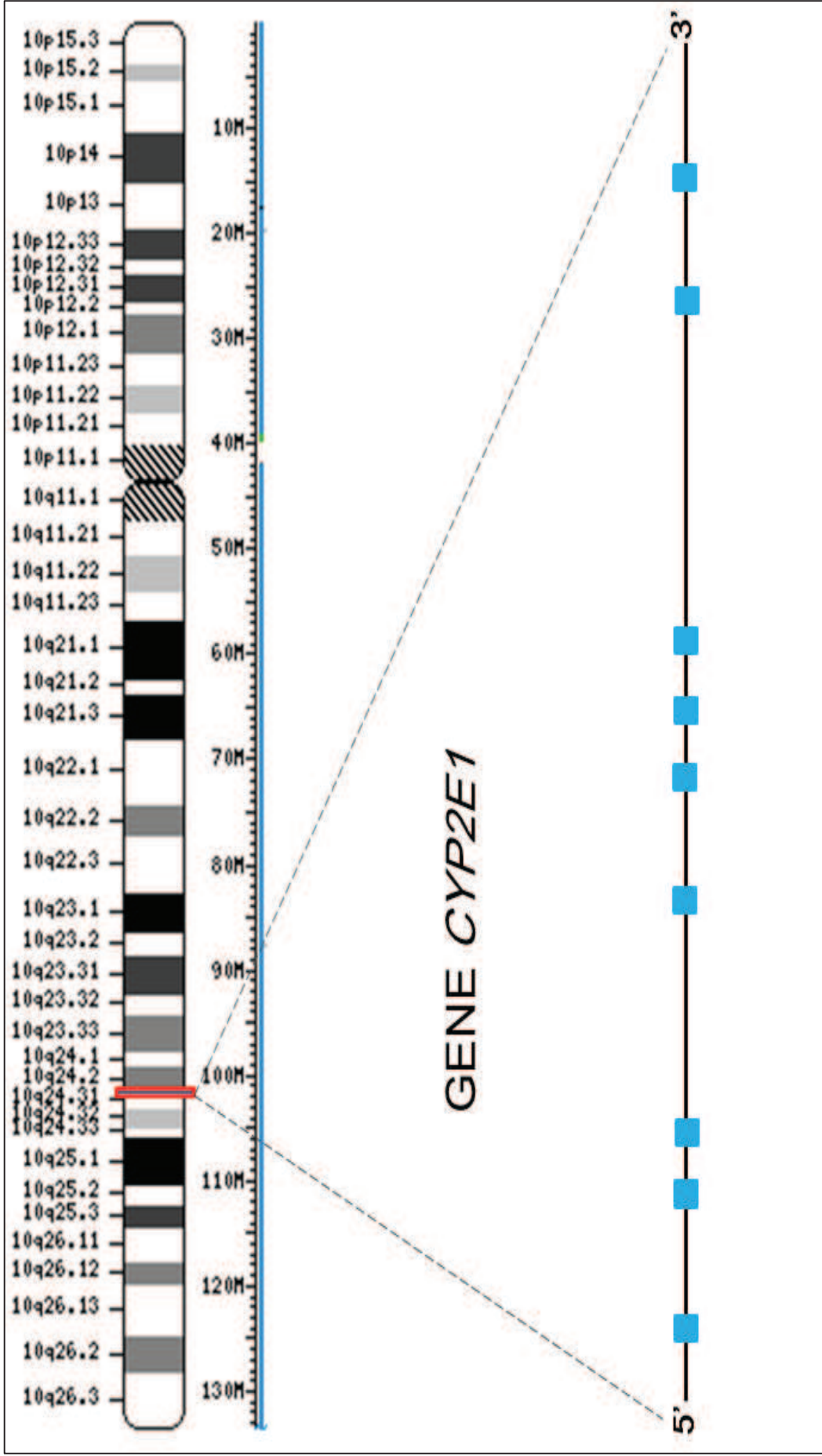
A enzima é constitutivamente expressa no fígado, órgão onde atinge níveis máximos de expressão, em particular nas regiões mais vulneráveis aos danos causados pelo etanol. Esta isoforma representa 7% do conteúdo total de CYP450 no fígado sendo também expressa, em menor extensão, em outros locais severamente afetados pelo consumo de etanol como o trato



gastrointestinal ou o cérebro (CARTMELL et al., 2005; MARQUES, 2010; TAKAMORI, 2012).

A isoforma CYP2E1 é o principal constituinte do MEOS, uma das vias envolvidas no metabolismo oxidativo do etanol e outros xenobióticos. Altas concentrações de etanol exercem um forte efeito indutor na atividade catalítica da CYP2E1, sendo que até o momento é a única isoforma CYP conhecida por ser regulada desta forma (CARTMELL et al., 2005; DRUMMOND, 2005). O efeito indutor do etanol na atividade da enzima pode levar a um aumento da transcrição e da estabilidade da enzima através de mecanismos transcricionais, pós-transcricionais e pós-traducionais. Verifica-se uma dualidade de efeitos em que, por um lado, a atividade da CYP2E1 promove a ativação de carcinogênicos e outros compostos tóxicos e, por outro lado, desempenha funções importantes ao nível do metabolismo, nomeadamente na gluconeogénese, e na destoxificação de uma grande variedade de xenobióticos, entre os quais o etanol (VOGEL, 2007; MARQUES, 2010).

Para além do consumo de etanol, vários outros compostos endógenos ou exógenos podem atuar como substratos e, simultaneamente, induzir a atividade da enzima. Fatores como o estado nutricional e metabólico do organismo, obesidade ou diabetes participam também nos complexos mecanismos de regulação da atividade desta enzima (CEDERBAUM, 2012; CELORRIO et al. 2012; ZANGER & SCHWAB, 2013).



**Figura 2.** Representação esquemática (ideograma) do cromossomo 10. Em destaque a posição genômica aproximada do gene *CYP2E1*. O retângulo vermelho representa a posição do gene *CYP2E1* no cromossomo 10 e os quadrados azuis representam os 9 exons do *CYP2E1*.  
Fonte: Elaborada pela autora.

### 2.2.3 Polimorfismos do gene *CYP2E1*

O gene *CYP2E1* contém vários polimorfismos, alguns dos quais parecem afetar a expressão da proteína (DRUMMOND, 2005). De acordo com o Banco de Dados de nomenclatura dos alelos do *Citocromo P450 (CYP)* humano (<http://www.cypalleles.ki.se/cyp2e1.htm>), foram descritos 7 alelos e 14 variantes alélicas para o gene *CYP2E1* (Tabela 1) e é possível que as variantes alélicas apresentem diferentes níveis de expressão da enzima, influenciando assim a suscetibilidade individual a carcinógenos (ZANGER & SCHWAB, 2013).

**Tabela 1.** Nomenclatura dos alelos do gene *CYP2E1*.

ALELO	POSICÃO	ALTERAÇÃO NUCLEOTIDICA
<i>CYP2E1</i> * 1A		Nenhuma
<i>CYP2E1</i> * 1B	Intron 7	9896C>G
<i>CYP2E1</i> * 1C	Região flanqueadora 5'	6 repetições
<i>CYP2E1</i> * 1Cx2		
<i>CYP2E1</i> * 1D	Região flanqueadora 5'	8 repetições
<i>CYP2E1</i> * 2	Exon 2	1132G>A
<i>CYP2E1</i> * 3	Exon 8	10023G>A
<i>CYP2E1</i> * 4	Exon 4	4768G>A
<i>CYP2E1</i> * 5A	Região flanqueadora 5'	-1295G>C; -1055C> T; 7632T>A
<i>CYP2E1</i> * 5B	Região flanqueadora 5'	-1295G>C; -1055C>T
<i>CYP2E1</i> * 6	Intron 6	7632T>A
<i>CYP2E1</i> * 7A	Região flanqueadora 5'	-333T>A
<i>CYP2E1</i> * 7B	Região flanqueadora 5'	-71G>T; -333T> A
<i>CYP2E1</i> * 7C	Região flanqueadora 5'	-333T>A; -352A>G

Fonte: Banco de dados de nomenclatura dos alelos do *Citocromo P450 (CYP)* humano, 2014.

O efeito dos polimorfismos do gene *CYP2E1* no metabolismo do álcool vem sendo estudado e os alelos \*5 (região promotora), \*6 (intron 6) e \*1D (região promotora) são descritos com maior evidência de associação com alterações nos níveis de expressão da enzima e podem estar associados com o alcoolismo e distúrbios associados (DASGUPTA, 2015).

De acordo com as recomendações para a nomenclatura convencional das variantes alélicas do gene *CYP2E1* o alelo selvagem equivale a *CYP2E1*\*1A e a atividade da enzima codificada por esse alelo é normal. Os polimorfismos com substituição C>T encontrado na posição -1055 e com substituição G>C encontrado na posição -1295 correspondem aos alelos

*CYP2E1\*5A* e *CYP2E1\*5B*, respectivamente. (MARICHALAR-MENDIA et al., 2010; RAMCHANDANI, 2013; ZANGER & SCHWAB, 2013).

Um importante alelo de alta prevalência (*CYP2E1\* 5*) formado por dois polimorfismos na região flanqueadora 5' (encontradas nas posições -1295 e -1055, respectivamente) ocorrem em completo desequilíbrio de ligação em algumas populações e parece envolver um local de ligação para o fator de transcrição HNF-1, levando a um aumento da transcrição na atividade catalítica da enzima (DRUMMOND, 2005; GARCÍA-BAÑUELOS et al., 2012; RAMCHANDANI, 2013).

O polimorfismo localizado no íntron 6 com substituição T>A na posição 7632 gera a variante alélica *CYP2E1\*6*, também conhecida por estar associada com o aumento da expressão e atividade enzimática (MARICHALAR-MENDIA et al., 2010; ZANGER & SCHWAB, 2013; ZENG et al., 2013).

Outro polimorfismo descrito na literatura do *CYP2E1* é um polimorfismo de inserção na região promotora de 96pb, na qual segundo a nomenclatura convencional o alelo de inserção é nomeado *CYP2E1\*1D*, e o alelo de não inserção, *CYP2E1\*1C* (TANG et al., 2010).

As frequências da distribuição das variantes alélicas do gene *CYP2E1* são dependentes da etnia do grupo estudado (KHAN et al., 2009; TANG et al., 2010). Alguns alelos são aproximadamente dez vezes mais frequentes em Asiáticos do que em Europeus. O alelo *\*5B*, por exemplo, tem sido descrito com uma prevalência maior em populações asiáticas (cerca de 40% são homozigotos ou heterozigotos) em comparação com populações caucasianas (inferior a 8%). Para o alelo *\*1D* a frequência encontrada foi de 23% em chineses, 31% para afro-americanos e 1-7% para caucasianos (RAMCHANDANI, 2013).

Estudos envolvendo as variantes do gene *CYP2E1* têm sido desenvolvidos, porém os resultados ainda são controversos, possivelmente devido às dificuldades na interpretação sobre o mecanismo biológico de ação das mutações sendo necessários mais estudos para compreender os mecanismos de regulação da transcrição e pós-tradução do gene *CYP2E1* e seu papel na metabolização do álcool (CEDERBAUM, 2008; MARQUES, 2010; RAMCHANDANI, 2013).

### 2.3 Ensaio cometa e avaliação do dano genotóxico

O Ensaio Cometa, ou Eletroforese em Gel de Célula única, é um método de estudo genotóxico desenvolvido por Ostling e Johanson (1984) e posteriormente foi modificado por Singh et al., (1988) que avalia danos ao DNA de células individuais e possibilita quantificar quebras da fita simples e dupla no DNA (COLLINS et al., 2008).

Esse teste é utilizado em uma ampla variedade de aplicações que incluem: biomonitoramento, em uma grande variedade de espécies e em sistemas *in vitro* e *in vivo*; avaliação do dano do DNA e do estresse oxidativo em relação a inúmeras doenças, assim como a avaliação da proteção pela atuação de antioxidantes; genética toxicológica (*in vitro* e *in vivo*, em células humanas, de outros animais e de plantas); monitoramento ecológico e toxicologia aquática; uso como ferramenta na investigação do dano e do reparo de DNA em diferentes tipos celulares, em resposta a inúmeros agentes genotóxicos (COLLINS et al., 2008; BAGATINI & MALUF, 2011).

O princípio da técnica é simples e consiste em fazer passar uma corrente elétrica pelas células lisadas da amostra em análise, embebidas em gel de agarose de baixo ponto de fusão, sobre lâminas de microscopia. As células são englobadas em gel e espalhadas sobre uma lâmina e submetidas a uma corrente elétrica que promove uma migração dos segmentos de DNA livres, resultantes de quebras, para fora do núcleo. Após a eletroforese, como o DNA tem carga negativa, se estiver rompido (clastogênese), migra para fora do núcleo, ficando com a aparência de um cometa ou cauda (SILVA et al., 2000). Nesta metodologia, as análises podem ser realizadas em microscópios ópticos comuns, quando as células são coradas com nitrato de Prata ou corante Giemsa, ou em microscópios de fluorescência, quando coradas com brometo de Etídio, Acridine Orange ou iodeto de propídeo.

Quando comparado com outras técnicas, o ensaio cometa apresenta algumas vantagens, dentre elas: (1) Apresenta sensibilidade em apontar baixo nível de danos no DNA; (2) Requerimento de baixo número de células por amostras; (3) Flexibilidade; (4) Baixo Custo; (5) Fácil aplicação; (6) Habilidade de conduzir estudos utilizando pequena quantidade de substância; e (7) Tempo relativamente curto para a realização de experimentos (TICE et al., 2000).

## 2.4 Projeto 1000 Genomas

O projeto 1000 Genomas (THE 1000GENOMES PROJECT CONSORTIUM, 2010; 2012; 2015) é um consórcio internacional estabelecido para fornecer uma descrição detalhada da variação genética humana (com uma frequência de ocorrência de  $>1\%$ ), incluindo SNPs, variantes estruturais e seu contexto de haplótipos, por meio de técnicas de sequenciamento de nova geração.

Inicialmente (2008) foi avaliado o genoma completo de mil indivíduos de diferentes populações, aumentando em 2012 para 1.092 indivíduos oriundos de 14 populações diferentes e em 2015, na conclusão do projeto, o genoma de 2.504 indivíduos de 26 populações divididos em 5 superpopulações: África (AFR), Europa (EUR), Leste Asiático (EAS), Sul Asiático (SAS), e as Américas (AMR) foram avaliados (THE 1000GENOMES PROJECT CONSORTIUM, 2015).

O conjunto de dados disponibilizados de forma pública na internet e obtidos em diferentes indivíduos é uma ferramenta essencial para estudos genéticos como a associação e identificação de genes candidatos para diferentes doenças e padrões de diversidade gênica populacional com a produção de um catálogo de variações genéticas (polimorfismos) e avançando para a criação de um mapa em alta resolução das principais diferenças entre os seres humano (INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM, 2012; INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM, 2015; GAZAL et al., 2015).

Consórcios como o Projeto 1000 Genomas é fundamental para alcançarmos uma compreensão abrangente da variação humana, entretanto é necessário que ocorra a análise de um conjunto cada vez mais diversificado de populações humana (THE INTERNATIONAL HAPMAP 3 CONSORTIUM, 2010). A população brasileira, por exemplo, ainda não foi analisada pelos projetos de sequenciamento e seria uma excelente fonte de estudos, tendo em vista que esta constitui uma das populações mais heterogêneas do mundo.

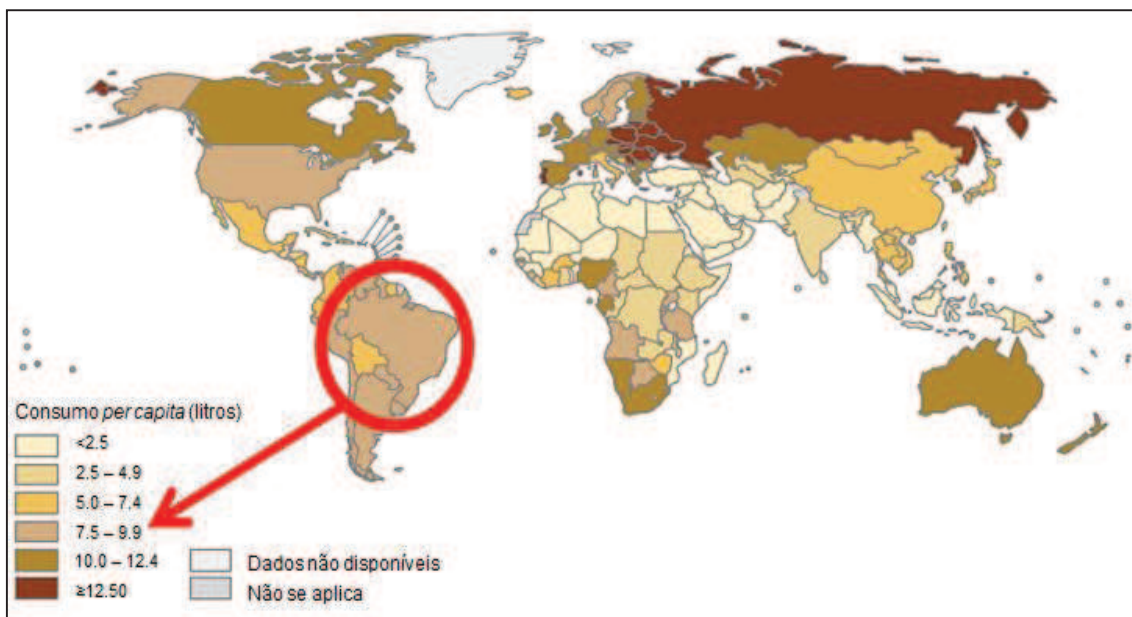


## 2.5 Aspectos epidemiológicos

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) o consumo abusivo de bebidas alcoólicas é considerado um fator de risco das principais Doenças Crônicas Não Transmissíveis, bem como dos acidentes e violências.

Conforme as estatísticas do Relatório Global sobre Álcool e Saúde da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2014) sobre o uso *per capita* de álcool puro, houve no Brasil um consumo de 8,7 litros no ano de 2010, sendo a média mundial de 6,2 litros *per capita* (Figura 3).

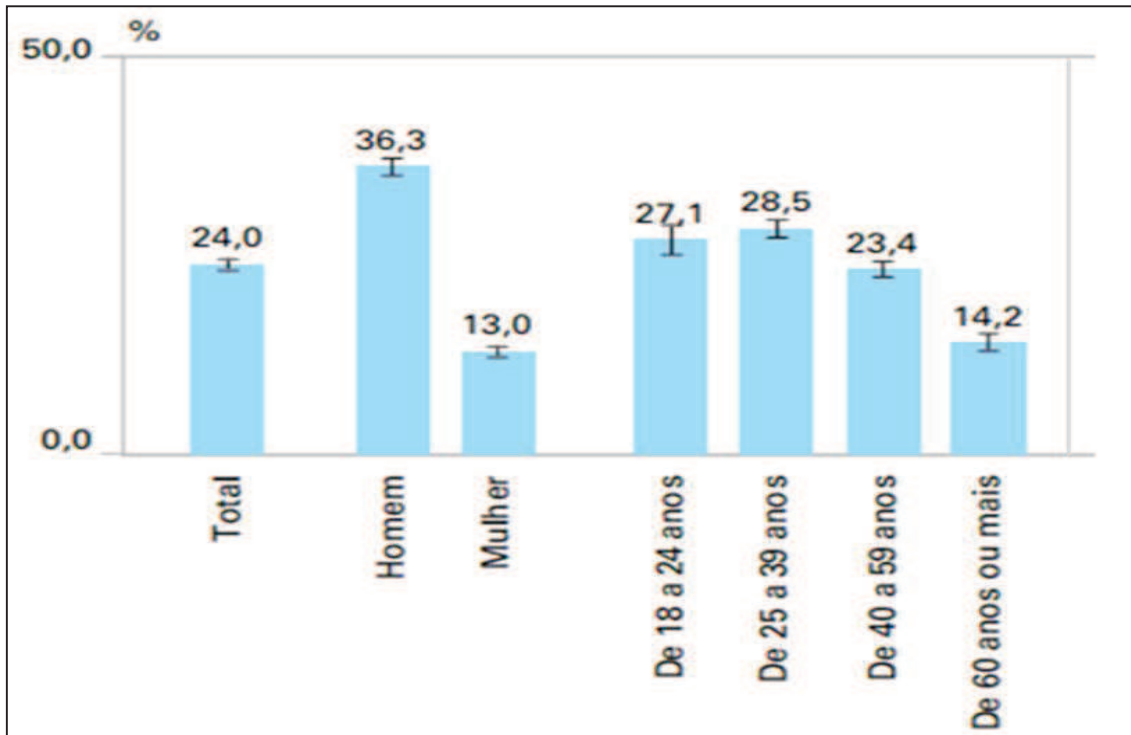
A análise deste indicador possibilitou avaliar o padrão de uso de álcool na população adulta permitindo identificar características sócio demográficas associadas e tendências de consumo.



**Figura 3.** Consumo mundial per capita de bebidas, em litros de álcool puro, 2010.  
Fonte: Adaptado de Global status report on alcohol and health (WHO, 2014).

Dados da Pesquisa Nacional de Saúde (PNS), realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em 2013, revelaram que o percentual para a população brasileira com 18 anos ou mais de idade que costumava consumir bebida alcoólica uma vez ou mais por semana, foi de 36,3% entre os homens enquanto, entre as mulheres foi de 13,0% (Figura 4).

De maneira consistente com o PNS, o levantamento da Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel) de 2014, demonstrou que a frequência do consumo abusivo de bebidas alcoólicas (ingestão de bebidas alcoólicas, em uma única ocasião, nos últimos 30 dias sendo cinco ou mais doses para homens ou quatro ou mais doses para mulheres) foi maior entre os homens (24,8%) do que em mulheres (9,7%)



\* ‡ : Intervalo de confiança

**Figura 4.** Proporção de pessoas de 18 anos ou mais de idade que costumam consumir bebida alcoólica uma vez ou mais por semana, com indicação do intervalo de confiança de 95%, segundo o sexo e os grupos de idade- Brasil – 2013.

Fonte: Adaptado de IBGE, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Trabalho e Rendimento, Pesquisa Nacional de Saúde 2013.

Segundo os dados obtidos pelo Vigitel em 2014, em ambos os sexos, o consumo abusivo de bebidas alcoólicas foi mais frequente entre os indivíduos mais jovens, entre 19 a 34 anos. De acordo com os dados obtidos pela PNS em 2013, a maior frequência do consumo abusivo de bebidas alcoólicas ocorreu na faixa etária de 25 a 39 anos com um percentual de 28,5% (Figura 4).

Estudo descritivo realizado por Garcia e Freitas em 2015 a partir dos dados da PNS do ano de 2013 demonstra prevalências maiores entre os fumantes ocasionais (35,2%; IC<sub>95%</sub> 30,4; 40,0%), comparados aos fumantes diários (27,4%; IC<sub>95%</sub> 25,6; 29,2%), e tais categorias apresentaram prevalências mais elevadas do que os não fumantes (11,1%; IC<sub>95%</sub> 10,6; 11,6%).



Entre as regiões, prevalências mais expressivas foram encontradas no Centro-Oeste (16,2%; 15,0; 17,3%) e Nordeste (15,6%; IC95% 14,8; 16,4%), enquanto a menor foi no Sul (11,1%; 10,0; 12,2%).

## **2.6 Centro de atenção psicossocial – Álcool e drogas**

Considerando os elevados índices sobre o uso e abuso de bebidas alcoólicas, a existência de centros de atendimento que ofereçam assistência direta ao indivíduo com transtornos decorrentes do uso e dependência de substâncias psicoativas e a sua família torna-se necessário (PILLON E LUIS, 2004).

Através da reorganização dos serviços e das ações de saúde mental surgiram dois serviços de atenção representados pelos Núcleos de Atenção Psicossocial (NAPS) e pelos Centros de Atenção Psicossocial (CAPS). No ano de 2002, o Ministério da Saúde através das Portarias nº 336/GM e 816/GM regulamentou o atendimento do dependente de álcool e drogas em Centros de Atenção Psicossocial (CAPS-Ad) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

O CAPS-Ad é uma unidade de atendimento em saúde mental, com equipe multiprofissional composta principalmente por médico, enfermeiro, psicólogo, terapeuta ocupacional e assistente social que realiza atendimentos individuais (medicamentoso, psicoterápico, de orientação), atendimentos em grupos e visitas domiciliares (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

Conforme preconizado pela Política do Ministério da Saúde para a Atenção Integral a Usuários de Álcool e outras Drogas, o CAPS se caracteriza pela existência de uma rede formada por diversos pontos de atenção interconectados entre si e diversos estabelecimentos que prestam o atendimento à saúde e encaminham o paciente conforme suas necessidades (OLIVEIRA, 2010).

Devido ao elevado número de alcoolistas crônicos atendidos no CAPS-Ad Casa do município de Goiânia-GO, essa unidade foi escolhida para realização da coleta de material para o desenvolvimento do presente estudo.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Avaliar a variabilidade dos polimorfismos de base única (SNPs) presentes na região promotora do gene *citocromo P4502E1 (CYP2E1)* em indivíduos alcoolistas do município de Goiânia-Goiás, Brasil e associa-los com o dano genotóxico avaliado pelo ensaio cometa.

#### 3.2. Objetivos específicos

1. Avaliar as frequências de oito polimorfismos da região promotora do gene *CYP2E1* (rs3813867, rs6413422, rs2031920, rs2031921, rs181373843, rs147346339, rs3813870, rs2031922) no grupo de alcoolistas com as obtidas para o grupo controle;
2. Correlacionar as frequências referentes aos polimorfismos de base única da região promotora do gene *CYP2E1* obtidos do grupo caso e controle com os dados do projeto 1000 Genomas;
3. Identificar os haplotipos e desequilíbrio de ligação (LD) existentes na região promotora do gene *CYP2E1*;
4. Avaliar o efeito genotóxico, ao qual estão expostos os indivíduos que fazem uso crônico de bebidas alcoólicas, com a utilização do ensaio cometa;
5. Contribuir para a compreensão da relação do polimorfismo genético com o consumo de álcool e os danos ao material genético.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Casuística**

A presente pesquisa contempla um estudo do tipo caso-controle. No período de janeiro de 2014 a novembro de 2015 foram avaliados 84 alcoolistas com idade igual ou superior a 18 anos do município de Goiânia-Goiás, Brasil. Além desse grupo, foram avaliados 96 indivíduos que não consomem álcool de forma crônica, também com idade igual ou superior a 18 anos do município de Goiânia, que apresentaram condições socioambientais (idade, sexo) e estilo de vida (hábito tabagista) semelhante aos alcoolistas, perfazendo o grupo controle.

Os critérios de inclusão para o grupo caso considerados para o presente estudo foram: paciente previamente diagnosticado pelo Ambulatório do Centro de Atenção Psicossocial – Álcool e drogas (CAPS Ad/Casa) como alcoolista por fazer o uso crônico de álcool, possuir mais de 18 anos, ter concordado em participar do estudo e assinado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Os critérios de exclusão para o grupo caso foram: pacientes com menos de 18 anos, não ser considerado alcoolista e não ter concordado em participar e assinar o TCLE (Apêndice A).

Tais indivíduos foram escolhidos aleatoriamente e as amostras de sangue foram obtidas voluntariamente, de acordo com TCLE. Dados como idade, hábitos sociais, tempo de uso e formas de álcool consumido foram anotados em um questionário de estilo de vida (Apêndice B) para a realização dos dados estatísticos.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas (CEP) da Universidade Federal de Goiás (UFG), com o número de referência 476.938 (Anexo A).

### **4.2 Coleta e processamento das amostras**

As amostras biológicas foram obtidas a partir de coleta por punção venosa de 10 ml de sangue periférico dos alcoolistas e dos participantes do grupo controle, na qual 5 ml foram acondicionadas em tubos vacutainer heparinizados e 5 ml em tubos vacutainer contendo EDTA, sendo posteriormente armazenadas em isopor com gelo e encaminhadas

imediatamente ao Laboratório de Radiobiologia e Mutagênese (LabMut) da Universidade Federal de Goiás (UFG) onde foram armazenadas em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

As coletas do grupo caso foram realizadas no Centro de Atenção Psicossocial – Álcool e drogas (CAPS Ad/Casa) no município de Goiânia-Goiás, Brasil.

### 4.3 Ensaio cometa

O ensaio cometa foi realizado conforme metodologia descrita por Hartmann et al. (2003), com modificações. Para a realização do ensaio cometa, foram utilizadas amostras biológicas de 76 pessoas do grupo caso e 66 pessoas do grupo controle devido a inviabilidade de algumas amostras ou por impossibilidade de realização do ensaio cometa imediatamente após a coleta de sangue. As lâminas foram limpas e preparadas com uma pré-cobertura de agarose com ponto de fusão normal (*Normal Melting*) a 1,5%. Foram utilizados 10  $\mu\text{L}$  de sangue de cada indivíduo e diluídos em 1 mL de tampão PBS em tubo plástico tipo Eppendorf de 2 mL. Em seguida foram retirados 10  $\mu\text{L}$  desta solução e embebidos em 120  $\mu\text{L}$  de agarose com baixo ponto de fusão (*Low Melting Point*) a 0,5%, a qual estava em banho Maria a  $37^{\circ}\text{C}$ . Essa mistura foi colocada em lâmina preparada com a pré-cobertura de agarose com ponto de fusão normal (*Normal Melting*) 1,5% e coberta com uma lamínula.

As lâminas foram colocadas na geladeira a  $4^{\circ}\text{C}$  durante dois minutos para que houvesse a solidificação do material. Após esse tempo as lamínulas foram retiradas e as lâminas foram colocadas em cubas de vidro apropriadas e protegidas da luz já com solução Tampão de Lise gelada (2,5M NaCl, 10 mM Tris, 100 mM EDTA, 1% Triton X-100 e 10% DMSO, pH10,0) e permaneceram imersas por até 24 horas.

Após 24 horas as lâminas foram retiradas da lise e colocadas em uma cuba horizontal de eletroforese e fonte eletroforética (Hofer, EUA), incubadas em tampão alcalino (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13,0) deixando descansar por 30 minutos e protegidas da luz. A corrida eletroforética foi realizada por 25 minutos, a 25 volts e 300 mA. Esta etapa foi feita com a cuba de eletroforese no gelo para manter a temperatura a  $4^{\circ}\text{C}$  e ao abrigo de luz.

A neutralização foi feita com uma solução Tampão Tris a 0,4M (pH 7,5) por três vezes, durante 5 minutos. Após a neutralização essas lâminas foram lavadas duas vezes com água destilada e colocadas para secar “*overnight*” em temperatura ambiente na posição

inclinada. A fixação foi feita com etanol absoluto por 5 minutos e o DNA foi corado com 20  $\mu\text{L}$  da solução de brometo de etídio a 10  $\text{ng}/\mu\text{L}$ . Após a fixação a lamínula foi novamente colocada sobre a lâmina deixando descansar por aproximadamente 5 minutos. Após esse tempo essas lâminas foram analisadas sob microscopia de epifluorescência *Axio Imager 2*® (*Carl Zeiss*, Alemanha) utilizando um conjunto de filtros de excitação 515-560 nm, para fluorescência vermelha. Os núcleos das células foram visualizados utilizando a objetiva de 10X e a imagem fluorescente foi captada utilizando o software ISIS®. Foram analisadas duas lâminas para cada indivíduo e foram contadas, ao todo, 100 células por indivíduo, as quais foram avaliadas com o auxílio do programa “*Comet score*” versão 1.5 no qual foram analisados quatro parâmetros relacionados a danos genômicos: Comprimento da cauda do cometa, Porcentagem de DNA na cauda e Momento da cauda de Olive.

#### 4.4 Extração e quantificação das amostras

A extração de DNA foi realizada com o kit de extração *ReliaPrep*™ *Blood gDNA Miniprep System* (Promega®, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante.

Em seguida, as amostras extraídas foram quantificadas utilizando-se o equipamento espectrofotômetro *NanoVue Plus*™ (GE Healthcare, EUA) com alíquotas de 1  $\mu\text{L}$  seguindo as recomendações do fabricante.

Após a quantificação as amostra de DNA foram diluídas para a concentração final de 20  $\text{ng}/\mu\text{L}$  de DNA. Em seguida as amostra foram armazenada em freezer a  $-20^\circ\text{C}$ , até o momento do uso. Para garantir a pureza do DNA, foram avaliados os seguintes parâmetros de absorbância:

- $A_{260}/A_{230} \geq 1,7$  (Avaliar contaminação por sais, polissacarídeos e compostos orgânicos como fenol)
- $A_{260}/A_{280} = 1,8$  a  $2,0$  (Avaliar contaminação por proteínas)

#### 4.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Fragmentos gênicos da região promotora do gene *CYP2E1* foram detectados utilizando a reação de PCR convencional. O *primer* utilizado e a temperatura de desnaturação estão listados na tabela abaixo (Tabela 2).

**Tabela 2.** Sequência do oligonucleotídeo iniciador e sua respectiva temperatura de desnaturação.

PRIMER	SEQUÊNCIA	TEMPERATURA DE DESNATURAÇÃO
<i>CYP2E1</i>	F: CCGTGAGCCAGTCGAGTCTA R: GGAAAGAGTGAGTCAACCAATTCTG	95 °C

\* F-Senso; R-Antisenso

A reação de PCR foi realizada no termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler da Applied Biosystems® (Califórnia, EUA). O protocolo de termociclagem pode ser visualizado na Tabela 3.

**Tabela 3.** Protocolo de termociclagem para amplificação por PCR convencional.

CICLOS	TEMPERATURA (°C)	TEMPO	ETAPA
1	95	05'	Ativação enzimática
	95	10"	
40	61	20"	Ciclagem 40 X
	72	25"	
1	72	05'	
1	4	∞	

O volume utilizado para cada PCR pode ser visualizado na Tabela 4. Como controle negativo para o gene *citocromo P4502E1 (CYP2E1)* utilizamos uma amostra contendo a mistura de reagentes e água ultrapura sem o DNA.

**Tabela 4.** Protocolo de termociclagem para a genotipagem do primer *CYP2E1*.

Reagentes	[ ] Inicial	[ ] Final	Vol. 1 reação
Buffer	10X	1X	2,5 µL
<i>CYP2E1</i> F	10 mM	1 mM	0,5 µL
<i>CYP2E1</i> R	10 mM	1 mM	0,5 µL
dNTP	10 mM	0.2 mM	0.5 µL
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1.5 mM	0,75 µL
Taq Platinum	5 U/µL	1U	0,2 µL
H <sub>2</sub> O			15.3 µL
DNA		100 ng/µL	5 µL

[ ]: Concentração

#### 4.6 Eletroforese em gel de agarose

Para a detecção dos amplicons, o produto de PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose com concentração de 2%, corado com Brometo de Etídeo. A agarose foi dissolvida em tampão TBE na concentração de 1X (89 mM Tris; 89 mM Ácido Bórico; 2 mM EDTA) e aquecida em forno micro-ondas. Após o resfriamento, à temperatura ambiente, o brometo de etídio (1 mg/mL) foi adicionado à solução e esta foi colocada em uma cuba de eletroforese para polimerização.

As amostras foram colocadas em poços individuais e submetidas a eletroforese conduzida em cuba horizontal e fonte eletroforética (Hoefer, EUA) sob voltagem constante (90 V), durante uma hora. Foi utilizado como padrão molecular o marcador de massa molecular (100 pb) Low DNA Mass™ Ladder da Invitrogen™, 2 µL de cada produto de PCR combinados a 5 µL de tampão de carregamento (0,5% azul de bromo fenol e 20% de glicerol).

Ao final do processo, o resultado foi registrado através de captura da imagem do gel sob luz ultravioleta utilizando o fotodocumentador GelDoc XR BioRad®.

#### 4.7 Reação de sequenciamento

Os produtos de PCR foram purificados pelo método EXO-SAP, utilizando as enzimas Exonuclease I e Fosfatase Alcalina (do inglês *Shrimp Alkaline Phosphatase*). Em linhas gerais, 5 µL de produto da PCR foi adicionado a 1µL de solução Exo/Sap (0,5 µL Exonuclease I, 0,5 µL SAP), depois incubado a 37°C por 90 minutos e então a 80°C por 20 minutos.

Posterior a purificação foi realizado a reação de sequenciamento por eletroforese capilar utilizando o método de Sanger com o *Kit* BigDye® Terminator Cycle Sequencing Standart Version 3.1 (Applied Biosystems™, Foster City, CA, USA), seguindo recomendações do fabricante.

Na reação de sequenciamento foram utilizados 1µL de BigDye®, 2 µL de solução tampão 5X (fornecido pelo fabricante), 2,5 µL de *primer* (F/R), 1 µL do produto de PCR

purificado por Exo-SAP e ajustados com 3,5  $\mu$ L água livre de RNase e DNase para um volume final de 10  $\mu$ L. A amplificação foi realizada em termociclador (Veriti® 96-Well Thermal Cycler da Applied Biosystems) com o protocolo que consiste de 25 ciclos, cada um composto por etapas de desnaturação a 95°C por 20 segundos, anelamento dos iniciadores a 50°C por 15 segundos e extensão a 60°C por 1 minuto.

O produto final foi precipitado com a adição de 40  $\mu$ L de isopropanol (álcool isopropílico) 65%. A mistura foi agitada durante 30 segundos, incubada por 20 minutos à temperatura ambiente e centrifugada a 2.000rcf por 45 minutos. Ao final, o sobrenadante foi retirado e desprezado e, em seguida, a placa foi vertida e centrifugada novamente por 1 minuto a 300rpm. O precipitado foi lavado com 250  $\mu$ L de etanol a 60% e centrifugado a 2.000rcf por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e inverteu-se a placa e centrifugou-se por 1 minuto a 400rpm. Foram adicionados 100  $\mu$ L de etanol 60% e a placa centrifugada invertida por 10 minutos a 2.000rcf e descartado o sobrenadante. O precipitado foi centrifugado por 1 minuto a 500rpm e incubado a 95°C por 1 minutos para a completa evaporação do etanol.

Foi adicionado ao precipitado 10  $\mu$ L de solução de formamida Hi-Di, deixado a temperatura ambiente por 5 minutos e posteriormente agitado durante 1 minuto. A placa contendo o precipitado foi centrifugada e então aquecida a 95°C por 5 minutos e colocada no gelo por 1 minuto. Após as etapas citadas a placa pode ser injetada no sequenciador automático.

O sequenciamento dos fragmentos ocorreu em um sequenciador automático de DNA ABI PRISM® 3500 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems™, CA). As reações de sequenciamento ocorreram em ambas às direções, “*forward*” e “*reverse*” para a montagem da fita consenso.

A avaliação da qualidade do sequenciamento foi realizada utilizando o programa Sequence Analyzer versão 6 (Applied Biosystems) descartando-se regiões de baixa qualidade (nucleotídeos com valor PHRED inferiores a 25 foram descartados e posteriormente reavaliados). Os dados fornecidos pelo sequenciador foram avaliados e editados no software SeqScape versão 3 (Applied Biosystems™) e editadas manualmente para a correção de possíveis erros utilizando o programa Bioedit Sequence Alignment Editor versão 7.2.5 (HALL et al. 1999). Cada SNP detectado (Tabela 5) foi anotado individualmente e comparado com as variações já descritas para a sequência genômica do *CYP2E1* por meio do *software* CLC Sequence Viewer versão 7.6.1 (CLC bio, Aarhus, Dinamarca). Cada SNP teve



sua posição correta definida a partir da comparação com a sequência NM\_000773.3, considerando a Adenina do primeiro ATG traduzido como base número +1.

**Tabela 5.** SNPs da região promotora do gene *CYP2E1* identificados nesse estudo.

	SNP ID	ALTERAÇÃO NUCLEOTÍDICA	POSIÇÃO GENÔMICA
Loco 1	rs3813867	G>C	-1295
Loco 2	rs6413422	A>C	-1129
Loco 3	rs2031920	C>T	-1055
Loco 4	rs2031921	C>T	-1027
Loco 5	rs181373843	G>A; G>C	-1009
Loco 6	rs147346339	A>G	-1005
Loco 7	rs3813870	A>G	-930
Loco 8	rs2031922	T>C	-807

#### 4.8 Análise dos dados do projeto 1000 Genomas

Os dados do projeto 1000 Genomas referentes ao gene *CYP2E1* foram obtidos no site oficial do projeto ([www.1000genomes.org](http://www.1000genomes.org)) (THE 1000GENOMES PROJECT CONSORTIUM, 2010; 2012). A região avaliada neste estudo, região promotora 5' do gene *CYP2E1*, foi filtrada a partir dos arquivos .vcf baixados do site oficial do projeto 1000 Genomas e concatenados com os dados obtidos a partir das análises das amostras obtidas para esse estudo (alcoolistas e controles). O arquivo .vcf resultante foi convertido para o formato GENEPOP e ARLEQUIN usando o programa PGDSpider 2.0.19 (LISCHER E EXCOFFIER, 2012). Para as variações encontradas em uma das análises, mas não na outra, i.e., pontos de variação que ocorreram exclusivamente nas análises das amostras brasileiras e vice-versa, esses pontos foram considerados monomórficos no grupo onde eles não variaram e a base considerada foi a presente na sequência padrão utilizada na análise (NM\_000773.3). As frequências alélicas e genotípicas de cada loco foram estimadas por contagem direta através do software GenePop® 4.0 (RAYMOND E ROUSSET, 1995). A aderência das frequências genotípicas em relação às proporções teóricas de Hardy-Weinberg foi avaliada pelo teste exato de Guo e Thompson (GUO E THOMPSON, 1992), utilizando-se o software GenePop® 4.0 (RAYMOND E ROUSSET, 1995).

#### 4.9 Análise estatística

Os dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais foram arquivados em um banco de dados criado no programa Excel 2010 (MICROSOFT®), para posterior conversão por meio do programa Convert (GLAUBITZ, 2004) para utilização do arquivo no *software* Arlequin v. 3.5.2 (EXCOFFIER E LISCHER, 2010).

Para a análise dos dados sócio demográficos e do ensaio cometa foi utilizado o programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 20.0 (IBM, Chicago, IL, USA), na qual foram realizados os testes de Qui-Quadrado e t-Student, respectivamente. A estatística descritiva foi utilizada para caracterizar a população estudada e os resultados obtidos foram expressos como médias  $\pm$  desvio padrão. O teste de Kolmogorov-Smirnov (KS) foi utilizado para os pressupostos da normalidade dos dados obtidos para as variáveis numéricas. Posteriormente, foram aplicados testes de hipóteses não paramétricos. Os testes aplicados foram o de Kruskal Wallis, para mais de dois grupos e o teste U de Mann Whitney, para até dois grupos. Para analisar a correlação entre as variáveis numéricas foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman. Foi considerado o valor de 5% ( $p < 0,05$ ) para a significância estatística.

Para a análise do possível desequilíbrio de ligação (LD), o arquivo .vcf foi convertido para o formato de .ped LINKAGE e a inferência do padrão de desequilíbrio de ligação (LD) na região foi realizada usando o programa Haploview® 4.2 (BARRETT et al., 2005). As imagens de LD foram geradas pelo Haploview utilizando-se os SNPs com o alelo menos frequente com uma frequência alélica mínima (MAF) de 0,01. As regiões com elevado LD (blocos de segregação) foram inferidas pelo método do Intervalo de Confiança (GABRIEL et al., 2002).

Dada a associação positiva do desequilíbrio de ligação entre os pontos de variação encontrados, mas a fase de ligação entre cada um destas variantes desconhecida, foi realizada uma inferência computacional dos haplótipos definindo-se a provável constituição de cada um dos cromossomos dos indivíduos analisados.

Para a inferência dos haplótipos, dois métodos computacionais foram empregados: o software PHASE v2 (Stephens et al., 2001; Stephens e Donnelly, 2003) que implementa um método Bayesiano para reconstrução do haplótipo mais provável; e algoritmo de máxima verossimilhança implementado no software PL-EM (Qin et al., 2002), que calcula pela

maximização da expectativa cada um dos haplótipos presentes nas amostras. Foram realizadas 10 corridas independentes para cada um dos métodos e os resultados foram então comparados entre si. Para este procedimento foi utilizado um script em Perl denominado HaploRunner (desenvolvido por E. C. Castelli – disponível em <http://bioinfo.icb.ufg.br>), versão 1.1b.

Este script executou as 25 corridas independentes de cada algoritmo, comparando os resultados obtidos em todas as corridas e entre ambos os métodos. Foram aceitas somente as inferências de haplótipos que atenderam a dois requisitos: a) tiveram probabilidade de inferência superior a 90%; b) obtiveram o mesmo haplótipo inferido em todas as corridas para cada um dos programas e entre os dois programas. Para o método PHASE foram utilizados os seguintes parâmetros: number of iterations: 1000; thinning interval: 1; burn-in value: 1000 e valores seed diferentes para cada corrida. Para o algoritmo PL-EM foram utilizados os seguintes parâmetros: Top value: 0; Parsize value: 2; Buffer: 1300 e Round value: 200. As relações entre os haplótipos obtidos foram inferidas construindo-se uma network, utilizando-se para tanto o algoritmo median joining implementado no programa Network® 4.6.1.0 (BANDELT et al., 1999).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Caracterização geral do grupo caso e controle

A tabela 6 apresenta os dados referentes às características sócio demográficas dos grupos caso e controle quanto à faixa etária, sexo, hábito tabagista e uso de medicamentos.

Houve uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos caso e controle quando se avaliou a faixa etária, o hábito tabagista e o uso de medicamentos ( $p < 0,01$ ). Não houve diferença estatisticamente significativa em relação à distribuição dos grupos de acordo com o sexo ( $p < 0,20$ ).

A faixa etária  $>35$  anos foi mais frequente no grupo caso ( $p < 0,01$ ). O sexo masculino predominou nos grupos caso e controle ( $p < 0,20$ ). Sobre o hábito tabagista houve diferença entre os grupos, com predominância de fumantes no grupo caso e não fumantes no grupo controle ( $p < 0,01$ ). Também houve variação entre os grupos quanto ao uso de medicamentos, na qual, há maior uso de medicamentos no grupo caso ao contrario do grupo controle em que a maioria não faz o uso de medicamentos ( $p < 0,01$ ) (Tabela 6).

No grupo caso obteve-se uma média na faixa etária de 44 anos ( $\pm 8,13$  anos), sendo a idade mínima de 25 anos e a máxima de 60 anos e para o grupo controle obteve-se uma média de 36 anos ( $\pm 9,17$  anos), variando entre 20 a 56 anos.

**Tabela 6.** Características sócio demográficas dos grupos caso e controle.

Variáveis Sócio demográficas	Grupo n (%)		Total	<i>p</i> *
	Caso	Controle		
<b>Faixa etária</b>				
≤ 35 anos	11 (14,5%)	35 (53,0%)	46 (32,4%)	<0,01
>35 anos	65 (85,5%)	31(47,0%)	96 (67,6%)	
<b>Sexo</b>				
Feminino	12 (15,8%)	16 (24,2%)	28 (19,7%)	<0,20
Masculino	64 (84,2%)	50 (75,8%)	114 (80,3%)	
<b>Tabagismo</b>				
Não	19 (25,0%)	54 (81,8%)	73 (51,4%)	<0,01
Sim	57 (75,0%)	12 (18,2%)	69 (48,6%)	
<b>Uso de Medicamentos</b>				
Não	19 (25,0%)	47 (71,2%)	66 (46,5%)	<0,01
Sim	57 (75,0%)	19 (28,8%)	76 (53,5%)	

\*Teste Qui-Quadrado

## 5.2 Danos no DNA detectados pelo ensaio cometa

A avaliação dos danos ao DNA, calculados pelos parâmetros: *Tail Length* (TL), porcentagem de DNA na cauda (%DNA) e *Olive Tail Moment* (OTM) está representada na Tabela 7. Os resultados obtidos, analisando a média  $\pm$  DP (desvio padrão), mostraram maior dano genotóxico no grupo caso em relação ao grupo controle quando analisado os parâmetros comprimento da cauda (TL) ( $p < 0,001$ ), à porcentagem de DNA na cauda ( $p < 0,002$ ) e momento da cauda de Olive (OTM) ( $p < 0,001$ ).

Em relação ao parâmetro *Tail Length* (TL) foram obtidas os resultados de  $14,23 \pm 8,15$  para o grupo caso e  $9,75 \pm 5,49$  para o grupo controle. Quanto ao parâmetro porcentagem de DNA na cauda (%DNA) os resultados obtidos foram  $23,70 \pm 13,38$  para o grupo caso e  $15,74 \pm 10,36$  para o grupo controle. Os resultados obtidos para o parâmetro *Olive Tail Moment* (OTM) foram  $7,81 \pm 5,92$  no grupo caso e  $4,04 \pm 3,85$  no grupo controle.

**Tabela 7.** Valores médios  $\pm$  desvio padrão (DP) do *Tail Length* (TL), da porcentagem de DNA na cauda (% DNA) e do *Olive Tail Moment* (OTM) obtidos pelo ensaio do cometa para os grupos caso e controle.

Dano genômico	Grupo (Média $\pm$ Desvio padrão)		Z	p**
	Caso (nc = 1)	Controle (nc = 7)		
TL	14,23 $\pm$ 8,15	9,75 $\pm$ 5,49	4,17	<0,001
% DNA	23,70 $\pm$ 13,38	15,74 $\pm$ 10,36	4,26	<0,002
OTM	7,81 $\pm$ 5,92	4,04 $\pm$ 3,85	5,41	<0,001

\*nc = não consta \*\*Teste t-Student

Neste estudo, o dano genotóxico do grupo caso não mostrou associação com o tempo de tabagismo e etilismo, carga tabágica e quantidade de álcool/dia associadas para os parâmetros do ensaio cometa analisados, apresentando valores de  $p > 0,05$  (Tabela 8).

**Tabela 8.** Estimativas da correlação de Spearman dos parâmetros do ensaio cometa entre os hábitos tabagista e alcoolista para o grupo caso.

Matriz de correlação	TL	% DNA	OTM
Tempo de tabagismo (anos)	r=-0,14; p=0,23	r=0,00; p=0,97	r=-0,05; p=0,67
Carga tabágica	r=-0,10; p=0,38	r=0,02; p=0,88	r=-0,01; p=0,93
Tempo de etilismo	r=-0,19; p=0,09	r=-0,06; p=0,61	r=-0,07; p=0,55
Quantidade de álcool/dia	r=0,09; p=0,44	r=0,08; p=0,47	r=0,10; p=0,42

### 5.3 Frequências alélicas, genotípicas e aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg

Após a análise da variabilidade da região promotora do gene *CYP2E1*, das 84 amostras oriundas dos alcoolistas do Centro de Atenção Psicossocial, dos 96 do grupo controle e dos indivíduos incluídos no projeto 1000 Genomas, foram encontrados 17 pontos de variação (Tabela 9).

Considerando apenas as amostras brasileiras, oito pontos de variação foram detectados na região promotora do *CYP2E1*, nas posições -807 (rs2031922), -930 (rs3813870), -1005 (rs147346339), -1009 (rs181373843), -1027 (rs2031921), -1055 (rs2031920), -1129 (rs6413422) e -1295 (rs3813867) (considerando a primeira A do primeiro ATG traduzido como nucleotídeo +1) e nove pontos de variação estavam presentes somente nas amostras do 1000 Genomas. Todos os sítios de variação encontrados e as suas frequências em brasileiros e nas outras populações avaliadas no projeto 1000 Genomas são apresentados na Tabela 9.

Todas as variações exclusivas do Brasil ou de alguma população do projeto 1000 Genomas foram consideradas como sítios monomórficos nas demais populações, considerando o nucleotídeo presente na sequência de referência (NM\_000773.3) como o nucleotídeo presente nestes pontos.

Das nove variações encontradas exclusivamente nas populações avaliadas pelo projeto 1000 Genomas, todas apresentaram frequências superiores a 1% em pelo menos uma das populações.

O número de pontos de variação por população variou entre cinco e oito. As populações brasileira (grupos caso e controle) e Cingaleses de Tamil habitantes do Reino Unido (STU) apresentaram o maior número de variações. Sete dos dezessete pontos de variação foram encontrados em apenas um grupo populacional.

As frequências genotípicas aderiram ao esperado pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg para todos os marcadores ( $P > 0,05$ ) (Tabela 10). Não foram detectados desvios para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg nas amostras Brasileiras.



**Tabela 9.** Pontos de variação na região promotora do gene *CYP2E1* e suas frequências em diferentes populações do projeto 1000 Genomas e em uma amostra brasileira

Ponto de variação	Supe população		Brasil		Africanos				Europeus				Leste asiáticos				Sul asiáticos				Americanos				GLOBAL								
	Posição genômica	SNP ID	SNP	Controle	Case	YRI	LWK	GND	MSL	ESN	TSI	FIN	GBR	IBS	CHB	JPT	CHS	CDX	KHV	PUL	BEB	STU	ITU	CEU		ASW	ACB	MWL	PUR	CLM	PEL	GIH	
																																	R
-1295	135339605	rs3813867	G/C	0.958	0.964	0.917	0.975	0.920	0.935	0.919	0.949	0.960	0.973	0.977	0.762	0.808	0.800	0.839	0.783	0.783	0.990	0.988	0.995	0.990	0.939	0.926	0.943	0.844	0.938	0.872	0.835	0.990	0.9178
-1282	135339618	rs532607936	T/G	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.9998
-1129	135338771	rs6413422	A/C	0.995	0.994	0.995	0.995	0.978	0.965	0.995	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.984	0.984	1.000	1.000	0.995	1.000	1.000	1.000	0.9965
-1078	135338822	rs59232477	G/A	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.995	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.9998
-1055	135338845	rs2031920	C/T	0.998	0.964	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.949	0.960	0.973	0.977	0.762	0.808	0.800	0.839	0.783	0.783	0.990	0.988	0.995	0.990	0.939	0.984	1.000	0.844	0.942	0.888	0.841	0.990	0.9348
-1027	135338873	rs2031921	T/C	0.953	0.964	0.921	0.980	0.934	0.965	0.929	0.949	0.960	0.973	0.977	0.762	0.808	0.800	0.839	0.783	0.783	0.990	0.988	0.995	0.990	0.939	0.934	0.943	0.844	0.942	0.872	0.835	0.990	0.9203
-1009	135338991	rs18137843	G/C	0.995	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.9991
-1005	135338995	rs147346339	A/G	0.995	1.000	0.991	0.995	0.991	0.994	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.967	0.984	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.9959
-930	135339970	rs3813870	A/G	0.922	0.940	0.838	0.894	0.814	0.853	0.894	0.967	0.980	0.989	0.963	0.772	0.736	0.776	0.613	0.773	0.773	0.755	0.686	0.672	0.721	0.975	0.893	0.875	0.922	0.875	0.904	0.506	0.728	0.8418
-897	135340003	rs577399320	T/G	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.9998
-888	135340012	rs546046390	C/T	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.995	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.9998
-857	135340043	rs556363528	C/T	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.9998
-846	135340054	rs576417537	C/T	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.994	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.995	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.9996
-807	135340093	rs2031922	T/C	0.901	0.821	0.657	0.636	0.690	0.676	0.626	0.916	0.955	0.956	0.958	0.762	0.808	0.800	0.839	0.783	0.783	0.990	0.988	0.995	0.980	0.919	0.803	0.734	0.805	0.875	0.851	0.800	0.990	0.8404
-793	135340107	rs368294078	T/G	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.9981
-786	135340114	rs527327421	C/A	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.9998
-763	135340137	rs2854143	A/C	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.995	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.9998

Os pontos de variação em negrito representam aqueles presentes nas amostras brasileiras. Pontos de variação presentes nos dados do 1000Genomes, mas não amostrados em brasileiros, foram considerados como monomórficos para a população brasileira. YRI (Yoruba em Ibadan, Nigéria), LWK (Luhya em Webuye, Kenia), GWD (Gambianos nos estados do Oeste em Gambia), MSL (Mende em Serra Leoa), ESN (Esn na Nigéria), TSI (Habitantes da Toscana na Itália), FIN (Finlandeses na Finlândia), GBR (Britânicos da Inglaterra e Escócia), IBS (População Ibérica da Espanha), CHB (Chineses Han de Pequim, China), JPT (Japoneses em Tóquio, Japão), CHS (Chineses Han do Sudoeste da China), CDX (Chineses Dai em Xishuangbanna, China), KHV (População Kinh na cidade de Ho Chi Minh, Vietnam), PUL (Punjabi de Lahore, Paquistão), BEB (Bengalis de Bangladesh), STU (Cingaleses de Tamil habitantes do Reino Unido), ITU (Indianos de Telugu, habitantes do Reino Unido), CEU (Moradores de Utah com ascendência do Norte e Oeste Europeu), ASW (Americanos do sudoeste dos Estados Unidos com ancestralidade africana), ACB (Afro-caribenhos em Barbados), MXL (Americanos com ascendência mexicana em Los Angeles, EUA), PUR (Porto-riquenhos de Porto Rico), CLM (Colombianos de Medellin, Colombia), PEL (Peruanos de Lima, Peru), GIH (Indianos Gujarati de Houston, Texas).

**Tabela 10.** Aderência das frequências dos genótipos ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg considerando as populações do projeto 1000 Genomas e as amostras Brasileiras

Ponto de variação	Superpopulação		Brasil		Africanos				Europeus				Leste asiáticos				Sul asiáticos				Americanos						GLOBAL				
	População		Controle	Caso	YRI	LWK	GWD	MSL	ESN	TSI	FIN	GBR	IBS	CHB	JPT	CHS	CDX	KHV	PJL	BBB	STU	ITU	CEU	ASW	ACB	MXL		PUR	CLM	PEL	GIH
	Posição genômica	SNP ID			84	108	99	113	85	99	107	99	91	107	103	104	105	93	99	96	86	102	102	99	61	96		64	104	94	85
-1295	135339605	rs8183867	0.96	0.92	0.97	0.92	0.94	0.92	0.95	0.96	0.97	0.98	0.76	0.81	0.80	0.84	0.78	0.99	0.99	1.00	0.99	0.94	0.93	0.94	0.84	0.94	0.87	0.84	0.99	0.92	
-1282	135339618	rs532607936	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	
-1129	135339771	rs6413422	0.99	1.00	0.99	0.98	0.96	0.99	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.98	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	
-1078	135339822	rs569232477	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	
-1055	135339845	rs2031920	0.96	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.95	0.96	0.97	0.98	0.76	0.81	0.80	0.84	0.78	0.99	0.99	1.00	0.99	0.94	0.98	1.00	0.84	0.94	0.89	0.84	0.99	0.93	
-1027	135339873	rs2031921	0.95	0.92	0.98	0.93	0.96	0.93	0.95	0.96	0.97	0.98	0.76	0.81	0.80	0.84	0.78	0.99	0.99	1.00	0.99	0.94	0.93	0.94	0.84	0.94	0.87	0.84	0.99	0.92	
-1009	135339891	rs181373843	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	
-1005	135339895	rs147346339	0.99	0.99	0.95	0.99	0.99	0.99	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.97	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	
-930	135339970	rs8183870	0.92	1.00	0.84	0.84	0.81	0.81	0.89	0.97	1.00	0.99	0.96	0.77	0.74	0.78	0.61	0.77	0.76	0.69	0.67	0.72	0.97	0.89	0.88	0.92	0.90	0.91	0.73	0.84	
-897	135340003	rs577399320	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	
-888	135340012	rs46046390	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	
-857	135340043	rs55636328	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	
-846	135340054	rs76417557	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	
-807	135340093	rs2031922	0.90	0.66	0.66	0.64	0.69	0.63	0.92	0.99	0.83	0.96	0.76	0.81	0.80	0.84	0.78	0.99	0.99	1.00	0.98	0.92	0.80	0.73	0.80	0.88	0.85	0.80	0.99	0.84	
-793	135340107	rs36294078	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	
-786	135340114	rs27327421	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	
-763	135340137	rs2854143	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	

YRI (Yoruba em Ibadan, Nigéria), LWK (Luhya em Webuye, Kenia), GWD (Gambianos nos estados do Oeste em Gambia), MSL (Mende em Serra Leoa), ESN (Esan na Nigéria), TSI (Habituantes da Toscana na Itália), FIN (Finlandeses na Finlândia), GBR (Britânicos da Inglaterra e Escócia), IBS (População Ibérica da Espanha), CHB (Chineses Han de Pequim, China), JPT (Japoneses em Tóquio, Japão), CHS (Chineses Han do Sudoeste da China), CDX (Chineses Dai em Xishuangbanna, China), KHV (População Kinh na cidade de Ho Chi Minh, Vietnam), PJL (Punjabi de Lahore, Paquistão), BEB (Bengalis de Bangladesh), STU (Cingaleses de Tamil habitantes do Reino Unido), ITU (Indianos de Telugu, habitantes do Reino Unido), CEU (Moradores de Utah com ascendência do Norte e Oeste Europeu), ASW (Americanos do sudoeste dos Estados Unidos com ancestralidade africana), ACB (Afro-caribenhos em Barbados), MXL (Americanos com ascendência mexicana em Los Angeles, EUA), PUR (Porto-riquenhos de Porto Rico), CLM (Colombianos de Medellín, Colômbia), PEL (Peruanos de Lima, Peru), GIH (Indianos Gujarati de Houston, Texas)



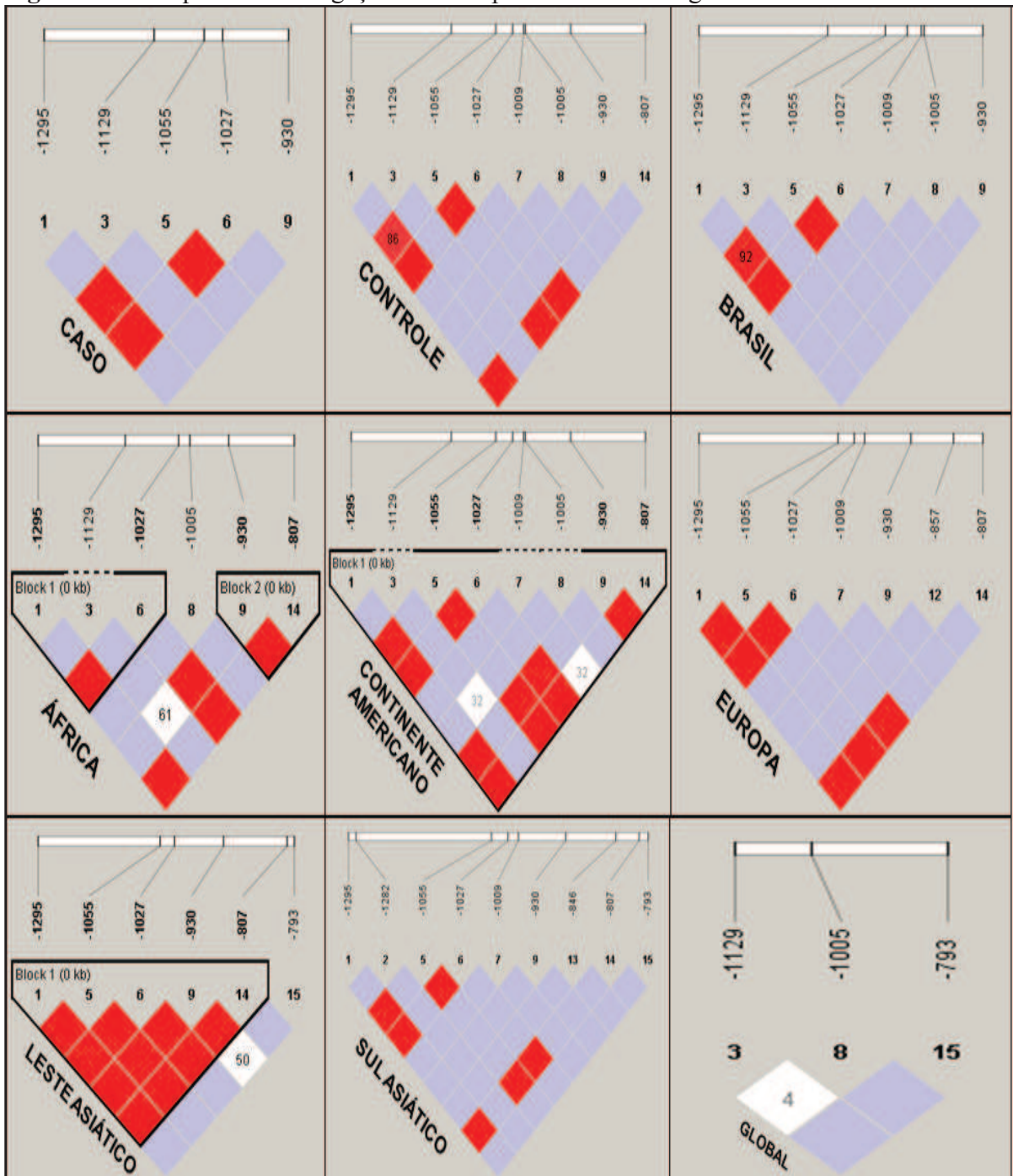
#### 5.4 Desequilíbrio de ligação

A presença de uma associação significativa entre os pontos de variação na região promotora do gene *CYP2E1* foi avaliada pela mensuração do Desequilíbrio de Ligação (LD) ( $D'$ ) (Lewontin, 1964), utilizando o software Haploview 4.1 (Barrett et al., 2005). A Figura 6 mostra o padrão de LD obtido utilizando-se os pontos de variação que apresentaram frequência alélica mínima (MAF) de 1%.

A avaliação do LD apresentados pelos grupos caso e controle e populações americana, europeia e asiática indicou a presença de regiões cujos polimorfismos -1295G>C e -1055C>T apresentam um forte desequilíbrio (Figura 6). Os padrões de LD variam entre os grupos avaliados, especialmente entre as amostras das populações americana e leste asiática.

Utilizando o método de intervalo de confiança executado no software Haploview, apenas na população americana foi detectado um bloco envolvendo toda a região promotora do *CYP2E1*. Também foi observado um bloco com elevado LD na população leste asiática. Na população africana, dois blocos de LD foram detectados envolvendo as extremidades da região promotora do gene *CYP2E1*.

**Figura 6.** Desequilíbrio de Ligação entre os pares de SNPs no gene *CYP2E1*.



A imagem foi gerada pelo programa Haploview usando SNPs com frequência  $\geq 1\%$ . Áreas em vermelho escuro indicam forte LD ( $LOD \geq 2$ ,  $D' = 1$ ), azul indica LD fraco ( $LOD \leq 2$ ,  $D' = 1$ ) e branco indica que não há LD ( $LOD \leq 2$ ,  $D' \leq 1$ ). Os blocos de haplótipos foram definidos pelo método de intervalos de confiança implementado no *software* Haploview. Diferentes valores de  $D'$  são representados dentro dos quadrados como percentagens.  $LOD$  log das probabilidades;  $D'$ , correlação par a par entre os SNPs. Posições de SNPs foram estimados considerando a adenina no primeiro ATG como uma base +1.

### 5.5 Diversidade, frequência e relações entre os haplótipos

Dada à associação positiva entre os pontos de variação da região promotora, os haplótipos foram inferidos por dois métodos probabilísticos: PHASE, e algoritmo de máxima verossimilhança implementado no software PL-EM (QIN et al., 2002). A inferência de haplótipos foi realizada em 2.684 (2.504 amostras do projeto 1000 Genomas e 180 amostras brasileiras). O projeto 1000 Genomas permite que os dados sejam baixados já com fase inferida.

A análise revelou a presença de 22 haplótipos diferentes utilizando os 17 pontos de variação considerando todas as populações em conjunto (Tabela 11). A probabilidade média de cada par de haplótipos foi 0,999995 para o método PHASE e 0,99997 para o algoritmo PL-EM. A Tabela 12 apresenta a frequência relativa dos 22 haplótipos encontrados nos dados do projeto 1000 Genomas e nas amostras caso e controle.

O haplótipo H01 foi o mais frequentemente encontrado em todas as populações avaliadas (Tabela 12). O segundo haplótipo mais frequente considerando todos os grupos é o H02 seguido pelos haplótipos H03 e H04, respectivamente. A população brasileira apresentou o maior número de haplótipos sendo um exclusivo do Brasil, haplótipo H22.

**Tabela 11.** Haplótipos encontrados considerando os pontos de variação presentes na região promotora do gene *CYP2E1*.

Haplótipos	Pontos de variação <sup>a</sup>																
	-1295	-1282	-1129	-1078	-1055	-1027	-1009	-1005	-930	-897	-888	-857	-846	-807	-793	-786	-763
H01	G	T	A	G	C	T	G	A	A	T	C	C	C	T	T	C	A
H02	G	T	A	G	C	T	G	A	G	T	C	C	C	T	T	C	A
H03	G	T	A	G	C	T	G	A	A	T	C	C	C	C	T	C	A
H04	C	T	A	G	T	C	G	A	A	T	C	C	C	C	T	C	A
H05	C	T	A	G	C	C	G	A	A	T	C	C	C	C	T	C	A
H06	G	T	A	G	C	T	G	G	A	T	C	C	C	T	T	C	A
H07	G	T	C	G	C	T	G	A	A	T	C	C	C	T	T	C	A
H08	C	T	A	G	C	T	G	A	A	T	C	C	C	C	T	C	A
H09	G	T	A	G	C	T	G	A	A	T	C	C	C	T	G	C	A
H00	G	T	A	G	C	T	C	A	A	T	C	C	C	T	T	C	A
H11	G	T	A	G	C	T	G	A	G	T	C	C	T	T	T	C	A
H12	C	T	A	G	T	C	G	A	A	T	C	C	C	T	T	C	A
H13	G	T	A	G	C	T	G	A	A	T	C	T	C	T	T	C	A
H14	G	T	A	G	C	T	G	A	A	G	C	C	C	T	T	C	A
H15	G	G	A	G	C	T	G	A	A	T	C	C	C	T	T	C	A
H16	G	T	A	G	C	T	G	A	G	T	C	C	C	T	T	C	C
H17	G	T	A	G	C	T	G	A	A	T	T	C	C	T	T	C	A
H18	G	T	A	A	C	T	G	A	A	T	C	C	C	T	T	C	A
H19	G	T	A	G	T	T	G	A	A	T	C	C	C	T	T	C	A
H20	C	T	A	G	C	T	G	A	G	T	C	C	C	C	T	C	A
H21	G	T	A	G	C	T	G	A	A	T	C	C	C	T	T	A	A
H22	G	T	A	G	T	C	G	A	A	T	C	C	C	C	T	C	A

<sup>a</sup> Posição genômica referenciada tendo a base A do primeiro ATG traduzido como a +1.

Alelo alternativo de cada ponto de variação está marcado em cinza.

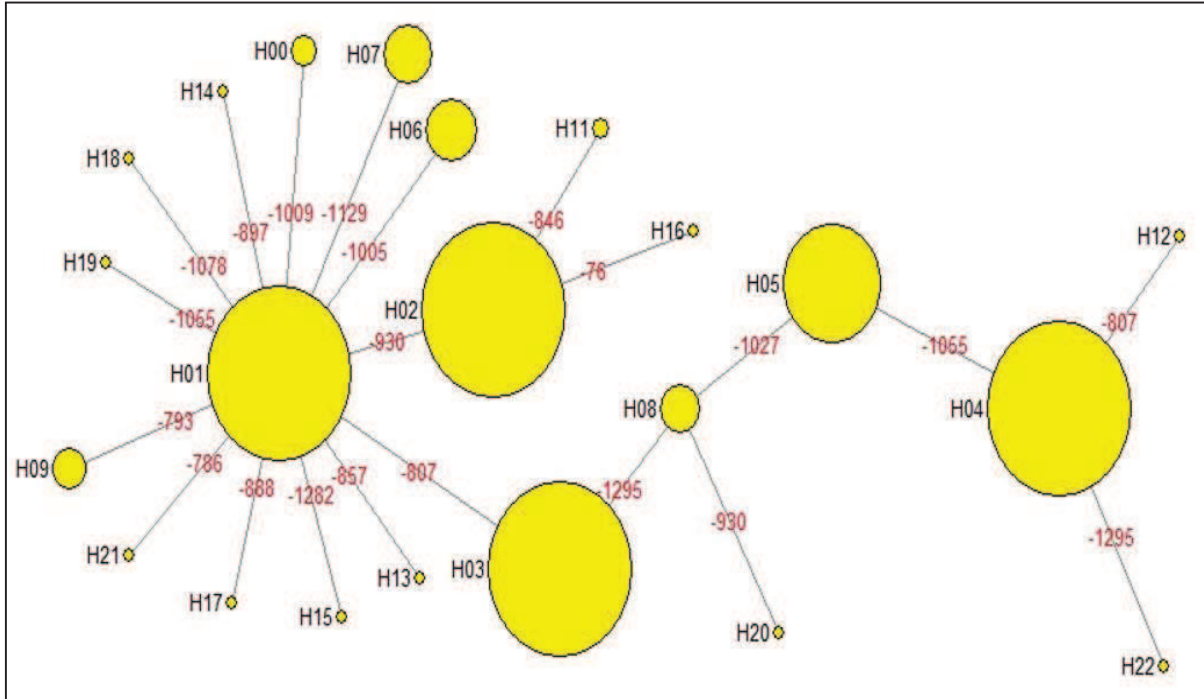
**Tabela 12.** Frequência relativa dos 22 haplótipos encontrados para a região promotora do gene *CYP2E1* considerando-se dados do projeto 1000 Genomas e as amostras brasileiras.

Superpopulação	Brasil		Africanos					Europeus					Leste asiáticos					Sul asiáticos					Americanos					Global	
	CONTROLE	CASO	YRI	LWK	GWD	MSL	ESN	TSI	FIN	GBR	IBS	CHB	JPT	CHS	CDX	KHV	PIL	BEB	STU	ITU	CEU	ASW	ACB	MXL	PUR	CLM	PEL	GIH	Global
População	192	168	216	198	226	170	198	214	198	182	214	206	208	210	186	198	192	172	204	204	198	122	192	128	208	188	170	206	5008
Haplótipo																													
H1	0.8070	0.7560	0.4810	0.4800	0.4730	0.4880	0.5150	0.8830	0.9340	0.9400	0.9110	0.5290	0.5430	0.5760	0.4350	0.5250	0.7450	0.6690	0.6570	0.6960	0.6480	0.5940	0.7190	0.7450	0.7550	0.7060	0.7140	0.6700	
H2	0.0781	0.0585	0.1620	0.1060	0.1860	0.1410	0.1060	0.0327	0.0202	0.0110	0.0374	0.2280	0.2640	0.2240	0.3870	0.2270	0.2450	0.3140	0.3240	0.2750	0.0253	0.1070	0.1250	0.0781	0.1200	0.0957	0.0941	0.2720	0.1570
H3	0.0621	0.1430	0.2590	0.3380	0.2300	0.2590	0.2930	0.0327	0.0051	0.0165	0.0234	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0098	0.0202	0.1230	0.2080	0.0391	0.0625	0.0213	0.0353	-	0.0775
H4	0.0365	0.0357	-	-	-	-	-	0.0514	0.0404	0.0275	0.0167	0.2390	0.1920	0.2000	0.1610	0.2170	0.0104	0.0116	0.0049	0.0098	0.0606	0.0164	-	0.1480	0.0577	0.1120	0.1590	0.0037	0.0646
H5	0.0052	-	0.0787	0.0202	0.0664	0.0353	0.0707	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0492	0.0573	0.0078	-	0.0160	0.0059	-	0.0147
H6	0.0052	-	0.0083	0.0455	0.0089	0.0059	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0328	0.0156	-	-	-	-	-	-	0.0041
H7	0.0052	0.0060	0.0046	0.0051	0.0221	0.0353	0.0051	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0164	-	-	0.0048	-	-	-	-	0.0035
H8	-	-	0.0046	0.0051	0.0133	0.0294	0.0101	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0082	-	-	-	-	-	-	0.0024
H9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0049	-	-	0.0108	0.0303	-	0.0058	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0019
H10	0.0052	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0055	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0049	0.0049	-	-	-	0.0048	-	-	-	-	0.0009
H11	-	-	-	-	-	0.0059	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0049	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0004
H12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0047	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0002
H13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0047	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0002
H14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0054	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0002
H15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0049	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0002
H16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0002
H17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0002
H18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0002
H19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0078	-	-	-	-	-	0.0002
H20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0048	-	-	-	-	0.0002
H21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0002
H22	0.0052	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0002

YRI (Yoruba em Ibadan, Nigéria), LWK (Luhya em Webuye, Kenia), GWD (Gambianos nos estados do Oeste em Gambia), MSL (Mende em Serra Leoa), ESN (Esan na Nigéria), TSI (Habitantes da Toscana na Itália), FIN (Finlandeses na Finlândia), GBR (Britânicos da Inglaterra e Escócia), IBS (População Ibérica da Espanha), CHB (Chineses Han de Pequim, China), JPT (Japoneses em Tóquio, Japão), CHS (Chineses Han do Sudoeste da China), CDX (Chineses Dai em Xishuangbanna, China), KHV (População Kinh na cidade de Ho Chi Minh, Vietnam), PJI (Punjabi de Lahore, Paquistão), BEB (Bengalis de Bangladesh), STU (Cingaleses de Tamil habitantes do Reino Unido), ITU (Indianos de Telugu, habitantes do Reino Unido), CEU (Moradores de Utah com ascendência do Norte e Oeste Europeu), ASW (Americanos do sudoeste dos Estados Unidos com ancestralidade africana), ACB (Afro-caribenhos em Barbados), MXL (Americanos com ascendência mexicana em Los Angeles, EUA), PUR (Porto-riquenhos de Porto Rico), CLM (Colombianos de Medellín, Colômbia), PEL (Peruanos de Lima, Peru), GIH (Indianos Gujarati de Houston, Texas).

Para avaliar a similaridade entre estes haplótipos da região promotora do *CYP2E1* e concatena-los em grupos relacionados, uma rede de haplótipos foi construída (Figura 7).

**Figura 7.** Rede de haplótipos ilustrando as relações entre os 22 haplótipos (Tabela 8) encontrados em populações mundiais.



A rede de haplótipos foi calculada utilizando-se o algoritmo *median joining* pelo *software Network 4.6.1.0*. O tamanho da área do círculo é proporcional à frequência dos haplótipos.

### 5.6 Danos no DNA detectados pelo ensaio cometa nos grupos caso e controle distribuídos de acordo com as variantes na região promotora do gene *CYP2E1*

Comparando a análise molecular com os danos genotóxicos entre os grupos caso e controle, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes, exceto para o parâmetro OTM nos locos 1,3 e 4 (Tabela 13). Os locos 1, 2, 3, 4, 7 e 8 correspondem aos SNPs rs3813867, rs6413422, rs2031920, rs2031921, rs3813870, rs2031922, respectivamente. Os locos 5 e 6 não foram analisados, pois só apresentaram o genótipo homozigoto normal.

**Tabela 13.** Estimativas da correlação dos parâmetros do ensaio cometa (média  $\pm$  desvio padrão) e os genótipos individuais entre os alcoolistas.

	TL	% DNA	OTM
<b>Loco 1 (rs3813867)*</b>	<b><i>p</i>= 0,44</b>	<b><i>p</i>= 0,22</b>	<b><i>p</i>= 0,29</b>
Heterozigoto C/G (n=6)	16,72 $\pm$ 4,09	30,13 $\pm$ 14,33	10,25 $\pm$ 3,98
Homozigoto normal G/G (n=69)	14,02 $\pm$ 8,40	23,14 $\pm$ 13,26	7,59 $\pm$ 6,04
<b>Loco 2 (rs6413422)*</b>	<b><i>p</i>= 0,85</b>	<b><i>p</i>= 0,37</b>	<b><i>p</i>= 0,26</b>
Heterozigoto A/C (n=1)	14,08 $\pm$ 0	35,34 $\pm$ 0	11,76 $\pm$ 0
Homozigoto normal A/A (n=74)	14,24 $\pm$ 8,21	23,55 $\pm$ 13,4	7,75 $\pm$ 5,95
<b>Loco 3 (rs2031920)*</b>	<b><i>p</i>=0,44</b>	<b><i>p</i>= 0,22</b>	<b><i>p</i>= 0,29</b>
Heterozigoto C/T (n=6)	16,72 $\pm$ 4,09	30,13 $\pm$ 14,33	10,25 $\pm$ 3,98
Homozigoto normal C/C(n=69)	14,02 $\pm$ 8,40	23,14 $\pm$ 13,26	7,59 $\pm$ 6,04
<b>Loco 4 (rs2031921)*</b>	<b><i>p</i>=0,44</b>	<b><i>p</i>= 0,22</b>	<b><i>p</i>=0,29</b>
Heterozigoto T/C (n=6)	16,72 $\pm$ 4,09	30,13 $\pm$ 14,33	10,25 $\pm$ 3,98
Homozigoto normal T/T (n=69)	14,02 $\pm$ 8,4	23,14 $\pm$ 13,26	7,59 $\pm$ 6,04
<b>Loco 7 (rs3813870)*</b>	<b><i>p</i>= 0,87</b>	<b><i>p</i>= 0,49</b>	<b><i>p</i>= 0,90</b>
Heterozigoto A/G (n=8)	13,53 $\pm$ 4,8	23,68 $\pm$ 8,05	6,86 $\pm$ 2,46
Homozigoto normal A/A (n=67)	14,32 $\pm$ 8,49	23,7 $\pm$ 13,92	7,92 $\pm$ 6,21
<b>Loco 8 (rs2031922)**</b>	<b><i>p</i>= 0,42</b>	<b><i>p</i>= 0,22</b>	<b><i>p</i>= 0,31</b>
Heterozigoto T/C (n=13)	12,42 $\pm$ 5,78	15,86 $\pm$ 7,48	5,04 $\pm$ 3
Homozigoto mutado C/C (n=8)	14,69 $\pm$ 4,45	28,65 $\pm$ 13,44	9,36 $\pm$ 4,18
Homozigoto normal T/T (n=54)	14,61 $\pm$ 9,04	24,86 $\pm$ 13,9	8,24 $\pm$ 6,5

\*Teste U de Mann Whitney \*\*Teste Kruskal Wallis



## 6 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo demonstram que o consumo crônico do álcool é realizado predominantemente por homens com idade superior a 35 anos. Os resultados encontrados são consistentes com estudos caso-controle que analisaram alcoolistas (Pastorelli et al., 2001; Soya et al., 2008; Marques, 2010) e com os dados do Inquérito domiciliar sobre comportamento de risco e morbidade referida de doenças e agravos não transmissíveis (Instituto Nacional De Câncer, 2004), Pesquisa Nacional em Saúde (Instituto Brasileiro De Geografia E Estatística, 2013) e Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Brasil, 2015). A maior frequência de homens alcoolistas pode se dar devido ao fato de as mulheres serem mais vulneráveis aos efeitos adversos do consumo excessivo de álcool (Marques, 2010). O menor índice de massa corporal e a menor quantidade de água corporal, em detrimento da maior quantidade de gordura, associado a menor quantidade de enzimas metabolizadoras de álcool, implica em uma taxa de metabolização do álcool diferente em relação aos homens. Além disso, o julgamento social em relação à mulher que consome álcool continua sendo relevante para a baixa frequência de mulheres alcoolistas. Outros estudos também indicam que há uma maior predominância de pessoas com faixa etária acima de 35 anos que fazem o consumo crônico de álcool e são atendidas em Centros de Atenção Psicossocial (Ballarin et al., 2011; Freitas et al., 2012)

Os nossos dados sobre o maior uso de medicamentos por parte dos indivíduos que perfazem o grupo caso (alcoolistas) pode ser explicado em parte pelo fato de ser preconizado pelo Ministério da Saúde Brasileiro que os Centros de Atenção Psicossocial-Álcool e Drogas devem oferecer atendimento individual que inclui medicamentos e psicoterápicos, logo é esperado que haja um elevado numero de alcoolistas atendidos pelo CAPS-Ad que façam uso de medicamentos (Freitas, 2012)

Sobre o hábito tabagista, nesse estudo houve diferença entre os grupos, com predominância de fumantes no grupo caso e não fumantes no grupo controle. O uso concomitante de álcool e tabaco ocorreu em 75% dos indivíduos alcoolistas. O consumo crônico de álcool e o tabagismo são comuns em alcoolistas e estão associados com uma maior produção de acetaldeído (Pastorelli et al., 2001; Soya et al., 2008). O tabagismo pode interferir na relação do dano genotóxico e o consumo crônico de álcool e por isso foram realizadas análises (Correlação de Spearman) para o ajuste estatístico. Entretanto, não houve



diferenças estatisticamente significantes quando analisados o tempo de tabagismo e carga tabágica associadas para os danos genotóxicos avaliados pelo ensaio cometa, sendo que, o mesmo ocorreu quando analisado o tempo e a quantidade de consumo álcool/dia.

Maior dano genotóxico foi encontrado no grupo caso em relação ao grupo controle para todos os parâmetros avaliados pelo ensaio cometa. Quando alcoolistas bebem álcool em grandes quantidades e de forma crônica, eles são expostos a níveis elevados de acetaldeído por longos períodos e tem sido sugerido que a toxicidade do acetaldeído no organismo induz ao estresse oxidativo, danos genotóxicos e além de ter impacto na susceptibilidade ao câncer de cabeça e pescoço (Garcia, 2010; Hakenewertha et al., 2013), carcinoma de boca (Takamori, 2012) e doenças hepáticas (Khan et al., 2009). Além disso, os indivíduos do grupo caso possuem faixa etária mais elevada e podem ser mais vulneráveis aos efeitos tóxicos do acetaldeído devido à capacidade de defesa antioxidante reduzida. Martelle-Palomino e colaboradores (2005) ao avaliar, pelo ensaio cometa, o grau de exposição genotóxica ao qual estavam expostos 49 indivíduos que faziam o uso exagerado de bebidas alcoólicas, abstinentes e controles saudáveis (não fumantes e que não faziam o uso recente de tratamentos químicos e físicos) identificaram diferença significativa entre o grupo dos alcoolistas ( $0.48 \pm 0.24$ ) e grupo controle ( $0.22 \pm 0.16$ )  $p < 0.0001$ .

Além disso, no nosso estudo, a análise dos polimorfismos rs3813867, rs2031920 e rs2031921 demonstrou que o alelo não mutado foi mais frequente nos grupos caso (96, 96 e 96%) e controle (95,8, 94,9 e 94,9%), sendo que nenhum homozigoto mutado foi detectado. Pastorelli e colaboradores (2001) ao realizarem um estudo caso-controle com indivíduos italianos, sendo 60 alcoolistas e 64 indivíduos não dependentes de álcool identificaram que a distribuição dos genótipos *CYP2E1* para o alelo mutado foi semelhante nos controles e nos alcoolistas. Nenhum homozigoto mutado foi detectado e a frequência do alelo mutado não foi significativamente diferente nos controles (4,7%) e indivíduos dependentes de álcool (2,5%). A frequência do genótipo homozigoto não mutado foi maior em alcoolistas (95%) e controles (90,6%) em relação ao genótipo heterozigoto. Resultados similares foram identificados em um estudo realizado por Plemenitas e colaboradores (2014) ao analisarem uma população eslovena composta por 101 alcoolistas, 100 indivíduos ex-dependentes ao álcool e também 97 controles que não consumiam álcool de forma crônica, na qual não houve diferença na distribuição dos genótipos e alelos para o polimorfismo rs2031920 do gene *CYP2E1* e o genótipo homozigoto e alelo não mutado foram mais frequentes entre os grupos investigados.

Dutta (2013) ao realizar um estudo com indivíduos do norte da Índia, sendo 100 controles saudáveis e 120 alcoolistas (60 alcoolistas cirróticos e 60 alcoolistas não cirróticos),

não detectou o genótipo homocigoto mutado entre os grupos estudados e também encontrou maior frequência do genótipo homocigoto não mutado sendo a frequência de 99; 97,50 e 95% pra os grupos controle, alcoolistas cirróticos e alcoolistas não cirróticos respectivamente.

Rossini e colaboradores (2006) ao analisar o polimorfismo rs2031920 no gene *CYP2E1* em uma população de alcoolistas no Brasil vivendo na cidade do Rio de Janeiro encontraram as frequências genotípicas de 91, 8, e 1% para homocigotos não mutado, heterocigotos e homocigotos mutado, respectivamente.

A população brasileira é altamente miscigenada e consiste na mistura de africanos, europeus e ameríndios, De fato, em nossos resultados, quanto à comparação da frequência dos pontos de variação rs3813867, rs2031920 rs2031921 do *CYP2E1* entre as 26 populações do projeto 1000 Genomas e os grupos caso e controle mostraram que há maior proximidade genética, nos pontos de variação citados, entre as amostras da população brasileira com as subpopulações Finlandeses na Finlândia, Britânicos da Inglaterra e Escócia, População Ibérica da Espanha. Esses resultados confirmam a similaridade no perfil de grande consumo de álcool entre a amostra brasileira (grupos casos e controle) e subpopulações europeias, na qual, de acordo de acordo com o Relatório Global sobre Álcool e Saúde (Organização Mundial de Saúde, 2014) sobre o uso *per capita* em litros de álcool puro, houve no ano de 2010 um consumo de 8,7 litros no Brasil, 12,3 na Finlândia, 11,6 no Reino Unido da Grã-Bretanha e Irlanda do Norte (engloba a subpopulação Britânicos da Inglaterra e Escócia) e 11,2 na Espanha, sendo a média mundial de 6,2 litros *per capita*.

Nossos achados também demonstraram que as populações com maior distância genética para os pontos de variação rs3813867, rs2031920 rs2031921 do *CYP2E1* com os grupos caso e controle foram as subpopulações, Japoneses em Tóquio (Japão), Chineses Han em Beijing (China) e Kinh em Ho Chi Min (Vietnã). O Relatório Global da OMS também confirma a distância no perfil de consumo entre as populações do Leste Asiático e as populações caso e controle na qual o uso *per capita*, em litros, de álcool puro, no ano de 2010 na China foi de 6,7, no Japão de 7,2 e no Vietnã de 6,6.

Chun e colaboradores (2009) ao estudarem os polimorfismos rs3813867, rs3813870, rs2070673, rs2515641 e rs2480257 do gene *CYP2E1* por meio de genotipagem de 1.092 indivíduos coreanos descreveu que o polimorfismo rs3813867 está em desequilíbrio de ligação absoluta (LD) ( $|D'| = 1$  e  $r^2 = 1$ ) com o polimorfismo rs2031920 e estimaram que o polimorfismo rs2031920 não está associado com a atividade da *CYP2E1*, mas está associado com a indução da atividade da *CYP2E1* por interações gene-ambiente, incluindo ligações com o consumo de etanol. Outros estudos identificaram desequilíbrio de ligação entre os

polimorfismos rs2031920 e rs3813867 (Heathfield, 2014; Polonikov et al., 2013; Wang et al., 2009) e entre rs2031920 e rs2031921 (Tang et al., 2010)

Vale ressaltar que não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os genótipos nos pontos de variação rs3813867, rs2031920 rs2031921 do *CYP2E1* com os danos genotóxicos avaliados pelo ensaio cometa entre o grupo caso (alcoolistas), pelos parâmetros comprimento da cauda do cometa ( $p=0,44$ ), porcentagem de DNA na Cauda ( $p=0,22$ ) e Momento da cauda de Olive ( $p=0,29$ ). Contudo, alcoolistas heterozigotos para os pontos de variação rs3813867, rs2031920 e rs2031921 apresentaram um dano no DNA superior em relação aos indivíduos com o alelo homozigoto não mutado quando analisados os parâmetros Comprimento da cauda do cometa (*Tail Length*) e Momento da cauda de Olive (OTM). Nossos resultados são biologicamente plausíveis, uma vez que o alelo mutado está associado com o aumento da atividade de transcrição enzimática e, portanto, produção mais elevada de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Gemma et al., 2006) ocasionando maior dano genotóxico. Embora seja possível perceber uma tendência de dano inferior nos alcoolistas que apresentam genótipo homozigoto não mutado, devido à falta de significância estatística, não é possível afirmar que este efeito seja uma vantagem conferida ao genótipo. A falta de significância estatística, em nosso estudo, pode ser explicada pela baixa frequência do alelo variante em uma amostra limitada.

Assim, os resultados do presente estudo demonstram a ausência de correlação entre os genótipos encontrados nos pontos de variação rs3813867, rs2031920 rs2031921 do *CYP2E1* e os danos genotóxicos, porém não exclui a possibilidade de estes exercerem alguma influência nos danos genotóxicos, visto que a combinação destes e de outros genes do metabolismo do etanol também pode contribuir de alguma forma para os danos genotóxicos.

## 7 CONCLUSÃO

A análise dos resultados desse estudo permitiu obter as seguintes conclusões:

- A maior parte dos indivíduos do grupo caso é do sexo masculino, com idade acima de 35 anos e apresentam histórico de tabagismo.
- Maior dano genotóxico foi observado no grupo caso em relação ao grupo controle.
- O dano genotóxico do grupo caso não mostrou associação com o tempo de tabagismo e etilismo, carga tabágica e quantidade de álcool/dia.
- Não houve diferenças estatisticamente significativas entre as frequências do genótipo *CYP2E1* dos grupos caso e controle.
- No presente estudo foram identificados 8 pontos de variação na região promotora do gene *CYP2E1* nas amostras dos grupos caso e controle e 9 pontos de variações encontrados apenas nas populações do projeto 1000 Genomas.
- Um elevado LD entre os polimorfismos -1295 e -1055 foi identificado nas amostras dos grupos caso e controle e nas populações asiática, europeia e americana.
- Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes quanto à relação dos danos genotóxicos e os genótipos do grupo caso (alcoolistas).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARIF, E., VIBHUTI, A., ALAM, P., DEEPAK, D., SINGH, B., ATHAR, M., & PASHA, M. A. Association of CYP2E1 and NAT2 gene polymorphisms with chronic obstructive pulmonary disease. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 382(1-2), p. 37, 2007.

BAGATINI, P. B.; MALUF, S. W. Ensaio Cometa. In: MALUF, S. W. **Citogenética Humana**. 1ª edição. Porto Alegre: Artmed, p.194-201, 2011.

BANDELT H.J., FORSTER P., ROHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Mol. Biol. Evol.**, v. 16, p. 37–48, 1999.

BARRETT, J. C. et al. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. **Bioinformatics**, v. 21, n. 2, p. 263-5, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vigitel Brasil 2014: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico**. Brasília: Ministério da Saúde; 2015. 165 p. Disponível em: <[http://www.ans.gov.br/images/stories/Materiais\\_para\\_pesquisa/Materiais\\_por\\_assunto/2015\\_vigitel.pdf](http://www.ans.gov.br/images/stories/Materiais_para_pesquisa/Materiais_por_assunto/2015_vigitel.pdf)>. Acesso em 2015-10-11.

CARTMELL, M. T., SCHULZ, H. U., O'REILLY, D. A., YANG, B. M., KIELSTEIN, V., DUNLOP, S. P., HALANGK, W., DEMAINE, A. G., KINGSNORTH, A. N. Cytochrome P450 2E1 high activity polymorphism in alcohol abuse and end-organ disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 11(41), p. 6445–6449, 2005.

CARVALHO, M. T. P. M. **Polimorfismos nos genes NAT2, CYP2E1, GSTT1, GSTM1 e ABCB11 e hepatotoxicidade induzida pela isoniazida**. 2012. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra, Portugal, 2012. Disponível em: <<https://estudogeral.sib.uc.pt/handle/10316/24985#>>. Acesso em: 2015-08-10

CEDERBAUM, A. I. CYP2E1 – Biochemical and Toxicological Aspects and Role in Alcohol-Induced Liver Injury. In: A. Elfarra (Ed.), *Advances in Bioactivation Research*. New York, NY: **Springer**, p. 133–67, 2008.

CEDERBAUM, A. I. Alcohol Metabolism. **Journal of Clinical Liver Disease**, v. 16(4), p. 667-685, 2012.

CEDERBAUM A. I. Molecular mechanisms of the microsomal mixed function oxidases and biological and pathological implications. **Redox Biol.**, v. 4, p. 60-73, 2015.

CELORRIO, D., BUJANDA, L., CASO, C., LANDABASO, M., ORIA, J. C., OGANDO, J., & DE PANCORBO, M. M. A comparison of Val81Met and other

polymorphisms of alcohol metabolising genes in patients and controls in Northern Spain. **Alcohol**, v. 46(5), p. 427–431, 2012.

CHARLIER, C. F. **Influência da variabilidade genética sobre biomarcadores de dano oxidativo e não oxidativo em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC)**. 2012 Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rio Grande do Sul. 2012. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10183/60539>>. Acesso em 2015-08-13

COLLINS A. R., OSOZ A. A. BRUNBORG G., GAIVÃO I., GIOVANNELLI L., KRUSZEWSKI M., SMITH, C. C. AND STETINA, R. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, 23 (3): 143-151, 2008.

DASGUPTA, A. **Alcohol and Its Biomarkers: Clinical Aspects and Laboratory Determination**. Elsevier, v. 1, 2015.

DIAS, A.P. **Estado nutricional de indivíduos alcoolistas crônicos na internação e na alta médica, em um hospital psiquiátrico, Araçatuba, S.P.** [Dissertação]. [Araçatuba (SP)]: Universidade Estadual Paulista; 2007. 84 p.

DRUMMOND, S. N. **Associação entre os polimorfismos dos genes *CYP1A1*, *CYP2E1*, *GSTM1*, *GSTT1* e o carcinoma de células escamosas da boca**. 2005. Tese (Doutorado em Farmacologia Bioquímica e Molecular) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2005. Disponível em:<<http://www.dominiopublico.gov.br/download/texto/cp098424.pdf>>. Acesso em 2015-08-13

EXCOFFIER, L. & LISCHER H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Mol. Ecol. Res.**, v.10, p. 564–567, 2010.

FREITAS, R. M. de; SILVA, H. R. R. da; ARAÚJO, D. S. de. Resultados do acompanhamento dos usuários do Centro de Atenção Psicossocial - Álcool e Drogas (Caps-AD). **SMAD, Rev. Eletrônica Saúde Mental Álcool Drog. (Ed. port.)**, Ribeirão Preto , v. 8, n. 2, p. 56-63, ago. 2012 .

FORTE EB. **Perfil de consumo dos medicamentos psicotrópicos na população de Caucaia**. Monografia [Especialização em Assistência Farmacêutica]. Escola de Saúde Pública, Fortaleza-Ceará. 2007. 38p.

GABRIEL, S. B., SCHAFFNER, S. F., NGUYEN, H., MOORE, J. M., ROY, J., BLUMENSTIEL, B., HIGGINS, J., DEFELICE, M., LOCHNER, A., FAGGART, M., LIU-CORDERO, S. N., ROTIMI, C., ADEYEMO, A., COOPER, R., WARD, R., LANDER, E. S., DALY, M. J., ALTSHULER, D. The structure of haplotype blocks in the human genome. **Science**, v. 296, n. 5576, p. 2225-2229, 2002.

GARCÍA-BAÑUELOS, J., PANDURO, A., GORDILLO-BASTIDAS, D., GORDILLO-BASTIDAS, E., MUÑOZ-VALLE, J. F., GURROLA-DÍAZ, C. M., SÁNCHEZ-ENRÍQUEZ, S., RUIZ-MADRIGAL, B., BASTIDAS-RAMÍREZ, B. E.

Genetic Polymorphisms of Genes Coding to Alcohol-Metabolizing Enzymes in Western Mexicans: Association of CYP2E1\*c2/CYP2E1\*5B Allele with Cirrhosis and Liver Function. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 36(3), p. 425–431, 2012.

GARCIA, L. P. AND FREITAS, L. R. S. de. Consumo abusivo de álcool no Brasil: resultados da Pesquisa Nacional de Saúde 2013. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, v. 24 (2), p. 227-237, abr-jun 2015. Disponível em: <<http://scielo.iec.pa.gov.br/pdf/ess/v24n2/v24n2a05.pdf>>. Acesso em: 2015-10-11

GARCIA, S. M. N. **Genes de metabolização do álcool e o risco de câncer de cabeça e pescoço**. 2009. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Experimental) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5160/tde-27102009-204856/>>. Acesso em: 2015-08-10.

GAZAL, S.; SAHBATOU, M.; BABRON, M. C.; GÉNIN, E.; LEUTENEGGER, A. L. High level of inbreeding in final phase of 1000 Genomes Project. **Sci Rep**, v. 5, p. 17453, 2015.

GLAUBITZ, J.C. Convert: A user-friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, p. 309-310, 2004.

GUO, S. W. AND THOMPSON, E. A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics**, v. 48, n. 2, p. 361-72, 1992.

HALL, T. A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl Acids Symp Ser.**, v. 41, p. 95–98, 1999.

HARTMANN, A.; AGURELL, E.; BEEVERS, C.; BRENDLER-SCHWAAB, S.; BURLINSON, B.; CLAY, P.; COLLINS, A.; SMITH, A.; SPEIT, G.; THYBAUD, V.; TICE, R. R. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. **Mutagenesis**, v. 18 (1), p. 45-51, 2003.

HINES, R. N. The ontogeny of drug metabolism enzymes and implications for adverse drug events. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 118(2), p. 250–267, 2008.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). **Inquérito domiciliar sobre comportamento de risco e morbidade referida de doenças e agravos não transmissíveis**: Brasil, 15 capitais e Distrito Federal, 2002-2003. Rio de Janeiro: Inca, 2004.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa Nacional de Saúde 2013: percepção do estado de saúde, estilos de vida e doenças crônicas – Brasil, Grandes Regiões e Unidades da Federação [Internet]. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística; 2014. 181 p. Disponível em: <<http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv91110.pdf>>. Acesso em 2015-10-11.



KHAN, A. J., RUWALI, M., CHOUDHURI, G., MATHUR, N., HUSAIN, Q., & PARMAR, D. Polymorphism in cytochrome P450 2E1 and interaction with other genetic risk factors and susceptibility to alcoholic liver cirrhosis. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 664(1), p. 55–63, 2009.

KOOP, D. R. Alcohol metabolism's damaging effects on the cell. **Alcohol Research & Health**, v. 29, p. 274–280, 2006.

Lee, M.-Y., Mukherjee, N., Pakstis, A. J., Khaliq, S., Mohyuddin, A., Mehdi, S. Q., ... Kidd, K. K. Global patterns of variation in allele and haplotype frequencies and linkage disequilibrium across the *CYP2E1* gene. **The Pharmacogenomics Journal**, v. 8(5), p. 349–356, 2008.

LEWONTIN, R. C. The interaction of selection and linkage. I. General considerations; heterotic models. **Genetics**, Austin, v. 49, p.49-67, 1964.

LISCHER, H. E. L., & EXCOFFIER, L. PGDSpider: an automated data conversion tool for connecting population genetics and genomics programs. **Bioinformatics**, v. 28, p. 298–299, 2012.

MANGUEIRA, S. O., GUIMARÃES, F. J., MANGUEIRA, J. O., FERNANDES, A. F. C., LOPES, M. V. O. Promoção da saúde e políticas públicas do álcool no Brasil: revisão integrativa da literatura. **Psicol. Soc.**, Belo Horizonte, v. 27, n. 1, p. 157-168, 2015.

MARICHALAR-MENDIA, X., RODRIGUEZ-TOJO, M. J., ACHA-SAGREDO, A., REY-BARJA, N., & AGUIRRE-URIZAR, J. M. Oral cancer and polymorphism of ethanol metabolising genes. **Oral Oncology**, v.46(1), p. 9–13, 2010.

MARQUES, A. T. da S. **Alcoolismo e violência doméstica: investigação de variantes genéticas em genes da família do citocromo P450**. 2010. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra, Portugal, 2010. Disponível em: <<https://estudogeral.sib.uc.pt/handle/10316/28812#>>. Acesso em 2015-08-10.

MARTELLI-PALOMINO, G. ; VOGEL, C. I. G.; COSTA JR, L. A.; TAKAHASHI, C. S. Utilização de biomarcadores para a avaliação do dano genético induzido pelo consumo abusivo de álcool. In: 51 Congresso Brasileiro de genética, 2005, Águas de Lindóia. Congresso Brasileiro de Genética, 2005.

MESSAS, G. P.; VALLADA FILHO, H. P. O papel da genética na dependência do álcool. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, São Paulo , v. 26, supl. 1, p. 54-58, 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. (2004c). **A política do Ministério da Saúde para Atenção Integral a Usuários de Álcool e Outras Drogas**. 2.ed. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção a Saúde.



OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, M. A. F.; CLARO, H. G.; PAGLIONE, H. B. Care Practices in a Psychosocial Care Center for Alcohol, Tobacco and Other Drugs. **Rev. Ter. Ocup. Univ. São Paulo**, v. 21, n. 3, p. 247-254, set./dez. 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Alcohol. Geneva, Switzerland: World Health Organization. Disponível em: <[http://www.who.int/topics/alcohol\\_drinking/en/](http://www.who.int/topics/alcohol_drinking/en/)>. Acesso em: 2015-08-15.

PILLON, S. C.; LUIS, M. A. V. Modelos explicativos ao fenômeno do uso do álcool e drogas. **Rev Latino-am Enfermagem**, v. 12, n. 4, p. 676-82, 2004.

PLEMENITAS, A., KASTELIC, M., PORCELLI, S., SERRETTI, A., RUS MAKOVEC, M., KORES PLESNICAR, B., & DOLŽAN, V. Genetic variability in CYP2E1 and catalase gene among currently and formerly alcohol-dependent male subjects. **Alcohol and Alcoholism**, v. 50 (2), p. 140–145, 2015.

QIN, Z. S. et al. Partition-ligation-expectation-maximization algorithm for haplotype inference with single-nucleotide polymorphisms. **Am J Hum Genet**, v. 71, n. 5, p. 1242-7, 2002.

RAYMOND, M. & ROUSSET, F. Genepop (Version-1.2) - Population-Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. **Journal of Heredity**, v. 86, n. 3, p. 248-249, 1995.

RAMCHANDANI, V. A. Genetics of alcohol metabolism. In: R. R. Watson et al. eds. **Alcohol, Nutrition and Health Consequences**. New York, Humana Press, p. 15-25, 2013.

REBELLO, A. S., & CARVALHO, M. G. da C. Metodologia para estudo do polimorfismo do gene da enzima álcool desidrogenase. **R. Ci. med. biol.**, Salvador, v. 7, n. 2, p. 163–168, 2008.

SEITZ, H. K., & MUELLER, S. Alcoholic liver disease. In: Dancygier H. eds. **Clinical Hepatology: Principles and Practice of Hepatobiliary Diseases**. Heidelberg, Dordrecht, London, New York: **Springer**, p. 1111-52, 2010.

STEPHENS, J. C. et al. Haplotype variation and linkage disequilibrium in 313 human genes. **Science**, v. 293, n. 5529, p. 489-93, 2001.

STEPHENS, M.; DONNELLY, P. A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. **Am J Hum Genet**, v. 73, n. 5, p. 1162-9, 2003.

SILVA, J. O uso do ensaio cometa para o ensino de genética toxicológica. **Genética na escola**. Universidade Luterana do Brasil, ISSN 1980-3540, Canoas-RS, p. 30-33, 02 fev, 2007.

TANG, K., LI, X., XING, Q., LI, W., FENG, G., HE, L., & QIN, S. Genetic polymorphism analysis of cytochrome P4502E1 (CYP2E1) in Chinese Han populations

from four different geographic areas of Mainland China. **Genomics**, v. 95(4), p. 224–229, 2010.

TAKAMORI, J. T. **Avaliação de polimorfismos em genes de metabolismo do etanol e gene de reparo do DNA em pacientes portadores de câncer de boca**. 2012. Dissertação (Mestrado em Oncologia) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5155/tde-01102012-163638/>>. Acesso em: 2015-08-10.

THE 1000 GENOMES PROJECT CONSORTIUM. A map of human genome variation from population-scale sequencing. **Nature**, v. 467, p.1061-1073, 2010.

THE 1000 GENOMES PROJECT CONSORTIUM. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. **Nature**, v. 491, p.56-65, 2012.

THE 1000 GENOMES PROJECT CONSORTIUM. A global reference for human genetic variation. **Nature**, v. 526, p. 68-74, 2015.

THE INTERNATIONAL HAPMAP 3 CONSORTIUM. Integrating common and rare genetic variation in diverse human populations. **Nature**, v. 467(7311), p. 52–58, 2010.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANERSON, B.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y.F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 206-21, 2000.

TSENG, Y. M., HU, B. W., TSAI, S. M., CHEN, I. J., JIN, Y. R., LEE, J. H., TSAI, L. Y. Distribution of alcohol-metabolizing enzyme genotypes in trauma patients with excessive alcohol consumption in the emergency department. **Clinical Biochemistry**, v. 40 (5-6), p. 370–376, 2007.

VIEIRA, J. M. F. **Metabolismo do etanol**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2012. Disponível em: <<http://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/3757/1/Joana%20Vieira.pdf>>. Acesso em: 2015-08-11.

VOGEL, C. I. G. **Estudo citogenético e molecular de uma população de alcoolistas**. 2007. Tese (Doutorado em Genética) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/17/17135/tde-17082007-164428/>>. Acesso em: 2015-08-10.

ZAKHARI, S. Overview: how is alcohol metabolized by the body? **Alcohol Research & Health : The Journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism**, v. 29(4), p. 245–254, 2006.

ZANGER, U. M., & SCHWAB, M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 138(1), p.103–141, 2013.

ZENG, T., GUO, F. F., ZHANG, C. L., SONG, F. Y., ZHAO, X. L., & XIE, K. Q. Roles of Cytochrome P4502E1 Gene Polymorphisms and the Risks of Alcoholic Liver Disease: A Meta-Analysis. **PLoS ONE**, v. 8(1), p. 1–8, 2013.

WEBB, A., LIND, P. A., KALMIJN, J., FEILER, H. S., SMITH, T. L., SCHUCKIT, M. A., & WILHELMSEN, K. The investigation of CYP2E1 in relation to the level of response to alcohol through a combination of linkage and association analysis. **Alcoholism, Clinical and Experimental Research**, v. 35(1), p. 10–18, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, (WHO). Global status report on alcohol and health 2014. Geneva, Switzerland: World Health Organization. Disponível em: <[http://www.who.int/substance\\_abuse/publications/global\\_alcohol\\_report/en/](http://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/en/)>. Acesso em: 2015-08-15.

## ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
GOIÁS - UFG



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Utilização de Biomarcadores para Avaliação do Dano Genético Induzido pelo Consumo Abusivo do Alcool

**Pesquisador:** Caroline Oliveira de Araújo Melo

**Área Temática:** Genética Humana

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

**Versão:** 2

**CAAE:** 20625113.8.0000.5063

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Goiás - UFG

**Patrocinador Principal:** FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE GOIÁS

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 476.938

**Data da Relatoria:** 02/12/2013

#### Apresentação do Projeto:

O alcoolismo é uma doença multifatorial que não tem restrições à classe social nem idade de início do hábito de beber. Consiste numa interação de influências poligênicas (genéticas) e ambientais. A presente pesquisa visa avaliar o grau de exposição genotóxica de indivíduos que fazem uso exagerado de bebidas alcoólicas, pelos testes de micronúcleo em células binucleadas e pelo ensaio cometa. Além disso, serão avaliados os condicionantes genéticos do alcoolismo associados ao risco de doenças hepáticas, como a cirrose e investigadas as alterações gênicas, ou seja, a capacidade do uso abusivo e crônico do álcool de provocar quebras ou danos no DNA genômico. Os dados clínicos dos etilistas serão correlacionados aos dados do grupo controle (indivíduos saudáveis).

#### Objetivo da Pesquisa:

- Avaliar o grau de exposição genotóxica ao qual estão expostos os indivíduos que fazem uso exagerado de bebidas alcoólicas, pelos testes de micronúcleo em células binucleadas e o ensaio cometa; - Avaliar os condicionantes genéticos do alcoolismo associados ao risco de doenças hepáticas, como a cirrose e investigar as alterações gênicas, ou seja, a capacidade do uso abusivo

**Endereço:** Prédio da Retoria Terceiro Cx. Postal 151

**Bairro:** Campus Samambaia

**CEP:** 74.001-970

**UF:** GO

**Município:** GOIÂNIA

**Telefone:** (62)3521-1215

**Fax:** (62)3521-1163

**E-mail:** cep.prog.ufg@gmail.com

Continuação do Parecer: 470.020

e crônico do álcool de provocar quebras ou danos no DNA genômico; - Correlacionar os dados clínicos dos etilistas com os danos genômicos encontrados; -Associar os dados genômicos encontrados nos etilistas em relação ao grupo controle (indivíduos saudáveis).

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Como benefício individual, os autores relatam que, após a realização dos testes genéticos, ao se verificar que um indivíduo apresentou muito dano, o mesmo será monitorado pelo clínico geral do Ambulatório do Centro de Atenção Psicossocial (CAPS Ad/Casa). Além disso, os autores relatam que os resultados do estudo podem contribuir para o entendimento sobre as consequências do consumo abusivo de álcool, no município de Goiânia - Goiás. Relatam ainda que os resultados desse estudo poderão ser utilizados como ferramentas para a detecção precoce de enfermidades, o que deve ser levado em consideração para prevenção dos males em etilistas. Com relação aos riscos da pesquisa, os autores relatam que são mínimos e estão associados à coleta sanguínea (hematoma), bem como a possibilidade de desconforto durante a coleta de material estofado da cavidade oral, ambos descritos no TCLE.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa utilizará dois grupos para a realização do trabalho: o grupo de pacientes, indivíduos que fizeram uso abusivo e crônico de álcool, diagnosticados pelo Ambulatório do Centro de Atenção Psicossocial (CAPS Ad/Casa) e o grupo dos que estão abstinidos em clínica de reabilitação. O grupo controle será constituído por estudantes da UFG que não fazem uso de bebida alcoólica.

Os indivíduos serão separados em grupos, de acordo com o tempo de consumo de álcool: indivíduos que bebem há 10 anos, indivíduos que bebem entre 10 e 15 anos e indivíduos que bebem há mais de 15 anos, cada grupo com 20 componentes. Após a concordância do TCLE, será realizada uma coleta de 10 mL de sangue total em tubo a vácuo com EDTA para que sejam procedidas as análises e os indivíduos deverão responder o questionário que aborda os hábitos de vida dos etilistas, assim como a idade, sexo, tempo de uso do álcool e demais variáveis.

#### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

O projeto apresenta metodologia adequada. Os currículos dos pesquisadores são compatíveis com a pesquisa proposta. Garantia da Privacidade e Confidencialidade contempladas no projeto de pesquisa. Orçamento apresentado, TCLE adequado.

Endereço: Prédio da Retoria Técnico-Cx. Postal 131  
 Bairro: Campus Samambaia CEP: 74.001-970  
 UF: GO Município: GOIÂNIA  
 Telefone: (62)3521-1215 Fax: (62)3521-1185 E-mail: ceps.prog.ufg@gmail.com

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
GOIÁS - UFG



Continuação do Parecer: 470/2013

**Recomendações:**

Adequar o cronograma (coleta de materiais).

No projeto modificado fala-se em coletar 10 mL de sangue, no TCLE 20 mL, e nas informações básicas do projeto, 8 mL. Padronizar qual o real volume de sangue a ser coletado. Apesar de descrito no TCLE e nas informações básicas do projeto, no projeto modificado não há menção à coleta de células esfoliadas da mucosa da boca. É necessário incluir no projeto. Autorizar ligações a cobrar. Informar no TCLE como serão tomados públicos os resultados da pesquisa.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Aprovado, salve melhor juízo desse comitê.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Enviar relatórios parcial e final.

GOIÂNIA, 03 de Dezembro de 2013

---

Assinador por:  
João Batista de Souza  
(Coordenador)

Endereço: Prédio da Retoria Tênis Cx. Postal 131  
Bairro: Campus Samambaia CEP: 74.001-970  
UF: GO Município: GOIÂNIA  
Telefone: (62)3521-1215 Fax: (62)3521-1183 E-mail: cep@peg.ufg@gmail.com

**APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****TÍTULO DO PROJETO: UTILIZAÇÃO DE BIOMARCADORES PARA AVALIAÇÃO DO DANO GENÉTICO INDUZIDO PELO CONSUMO ABUSIVO DE ÁLCOOL**

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS PELO PROJETO:

Orientadora: *Profa. Daniela Melo e Silva, Dra.*

Doutoranda (pesquisadora responsável): Caroline Oliveira de Araújo Melo, MSc

Telefones: (62)96064416 (Pesquisadora responsável); (62) 3946-1385 (REPLICON)

Email: [carolineomelo@yahoo.com.br](mailto:carolineomelo@yahoo.com.br)

O consumo abusivo de álcool traz inúmeras consequências para a saúde e qualidade de vida do indivíduo. O alcoolismo, por si só, é considerado uma doença, sendo caracterizada como multifatorial, que não tem restrições à classe social nem idade de início do hábito de beber e consiste numa interação de influências poligênicas (genéticas e ambientais). Segundo relatório da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2004), o consumo de álcool nos últimos vinte anos tem diminuído nos países desenvolvidos e aumentado nos países em desenvolvimento.

O objetivo principal deste estudo é científico e se baseia em identificar possíveis efeitos do uso do álcool, podendo contribuir para o entendimento sobre as consequências do seu consumo abusivo, no município de Goiânia - Goiás. Além disso, os resultados desse estudo poderão ser utilizados como ferramentas para a detecção precoce de enfermidades, o que deve ser levado em consideração para prevenção dos males em alcoolistas.

Prezado (a) senhor (a),

Por este documento, você está sendo convidado (a) a participar desse estudo. E, também, informado (a) e esclarecido (a) sobre como se dará seu envolvimento para que, então, possa decidir sobre sua participação.

A participação é voluntária e gratuita, e implica, basicamente, em:

- aplicação de questionário de estilo de vida;
- coleta sanguínea.

O *questionário de estilo de vida* irá abordar, individualmente, perguntas sobre fatores da sua vida que possam estar correlacionados ao consumo do álcool e/ou que possam colaborar no entendimento dos resultados obtidos no seu exame laboratorial. A aplicação deste será acompanhada pela equipe de pesquisa, a qual auxiliará em sua compreensão. Contudo, se durante a aplicação, o participante sentir qualquer desconforto, lhe é garantida total liberdade para interromper parcial ou totalmente o preenchimento do mesmo, sem obrigações em justificar essa decisão.

Sua entrevista – contendo dados que permitam sua identificação, informações pessoais e de trabalho - não serão conduzidas (sem sua autorização), a indivíduos não integrantes da equipe de pesquisa. Suas informações, relatos e opiniões ficarão em segredo. O uso dessas respostas será realizado diante de análise e enquadramento estatístico e/ou com conversão dos seus dados identificatórios em códigos (que impeçam sua identificação). A partir de então, os resultados obtidos poderão ser apresentados e publicados, desde que respeitada a garantia de sigilo que lhe foi dada.

A *coleta de sangue* será realizada para obtenção do seu perfil bioquímico e hematológico (baseados nas Diretrizes para Atenção Integral à Saúde do Trabalhador de Complexidade Diferenciada, do Ministério da Saúde, agosto de 2006). Será realizada a coleta endovenosa de 20 mL de sangue.

Nenhuma pesquisa com seres humanos é livre de riscos. Contudo, os procedimentos envolvidos no presente estudo oferecem riscos mínimos aos participantes, sendo eles: possibilidade de aparecimento de hematoma pós-coleta e formação de edema. Mas, caso ocorra qualquer intercorrência devido à coleta de sangue, os pacientes serão encaminhados ao Serviço de Atendimento Médico da Universidade Federal de Goiás.

Solicita-se para obtenção de resultados clinicamente fidedignos que o participante se apresente: em jejum alimentar (de 10 a 13 horas, não excedendo 14 horas de jejum) e que informe o uso de medicamentos ou a presença de alguma doença.

As entrevistas e análises laboratoriais ficarão sob guarda da pesquisadora responsável por 5 (cinco) anos, e não será permitido acesso de terceiros (além da equipe de pesquisa) a ele.

Ressalta-se que todos os dados que permitam sua identificação pessoal serão mantidos em sigilo profissional e científico. Sendo-lhe garantido que todos os resultados aqui obtidos serão utilizados somente para estudo científico e não irão



prejudicar em algum tratamento que o participante já esteja submetido (a), nem tão pouco na sua condição profissional.

Sua participação no estudo não sujeita a equipe de pesquisa a te fornecer tratamento a qualquer enfermidade que possa vir a ser identificada.

Com relação à indenização, diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa, você poderá buscar a justiça e o que for decidido judicialmente será acatado pelo pesquisador.

Mesmo após a assinatura deste termo, você tem total liberdade de desistir ou de interromper sua colaboração nesse estudo, no momento em que desejar (até dada a publicação), sem precisar se justificar. Em que a desistência do participante não trará prejuízo algum ao seu trabalho nem a seu bem-estar.

Os resultados, caso deseje ter acesso a eles, estarão liberados 30 dias após a realização da coleta. Para tal, você informa:

- Desejo saber os resultados
- Não desejo saber os resultados

Os resultados dos exames, obtidos nesse trabalho, poderão compor sua ficha médica de exames periódicos no pelo Ambulatório do Centro de Atenção Psicossocial (CAPS Ad/Casa), onde poderão ser avaliados pelo médico do SESMT, caso assim você consinta:

- Desejo que os resultados dos meus exames sejam encaminhados ao médico do CAPS Ad/Casa;
- Não desejo que os resultados dos meus exames sejam encaminhados ao CAPS Ad/Casa;

Sua colaboração será de extrema importância para o êxito desta pesquisa, pela qual, agradecemos de antemão.

Declaro verdadeiras as informações acima citadas,

---

Caroline Oliveira de Araújo Melo Pesquisadora Responsável

**TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO**

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

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

Tenho ciência do exposto acima

Goiânia, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ .

\_\_\_\_\_  
Assinatura do paciente

## APÊNDICE B - QUESTIONÁRIO DE ESTILO DE VIDA

### 1 - Dados de identificação

Nº do prontuário:

Nome do Paciente:

.....  
 .....

Diagnóstico principal ( ) caso ( ) controle

### 2 – Informações gerais

Data da entrevista:.....

Coleta de sangue: ( ) sim ( ) não

Sexo: ( ) Feminino ( ) Masculino

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

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

Endereço:

Bairro:

Cidade

CEP:

Telefone:

Data de nascimento: .....

Qual a sua idade? .....

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

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

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

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

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

Selecione a opção mais elevada quanto ao grau de instrução:

( ) alfabetizado ( ) fundamental incompleto ( ) fundamental completo

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

### 3 – História de Tabagismo

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

( ) sim, ainda fuma - Quantos cigarros por dia:

( ) nunca fumou

( ) somente no passado – Quantos cigarros fumava por dia:

Idade de início:

Idade em que parou:

### 4 – História de Etilismo

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

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

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

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

Idade de início:

Quantidade e tipo de bebida:

Idade em que parou:

Idade em que tomou o primeiro porre:

Quando começou a notar dependência alcoólica:

Tempo de consumo pesado de álcool:

Situações decorrentes por causa do consumo de álcool:

( ) foi atropelado

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

- queimou alguma coisa ao cozinhar
- perdeu o dia de trabalho
- machucou alguém
- entrou em uma discussão por estar embriagado
- perdeu documentos/dinheiro
- acordou sem saber onde estava ou como havia chegado lá
- fica deprimido

#### História familiar

Alguém na família possui problemas com álcool?

5- Possui alguma doença? ( ) não ( ) sim Qual (is)? .....

6- Possui algum defeito de nascimento/desordem genética hereditária? ( ) não ( ) sim  
Qual (is)? .....

7- Apresenta histórico familiar de:

- |                                 |                                   |  |
|---------------------------------|-----------------------------------|--|
| <input type="radio"/> Diabetes  | <input type="radio"/> Hipertensão | <input type="radio"/> Câncer                   |
| <input type="radio"/> Alergias  | <input type="radio"/> Aborto      | <input type="radio"/> Alterações<br>congenitas |
| <input type="radio"/> Outro(s): |                                   |  |

8- Você é casado? ( ) sim ( ) não

Se sim, você e/ou sua esposa possui(em) dificuldade para engravidar? ( ) não ( ) sim  
Qual? .....

Teve algum filho com nascimento prematuro?

9- Pratica exercícios físicos? ( ) Nunca ( ) Sim – Frequência por semana .....

10- Faz uso de medicamentos? ( ) não ( ) sim Qual (is)? .....

11- Possui dependência química? ( ) não ( ) sim A quê? .....

12- Histórico de dependência química na família? ( ) não ( ) sim Grau de parentesco?

13- Com qual frequência tem apresentado os seguintes sintomas:

Sintomas	Frequência				Sintomas	Frequência			
	Nunca	Às vezes	Sempre	Imediatamente após consumo		Nunca	Às vezes	Sempre	Imediatamente após contato
Assintomático	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Alteração de memória	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Alteração do sono	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Alteração na vida sexual	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Alucinação	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Bradycardia	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Chiadeira torácica	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Cansaço fácil nas pernas	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Confusão	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Diarreias	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Dor de cabeça	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Falta de apetite	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Formigamento de braços/mãos	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Formigamento de pernas/pés	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Fotofobia	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Irritação da pele	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Fraqueza muscular	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Irritação de mucosa	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Hipertensão	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Náusea	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Incontinência	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Salivação	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Incontinência urinária	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Sangramentos	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Irritabilidade	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Suor excessivo	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Lacrimajament	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Taquicardia	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Tontura	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Tosse	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Visão turva	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Vômito	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Tremor	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Falta de ar	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Outros:									

14- Percebe alguma relação entre o aparecimento dos sintomas e o consumo de álcool?

( ) não ( ) sim