



Universidade Federal de Goiás
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular
Laboratório de Radiobiologia e Mutagênese
Laboratório de Pesquisas Replicon

CAROLINE OLIVEIRA DE ARAÚJO MELO

**AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS GENES DE REPARO E
DETOXIFICAÇÃO E A ASSOCIAÇÃO COM O DANO NO DNA EM ETILISTAS**

Goiânia-GO

2017

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS
DE TESES E
DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor: Caroline Oliveira de Araújo Melo

Título do trabalho: Avaliação de polimorfismos nos genes de reparo e detoxificação e a associação com o dano no DNA em etilistas

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.



Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:



Assinatura do(a) orientador(a)²

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente
- Submissão de artigo em revista científica
- Publicação como capítulo de livro
- Publicação da dissertação/tese em livro

²A assinatura deve ser escaneada.

CAROLINE OLIVEIRA DE ARAÚJO MELO

**AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS GENES DE REPARO E
DETOXIFICAÇÃO E A ASSOCIAÇÃO COM O DANO NO DNA EM ETILISTAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal de Goiás como Requisito parcial para obtenção do Título de Doutora, sob orientação da professora Dra. Daniela de Melo e Silva

Goiânia- GO

2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Melo, Caroline Oliveira de Araújo

Avaliação de polimorfismos nos genes de reparo e detoxificação e a associação com o dano no DNA em etilistas [manuscrito] / Caroline Oliveira de Araújo Melo. - 2017.

81 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Daniela de Melo e Silva.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Goiânia, 2017.

Bibliografia. Anexos. Apêndice.

Inclui siglas, símbolos, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. etilismo. 2. genotoxicidade. 3. SNPs. 4. frequência genotípica. I. Silva, Daniela de Melo e , orient. II. Título.

CDU 575



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

1 **ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE TESE DE Nº 006**

2 Aos seis dias do mês de Julho do ano de dois mil e dezessete, às 13hs00min,
3 no Anfiteatro do ICB I /UFG, reuniram-se os componentes da banca
4 examinadora: Profa. Dra. Daniela de Melo e Silva, orientadora; Profa. Dra.
5 Flávia Melo Rodrigues; Profa. Dra. Emília Oliveira Alves Costa; Profa. Dra.
6 Juliana Boaventura Avelar e Profa. Dra. Michele Rocha Parise para, em sessão
7 pública presidida pela primeira examinadora citada, procederem à avaliação
8 da defesa de tese intitulada: **"AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS**
9 **GENES DE REPARO E DETOXIFICAÇÃO E A ASSOCIAÇÃO COM O DANO**
10 **NO DNA EM ETILISTAS"**, em nível de doutorado, área de concentração em
11 **Genética e Biologia Molecular**, de autoria de **Caroline Oliveira de Araújo**
12 **Melo**, discente do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia
13 Molecular da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela
14 presidente da banca, Profa. Dra. Daniela de Melo e Silva, que fez a
15 apresentação formal dos membros da banca. A palavra, a seguir, foi concedida
16 à autora da tese que, em cerca de 50 minutos, procedeu à
17 apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da
18 banca arguiu a examinada, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial.
19 Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da tese. Tendo-se em
20 vista o que consta na Resolução nº 1294 de 06 de Junho de 2014 do Conselho
21 de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o
22 Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, a tese foi
23 aprovada, considerando-se integralmente cumprido este
24 requisito para fins de obtenção do título de Doutor (a) em Genética e Biologia
25 Molecular pela Universidade Federal de Goiás. A conclusão do curso dar-se-á
26 quando da entrega da versão definitiva da tese na secretaria do
27 programa, com as devidas correções sugeridas pela banca examinadora, no



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR
28 prazo de trinta dias a contar da data da defesa. Cumpridas as formalidades de
29 pauta, às 17 horas e 00 minutos, encerrou-se a sessão de defesa
30 e, para constar, eu, Glezilene Braz Pereira dos Santos, Assistente em
31 Administração da Universidade Federal de Goiás, lavrei a presente ata que,
32 após lida e aprovada, será assinada pelos membros da banca examinadora em
33 três vias de igual teor.

Daniela de Melo e Silva

Profa. Dra. Daniela de Melo e Silva

Presidente da Banca

ICB/UFG

Flávia Melo Rodrigues

Profa. Dra. Flávia Melo Rodrigues

UEG/GO

Emília Oliveira Alves Costa

Profa. Dra. Emília Oliveira Alves Costa

PUC/GO

Juliana Boaventura Avelar

Profa. Dra. Juliana Boaventura Avelar

UFG/GO.

Michele Rocha Parise

Profa. Dra. Michele Rocha Parise

UFG/GO

AGRADECIMENTOS

Ao longo de quatro anos de trabalho que resultaram nesta tese, algumas instituições e pessoas, que têm um valor imensurável para mim, me ajudaram e apoiaram. Agora, que alcanço o meu objetivo, não poderia deixar de reconhecê-las.

À minha família que sempre acreditou em mim, mesmo quando eu mesma não acreditava. Muito obrigada por sentirem tanto orgulho e por sempre fazerem questão de demonstrarem todo o amor de vocês por mim. Theo, estou ansiosa pela sua chegada!

À minha querida professora Dra. Daniela de Melo e Silva. Você foi a pessoa que me acolheu há mais de 10 anos e estamos juntas desde então. Obrigada por todo ensinamento, por sempre ser tão atenciosa e gentil comigo, e, principalmente, pela paciência, confiança e generosidade que teve nesses últimos anos. Ter sido sua aluna desde a graduação foi um imenso privilégio. Amo muito você e a sua família.

Gostaria de agradecer a três pessoas essenciais na minha vida, amigas maravilhosas que estiveram comigo nos momentos mais difíceis, que não medem esforços para me ajudar e que são o meu amparo emocional. Dalila Cesarino, Júlia Malta e Letícia Nunes, vocês são as melhores. Obrigada por serem tão boas e por me darem todo apoio de que preciso!

Agradeço também às queridas pessoas que fazem parte do Núcleo de Pesquisas Replicon que, por muitos anos da minha vida, foi a minha segunda casa. Deixo registrado o meu agradecimento especial ao Professor Aparecido Divino da Cruz, PhD; ao professor Dr. Cláudio Carlos da Silva, à professora Dra. Thaís Cidália Vieira, ao professor Dr. Marc Giconzac, à minha amiga de longa data e aluna de doutorado Andréia Pires Amancio e às alunas de graduação do curso de biologia da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Cimara Sales, Jakeline Soares, Sabrina Sara, e Sara Romana.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Goiás (FAPEG), pela bolsa e fomento concedidos durante o doutorado, pelo Edital 05/2012 (Álcool e Drogas Ilícitas) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal.

E a todas as pessoas que colaboraram para a realização deste trabalho, por todo apoio e incentivo.

RESUMO

O consumo abusivo do álcool está relacionado a aproximadamente 3,3 milhões de mortes anuais em todo o mundo, sendo considerado o primeiro fator de risco para a carga global de doenças em países das Américas. O abuso da ingestão de álcool em longo prazo induz inúmeras alterações moleculares e bioquímicas nos tecidos relacionadas ao álcool. Acredita-se que os efeitos tóxicos do álcool sejam mediados por danos ao DNA por vários mecanismos, como pela indução dos danos oxidativos, pelos adutos de DNA, pelos crosslinks e pelas quebras de fitas de DNA. Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho foi de verificar a frequência de polimorfismos nos genes de reparo e detoxificação e a associação com o dano no DNA em etilistas. A análise dos resultados obtidos mostrou um maior dano genotóxico nos etilistas, ao realizar o Ensaio Cometa. Foi encontrado um ponto de variação no gene *GSTP1* e um ponto de variação no gene *XRCC1*. No entanto, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os genótipos *GSTM1* e *GSTT1* e os danos genéticos. Nesse contexto, pode-se concluir que o Ensaio Cometa é um método bastante eficaz e barato para a análise de danos genotóxicos.

Palavras-chave: etilismo, genotoxicidade, SNPs, frequência genotípica

ABSTRACT

Alcohol abuse is related to approximately 3.3 million annual deaths worldwide and is considered the first risk factor for the global burden of disease in countries of the Americas. Long-term abuse of alcohol induces numerous molecular and biochemical changes in alcohol-related tissues. It is believed that the toxic effects of alcohol are mediated by DNA damage by several mechanisms, such as by the induction of oxidative damage, DNA adducts, crosslinks and DNA strand breaks. In this sense, the aim of this study was to verify the frequency of polymorphisms in the repair and detoxification genes and the association with the DNA damage in alcoholics. The analysis of the obtained results showed a greater genotoxic damage in the alcoholics, when carrying out the Comet Assay. A point of variation was found in the GSTP1 gene and another point of variation in the XRCC1 gene. However, no statistically significant differences were observed between GSTM1 and GSTT1 genotypes and genetic damage. In this context, it can be concluded that the Comet Assay is a very effective and inexpensive method for the analysis of genotoxic damage.

Keywords: alcoholism, genotoxicity, SNPs, genotypic frequency

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Consumo <i>per capita</i> de álcool no mundo.....	13
Figura 2. Vias do metabolismo oxidativo do álcool.....	18
Figura 3. Conjugação da glutathione.....	20
Figura 4. Sistema de reparo do DNA.....	23
Figura 5. Diagrama esquemático mostrando as regiões do gene <i>XRCC1</i> e suas estruturas.....	24
Figura 6. Esquema do reparo de DNA por Excisão de Base (BER).....	25
Figura 7. Técnica do Ensaio Cometa.....	26
Figura 8. Curva de amplificação da PCR em tempo real.....	29
Figura 9. Representação esquemática de um ciclo de PCR em tempo real utilizando SYBR Green	30
Figura 10. Distribuição populacional de SNPs.....	33
Figura 11. Prospecção de SNPs em regiões genômicas específicas com o sequenciamento direto de produtos de PCR	34
Figura 12A. Fluxograma indicando a seleção dos indivíduos para os grupos caso e controle, na análise dos dados obtidos no Ensaio Cometa e na PCR em Tempo Real.....	38
Figura 12B. Fluxograma indicando a seleção dos indivíduos para os grupos caso e controle, na análise dos dados obtidos no Sequenciamento	39
Figura 13. Classificação dos Cometas de acordo com o dano ao DNA encontrado.....	40
Figura 14. Cromatograma obtido após o Sequenciamento.....	44
Figura 15. Fluxograma dos aspectos éticos e instituições participantes.....	45
Figura 16. Análise Discriminante.....	46
Figura 17A. Amostras de indivíduos analisados para o gene <i>XRCC1</i>	49
Figura 17B. Amostras de indivíduos analisados para o gene <i>GSTP1</i>	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características gerais dos <i>primers</i> utilizados para a análise dos polimorfismos de <i>GSTM1</i> e <i>GST1</i> nos grupos caso e controle	41
Tabela 2. Protocolo de termociclagem para a genotipagem dos <i>primers</i> RH92600, <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i>	41
Tabela 3. Características gerais dos <i>primers</i> utilizados para a PCR convencional realizada anteriormente à etapa de sequenciamento	42
Tabela 4. Resultado do teste Mann-Whitney comparando o dano genotóxico entre os grupos caso e controle obtidos pelo Ensaio Cometa.....	46
Tabela 5. Estimativas da correlação de Spearman dos parâmetros do ensaio cometa entre os hábitos tabagista e etilista para o grupo caso.....	47
Tabela 6. Resultado do teste qui-quadrado comparando a frequência do <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> entre os grupos caso e controle.....	47
Tabela 7. Distribuição dos hábitos de vida e saúde dos grupos caso e controle.....	48
Tabela 8. Resultados dos genótipos encontrados nos genes <i>GSTP1</i> e <i>XRCC1</i> nos grupos caso e controle.....	50
Tabela 9. Comparação da frequência do genótipo do SNP rs1695 com o T1 e M1 no grupo caso.....	51
Tabela 10. Estimativas da correlação dos parâmetros do ensaio cometa (média \pm desvio padrão) e os genótipos individuais entre os etilistas no grupo caso.....	52
Tabela 11. Estimativas da correlação dos parâmetros do ensaio cometa (média \pm desvio padrão) e os genótipos individuais entre os etilistas e não-etilistas no grupo controle.....	52

LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS

- %** - Do latim, *per centum*, unidade de medida dada em porcentagem
- ≥** - Maior ou Igual
- μL** - Unidade de medida microlitro
- γ** - Subunidade Peptídica da Isoenzima ADH3
- α** - Subunidade Peptídica da Isoenzima ADH1
- β** - Subunidade Peptídica da Isoenzima ADH2
- CO₂** - Dióxido de Carbono
- DMSO** - Reagente Dimetilsulfóxido
- DNA** - Do inglês, *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucleico)
- EDTA** - Ácido Etileno diamino tetracético
- g** - Unidade de Medida gramas
- h** - Forma abreviada de hora
- H₂O** - Água
- H₂O₂** - Peróxido de hidrogênio
- KCl** - Cloreto de Potássio
- KH₂PO₄** - Fosfato monopotássico
- L** - Litros
- LaGene** - Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular
- M** - Unidade de Medida Molar
- mA** - Unidade de Medida Miliampère
- Min** - Forma abreviada de Minutos
- MgCl₂** - Cloreto de Magnésio
- mL** - Mililitros
- mM** - Unidade de Medida Mili Molar
- MMR** - Abreviação de Reparo Mismatch
- Na₂HPO₄** - Fosfato Dissódico
- NaCl** - Cloreto de Sódio
- NAD** - Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina
- NADP** - Fosfato de Dinucleotídeo de Adenina e Nicotinamida
- NADPH** - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato em sua forma reduzida
- NaOH** - Hidróxido de Sódio
- °C** - Unidade de Temperatura em Graus Celsius

Overnight – Expressão que traduzida para o português significa: durante a noite

PBS – Do inglês, *Phosphate Buffered Saline* (Tampão Fosfato Salino)

pH - Potencial Hidrogeniônico

SCG – Do inglês, *Single Cell Gel Assay* (Eletroforese de Célula Única)

TL – Tamanho da Cauda

TRIS – Forma abreviada de Tris (Hidroximetil) Aminometano

TRITON X-100 – Detergente não iônico utilizado para romper a membrana das células (lise celular)

V - Unidade de Medida Volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
2REVISÃO DE LITERATURA	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.3
2.1 Dados Epidemiológicos	13
2.2 Metabolização do álcool.....	15
2.2.1 Alcool Desidrogenase.....	16
2.2.2 Citocromo P450.....	17
2.2.3 Catalase.....	17
2.2.4 Produtos do metabolismo oxidativo do álcool	17
2.2.4.1 Acetaldeído.....	17
2.2.4.2 Acetato.....	17
2.3 Metabolismo de Xenobióticos	18
2.3.1 Família Glutationa S-transferase	19
2.4 Genes de Reparo.....	22
2.4.1 Reparo por Excisão de Base	23
2.4.1.1 X-Ray complementing Protein (XRCC1).....	24
2.5 Ensaio Cometa.....	26
2.6 PCR em tempo real.....	28
2.7 Sequenciamento.....	30
2.7.1 Polimorfismos de nucleotídeos únicos	31
2.8 Centro de Atenção Psicossocial.....	34
3 OBJETIVOS	36
3.1. Objetivo Geral	36
3.2. Objetivos Específicos	36
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 Grupo Amostral	37
4.2 Critérios de Inclusão e Exclusão	37
4.3 Coleta das Amostras	37
4.4 Seleção das Amostras	37
4.5 Ensaio Cometa.....	39
4.6 Extração e quantificação das amostras	40
4.7 Análise Molecular	40
4.7.1 PCR em tempo real	40

4.7.2 Sequenciamento	41
4.7.2.1 PCR.....	41
4.7.2.2 Reação de Sequenciamento	42
4.7.2.3 Precipitação da reação de sequenciamento.....	42
4.7.2.4 Processo de Sequenciamento.....	43
4.7.2.5 Edição das Sequências.....	43
4.7.2.6 Obtenção da sequência consenso e avaliação da qualidade	44
4.7.2.7 Comparação da sequência com o GenBank	44
4.7.2.8 Detecção de SNPs.....	45
4.8 Aspectos Éticos e Instituições Participantes.....	45
4.9. Análise Estatística.....	45
5 RESULTADOS	46
5.1 Ensaio Cometa	46
5.2 Frequência Genotípica de <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i>	47
5.3 Sequenciamento	48
6 DISCUSSÃO	53
7 CONCLUSÕES.....	56
8 REFERÊNCIAS	57
ANEXOS	72
APÊNDICES	83

1 INTRODUÇÃO

O etilismo constitui uma síndrome multifatorial, com comprometimento de ordem física e mental, além dos impactos sociais que ele acarreta. Ele se destaca hoje como um dos mais graves problemas de saúde pública, devido às complicações sobrevividas no plano somático e psíquico e de profunda repercussão no meio social. O abuso da ingestão de álcool em longo prazo induz inúmeras alterações moleculares e bioquímicas nos tecidos relacionadas com a ingestão e metabolismo do álcool (Gigliotti *et al.*, 2008).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define como consumo moderado de álcool a ingestão de até 15 doses por semana para os homens e 10 doses por semana para as mulheres sendo que 1 dose contém de 8 a 13 gramas de etanol (uma dose equivale a aproximadamente 285 mL de cerveja, 120 mL de vinho e aproximadamente 30 mL de destilado). A ingestão de doses diárias acima deste padrão é considerada prejudicial e representa algum risco para a saúde dos indivíduos e considera etilista como sendo um bebedor excessivo, cuja dependência em relação ao álcool, é acompanhada de perturbações mentais, de déficits ao nível da saúde física, bem como no relacionamento interpessoal e na vertente econômica (OMS, 2011; Ferreira & Moutinho, 2013).

O consumo de álcool tem sido apontado como responsável por grande número de acidentes de trânsito, violência doméstica, aumento da morbimortalidade por doenças cardiovasculares, cirrose hepática e distúrbios psiquiátricos. Seu consumo abusivo está também relacionado a aproximadamente 3,3 milhões de mortes anuais em todo o mundo, sendo considerado o primeiro fator de risco para a carga global de doenças em países das Américas (Abreu *et al.*, 2012).

O álcool é considerado o 5º principal fator de risco para mortes prematuras. No continente americano, o consumo de álcool é aproximadamente 40% maior que a média mundial, o que pode justificar o fato de que o continente americano é a única região do mundo onde o álcool está como primeiro causador de mortes prematuras e incapacidades (Vargas & Bittencourt, 2013).

A alta prevalência de indivíduos alcoólicos, as alterações comportamentais relacionadas e os prejuízos sociais, econômicos e de saúde pública estimulam a realização de inúmeros estudos que buscam o entendimento dos efeitos do álcool sobre o organismo. Estudos epidemiológicos realizados no Brasil obtiveram prevalência de 11,7% de alcoólicos e descrevem que 76,3% das internações em unidade psiquiátrica foram causadas pela síndrome de abstinência alcoólica (Levone *et al.*, 2013).

Além da quantidade ingerida, o padrão de consumo, com o passar do tempo, potencializa os riscos de prejuízos. O padrão de uso que corresponde a 60g ou mais de álcool puro em uma única ocasião por pelo menos uma vez no mês, está relacionado a vários problemas como acidentes e violência. Este padrão foi observado, em 16% dos indivíduos que bebem no mundo, e em 22% dos indivíduos que consomem álcool no Brasil, no ano de 2010 [CISA, 2014].

Polimorfismos na molécula de DNA podem resultar na redução da capacidade de reparo ao DNA, aumentando a taxa de mutação e influenciando na suscetibilidade aos efeitos adversos à saúde, como o câncer (Gao *et al.* 2013; Norjmaa *et al.* 2015).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Dados Epidemiológicos

O etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ou $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$), também chamado álcool etílico é uma substância orgânica obtida da fermentação de açúcares, hidratação do etileno ou redução de acetaldeído, encontrado em bebidas como cerveja, vinho e aguardente (Brasil, 2009). O álcool é uma substância psicoativa com propriedades capazes de levar à dependência e que tem sido amplamente utilizado em muitas culturas ao longo dos séculos. 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 (OMS, 2015), sendo apontado como o fator principal pelo grande número de acidentes de trânsito, violência doméstica, aumento da morbimortalidade por doenças cardiovasculares, cirrose hepática e distúrbios psiquiátricos. O consumo em excesso está também associado há cerca de 3,3 milhões de mortes anuais no mundo todo, sendo o principal fator de risco para a carga global de doenças em países das Américas (Abreu *et al.*, 2013, Garcia & Freitas, 2015).

Mundialmente é estimado que, pessoas com idade de 15 anos ou mais, tenham consumido, em 2010, 6,2 litros de álcool puro (o que equivale a 13,5g por dia). Tem-se a estimativa, que no Brasil, tal consumo total, seja de 8,7L por pessoa, valor acima da média mundial e estima-se que homens consumam 13,6L por ano, e as mulheres, 4,2L por ano. Analisando apenas pessoas que consomem álcool, esta média sobe para 15,1L de álcool por pessoa, sendo mulheres: 8,9L e homens: 19,6L (CISA, 2014) [Figura 1].

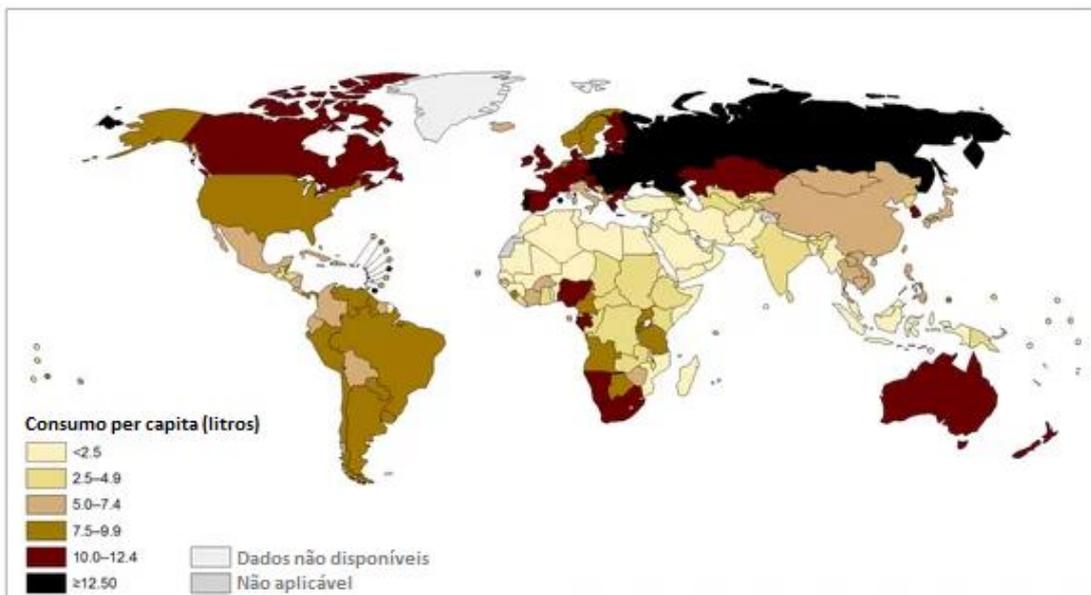


Figura 1. Consumo *per capita* de álcool no mundo.

Fonte: Adaptado de OMS, 2014.

No Brasil, o primeiro levantamento nacional relacionado aos padrões de consumo de álcool, realizado entre 2005 e 2006, apontou que 52% dos brasileiros com 18 anos ou mais ingeriam bebidas alcoólicas pelo menos uma vez ao ano. Entre os homens, essa taxa correspondia a 65% e, entre as mulheres, a 41% (Mascarenhas *et al.*, 2011). Mais de 50% da população brasileira consome álcool, 25% dela já experimentou algum tipo de problema vinculado ao seu consumo, 3% fizeram uso abusivo e 9% preenchem critérios para dependência do álcool (Abreu *et al.*, 2013).

O II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas (Lenad) divulgado no ano de 2013 estima que 11,7 milhões de pessoas sejam dependentes de álcool no Brasil. Este levantamento mostrou que, os 20% dos adultos que mais bebem, ingerem 56% de todo o álcool consumido por adultos. Na última década, houve um aumento substancial no número dos indivíduos que consomem álcool com frequência, ou seja, aqueles que bebem ao menos uma vez por semana, de 45% para 54%. As mulheres apresentam a maior taxa de aumento – de 29% em 2006 para 39% em 2012 (Laranjeira *et al.*, 2013). Na segmentação entre as regiões do Brasil, o consumo de álcool regular revelou-se maior na região Sudeste onde saltou de 46% no ano de 2006 para 60% em 2012. Os percentuais de pessoas que bebem frequentemente foram de 48% na região Nordeste que manteve-se estável em 2006 e 2012, 36% na região Norte, que antes era de 33%, 55% no Sul que antes marcava 43% e 56% no Centro-Oeste, que era de 40% no ano de 2006 (Lenad, 2013). Além disso, cerca de 25% dos adultos relataram, pelo menos, um problema social, ocupacional, familiar, legal ou físico relacionado ao álcool (Schmidt *et al.*, 2011).

O uso do álcool, e mais especificamente, o consumo abusivo do mesmo, pode resultar em uma gama de problemas sociais e na saúde. Os problemas de saúde relacionados ao álcool incluem vários tipos de cânceres (Deshpande *et al.*, 2014), diabetes, doenças infecciosas e neuropsiquiátricas (incluindo as desordens pelo uso do álcool), doença cardiovascular, doenças no fígado e no pâncreas. Nesse sentido, o consumo do álcool é um dos riscos primários para a carga global de doenças. Além disso, a dependência do álcool, como uma condição crônica, tipicamente requer um tratamento a longo prazo e cuidado e considerável custo para o sistema de saúde (Donati & Nakano, 2016).

O abuso da ingestão de álcool em longo prazo induz inúmeras alterações moleculares e bioquímicas nos tecidos relacionadas ao álcool (Gigliotti *et al.*, 2008). Acredita-se que os efeitos tóxicos do álcool são mediados por danos ao DNA por vários mecanismos (Maffei *et al.*, 2000). No entanto, como não existe evidência para confirmar que o efeito do álcool sozinho é um carcinógeno direto, isso sugere que o mecanismo pelo qual o álcool provoca danos ao DNA é indireto. Existem vários mecanismos propostos em que o álcool (etanol) pode causar

dano indireto ao DNA, como pela indução dos danos oxidativos, pelos adutos de DNA, pelos crosslinks e pelas quebras de fitas de DNA (Blasiak *et al.*, 2000).

Com os recentes avanços na área da biologia molecular, novos métodos vêm sendo incorporados ao estudo da etiologia do etilismo. A força dos achados de estudos epidemiológicos, que comprovam a existência da participação genética nos transtornos de dependência alcoólica permite que pesquisadores invistam nos estudos moleculares para identificar a etiologia do uso crônico e da dependência ao álcool (Messas & Vallada Filho, 2004).

2.2 Metabolização do Álcool

O álcool é metabolizado principalmente por duas vias – a via oxidativa, que acontece no fígado, e por vias não-oxidativas, que ocorrem principalmente em tecidos extra-hepáticos (Zakhari, 2013).

De acordo com o mesmo autor, os efeitos do álcool (etanol) em vários tecidos dependem das concentração no sangue ao longo do tempo. Essa concentração é determinada por quão rapidamente o álcool é absorvido, distribuído, metabolizado e excretado. Após o álcool ser engolido, ele é absorvido primariamente pelo intestino delgado nas veias que coletam o sangue do estômago e intestinos e da veia porta, o que leva ao fígado. De lá, ele é carregado até o fígado, onde ele é exposto a enzimas e metabolizado (Zakhari, 2013).

A concentração do álcool no sangue é influenciada por fatores ambientais (tais como a taxa de álcool na bebida, a presença de alimento no estômago e o tipo de bebida alcoólica) e por fatores genéticos (variações nas principais enzimas envolvidas no metabolismo do álcool, a álcool desidrogenase [ADH] e o aldeído desidrogenase [ALDH2] (Zakhari, 2006).

A taxa de eliminação do álcool varia amplamente entre os indivíduos e é influenciada por fatores como o consumo crônico do álcool, dieta, idade, hábito de fumar e horário do dia (Bennion & Li 1976; Kopun & Propping 1977).

O metabolismo do álcool também resulta em uma geração de acetaldeído, um subproduto altamente reativo e tóxico que pode contribuir para os danos nos tecidos, para a formação de moléculas prejudiciais conhecidas como espécies reativas de oxigênio (EROs), e para uma mudança no estado de redução-oxidação (ou redox) das células hepáticas. O consumo crônico do álcool e o seu metabolismo estão fortemente associados a várias consequências patológicas e danos nos tecidos. Como mostrado na figura 2, o ADH, o citocromo P450 (CYP450) e a catalase contribuem para o metabolismo oxidativo do álcool (Zakhari, 2006).

2.2.1 Álcool Desidrogenase

A principal via de metabolismo do etanol no fígado envolve a ADH (presente no citosol), uma enzima com muitas variantes (ou seja, isoenzimas). O metabolismo do etanol com ADH produz acetaldeído, um subproduto altamente tóxico e reativo que pode contribuir para os danos nos tecidos e, possivelmente, aos processos aditivos. A ADH constitui uma família de enzimas complexas, e, em humanos, há várias formas de ADH que são codificadas por oito genes e divididas em seis classes (Martins, 2013).

De acordo com o mesmo autor, as isoenzimas de classe I (ADH1, ADH2 e ADH3), constituídas por associações de subunidades polipeptídicas α , β e γ , respectivamente, têm alta afinidade pelo etanol. As enzimas ADH2 (codificam três subunidades γ diferentes) e ADH3 (codificam duas subunidades β diferentes) apresentaram-se polimórficas. Esse polimorfismo genético da ADH pode influenciar no hábito de ingerir bebidas alcoólicas e no desenvolvimento da doença hepática. A enzima codificada pelo alelo ADH2*2 ($\beta_2 \beta_2$) é mais ativa na oxidação do etanol, gerando mais aldeído acético. A ADH de classe II (ADH4) que expressa a subunidade π tem atividade menor em baixas concentrações de etanol. A ADH de classe III (ADH5), isoenzima que apresenta a subunidade X , tem baixa afinidade para o etanol e oxida álcoois de cadeia longa, funcionando como uma formaldeído desidrogenase. A classe IV (ADH6) está presente na mucosa do trato gastrointestinal e na córnea, representando uma barreira metabólica contra a entrada de álcoois e aldeídos externos. As ADH de classe V (ADH7) e VI (ADH8) foram descritas recentemente e ainda não se conhece sua importância no processo da metabolização do etanol.

Em altas concentrações, o álcool é eliminado em altas taxas devido à presença de sistemas de enzimas com altos níveis de atividade, como a ADH de classe II, β_3 -ADH (codificada pelos genes ADH4 e ADH1B, respectivamente) e o CYP2E1. Esse processo de oxidação envolve um portador de elétrons, o dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NAD⁺), que é reduzido em NADH por dois elétrons. Como resultado, a oxidação do álcool gera um ambiente citosólico altamente reduzido nos hepatócitos. Isso quer dizer que essas reações deixam as células do fígado em um estado que é particularmente vulnerável a danos pelos subprodutos originados do metabolismo do etanol, como os radicais livres e o acetaldeído (Bosron *et al.* 1993).

2.2.2 CitocromoP450

As isoenzimas do citocromo P450, incluindo a CYP2E1, 1A2 e 3A4, que estão presentes predominantemente nos microsossomos, ou vesículas, de uma rede de membranas dentro da célula, conhecido como retículo endoplasmático, também contribuem para a oxidação do álcool no fígado. O CYP2E1 é induzido pelo consumo crônico do álcool e exerce um papel importante na metabolização do etanol a acetaldeído em elevadas concentrações de etanol (de 8 a 10 mM, comparado com 0,2 a 2,0 mM para o ADH hepático). Além disso, o CYP2E1 dependente da oxidação do etanol pode ocorrer em outros tecidos, como o cérebro, onde a atividade de ADH é baixa. Também produz EROs, incluindo hidroxietil, ânion superóxido e radicais hidroxil, que aumenta o risco de danos no tecido (Setshedi *et al.* 2010).

2.2.3 Catalase

A catalase, uma enzima localizada nos peroxissomos, é capaz de oxidar o etanol *in vitro* na presença de um sistema gerador de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), como o complexo enzimático NADPH oxidase ou da enzima xantina oxidase. Quantitativamente, no entanto, isso é considerado uma via menor de oxidação alcoólica, exceto no estado de jejum (Handler & Thurman 1990).

2.2.4 Produtos do metabolismo oxidativo do álcool

2.2.4.1 Acetaldeído

O acetaldeído produzido pela oxidação do álcool, é rapidamente metabolizado em acetato, principalmente pela ALDH₂ (nas mitocôndrias), para formar acetato e NADH. O NADH é então oxidado por uma série de reações químicas na mitocôndria (ou seja, a cadeia transportadora de elétrons mitocondrial ou a cadeia respiratória). O acetaldeído tem a capacidade de se ligar a proteínas como as enzimas, as proteínas microsossomais e os microtúbulos. Isso também forma adutos com o cérebro sinalizando dopamina para formar salsolinol, o que pode contribuir para a dependência do álcool; e com o DNA para formar adutos carcinogênicos (Setshedi *et al.* 2010).

2.2.4.2 Acetato

O acetato, produzido pela oxidação do acetaldeído, é oxidado em dióxido de carbono (CO₂). A maioria do acetato resultante do metabolismo do álcool escapa do fígado para o sangue e é eventualmente metabolizado em CO₂ no coração, musculo esquelético e células do cérebro. O acetato não é um produto inerte, ele aumenta o fluxo sanguíneo no fígado e deprime o sistema

nervoso central, como também afeta os processos metabólicos. O acetato é metabolizado em acetil coA, que está envolvida na biossíntese do lipídeo e do colesterol na mitocôndria dos tecidos periféricos e cerebrais. Supõe-se que após a ingestão crônica de álcool, o cérebro começa a usar o acetato em vez da glicose como fonte de energia (Israel *et al.* 1994).

O consumo crônico do álcool aumenta o risco do desenvolvimento do câncer de esôfago e cavidade oral (Seitz *et al.* 2004). Vários mecanismos foram identificados por contribuir com o desenvolvimento de tumor associado com o etanol, alguns dos quais estão relacionados com o metabolismo do álcool. Por exemplo, o acetaldeído gerado durante o metabolismo do álcool promove o desenvolvimento do câncer, assim como a indução de *CYP2E1* levando à formação da ERO (Pöschl & Seitz 2004).

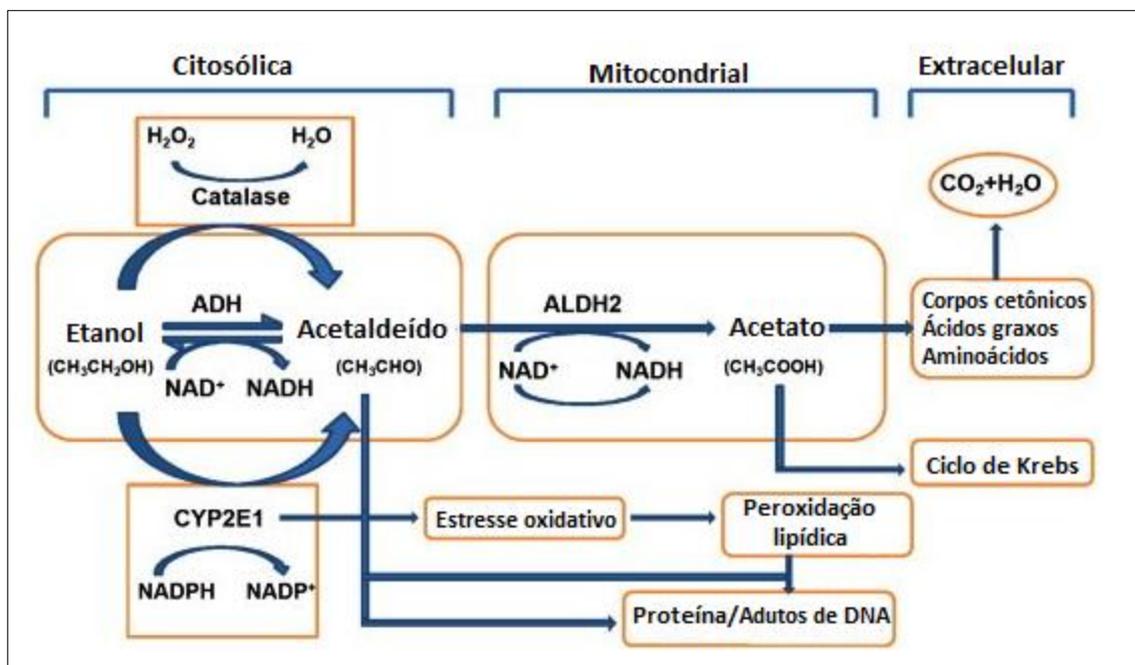


Figura 2. Vias do metabolismo oxidativo do álcool

Fonte: Adaptado de Santos, 2013.

2.3 Metabolismo de Xenobióticos

Os seres vivos estão continuamente expostos a substâncias químicas exógenas (xenobióticos) que podem interagir de maneira deletéria ao organismo. As substâncias químicas são metabolizadas em múltiplas vias gerando produtos que podem ser mais ou menos tóxicos que a substância original. No entanto, após o metabolismo, podem-se gerar produtos capazes de interagir com moléculas-alvo, como o DNA e o RNA, resultando em efeitos tóxicos (Huber & Almeida, 2008).

Para evitar o acúmulo de xenobióticos prejudiciais às células, os organismos desenvolveram diferentes vias de eliminação de compostos químicos estranhos. Embora um

grande número de enzimas seja necessário para reconhecer e metabolizar todos os possíveis compostos, a biotransformação de xenobióticos foi dividida em duas fases: primeiro, os compostos são metabolizados por enzimas de fase I, que compreendem hidrólise, redução e oxidação. Muitas enzimas presentes nessa fase fazem parte da família citocromo P450 (CYP) (Hatagima, 2002), podendo produzir intermediários eletrofílicos reativos e tóxicos. Estes produtos podem ser diretamente eliminados ou então participam das reação de fase II. Na fase II, as enzimas introduzem compostos hidrofílicos, semelhantes à glutationa ou um grupo acetil, dentro da molécula, para permitir que ela seja eliminada. Os principais componentes enzimáticos dessa fase são as glutationas S-transferases (GSTs). A formação de conjugados com a glutationa é a principal reação observada para muitos xenobióticos durante a fase II. Certamente, os níveis celulares de glutationa reduzida (GSH) são muito altos (aproximadamente 10mM), mostrando que o mecanismo de detoxificação por meio da glutationa pode representar uma adaptação biológica fundamental para a sobrevivência e perpetuação de muitas espécies (Landi, 2000).

2.3.1 Família Glutaciona S-transferase

As GSTs constituem um importante sistema enzimático do mecanismo celular de detoxificação que protege as células contra metabólitos oxigênio-reativos devido à conjugação da glutaciona com componentes eletrofílicos. As enzimas GSTs estão envolvidas no metabolismo de xenobióticos que incluem carcinógenos ambientais, EROs e agentes quimioterapêuticos (Gattas *et al.*, 2004).

As GSTs de mamíferos podem ser divididas em três grupos: as GST citosólica, GST mitocondrial e GST microssomal. Tanto a GST citosólica quanto a mitocondrial são enzimas solúveis, já a GST microssomal está associada à membrana. (Huber & Almeida, 2008).

Os genes da família de GST são agrupados em oito classes baseadas na estrutura, na especificidade do substrato e nas propriedades imunológicas: α (alfa), κ (kappa), μ (mu), ω (ômega), π (pi), σ (sigma), θ (theta) e ζ (zeta) [Whalen, & Boyer, 1998; Hayes *et al.*, 2005]. São importantes por desempenharem funções na proteção contra o stresse oxidativo, e na detoxificação de potenciais toxinas endógenas, como carcinogênicos e fármacos. Estas propriedades devem-se ao fato de estas enzimas catalisarem a conjugação da glutaciona (GSH) com vários substratos endógenos e exógenos (Figura 3), originando compostos inativados e hidrossolúveis que podem ser excretados pela urina ou pela bÍlis (Strange *et al.*, 2001).

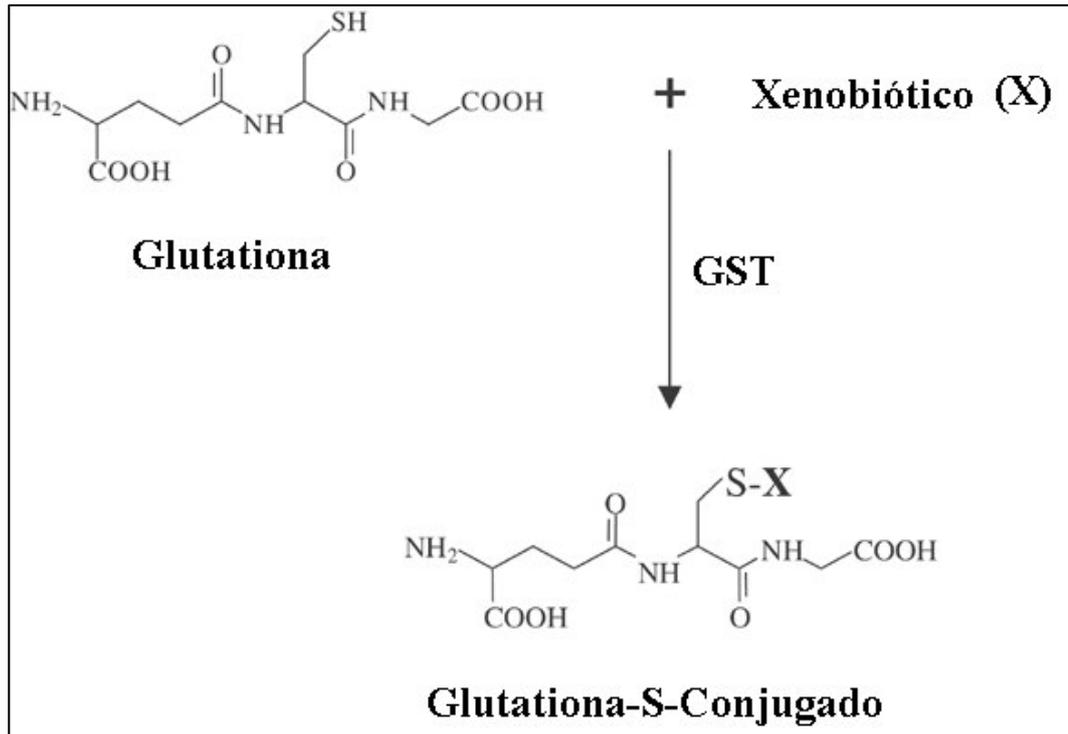


Figura 3. Conjugação da glutationa a um xenobiótico por ação da GST, resultando na formação da glutationa-S-conjugado

Fonte: Strange et al. 2001.

Dentre as classes, duas das isoenzimas mais relevantes são a GSTM1(μ) e GSTT1(θ), codificadas pelos genes *GSTM1* (localizado no braço curto do cromossomo 1, na posição 13.3) e *GSTT1* (localizado no braço longo do cromossomo 22 na posição 11.2), respectivamente. O gene *GSTT1* tem 5 éxons e o gene que codifica o GSTM1 é constituído por 7 éxons e ambos são polimórficos na população humana (Curioni *et al.*, 2013).

A enzima GSTM1 apresenta níveis médios de expressão nas glândulas salivares, por outro lado, a enzima GSTT1 apresenta padrão de expressão constitutivo, sendo expressa em baixos níveis na mucosa bucal normal e em níveis elevados no fígado. Entretanto, alguns agentes xenobióticos podem elevar os níveis de transcrição do gene (Sitimaziras *et al.* 2017).

Indivíduos com pelo menos um alelo funcional para *GSTM1* e *GSTT1* estão agrupados nos tipos de conjugação positiva e são chamados *GSTM1*-positivos e *GSTT1*-positivos respectivamente. Por outro lado, os indivíduos que possuem deleção dos genes e, conseqüentemente, completa perda de atividade da enzima, são denominados de portadores do genótipo "*GSTM1*-nulo" (*GSTM1** 0) e "*GSTT1*-nulo" (*GSTT1** 0). A variabilidade na distribuição de genótipos nulos para *GSTM1* e *GSTT1*, devido à deleção gênica total ou parcial, tem sido descrita em diferentes populações, especialmente em grupos étnicos bem definidos (Ganas *et al.*, 2004).

A variação étnica e geográfica relacionada à prevalência da deleção do *GSTM1* é evidente. As frequências variam de 13,0% em populações caucasianas a 52,0% em populações asiáticas. Amorin *et al.* (2002) relataram frequências do genótipo *GSTM1* nulo de 40,2% e 38,2%, respectivamente, em populações brasileiras de mesma localização geográfica. Ao passo que as frequências do genótipo *GSTT1* nulo em diferentes populações de origem caucasiana variam de 13,0 a 26,0%. Populações asiáticas apresentam frequências de 35,0 a 52,0% (Garte *et al.*, 2001). Estudos em populações brasileiras observaram valores de prevalência do genótipo *GSTT1* nulo em torno dos 25,0% (Amorin *et al.*, 2002; Pinto *et al.*, 2003).

O gene polimórfico da classe pi, *GSTP1*, está localizado no cromossomo 11 (11q13), tem 2.8 k.b e contém 7 éxons. A enzima codificada contém 209 aminoácido e codifica uma enzima expressa nos tecidos da placenta, do baço, e do pulmão, coração e tecido mamário. As formas mutantes do gene *GSTP1* codificam enzimas que têm sua atividade reduzida na detoxificação de xenobióticos (Oliveira, 2006).

Uma falta da atividade de GSTs, como é observado em indivíduos com o genótipo nulo, pode causar o acúmulo de componentes metabólicos provenientes da primeira fase. Estes componentes podem formar adutos e provocar mutações em genes críticos como oncogenes e/ou supressores tumorais aumentando a probabilidade do desenvolvimento de uma neoplasia. Segundo Autrup (2000), indivíduos classificados como *GSTM1*-nulo devem apresentar um alto nível de adutos comparados com indivíduos que expressam o gene. Como a maioria das enzimas de fase I e II apresentam sítios polimórficos, que podem afetar sua atividade, a força e o equilíbrio dessas atividades podem diferir de acordo com o genótipo individual desses genes metabólicos (Au, 2007).

As variações individuais na ativação metabólica e detoxificação dos carcinógenos químicos e genotoxinas, como o etanol, são umas das principais determinantes das diferenças interindividuais na suscetibilidade aos cânceres induzidos ambientalmente. De fato, a variação interindividual no metabolismo dos xenobióticos pode estar relacionada com as diferenças no risco para os diferentes tipos de cânceres, e existem evidências sugerindo sua associação com o aumento do risco do câncer (Reszka *et al.*, 2008). A deleção homocigótica do gene está associada com deficiências na atividade da enzima *GSTM1* e *GSTT1* e, assim, aumentos potenciais nos níveis de metabólitos resultantes da administração crônica do etanol (Burim *et al.*, 2004). Vários estudos têm sugerido que os genótipos nulos de *GSTM1* e *GSTT1* são fatores de risco para cânceres de bexiga, mama, oral, pulmão, cabeça e pescoço (Schnakenberg *et al.*, 2000; Mitrunen *et al.*, 2001; Buch *et al.*, 2002; Matthias *et al.*, 2002; Hung *et al.*, 2003; Sobbi *et al.*, 2004).

2.4 Genes de Reparo

A molécula de DNA pode ser danificada por vários fatores, classificados como endógenos e exógenos. O dano endógeno ao DNA é primariamente causado pelas EROs. Os agentes ambientais como a luz ultravioleta, a radiação ionizante e os químicos provocam danos exógenos ao DNA. No entanto, os sistemas de defesa antioxidante e as múltiplas vias de reparo ao DNA envolvem a proteção celular de estresse oxidativo e de agentes que provocam danos a molécula. Esses danos devem ser imediatamente reconhecidos e corrigidos a fim de evitar erros sequenciais e cumulativos (Soares *et al.*, 2014).

O processo de reparo do DNA requer a atuação de várias enzimas, que agem em conjunto para reconhecer a base alterada e removendo-a do filamento de DNA. Esse reconhecimento e remoção devem atuar de maneira apropriada para manter a funcionalidade celular normal, caso contrário, pode resultar em apoptose celular ou levar à instabilidade genômica, crescimento celular desregulado e a um aumento no risco do desenvolvimento do câncer (Soares *et al.*, 2014). Há uma variação na resposta individual ao dano ao DNA. Indivíduos que não apresentam a resposta de reparo apropriada podem ser mais suscetíveis a doenças, como o câncer, por exemplo (Flores-Obando *et al.*, 2010).

Os genes de reparo podem ser divididos em: genes associados com a sinalização e a regulação do reparo ao DNA e genes associados com mecanismos distintos de reparo. Esses últimos podem ser divididos, por sua vez, em: Reparo Mismatch (MMR), como o *Msh2* e o *Msh6*; Reparo por Excisão de Base (BER), como *Oapex1* e o *XRCC1*; Reparo por Excisão de Nucleotídeo (NER), como o *XPA*, *XPB*, *XPB* e *XPF*; Reparo pela quebra de dupla fita de DNA (DSB), como o *BRCA*, *XRCC-3* e *RAD51* e Reparo por reversão direta ao dano, como o *MGMT*. Alterações nesses genes podem levar a presença dos polimorfismos genéticos (Figura 4). Atualmente, tem se estudado um grande número de polimorfismos genéticos humanos que podem estar relacionados à diferenças na expressão proteica, acarretando doenças variadas (Cristmann *et al.*, 2003).

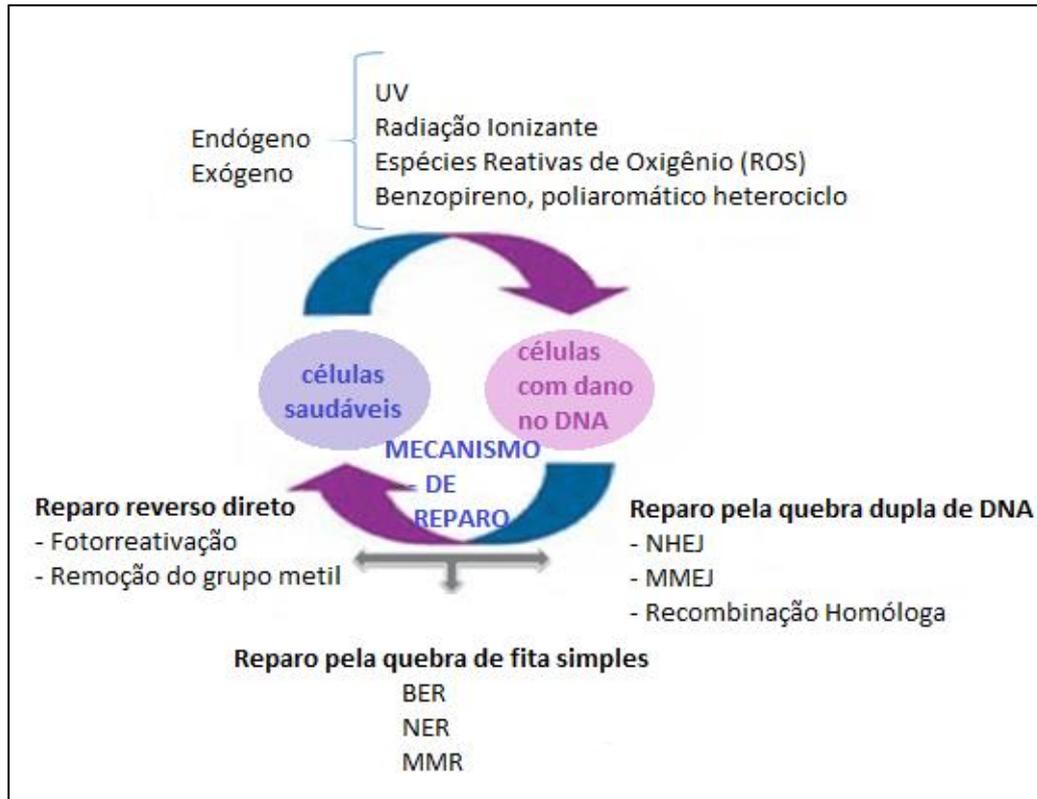


Figura 4. O sistema de reparo do DNA inclui o reparo por reverso direto, o reparo por queda de fita simples e o reparo pela quebra dupla de DNA.

Fonte: Adaptado de Saltoh *et al.* 2016.

2.4.1 Reparo por Excisão de Base (BER)

Esse é o mecanismo de reparo mais comum e atua em pequenos danos ao DNA como alquilação, hidrólise, oxidação e erro no pareamento de base e todos aqueles que são capazes de alterar as bases nitrogenadas e a estrutura da dupla hélice. Tanto as bases oxidadas como as quebras de fitas simples do DNA (SSBs), que são geralmente conhecidas como EROs, são as principais ameaças para a estabilidade genética e para a sobrevivência celular; ambos os tipos de danos aceleram as taxas de mutação e aumentam os níveis de aberrações cromossômicas. As EROs são produzidas de fontes endógenas e exógenas, incluindo a radiação ionizante (Schneider *et al.* 2008).

A via do BER age em pequenas lesões ao DNA ou bases modificadas, removendo e substituindo a base danificada. O reparo do tipo BER inicia com a ação da DNA-glicosilase em uma lesão específica e continua seguindo uma de duas vias: a curta, em que apenas um nucleotídeo é substituído (short-patch BER) e a longa, em que de dois a treze nucleotídeos são substituídos (long-patch BER). A maioria dos reparos acontece pelo caminho mais curto. Mutações em alguns genes resultam em uma completa perda de função das proteínas de reparo,

ao passo que diferenças mais sutis ocorrem por meio de herança de polimorfismos genéticos (Schneider *et al.* 2008).

2.4.1.1 X-Ray Repair Cross-complementing Protein (XRCC1)

Os genes como o *XRCC1* são de extrema importância para a via BER e polimorfismos nesses genes são capazes de modular a função e alterar a capacidade de reparo. A XRCC1 é uma proteína multidomínio e serve como âncora para o mecanismo de reparo do tipo BER, interagindo e estimulando a maioria das enzimas envolvidas nesse processo (Ginsberg *et al.*, 2011) O gene *XRCC1* está localizado no cromossomo 19q13.2-13.3, com um comprimento de 32kb, incluindo 17 éxons, sua proteína apresenta 633 aminoácidos, com um peso de 70kDa (Figura 5) [Nissar *et al.*, 2015].

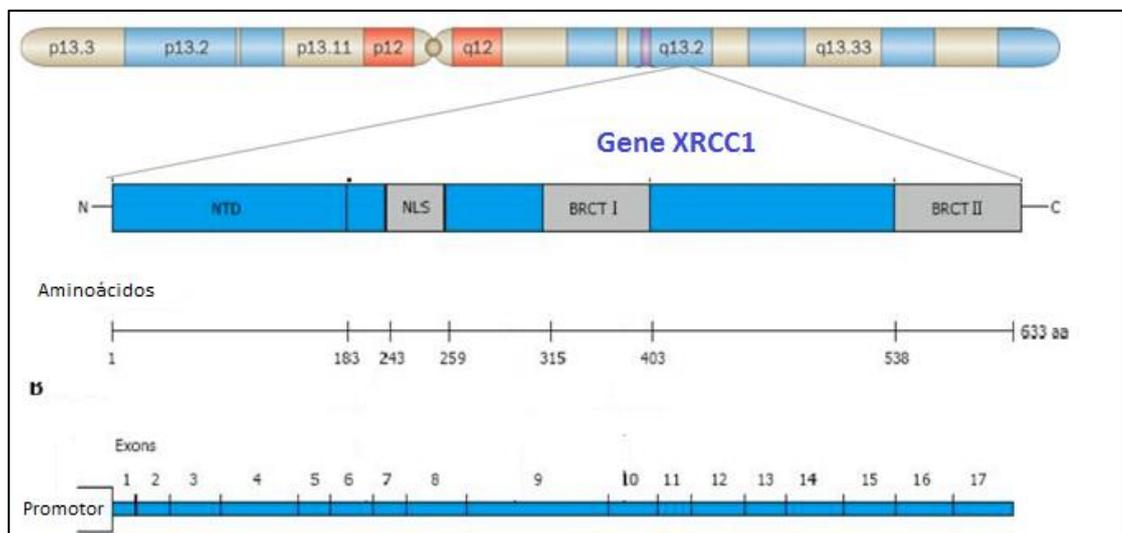


Figura 5. Diagrama esquemático mostrando as regiões do gene XRCC1 e suas estruturas

Fonte: Adaptado de Sterponde *et al.* 2010.

De acordo com Cristmann *et al.*, (2003), durante o mecanismo de correção, a base danificada é removida pela DNA glicosilase, que recruta a Pol β para o local para inserir de um a vários nucleotídeos, podendo seguir duas vias: a curta (dano direto) e a longa (dano indireto). Após isso, a XRCC1 é recrutada para o local depois da incisão inicial e tem como função estabilizar a estrutura intermediária do DNA, como os sítios sem bases, para que as enzimas de reparo possam atuar, adicionando os novos nucleotídeos. Nos casos em que o dano foi provocado por agentes endógenos diretos, como alquilação ou oxidação, a BER segue a via longa, já que a Pol β não é capaz de remover a porção terminal 5-dRP porque ela está reduzida ou oxidada, necessitando assim, de outras proteínas como a PCNA (proliferating cell nuclear antigen) e a FEN-1 (flap endonuclease-1) [Figura 6].

A variante genética mais comum no *XRCCI* (C>T) no éxon 6 resulta na substituição de uma Arginina para Triptofano (rs25487) no códon 194, enquanto que outro polimorfismo (G>A) no éxon 9 muda o aminoácido de Arginina para Histidina (rs25489) no códon 280 no ainda outro polimorfismo (G>A) no éxon 10 muda o aminoácido de Arginina para Glicina no códon 399. Esses polimorfismos podem diminuir a cinética de reparo do DNA, influenciar a suscetibilidade aos efeitos adversos à saúde, como o câncer (Norjmaa *et al.* 2015; Gao *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2012; Kabzinski *et al.*, 2010;) de bexiga, câncer de tireoide, de mama, gástrico, de pele não-melanoma, câncer oral e coloretal (Nissar *et al.* 2015).

2.5 Ensaio Cometa

O Ensaio Cometa, também denominado eletroforese em microgel, foi introduzido por Östling e Johanson em 1984 como uma técnica eletroforética para a direta visualização do dano no DNA em células individuais (Araújo, 2008). Consiste, basicamente, em uma eletroforese com o DNA proveniente de células lisadas sobre uma lâmina de vidro em meio alcalino. A frequência de quebras no DNA determina a formação da “cauda do cometa”, durante a migração induzida por uma eletroforese, que pode ser analisada por microscopia utilizando coloração adequada. Essas quebras incluem sítios apurínicos/apirimidínicos, os quais são frágeis em meio alcalino. Para avaliar a integridade do DNA em particular, o Ensaio Cometa é bastante utilizado como biomarcador, por ser um método simples, rápido e sensível para dosar quebras no DNA utilizando um pequeno número de células (Figura 7) (Carvalho, 2011).

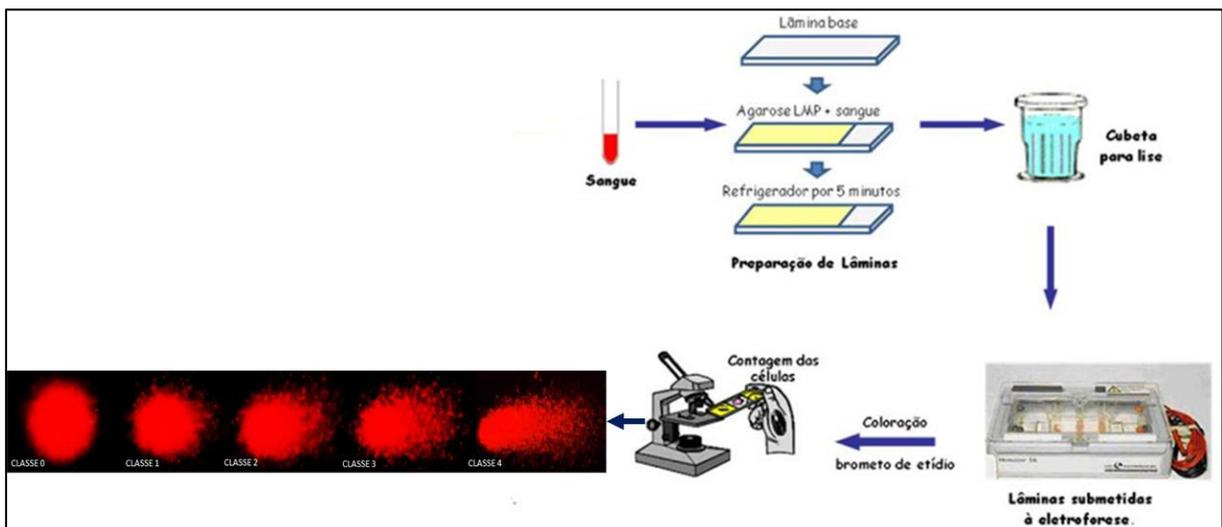


Figura 7. Técnica do Ensaio Cometa.

Fonte: Adaptado de Rocha (2009) e Centro (2007).

Quebras nas fitas do DNA ocasionam danos na estrutura da cromatina, causando um relaxamento. Desta forma, o filamento do DNA danificado (-), se mostra menos compacto e migra do núcleo em direção ao ânodo (+) quando submetido à eletroforese, apresentando-se semelhante a um cometa, dando origem ao nome da técnica (Magalhães, 2012).

Os nucleoides (DNA ligado à matriz nuclear após a lise e remoção das histonas) das células que apresentam seu conteúdo mais concentrado e circular (“cabeça” do cometa) não sofreram danos no DNA; já os nucleoides que apresentam filamentos que migram durante a eletroforese formando a “cauda” do cometa sofreram danos no DNA. O tamanho da cauda do cometa é diretamente proporcional ao dano (Magalhães, 2012).

Em 1988, Singh *et al.* descreveram a versão alcalina do teste do cometa, que possibilita a detecção das quebras ocorridas tanto nas fitas simples e duplas como nos sítios álcali-lábeis (Magalhães, 2012). Em geral, sob condições alcalinas, são medidas as quebras simples e duplas e os sítios álcali-lábeis, enquanto sob condições neutras somente são observadas as quebras duplas da fita do DNA (Araújo, 2008). Outras variações foram inseridas no ensaio, como a adição de enzimas específicas, permitindo que danos como incorporações erradas de uracila, sítios de reparo, ligações cruzadas fossem detectados (Meireles, 2013).

As células selecionadas para o ensaio do cometa são depositadas numa lâmina com agarose, a membrana é rompida por detergentes e as proteínas nucleares são extraídas por elevada concentração de sais. O DNA das células, devido a sua estrutura, permanece na lâmina como um nucleoide. Em seguida, o material genético é exposto a uma corrente elétrica e conforme o dano, a migração ocorrerá em menor ou maior distância e intensidade. Ao final do ensaio, as lâminas são coradas e as células analisadas em microscopia de fluorescência (Meireles, 2013). Os parâmetros utilizados para análise dos resultados variam entre os laboratórios, sendo os mais recomendados o momento da cauda (*Olive Tail Moment*) e sua porcentagem de DNA, porém, a utilização da classificação visual qualitativa e o escore resultante continuam aceitos para análise dos resultados e validação das técnicas (Brianezi, 2011).

Entre os parâmetros citados acima, o momento da cauda não possui uma fórmula padronizada, a mais utilizada é a descrita por Olive, que é denominada Olive tail moment, portanto a comparação desse parâmetro entre estudos pode não ser adequada. É calculado a partir da distância de migração e a porcentagem de DNA na cauda, e não apresenta linearidade de dose-resposta (Brianezi, 2011).

A classificação dos cometas por inspeção visual analisa cinco classes: 0 (zero) representa células sem danos (cometas sem cauda ou com caudas pouco detectáveis), e de 1 a

4 representam um aumento relativo na intensidade das caudas. O somatório dos valores de 0 a 4 dos 100 núcleos analisados resulta no valor individual, que pode variar, dessa forma, de 0 a 400 unidades arbitrárias (Maluf *et al.*, 2011).

A classificação visual é o método padrão e mais reproduzível, sendo empregada sob a forma de escore geral da amostra. É influenciada pela experiência do avaliador e possui certa variabilidade entre os analisadores, sendo recomendado que o mesmo avaliador seja responsável pela análise de todos os cometas do mesmo experimento (Brianezi, 2011).

Os cometas resultantes da corrida eletroforética do DNA necessitam passar por um processo de coloração, que pode ser feito alternativamente por técnicas de fluorescência, em que são usados brometo de etídio, iodeto de propídio e syber green, ou por histotécnica convencional com sal de prata. Esses métodos apresentam diferentes vantagens e limitações. As maiores limitações da fluorescência são a necessidade de microscópio próprio para análise de material fluorescente e a dificuldade de armazenamento das lâminas para observação posterior. Já sob coloração com sal de prata, a análise pode ser feita com microscópio óptico convencional e as lâminas podem ser armazenadas para análise posterior. Outra desvantagem da coloração fluorescente é a toxicidade de alguns reagentes, como o brometo de etídio, que é mutagênico e, sob exposição crônica, pode ser cancerígeno. Quando comparadas, as duas colorações não diferem com relação aos resultados das imagens obtidas, sendo, portanto, equivalentes (Brianezi *et al.*, 2009).

Esse ensaio é considerado uma ferramenta importante na avaliação de compostos genotóxicos, pois é sensível, rápido, econômico e requer pouca quantidade de células para sua realização. Adicionalmente, pode ser realizado tanto *in vivo* como *in vitro*, sendo que não são necessárias células em divisão para a realização do ensaio como ocorre em outros testes para detecção de danos ao DNA, possibilitando o uso de diversos tipos celulares (Meireles, 2013).

2.6 PCR em tempo real

No ano de 1993, Higuchi e colaboradores descreveram um ensaio quantitativo simples, para qualquer sequência de DNA amplificável. Nesse ensaio, era utilizada uma câmara de vídeo para monitorar múltiplas reações de PCR simultaneamente ao longo da termociclagem. A câmara de vídeo detectava o acúmulo de DNA de cadeia dupla (dsDNA) em cada PCR utilizando o aumento na fluorescência de brometo de etídio (EtBr) que resultava da sua ligação ao DNA de cadeia dupla (Higuchi *et al.* 1993).

A PCR em tempo real tem se mostrado uma importante ferramenta para a análise quantitativa de ácidos nucleicos. Isso tornou possível a realização de diversos experimentos que

não seriam possíveis de serem realizados por métodos tradicionais. A PCR em tempo real é capaz de quantificar a amplificação do material genético na medida em que a reação acontece, sendo possível avaliar os resultados da amplificação sem que seja necessário manejo pós-PCR (Bustin, 2005). A maioria das plataformas de PCR em tempo real abrangem um termociclador, com sistema óptico para a excitação e recolha da emissão da fluorescência e um computador com software próprio para a aquisição de dados e análise final da reação (Chang, 2010).

A tecnologia de PCR em tempo real baseia-se na detecção de um sinal fluorescente produzido proporcionalmente durante a amplificação de um DNA alvo. Ao invés de ter que olhar para a quantidade de DNA alvo acumulado após um número fixo de ciclos, o ensaio em tempo real determina o ponto no tempo durante o ciclo em que a amplificação do produto de PCR é detectado pela primeira vez. Isto é determinado pela identificação do número de ciclos em que a intensidade de emissão de corante repórter sobe acima do ruído de fundo. Esse número de ciclo é referido como o Ciclo de limiar (C_T). O C_T é determinado pela fase exponencial da reação de PCR e é inversamente proporcional ao número de cópia do alvo. Portanto, quanto maior for o número de cópias inicial de ácido nucleico alvo, mais cedo um aumento significativo na fluorescência será observado e menor será o C_T (Figura 8) [Bustin, 2005].

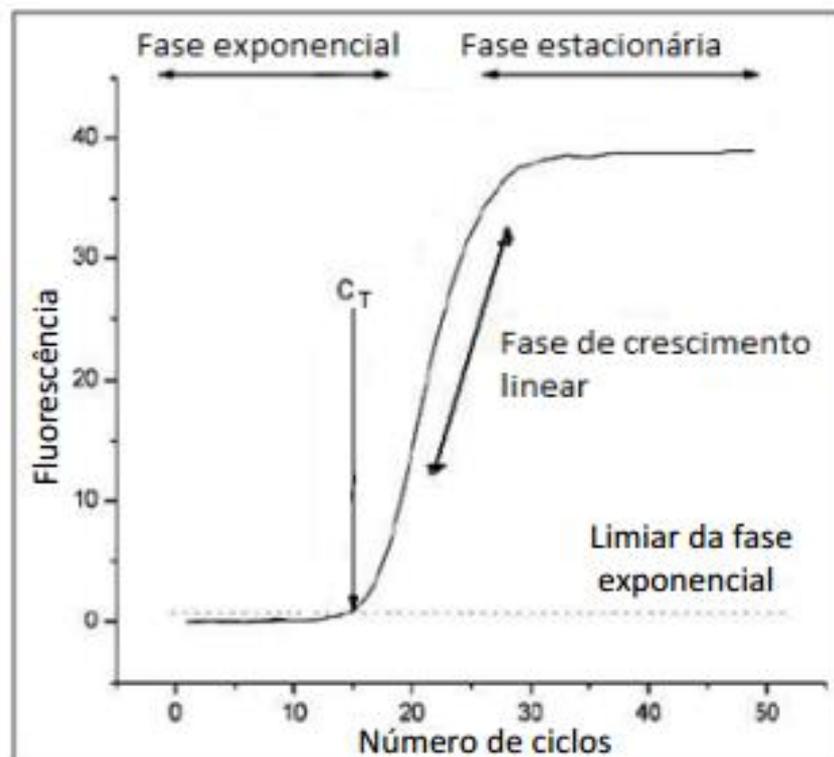


Figura 8. Curva de amplificação da PCR em tempo real.

Fonte: Adaptado de Kubista et al, 2006

A detecção em tempo real é feita monitorando-se cada amostra, ciclo a ciclo, até que uma determinada quantidade de produto seja acumulada, permitindo a detecção pelo equipamento. As análises quantitativas são feitas usando corantes fluorescentes durante a PCR, sem especificidade para uma sequência particular de DNA, que se intercalam na cadeia dupla de qualquer produto da PCR, permitindo a sua detecção (Mackay *et al.*, 2007). Assim, na medida em que a reação progride, a amplificação produz quantidades crescentes de DNA que se ligam ao corante, resultando em aumento da fluorescência. (Applied Biosystems, 2008). Dessa forma, o design correto dos *primers* confere alta especificidade da detecção e quantificação a estes métodos (Mackay *et al.*, 2007).

O SYBR® Green é um corante fluorescente que se liga à cavidade menor da dupla hélice e emite fluorescência verde quando excitado por luz. No início do processo, a fluorescência ainda é pequena, já que as moléculas SYBR® Green livres ainda não estão ligadas ao DNA de cadeia dupla e, dessa forma, o sinal produzido é mínimo. Durante o processo, após a detecção dos *primers*, quantidades crescentes dos fluorocromos ligam-se à cadeia dupla de DNA pré-sintetizada pela enzima Taq DNA polimerase. No fim da fase de extensão de cada ciclo, a fluorescência é monitorizada e quantificada e, então, o DNA amplificado é determinado (Correia, 2007; Mackay *et al.*, 2007) (Figura 9).

Alguns estudos demonstraram que a SYBR® Green liga-se preferencialmente a produtos da PCR cuja temperatura de melting seja superior, indicando a sua potencial preferência por regiões ricas em guanina e citosina. Assim, a especificidade dos resultados deve ser validada por meio de uma análise dessa temperatura (Correia, 2007; Mackay *et al.*, 2007).

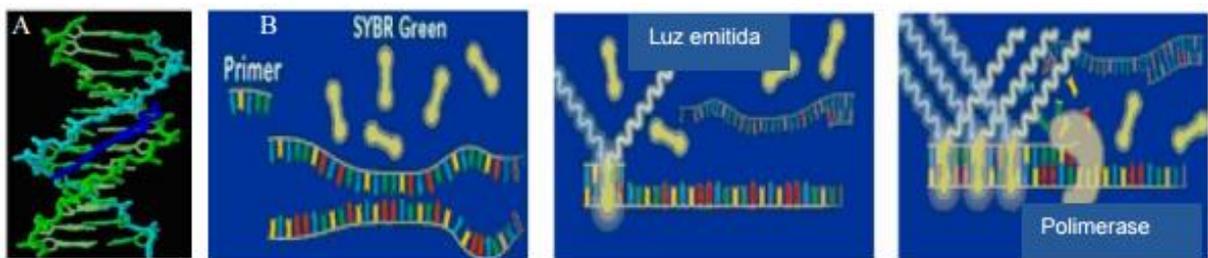


Figura 9. Representação esquemática de um ciclo de PCR em tempo real utilizando o SYBR Green.

Fonte: Sousa, 2012.

2.7 Sequenciamento

Em 1977, o cientista inglês Fred Sanger descreveu uma metodologia para determinação das sequências de DNA, posteriormente denominado método Sanger ou didesoxi (Sanger *et al.* 1977). O método Sanger foi virtualmente o único método de sequenciamento de ácidos nucleicos utilizado nas três décadas seguintes (Hutchison, 2007), servindo de base para a era

genômica na Biologia. Este período caracterizou-se por avanços técnicos, especialmente pela automatização de equipamentos de sequenciamento e análise de segmentos de DNA, que permitiram o sequenciamento de um grande número de genomas completos de diversos organismos (Ferreira, 2013).

Nos primeiros projetos de sequenciamento genômico com essa tecnologia, os fragmentos sequenciados eram caracterizados por um número pequeno de seqüências com tamanho de até 1000 bases, cujo processamento era realizado em períodos de semanas e meses em extenuante trabalho em laboratórios. No início dos anos 2000, porém, a automatização das tecnologias de sequenciamento foi aperfeiçoada até que equipamentos totalmente automatizados passaram a gerar seqüências de um modo paralelizado durante 24 horas por dia.

Grandes centros de sequenciamento de genomas ao redor do mundo abrigaram dezenas dessas máquinas de sequenciamento. Isto, por sua vez, levou à necessidade de criação de novos algoritmos montadores de genoma, utilizando seqüências variando de 35 a 1000 bases de comprimento, e com taxas de erro de sequenciamento variando de 0,5 e 15%, que ainda podem conter artefatos complexos como repetições (Ferreira, 2013).

Com a tecnologia Sanger, projetos de sequenciamento de bactérias com 20.000 a 200.000 segmentos de leitura podiam ser montados em um computador. Os maiores, como o genoma humano, com cerca de 3 bilhões de bases, já necessitavam de grandes estruturas de computação para processamento dos dados, envolvendo vários laboratórios e centros de pesquisa (Ferreira, 2013).

2.7.1 Polimorfismos de nucleotídeos únicos

Os polimorfismos genéticos são definidos como variações na seqüência do DNA caracterizadas por substituições de nucleotídeos, deleções, inserções e duplicações que ocorrem numa frequência de pelo menos 1,0% da população estudada (Bartsch *et al.*, 2000).

Uma troca de nucleotídeo localizada numa região codificadora de um gene pode provocar substituição de aminoácido com conseqüente alteração funcional da proteína codificada. Deleções em regiões codificadoras podem gerar produtos inativos ou ausência do produto proteico. Variações em regiões promotoras podem alterar as taxas de transcrição. Polimorfismos localizados em regiões intrônicas podem gerar produtos alterados ou inativos devido ao processamento “*splicing*” incorreto do RNA mensageiro. Amplificações gênicas resultam em aumento quantitativo do produto proteico (Bartsch *et al.*, 2000). Se um polimorfismo em um gene de reparo que desempenha um papel na remoção do dano oxidativo

ao DNA, por exemplo, a atividade de reparo reduzida resultante irá aumentar a possibilidade de doença (Ochiai, 2015).

De acordo com o Genetics Home Reference (2017), os polimorfismos de nucleotídeos únicos, frequentemente chamados de S, são os tipos de variações genéticas mais comuns entre as pessoas. Para ser classificado como um SNP, a mudança deve estar presente em, pelo menos um por cento da população geral (nenhuma mutação causadora de doença é tão comum). A maioria das mutações que causam doenças ocorrem dentro de regiões que codificam genes ou de regiões reguladoras. Os SNPs não estão necessariamente localizados dentro de genes, e eles nem sempre afetam o funcionamento da proteína (Figura 10). Os SNPs estão divididos em duas categorias principais:

- SNPs ligados (também conhecidos como SNPs indicativos), não residem dentro de genes e não afetam o funcionamento da proteína. No entanto, eles correspondem a uma determinada resposta a um fármaco ou ao risco de adquirir determinada doença;

- SNPs causais, afetam o funcionamento das proteínas. Estão correlacionados com a doença ou influenciam a resposta de uma pessoa ao medicamento. Os SNPs causais vem em duas formas:

- SNPs codificantes, localizados dentro de uma região codificante de um gene, muda a sequência de aminoácido do produto proteico do gene.

- SNPs não-codificantes, localizados dentro de sequências reguladoras do gene, alteram o momento, o local ou o nível de expressão do gene.

Cada SNP representa uma diferença em um nucleotídeo de DNA. Os SNPs baseiam-se na detecção de polimorfismos resultantes da alteração de uma única base e constituem a base genética da maioria das variações alélicas. Por exemplo, um SNP pode substituir o nucleotídeo citosina (C) com a timina (T) em um certo trecho de DNA (Genetics Home Reference, 2017, Ching *et al.*, 2002).

Os SNPs ocorrem normalmente ao longo de todo o DNA de uma pessoa. Eles ocorrem a cada 300 nucleotídeos, em média, o que significa que existem 10 milhões de SNPs no genoma humano. Devido à sua abundância no genoma, sua lenta taxa de mutação e, pela possibilidade de detecção automatizada, os SNPs vêm sendo cada vez mais utilizados como marcadores de grande aplicação em genética (McCouch *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2011). Normalmente, os marcadores SNP são bialélicos, ou seja, geralmente são encontrados apenas dois variantes em uma espécie (Ex: um alelo corresponde a um par de bases A/T e o outro a um G/C) [Caetano, 2009].

A maioria dos SNPs não tem efeito na saúde ou durante o desenvolvimento. No entanto, pesquisadores encontraram SNPs que podem ajudar a prever uma resposta individual a certas

drogas, a suscetibilidade a fatores ambientais como as toxinas, e o risco do desenvolvimento a doenças. Os SNPs também podem ser usados para rastrear a herança de genes envolvidos com doenças dentro da mesma família. Estudos futuros irão trabalhar para identificar os SNPs associados com doenças complexas como doenças cardíacas, diabetes e câncer (Genetics Home Reference, 2017).

Pelo fato de os SNPs serem predominantemente bialélicos, eles fornecem menor informação por loco gênico. No entanto, esse fato é compensado pela alta abundância desses marcadores ao longo dos genomas (McCouch *et al.*, 2010; Jehan & Lakhanpaul, 2006).

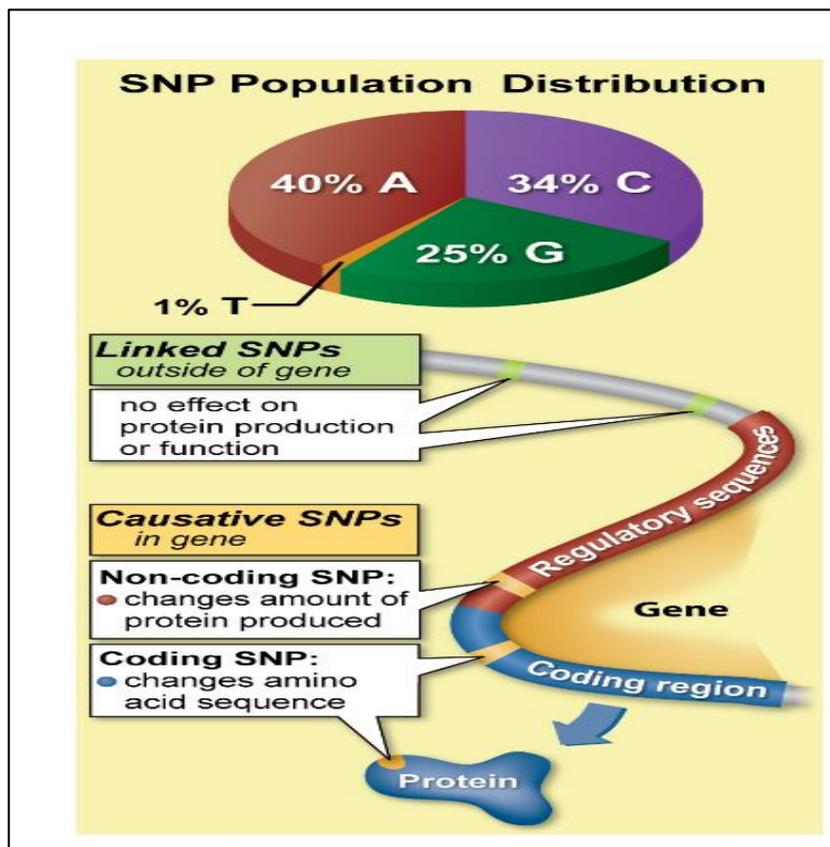


Figura 10. Distribuição populacional de SNPs.

Fonte: Genetics Home Reference, 2017.

Alternativas para prospectar SNPs em regiões específicas do genoma, utilizando sequenciamento Sanger foram desenvolvidas e extensamente aplicadas. O sequenciamento direto de fragmentos específicos do genoma amplificados por PCR, e subsequente alinhamento e comparação das sequências (Figura 11), permite a mineração de SNPs em uma região de interesse. Vários estudos utilizaram essa metodologia para prospectar SNPs em genes de interesse (Calvo *et al.*, 2006; Abatepaulo *et al.*, 2008). O método direto de sequenciamento (método didesoxi ou de terminação da cadeia) baseia-se na incorporação de desoxinucleotídeos

(dNTPs) e de didesoxinucleotídeos (ddNTPs) a uma fita de DNA que está sendo formada e utiliza como molde o DNA de interesse. Assim que os ddNTPs são adicionados à cadeia, a extensão é interrompida, pois os ddNTPs não possuem o grupo hidroxila (OH) 3', necessário para a ligação do próximo desoxinucleotídeo (dNTP). Esses ddNTPs são marcados com fluorescência. Dessa forma, podem ser detectados e a sequência dos nucleotídeos, identificada. Ao final de vários ciclos são obtidas diversas cadeias de DNA, de tamanhos variáveis e terminadas em diferentes ddNTPs que, posteriormente, serão identificados em sequenciador automático (Regitano *et al.*, 2007).

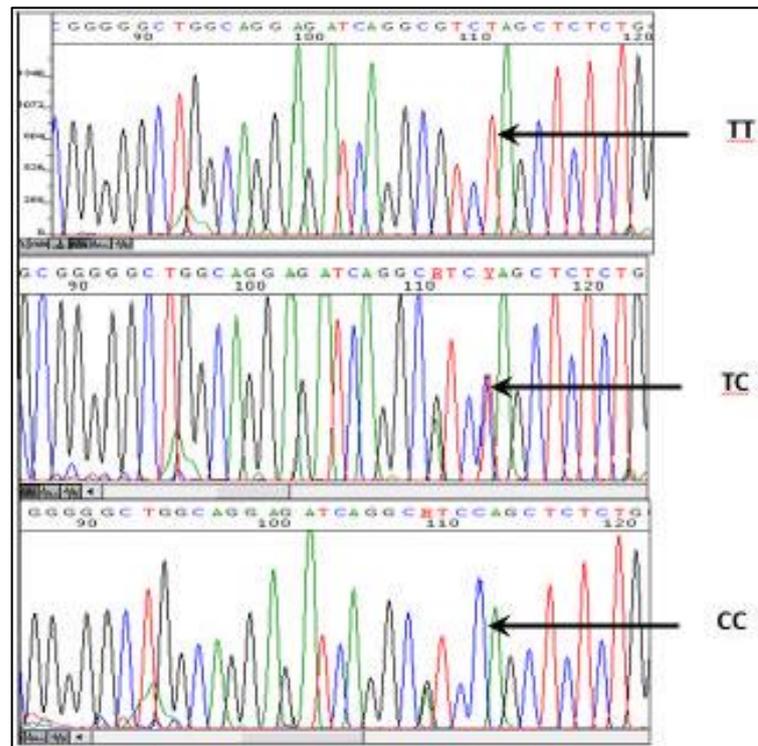


Figura 11. Prospecção de SNPs em regiões genômicas específicas com o sequenciamento direto de produtos de PCR.

Fonte: Caetano, 2009.

2.8 Centro de Atenção Psicossocial

Os Centros de Atenção Psicossocial (CAPs) são unidades específicas para atendimento diário à pacientes psiquiátricos e pessoas com necessidades decorrentes do uso de álcool e outras drogas. O serviço comunitário funciona com porta aberta e de forma substitutiva aos hospitais psiquiátricos e tratamento via internação (Ministério da Saúde, 2004).

Os CAPs, além de oferecerem atendimento em saúde mental, propõem uma nova abordagem através da reinserção social dos pacientes pelo acesso ao trabalho, lazer, exercício dos direitos civis e fortalecimento dos laços familiares e sociais. É função dos CAPs, ainda, o

acolhimento dos usuários e o suporte para que estes consigam ser autônomos na trajetória de seu tratamento (Ministério da Saúde, 2004).

Todo o trabalho desenvolvido no CAPs deverá ser realizado em um “meio terapêutico”, isto é, tanto as sessões individuais ou grupais como a convivência no serviço têm finalidade terapêutica. Isso é obtido através da construção permanente de um ambiente facilitador, estruturado e acolhedor, abrangendo várias modalidades de tratamento. As unidades disponibilizam atendimento por uma equipe multiprofissional, como terapeutas ocupacionais, enfermeiros, musicoterapeutas, médicos, psicólogos, assistentes sociais e arteterapeutas, que atua de forma interdisciplinar e acompanha os pacientes com transtorno mental grave ou persistente e pessoas com necessidades decorrentes do uso crônico de álcool e outras drogas (Ministério da Saúde, 2004).

Para os indivíduos cujo principal problema é o uso prejudicial de álcool e outras drogas passam a existir, a partir de 2002, os CAPs ad (Caps Álcool e Drogas). Os CAPs ad devem oferecer atendimento diário a pacientes que fazem um uso prejudicial de álcool e outras drogas, permitindo o planejamento terapêutico dentro de uma perspectiva individualizada de evolução contínua. Possibilita ainda intervenções precoces, limitando o estigma associado ao tratamento. Assim, a rede proposta se baseia nesses serviços comunitários, apoiados por leitos psiquiátricos em hospital geral e outras práticas de atenção comunitária (ex.: internação domiciliar, inserção comunitária de serviços), de acordo com as necessidades da população-alvo dos trabalhos. Os CAPs ad desenvolvem uma gama de atividades que vão desde o atendimento individual (medicamentoso, psicoterápico, de orientação, entre outros) até atendimentos em grupo ou oficinas terapêuticas e visitas domiciliares. Também devem oferecer condições para o repouso, bem como para a desintoxicação ambulatorial de pacientes que necessitem desse tipo de cuidados e que não demandem por atenção clínica hospitalar (Ministério da Saúde, 2004).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Verificar a frequência de polimorfismos genéticos em genes de reparo e detoxificação em indivíduos etilistas e não-etilistas do município de Goiânia-GO e a possível associação ao dano no DNA.

3.2 Objetivos específicos

- Comparar os níveis de dano ao DNA, mediante o Ensaio Cometa, dos indivíduos que fazem uso crônico do álcool com os níveis de dano do grupo controle;
- Comparar a frequência genotípica de *GSTM1* e *GSTT1* nos indivíduos etilistas com as obtidas no grupo controle, por meio da PCR em tempo real;
- Avaliar os hábitos de vida e saúde dos etilistas
- Detectar a frequência de polimorfismos nos genes *GSTP1* e *XRCC1* tanto nos etilistas como no grupo controle, pela técnica de sequenciamento.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Grupo Amostral

O presente estudo foi uma pesquisa do tipo caso-controle, no qual foram avaliados indivíduos etilistas há, pelo menos cinco anos, diagnosticados e atendidos no Ambulatório CAPs Ad/Casa do município de Goiânia-Goiás, Brasil. Todos os indivíduos foram escolhidos aleatoriamente e as amostras de sangue foram obtidas voluntariamente, de acordo com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice I). Dados como idade, tempo de consumo de álcool e tipos de bebidas consumidas foram relatados em um questionário de estilo de vida para a realização dos dados estatísticos (Apêndice II).

4.2 Critérios de Inclusão e Exclusão

Os critérios de inclusão do presente estudo, para o grupo caso, foram indivíduos com mais de 18 anos, que assinaram o TCLE e que fizeram uso crônico de álcool e, para o grupo controle, foram indivíduos com mais de 18 anos, que assinaram o TCLE, saudáveis, que não faziam uso de álcool e que não fizeram uso recente de tratamentos químicos e físicos.

Os critérios de exclusão para o grupo caso e grupo controle foram indivíduos que não atendiam aos critérios de inclusão descritos acima.

4.3 Coleta das Amostras

Após a concordância do TCLE, foi realizada uma coleta de 10 mL de sangue venoso em tubo à vácuo com EDTA. Os tubos foram armazenados em caixa de isopor com gelos e transportados para o laboratório, onde foram realizados os experimentos.

4.4 Seleção das Amostras

Para o presente trabalho, foram coletadas amostras de 87 indivíduos que faziam consumo crônico de álcool (grupo caso) e 74 indivíduos que não consumiam álcool (grupo controle). No entanto, foram obtidos dados de Ensaio Cometa de 82 indivíduos do grupo caso e de 52 do grupo controle. Ao realizar a análise dos indivíduos pela PCR em tempo real, foram obtidos dados de 75 indivíduos do grupo caso e 71 do grupo controle. Isso quer dizer que nem todos os indivíduos que tiveram dados no Ensaio Cometa, obtiveram também na PCR em tempo real. (Figura 13A).

Já no sequenciamento, do total de 87 indivíduos do grupo caso e 74 do grupo controle, foram obtidos resultados, para o gene *GSTP1*, 46 indivíduos do grupo caso e 65 do grupo

controle e, para o gene *XRCCI*, 53 indivíduos do grupo caso e 17 do grupo controle (Figura 13B).

Além disso, na tentativa de homogeneizar os grupos (pessoas com a mesma faixa etária, mesmos hábitos de vida), foram retirados do grupo amostral vários indivíduos. Dessa forma, as pessoas selecionados para a análise estatística estão nas figuras abaixo.

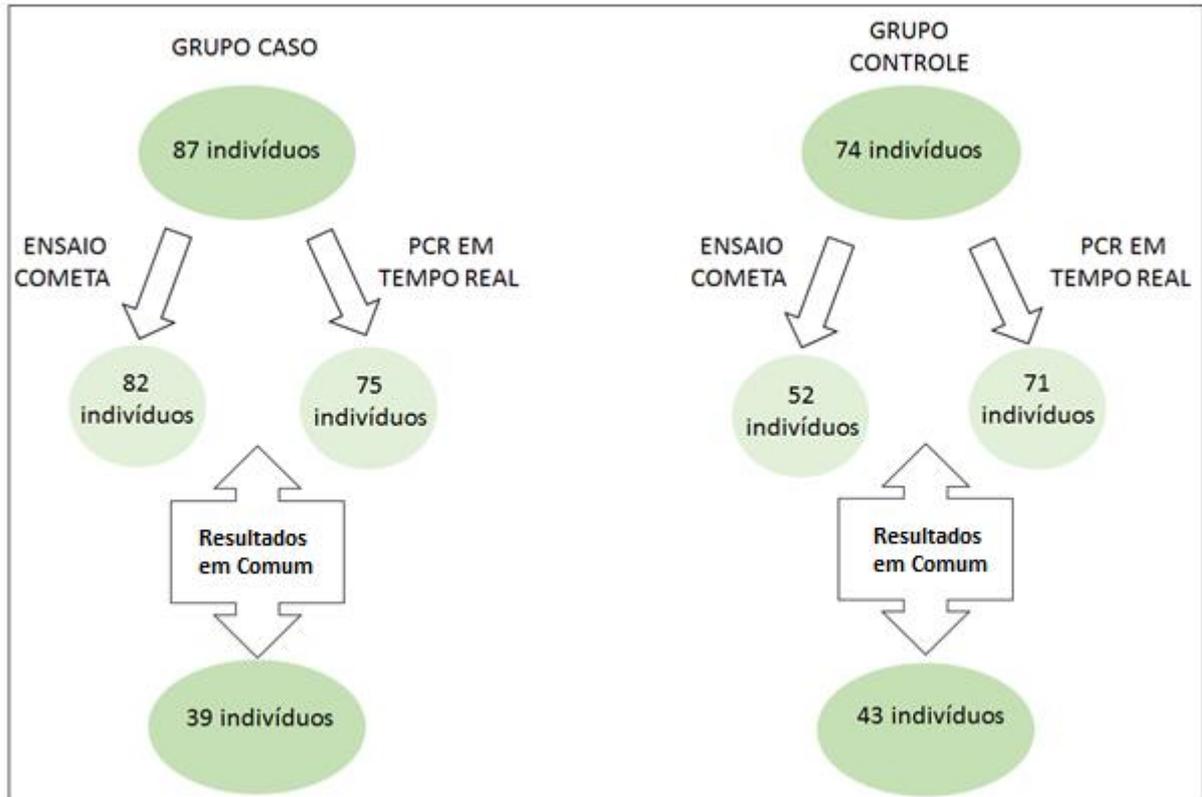


Figura 12A. Fluxograma indicando a seleção do indivíduos para os grupos caso e controle, na análise dos dados obtidos no Ensaio Cometa e na PCR em Tempo Real.

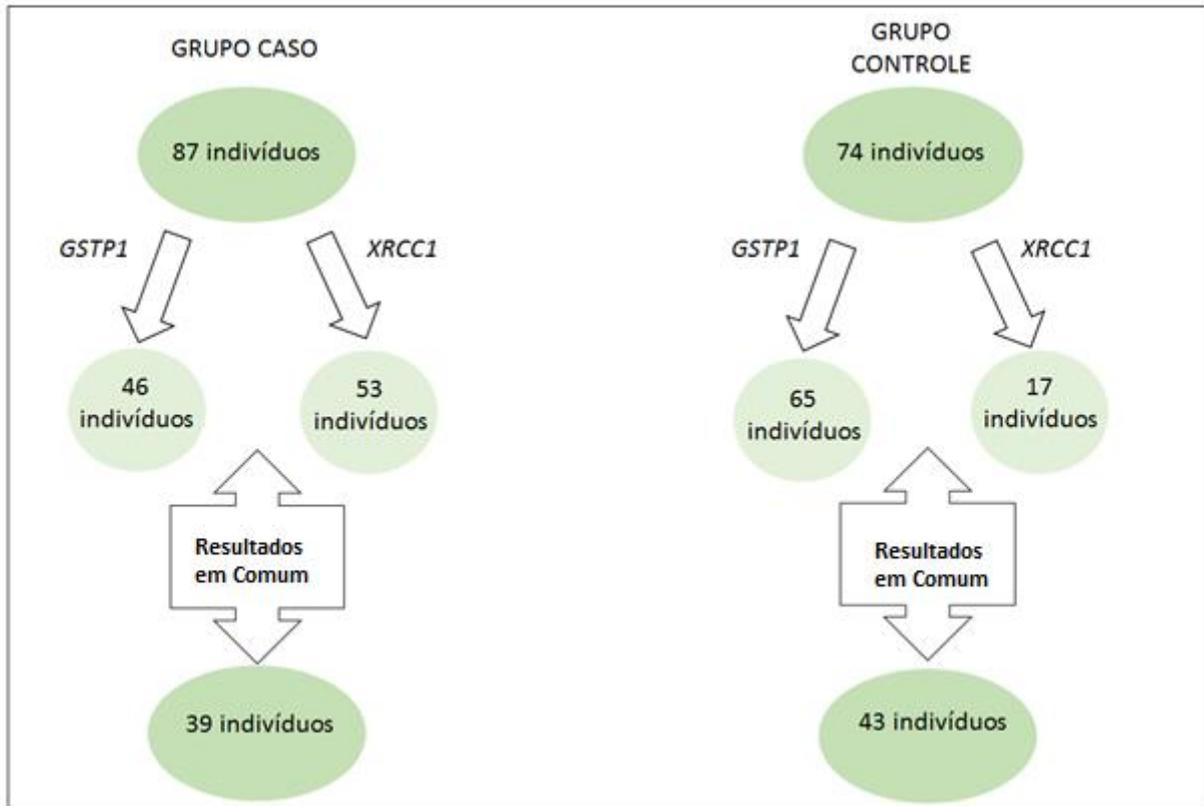


Figura 12 B. Fluxograma indicando a seleção do indivíduos para os grupos caso e controle, na análise dos dados obtidos no Sequenciamento.

4.5 Ensaio Cometa

O Ensaio Cometa foi realizado de acordo com Singh *et al.* (1988), com poucas modificações. As células foram suspensas em agarose a baixo ponto de fusão a 0,7% em PBS (tampão fosfato salino) [pH7,4] a 37°C e 80 µL de agarose LPM com 20 µL de células pipetadas em uma lâmina de microscópio pré-coberta com 100µL de agarose a 1%. A agarose foi colocada no gelo por 5 minutos e a lâmina foi imersa em solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10mM Tris, NaOH a pH 10 ± 0.5, e 1% Triton X-100) por 1 hora a 4°C para remover as proteínas das células. As lâminas foram colocadas em uma cuba de eletroforese horizontal contendo 0,3 M de NaOH e 1mM Na₂EDTA (pH >13) por 20 minutos. A eletroforese foi realizada a 25V (1 V/cm, 300 mA) por 20 minutos em uma temperatura de 4°C. Ao final, as lâminas foram lavadas com tampão de neutralização (Tris-HCl a 7,5pH), por 15 minutos, secas em temperatura ambiente e fixadas em etanol absoluto por 10 minutos. Todas as lâminas foram confeccionadas em duplicata, incluindo os controles negativo e positivo (H₂O₂ 50 µM) e armazenadas até o momento da análise.

Finalmente, as lâminas foram coradas com brometo de etídio e analisadas em um microscópio de epi-fluorescência. Os núcleos das células foram visualizadas usando objetiva

de 10x, e a imagem fluorescente foi capturada usando o software de análise ISIS[®], sendo duas lâminas para cada indivíduo. Foram analisados, randomicamente, 50 células, totalizando, 100 por indivíduo, em que foram analisadas pelo software Comet score versão 1.5.

De acordo com Speit (1995), as células são classificadas conforme o comprimento da cauda em cinco categorias, que correspondem às seguintes quantidades de dano ao DNA:

0= sem danos (<5%)

1= baixo nível de danos (5-20%)

2= médio nível de danos (20-40%)

3= alto nível de danos (40-95%)

4= totalmente danificado (>95%)

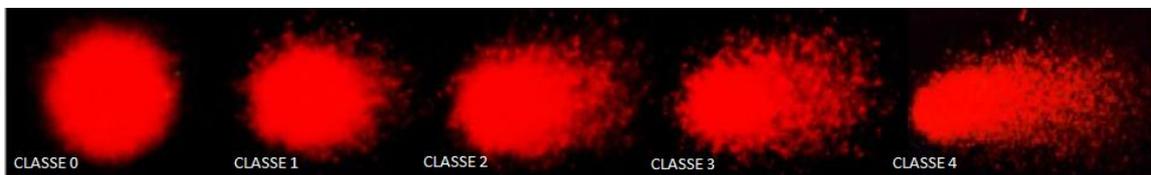


Figura 13. Classificação dos Cometas de acordo com o dano ao DNA encontrado.

Fonte: Adaptado de Centro, 2007

4.6 Extração e quantificação das amostras

Para a extração de DNA foi utilizado o Kit de extração de DNA Purelink TM Genomic[®] DNA Mini Kit (Invitrogen, EUA), de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante. A quantificação da concentração de DNA (ng/μL) presente em cada amostra foi realizada utilizando Nanovue TM[®] (GE, EUA), de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante.

4.7 Análise Molecular

4.7.1 PCR em Tempo Real

Para a análise das deleções de *GSTM1* e *GSTT1* utilizou-se a técnica PCR em Tempo Real com o fluoróforo SYBR Green Master Mix[®] (Life Technologies, EUA), e com a co-amplificação do gene RH92600, o qual amplifica uma região de microsatélite de 135pb localizado no cromossomo 6q13, usado como controle interno da reação. Os *primers* utilizados e as condições de PCR foram previamente sugeridos por Abdel-Rahma *et al.* (1996), com adaptações (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1. Características gerais dos *primers* utilizados para a análise dos polimorfismos de *GSTM1* e *GSTT1* nos grupos caso e controle

Marcador	Sequência	TEMPERATURA MELTING
<i>GSTM1</i>	F:GAAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC; R:GTTGGGCTAAATATACGGTGG	78° C
<i>GSTT1</i>	F:TTCCTTACTGGTCCTCACTCTC; R:TCACCGGTCATGGCCAGCA	83° C
<i>RH92600</i> (controle endógeno)	F:TCATATGCAAAAACAGCTTCCC; R:CTGGTCCTTCAAGCCTGTATG	75° C

Tabela 2. Protocolo de termociclagem para a genotipagem dos *primers* *RH92600*, *GSTM1* e *GSTT1*.

Etapas	Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	95	10 minutos	1
Desnaturação	95	10 segundos	35
Anelamento	60	20 segundos	
Extensão	72	25 segundos	
Extensão final	72	5 minutos	1
Armazenamento	4	∞	∞

O volume usado na PCR foi de 25 µL, contendo aproximadamente 10ng/µl de DNA em cada amostra, 0.06 nmoles de cada primer, 1X PCR Buffer (5 mM de KCl, 1mM de Tris-HCl), 2.5 mM de MgCl₂, 0.10mM de cada dNTP e 2.5U Taq DNA polimerase High Fidelity (Life Technologies, EUA). Para cada primer foi obtida uma curva de dissociação (melting curve).

4.7.2 Sequenciamento

4.7.2.1 PCR

Após a extração e quantificação das amostras, as mesmas foram submetidas ao procedimento de PCR convencional para amplificação utilizando os *primers* descritos nas tabelas abaixo (Tabela 3).

Tabela 3. Características gerais dos *primers* utilizados para a PCR convencional realizada anteriormente à etapa de sequenciamento.

Marcador	Sequência	TEMPERATURA MELTING	Extensão do Produto
<i>GSTP1</i>	F:CCCCGGAGCCTTTTCTTTA	60,25°C	773 pb
	R:AAAAGTGCCAGCACCTCCAT	60,18°C	
<i>XRCCI</i>	F:ATAGCTAGGTCCTGCTGGGT;	55°C	728 pb
	R:GAGAGGGAAGGAGCCAGGAA	60°C	

Após a realização dessa etapa, os produtos de PCR foram purificados com o kit comercial de purificação ExoSAP-IT[®]. Para isso, foram adicionados 5µL de produto de PCR e 1µL de ExoSAP em microtubos. Posteriormente, os microtubos foram incubados a 37°C por 90 minutos para remoção das impurezas e aquecidos a 80°C por 20 minutos para inativação do produto de PCR. Após o processo de purificação, as amostras de DNA amplificados e purificados foram armazenadas em freezer a -20°C para posterior sequenciamento (conforme recomendação do fabricante).

4.7.2.2 Reação de Sequenciamento

Para a reação de sequenciamento, utilizou-se 1µL de DNA amplificado e purificado, 3,5µL de água Mili-Q estéril, 2,5 µL dos *primers* forward e reverse utilizados na amplificação, 1µL de BigDye[®] Terminator Cycle Sequencing Standart Version 3.1 (Applied Biosystems[™], Foster City, CA, USA) e 2µL de tampão do kit de sequenciamento. A reação de sequenciamento foi realizada em termociclador e a programação compreendeu 25 ciclos de 1 etapa de 20 segundos a 95°C, outra etapa de 15 segundos a 50°C e, por fim, outra de 1 minuto a 60°C.

4.7.2.3 Precipitação da reação de sequenciamento

Após o preparo, realizou-se a precipitação da reação de sequenciamento, cuja função é retirar os dNTPs e os ddNTPs que não foram incorporados, os restos de enzimas que não foram utilizadas e sais que poderiam atrapalhar o processo de sequenciamento. A precipitação foi realizada utilizando 40µL de isopropanol (65%) a cada poço da placa de sequenciamento e incubada a temperatura ambiente por 20 minutos e ao abrigo da luz. Após essa etapa, a mistura foi centrifugada por 45 minutos a 2000 rcf, sob temperatura constante (20°C) e, em seguida, o

sobrenadante foi removido e a placa, levada à centrifugação por 1 minuto a 300 rpm, sob temperatura constante (21°C). Posteriormente, foi adicionado 250 µL de etanol (60%) a cada poço da placa de sequenciamento e centrifugado por 10 minutos a 2000 rcf. Após, o sobrenadante foi removido e a placa, levada à centrifugação por 1 minuto a 500 rpm e, depois, levada ao termociclador por 1 minuto a 95°C para secagem.

Foram adicionados 10µL de formamida Hi-Di por poço, a placa foi incubada a temperatura ambiente por 5 minutos, então, as amostras foram desnaturadas em termociclador a 95°C por 5 minutos e a placa foi mantida refrigerada a 4°C e ao abrigo de luz para posterior sequenciamento.

4.7.2.4 Processo de Sequenciamento

O sequenciamento das amostras foi realizado em um sequenciador ABI PRISM® 3500 Genetic Analyser (Applied Biosystems™, CA). O processo de sequenciamento baseia-se na adição, durante a reação, de nucleotídeos modificados carregados com fluorocromos. Estes nucleotídeos não possuem a hidroxila 3', apresentando somente um hidrogênio e impossibilitando a ligação do nucleotídeo seguinte durante o processo de polimerização da fita de DNA. Ao longo deste processo há a formação de inúmeros fragmentos de DNA de tamanhos diferentes, todos apresentando nucleotídeos marcados na extremidade. Estes fragmentos, uma vez ordenados por tamanho são submetidos a um feixe de laser onde os nucleotídeos modificados emitem luz ao serem excitados. Para cada um dos nucleotídeos (A, T, C e G) há a emissão de luz em comprimentos de ondas específicos (A = verde, T = vermelho, C = azul e G = amarelo).

4.7.2.5 Edição das Sequências

Para cada amostra de DNA fita dupla sequenciada foram obtidas duas sequências de fita simples, uma referente a fita forward e outra para a fita reverse. As sequências forward e reverse de cada amostra foram visualizadas e editadas no programa Sequence Scape Software 3. Para verificar a qualidade das sequências procedeu-se a comparação dos cromatogramas, sendo necessário primeiro inverter o sentido da fita Reverse e então obter o seu complementar para poder compará-la com a fita Forward. Após a obtenção do reverso complementar da fita Reverse procedeu-se a comparação e correção das fitas através da adição ou exclusão de bases, de acordo com o cromatogramas (Figura 12).

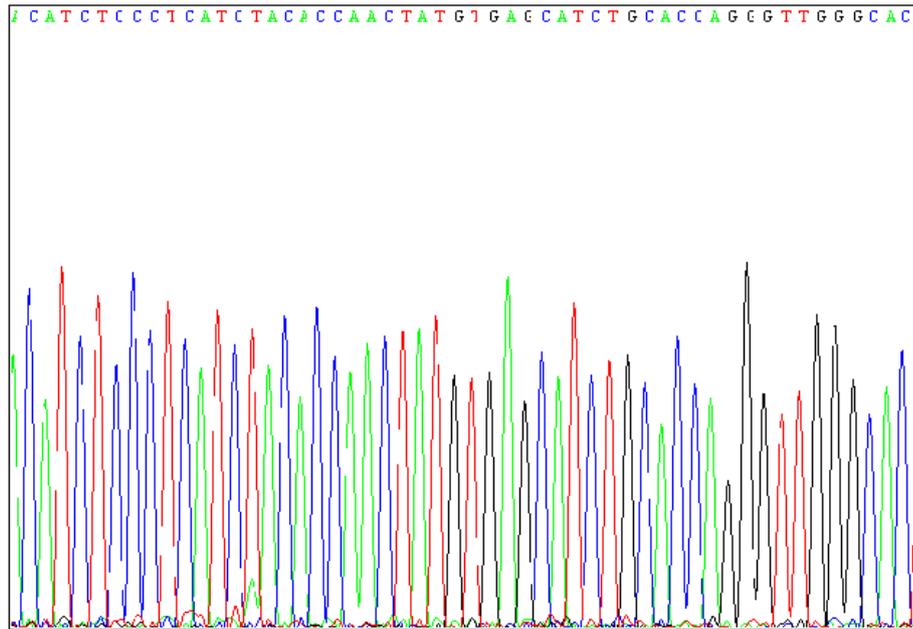


Figura 14. Cromatograma obtido após o Sequenciamento

Fonte: Arquivo próprio

4.7.2.6 Obtenção da sequência consenso e avaliação da qualidade

Após a comparação e correção das sequências procedeu-se à obtenção da sequência Consenso, isto é, aquela resultante da sobreposição das sequências das fitas forward e reverse corrigidas. 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 SeqScape[®] software 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).

4.7.2.7 Comparação da sequência com o GenBank

Em seguida, a sequência Consenso foi extraída para um arquivo próprio em formato FASTA e submetida ao programa Basic Local Alignment Search Tool[®] (BLAST) para comparação com as sequências depositadas no repositório mundial de sequências GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). As sequências foram comparadas com a base de dados de nucleotídeos BLASTN utilizando-se o algoritmo MEGABLAST, otimizado para a busca de sequências altamente similares, sendo o resultado classificado de acordo com o valor esperado e-Value, que calcula a probabilidade em se obter um resultado similar ao acaso, do valor do escore normalizado (Bit-Score) e dos valores de porcentagem de similaridade (% Similarity) e de identidade (% Identical).

4.7.2.8 Detecção dos SNPs

Cada SNP detectado foi anotado individualmente e comparado com as variações já descritas para a sequência genômica de *GSTP1* e *XRCC1* por meio do software CLC Sequence Viewer® versão 7.6.1 (CLC bio, Aarhus, Dinamarca).

4.8 Aspectos Éticos e Instituições Participantes

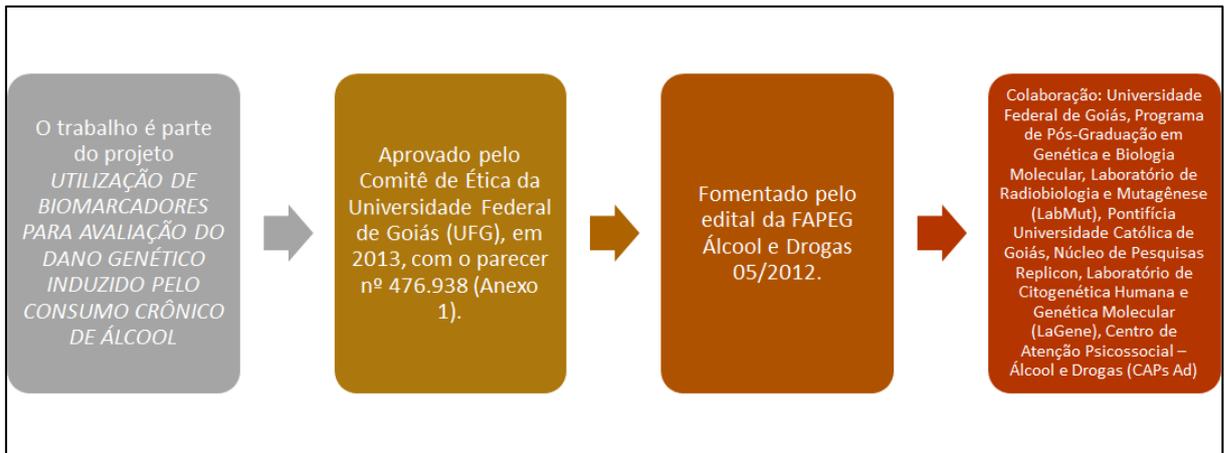


Figura 15. Fluxograma dos aspectos éticos e das instituições que fizeram parte do estudo

4.9 Análise Estatística

Para o Ensaio Cometa, foi realizada a análise da função discriminante e Mann-Whitney usando os seguintes parâmetros: porcentagem de DNA (%DNA), tamanho da cauda (TL) e momento da cauda de Olive (OTM). A relação entre os parâmetros do Ensaio Cometa e os hábitos tabagista e alcoolista para o grupo caso foi realizada usando a correlação de Spearman. Os hábitos de vida tanto dos etilistas quanto do grupo controle, como a idade, tempo de exposição ao álcool, tabagismo, e consumo de álcool foram comparados pelo teste qui quadrado. A frequência de *GSTM1* e *GSTT1* foi comparada pelo teste qui quadrado. Para a análise dos resultados obtidos no sequenciamento, foram utilizados os testes qui quadrado e Mann Whitney. A comparação da análise molecular com os danos genotóxicos entre ambos os grupos foi realizada usando o teste G.

Todos os testes foram conduzidos com um nível de significância de 0.05 ($p < 0,05$) usando o software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 23.0

5 RESULTADOS

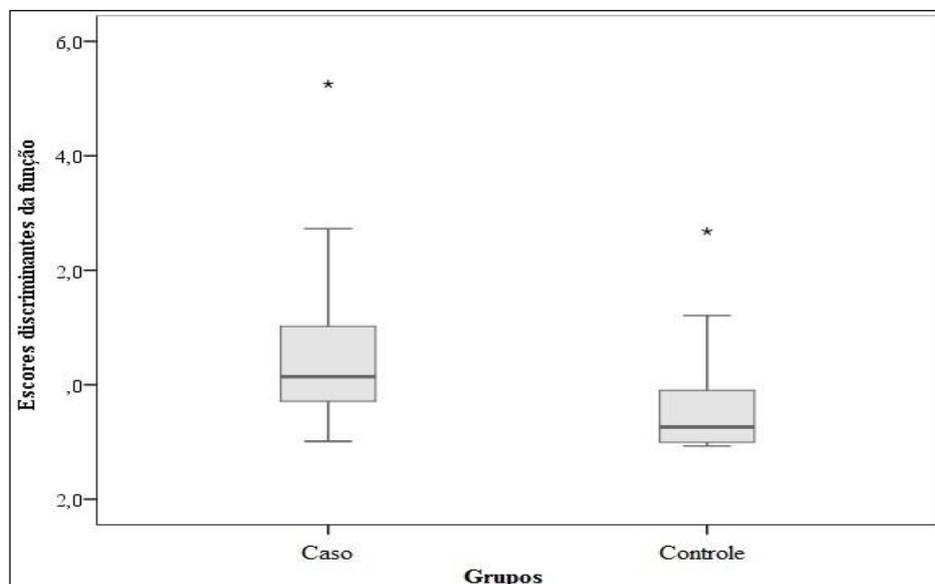
5.1 Ensaio Cometa

Ao se avaliar os danos no DNA pelos parâmetros: Tail Length (TL), porcentagem de DNA na cauda (%DNA) e Olive Tail Moment (OTM), foi possível observar pelos resultados obtidos que houve um maior dano genotóxico no grupo caso em relação ao grupo controle, com diferenças estatisticamente significativas entre os grupos para os três parâmetros do Cometa ($p < 0,05$) [Tabela 04].

Tabela 4. Resultado do teste Mann-Whitney comparando o dano genotóxico entre os grupos caso e controle obtidos pelo Ensaio Cometa.

Dano Genômico	Caso	Controle	Z	P
TL	14,73 ± 8,21	10,52 ± 7,24	2,65	0.008
% DNA	27,52 ± 14,49	17,12 ± 12,34	3,66	< 0.001
OTM	9,27 ± 6,80	4,54 ± 4,63	4,20	< 0.001

Para determinar se houve diferença do dano genômico medidos pelos parâmetros OTM, TL e %DNA, entre os grupos caso e controle, a análise da função discriminante foi realizada. O resultado mostrou que houve diferenças estatisticamente significativas ($p = 0,004$) no dano genômico encontrado entre os grupos. Além disso, o OTM foi o parâmetro que teve o maior valor dentro dessa função discriminante (0,973), seguido da % DNA (0,920) e TL (0,648) [Figura 10].



$p = 0,004$

Figura 16. Resultado da análise discriminante mostrando as diferenças entre os grupos caso e controle.

Não houve associação entre o dano genotóxico do grupo caso em relação a carga tabágica, quantidade de álcool por dia (mL) e tempo de consumo para os parâmetros do Ensaio Cometa analisados, com valores de $p > 0,05$ (Tabela 5).

Tabela 5. Estimativas da correlação de Spearman dos parâmetros do ensaio cometa entre os hábitos tabagista e etilista para o grupo caso.

Preditores	Coefficiente de padronização <i>Beta</i>	<i>P</i>
TL		
Carga tabágica	0,06	0.73
Quantidade de álcool por dia (mL)	0,29	0.13
Tempo de consumo	-0,03	0.88
% DNA		
Carga tabágica	0,15	0.41
Quantidade de álcool por dia (mL)	0,08	0.68
Tempo de consumo	-0,01	0.97
OTM		
Carga tabágica	0,06	0.73
Quantidade de álcool por dia (mL)	0,24	0.20
Tempo de consumo	0,06	0.77

5.2 Frequência Genotípica de *GSTM1* e *GSTT1*

A tabela a seguir (Tabela 6) mostra as frequências de GST (teta-1e mu-1) dos grupos caso e controle, demonstrando que não houve diferenças estatisticamente significativas, valores de $p > 0,05$.

Tabela 6. Resultado do teste qui-quadrado comparando a frequência do GST (teta1e mu-1) entre os grupos caso e controle.

Genótipo	Grupo n (%)		<i>p</i>
	Caso	Controle	
<i>GSTT1</i>			
Ausente	9 (23,1)	11 (25,6)	0.79
Presente	30 (76,9)	32 (74,4)	
<i>GSTM1</i>			
Ausente	19 (48,7)	24 (55,8)	0.52
Presente	20 (51,3)	19 (44,2)	

Os dados sociodemográficos dos indivíduos de ambos os grupos estão descritos na tabela abaixo (Tabela 7). Em média, os indivíduos do grupo caso consomem 3,12 litros de álcool e fumam 12,33 cigarros por dia, já no grupo controle, os indivíduos consomem 3,34 cigarros por dia. Dentro do grupo caso, 3 indivíduos relataram ter diabetes e 4 relataram hipertensão arterial sistêmica, enquanto que no grupo controle nenhum relatou apresentar essas duas doenças. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos caso e o grupo controle, exceto na variável ‘tabagismo’, cujo valor de $p=0,001$.

Tabela 07. Distribuição dos hábitos de vida e saúde dos grupos caso e controle

Variáveis	Grupo n (%)		χ^2	P
	Caso	Controle		
Idade*	40.89 ± 6.75	37.55 ± 10.44	1.69	0.09
Gênero**				
Feminino	10 (25.6)	20 (46.5)	2.99	0.08
Masculino	29 (74.4)	23 (53.5)		
Tabagismo**				
Não	11 (28.2)	29 (67.4)	11.08	0.001
Sim	28 (71.8)	14 (32.6)		
Etilismo**				
Não	0 (0.0)	43 (100.0)	NA	
Sim	39 (100.0)	0 (0.0)		

**Teste-t*; **Qui-quadrado; NA= não aplicável

5.3. Sequenciamento

Após sequenciadas as amostras, todos os dados obtidos foram analisados pelo programa SeqScape® v.3. Foram obtidas sequências de qualidade de 65 indivíduos do grupo controle e 46 indivíduos do grupo caso para o gene *GSTP1* e 17 indivíduos do grupo controle e 53 indivíduos do grupo caso para o gene *XRCC1*. A edição e o alinhamento das mesmas foram realizados pelo programa Bio Edit Sequence Alignment Editor, e foram obtidas sequências de 536pb referentes ao gene *XRCC1* e sequências de 589 pb referentes ao gene *GSTP1* (Figuras 15A e 15B)



Figura 17A. Amostras de indivíduos analisados para o gene *XRC1*, indicando o tamanho das mesmas obtido após o alinhamento.

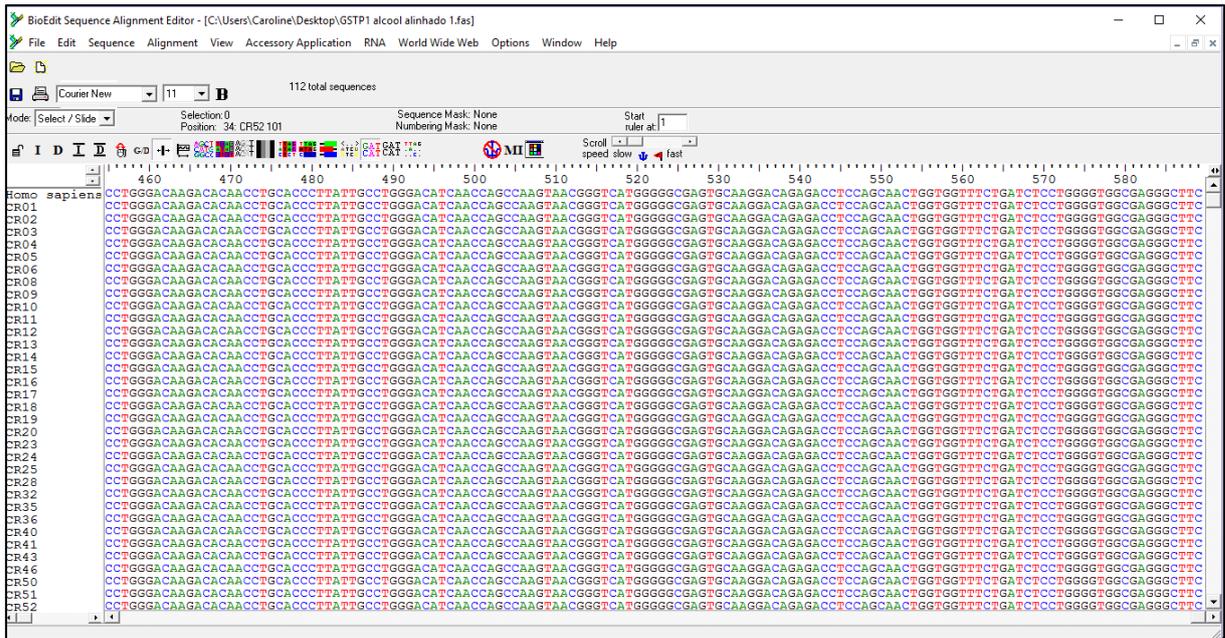


Figura 17B. Amostras de indivíduos analisados para o gene *GSTP1*, indicando o tamanho das mesmas obtido após o alinhamento.

Um ponto de variação foi encontrado no gene que codifica para a proteína GSTP1, no códon 105, localizado no éxon 5 (rs1695), que é caracterizado pela substituição de adenina para uma guanina, o que acarreta na troca do aminoácido isoleucina para valina. Outro ponto de variação foi encontrado no gene que codifica para a proteína XRC1, no códon 194 (rs1799782), que está localizado no éxon 6, levando a uma substituição de citosina para timina, resultando, portanto, na troca do aminoácido arginina para triptofano.

Foram encontrados cinco indivíduos do grupo caso e 10 do grupo controle, com o genótipo heterozigoto (A/G), 14 indivíduos do grupo caso e quatro do controle apresentando genótipo homozigoto alterado (G/G) e 13 indivíduos com genótipo homozigoto selvagem no grupo caso e três no grupo controle (A/A) no gene *GSTP1*. Enquanto que no gene *XRCC1*, 25 indivíduos com genótipo homozigoto selvagem (C/C) foram encontrados no grupo caso e três indivíduos no grupo controle e nenhum indivíduo do tipo homozigoto selvagem ou heterozigoto em ambos os grupos.

As frequências genóticas foram analisadas entre os indivíduos e a distribuição dos genótipos nos grupos caso e controle, tanto para o SNP rs1695 quanto para o SNP rs17997782 estão na tabela 8.

Tabela 8. Resultados dos genótipos encontrados nos genes *GSTP1* e *XRCC1* nos grupos caso e controle.

		Grupo		Total	<i>p</i>
		Caso	Controle		
<i>GSTP1</i> (rs1695)					
Heterozigoto (A/G)	Contagem	5	10	15	0.02
	% em Grupo	26.3%	71.4%	45.5%	
Homozigoto alterado (G/G)	Contagem	1	1	2	
	% em Grupo	5.3%	7.1%	6.1%	
Homozigoto selvagem (A/A)	Contagem	13	3	16	
	% em Grupo	68.4%	21.4%	48.5%	
<i>XRCC1</i> (rs17997782)					
Homozigoto selvagem (C/C)	Contagem	25	3	28	Na
	% em Grupo	100.0%	100.0%	100.0%	
Homozigoto alterado (T/T)	Contagem	0	0	0	
	% em Grupo	0.0%	0.0%	0.0%	
Heterozigoto (C/T)	Contagem	0	0	0	
	% em grupo	0.0%	0.0%	0.0%	

*Qui-quadrado

na = não se aplica.

Em relação ao gene *GSTP1*, foi possível observar uma diferença significativa ($p=0,02$) quando comparados os diferentes genótipos (heterozigoto, homozigoto alterado e homozigoto selvagem) nos grupos caso e controle, sendo possível verificar um predomínio de indivíduos com genótipo homozigoto alterado (G/G). Já no gene *XRCC1*, só estavam presentes genótipos do tipo homozigoto selvagem (C/C), tanto no grupo caso quanto no grupo controle (tabela 08).

Ao realizar a comparação da frequência do genótipo do SNP rs1695 com os genótipos de *GSTM1* e *GSTT1*, observamos que não houve diferença significativa tanto no grupo caso quanto no controle (TABELA 9).

Tabela 9. Comparação da frequência do genótipo do SNP rs1695 com o T1 e M1 no grupo caso.

		<i>GSTP1</i>			<i>p</i>	
		Heterozigoto (A/G)	Homozigoto alterado (G/G)	Homozigoto selvagem (A/A)		
T1						
Ausente	Contagem	1	0	2	0.88	
	% em <i>GSTP1</i>	20.0%	0.0%	15.4%		
Presente	Contagem	4	1	11		
	% em <i>GSTP1</i>	80.0%	100.0%	84.6%		
M1						
Ausente	Contagem	4	0	4		0.09
	% em <i>GSTP1</i>	80.0%	0.0%	30.8%		
Presente	Contagem	1	1	9		
	% em <i>GSTP1</i>	20.0%	100.0%	69.2%		

Comparação da frequência do genótipo do SNP rs1695 com o T1 e M1 no grupo controle.

		<i>GSTP1</i>			<i>p</i>	
		Heterozigoto (A/G)	Homozigoto alterado (G/G)	Homozigoto selvagem (A/A)		
T1						
Ausente	Contagem	2	1	0	0.11	
	% em <i>GSTP1</i>	20.0%	100.0%	0.0%		
Presente	Contagem	8	0	3		
	% em <i>GSTP1</i>	80.0%	0.0%	100.0%		
M1						
Ausente	Contagem	4	0	2		0.40
	% em <i>GSTP1</i>	40.0%	0.0%	66.7%		
Presente	Contagem	6	1	1		
	% em <i>GSTP1</i>	60.0%	100.0%	33.3%		

Ao comparar-se a análise molecular com os danos genotóxicos entre os grupos caso e controle, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativa, tanto para o grupo caso, como para o grupo controle, para o SNP rs1695 (Tabelas 10 e 11)

Tabela 10. Estimativas da correlação dos parâmetros do Ensaio Cometa (média \pm desvio padrão) e os genótipos individuais entre os etilistas no grupo caso pelo teste T

	<i>GSTP1</i>				<i>p</i>
	Heterozigoto (A/G)		Homozigoto selvagem (A/A)		
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	
TL	16.85	5.14	13.19	5.37	0.33
% DNA	21.87	7.78	22.71	10.81	0.99
OTM	8.38	2.40	7.78	4.05	0.63

a. Grupo = Caso

Tabela 11. Estimativas da correlação dos parâmetros do Ensaio cometa (média \pm desvio padrão) e os genótipos individuais entre os etilistas no grupo controle

	<i>GSTP1</i>				<i>p</i>
	Heterozigoto (A/G)		Homozigoto selvagem (A/A)		
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	
TL	12.06	7.37	14.58	2.97	0.47
% DNA	23.44	10.26	19.50	9.36	0.57
OTM	7.61	4.07	3.52	2.05	0.16

a. Grupo = Controle

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, houve diferença em relação ao hábito de fumar. A maioria dos indivíduos que consomem álcool também fazem uso de cigarros. O consumo crônico de álcool e o tabagismo estão associados com uma maior produção de acetaldeído, podendo produzir genotoxicidade (Pastorelli *et al.*, 2001; Freita *et al.*, 2005; Soya *et al.*, 2008). Como o hábito de fumar pode ser capaz de interferir na associação do dano genotóxico e o hábito de beber, foi realizado o coeficiente de Correlação de Spearman nesse estudo. No entanto, ao fazer a associação entre a carga tabágica, tempo de consumo e quantidade de consumo de álcool por dia (mL) com os danos genotóxicos por meio do Ensaio Cometa, verificou-se não haver diferença estatisticamente significativa.

Foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo caso em relação ao grupo controle para todos os parâmetros do cometa. Pelo fato desses indivíduos estarem constantemente expostos a altos níveis de acetaldeído, pelo elevado consumo de álcool em longos períodos, a toxicidade desse produto pode induzir danos genotóxicos, assim como ao estresse oxidativo e a suscetibilidade ao surgimento de várias patologias como câncer no trato intestinal, doenças hepáticas, pancreatite aguda e câncer de cabeça e pescoço (Hakenewertha *et al.*, 2013; Oga *et al.* 2014; Prado, 2014). Martelle-Palomino *et al.* (2005) ao avaliar, pelo Ensaio Cometa, o nível de exposição genotóxica ao qual estavam expostos 49 indivíduos que faziam consumo crônico de bebidas alcoólicas, abstinentes e controles saudáveis identificaram diferença significativa entre o grupo dos alcoolistas (0.48 ± 0.24) e grupo controle (0.22 ± 0.16) $p < 0,0001$.

Não houve diferenças estatisticamente significativas entre a distribuição genotípica ao analisar as frequências dos genótipos *GSTT1* e *GSTM1* nos grupos caso e controle.

O gene *GSTP1* está localizado no cromossomo 11q13 e a presença do polimorfismo no códon 105 (substituição de isoleucina para valina, rs1695) resulta em uma atividade reduzida da enzima GSTP1. Os polimorfismos do gene *GSTP1* foram primeiro descritos por Board *et al.* (1989). Eles consistem em uma transição de A→G do nucleotídeo 313 no éxon 5 (*GSTP1*B*) e em uma transição de G→T do nucleotídeo 314 no éxon 6 (*GSTP1*C*), envolvendo a substituição de dois aminoácidos no sítio ativo da enzima, Ile→Val e Val→Ala. Essas duas variantes parecem reduzir a atividade da GSTP1, que poderia levar ao dano genético e a um risco aumentado de câncer (Board *et al.* 1989).

No presente estudo, a análise do polimorfismo rs1695 demonstrou que o alelo não mutado (denominado genótipo selvagem) foi o mais frequente no grupo caso (68,4%), enquanto que, no grupo controle, o genótipo mais frequente foi o heterozigoto (71,4%) [Tabela 8].

O polimorfismo *GSTP1* Ile105Val tem sido associado com o aumento da suscetibilidade de várias formas de câncer, particularmente aqueles relacionados com o uso de cigarro e câncer de mama (Fryer et al. 2000). No estudo realizado por Kim *et al.*, 2004 relatou que mulheres que possuíam o polimorfismo rs1695 no gene *GSTP1* e consumiam álcool tinham um risco mais elevado de apresentar câncer de mama.

O consumo excessivo de álcool pode provocar o desenvolvimento de patologias no fígado e no pâncreas e vários cânceres no trato digestivo. As enzimas GSTM1, GSTT1, GSTP1, CYP1A1 e CYP2E1 estão envolvidas na bioativação e detoxificação de uma variedade de xenobióticos presentes em alimentos, solventes orgânicos, cigarro, drogas, pesticidas, poluentes ambientais e bebidas alcoólicas. Os polimorfismos nos genes que codificam para essas enzimas têm sido associados com a suscetibilidade a várias doenças, incluindo aquelas relacionadas ao etanol (Burim *et al.*, 2004).

Para investigar se os polimorfismos nos genes envolvidos na detoxificação de xenobióticos representam fatores de risco para doenças relacionadas ao consumo de álcool, um estudo foi conduzido envolvendo 120 brasileiros que consumiam álcool e 221 controles com etnias similares. Os dados revelaram que indivíduos que apresentavam o alelo Valina no gene *GSTP1* tinham um risco maior de desenvolver cirrose e pancreatite, visto que foram encontradas frequências mais elevadas do genótipo Val/Val em alcoólicos com cirrose no fígado e pancreatite em comparação com alcoólicos sem essa doença. Isso poderia indicar que pessoas com esses genótipos são mais propensas a desenvolver pancreatite alcoólica e cirrose alcoólica (Burim *et al.* 2004).

Um estudo realizado na China avaliou 618 indivíduos que apresentavam câncer gástrico e 1830 indivíduos sem o câncer, entre março de 2002 e dezembro de 2011, com o objetivo de avaliar a interação do alelo Valina no gene *GSTP1* e a infecção por *Helicobacter pylori*, consumo de cigarro e álcool e o aumento do risco de câncer gástrico entre a população chinesa. O *GSTP1*Ile105Val foi genotipado pela técnica RFLP. O risco de câncer gástrico foi significativamente elevado em pacientes com o genótipo *GSTP1* Val/Val nesses indivíduos (Zhang *et al.* 2012).

O consumo de cigarro e de álcool são o principal fator etiológico para o surgimento de alguns cânceres. No estudo com a população de Zhang *et al* (2012), foram observadas taxas elevadas de pessoas no grupo que apresentavam câncer gástrico que haviam consumido cigarro e álcool (57,1% e 42,2%, respectivamente), comparado com os controles (44,5% e 29,6%, respectivamente). Esses achados indicam que o consumo de álcool e de cigarro estão altamente

associados com o aumento de câncer gástrico. O consumo a longo prazo dessas substâncias tem mostrado contribuir para a carcinogênese.

Em um estudo realizado para verificar a associação do reparo do DNA e os polimorfismos dos genes envolvidos na via de xenobióticos com a suscetibilidade de câncer gástrico em pacientes da Índia, mostrou um elevado risco de G/C foi observado em fumantes e consumidores de álcool carregando o genótipo GSTP1 Ile/Val e Val/Val. Esses achados sugerem que o polimorfismo GSTP1 rs1695 pode ser considerado como um fator de risco associado para o câncer gástrico e pode ser usado como um marcador molecular para avaliar a suscetibilidade para a doença (Ghosh *et al*, 2016).

No presente estudo, ao analisar o polimorfismo rs1799782, foi observado que o alelo não mutado (genótipo selvagem) estava presente em 100% dos indivíduos tanto no grupo caso quanto no controle.

Os resultados do presente estudo demonstram a ausência de correlação entre os genótipos encontrados nos pontos de variação rs1765, rs1799782 dos genes *GSTP1* e *XRCC1*, respectivamente e os danos genotóxicos (Tabela 8).

A falta de significância estatística pode ser explicada devido ao fato do grupo caso ser bastante heterogêneo, apresentando diferentes padrões de consumo, como o tempo e o tipo de bebida e a idade variada dos indivíduos (com pessoas de 18 a 74 anos). Essas variações nem sempre fornecem uma estimativa precisa durante a análise. No entanto, esse resultado não exclui a possibilidade de essas alterações exercerem alguma influência, já que a combinação destes e de outras alterações serem capazes de contribuir para os danos genotóxicos, necessitando, portanto, de um aumento no número amostral e da seleção e um grupo mais homogêneo.

CONCLUSÕES

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

- O dano genotóxico do grupo caso não mostrou associação com o tempo de tabagismo e etilismo, carga tabágica e quantidade de álcool/dia;
- Houve um maior dano genotóxico no grupo caso, ao analisar os três parâmetros do Cometa;
- Não houve diferenças estatisticamente significativas entre as frequências dos genótipos *GSTM1* e *GSTT1*, dos grupos caso e controle;
- No presente estudo, foi encontrado um ponto de variação no éxon 5 do gene *GSTP1* e um ponto de variação no éxon 6 no gene *XRCC1*.
- Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os polimorfismos encontrados e os danos genotóxicos do grupo caso.
- O grupo estudado era bastante heterogêneo e de tamanho reduzido para fornecer dados precisos.

8 REFERÊNCIAS

ABATEPAULO, A. R.; CAETANO, A. R.; MENDES, J. R.; C.T. *et al.* Detection of SNPs in bovine immune-response genes that may mediate resistance to the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Animal Genetics*, v.39, p.328-329, 2008.

ABBAS, A.; DELVINQUIÈRE, K.; LECHEVREL, M.; LEBAILLY, P. *et al.* GSTM1, GSTT1, GSTP1 and CYP1A1 genetic polymorphisms and susceptibility to esophageal cancer in a French population: different pattern of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. *World J Gastroenterol*, v. 10, p. 3389-3393, 2004.

ABDEL-RAHMAN, S. Z.; EL-ZEIN, R. A.; ANWAR, W.A.; AU, W.W. A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. *Cancer Lett*, v.10: 229- 233, 1996.

ABREU, Â. M. M.; JOMAR, R. T.; SOUZA, M. H. N.; GUIMARÃES, R. M. Consumo prejudicial de álcool entre usuários da Estratégia Saúde da Família. *Carta*, v. 62, p. 91-92, 2013.

AMORIM; L.M.F.A, ROSSINI; A, MENDONÇA; G. A. S.; LOTSCH, P.F.; SIMÃO, TA, Gallo CVM e Pinto LFR (2002) *CYP1A1*, *GSTM1*, and *GSTT1* polymorphisms and breast cancer risk in Brazilian women. *Cancer Lett*, v. 181:179-186.

Applied Biosystems. Relative quantification getting started guide. Applied Biosystems. 2008.

ARAÚJO, M. M. Aplicação do Método Microbiológico Deft/Apc e do Teste do Cometa aa Detecção do Tratamento com Radiação Ionizante de Hortaliças Minimamente Processadas. Tese de Mestrado (Título de Mestre em ciências na área de tecnologia nuclear) - Instituto De Pesquisas Energéticas E Nucleares - Autarquia associada à Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

AU, W. W., “Usefulness of Biomarkers in Population Studies: From Exposure to Susceptibility and to Prediction of Cancer,” *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, v. 210, n 3-4, p. 239- 246, 2007.

AUTRUP, H. Genetic polymorphisms in human xenobiotic metabolizing enzymes as susceptibility factors in toxic response. *Mut. Res.* p. 65-76, 2000.

BARTSCH H.;NAIR, U.; RISCH, A.; ROJAS, M.; WIKMAN, H.; ALEZANDROV, K. Genetic polymorphism of CYP genes, alone or in combination, as a risk modifier 212 Parveen *et al.* of tobacco-related cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*,v. 9, p. 3 – 28, 2000.

BENNION, L.J. & LI, T.K. Alcohol metabolism in American Indians and whites: Lack of racial differences in metabolic rate and liver alcohol dehydrogenase. *New England Journal of Medicine.* v. 294, p. 9–13, 1976.

BOARD P.G.; WEBB G.C.; COGGAN, M. Isolation of a cDNA clone and localization of the human glutathione S-transferase 3 genes to chromosome bands 11q13 and 12q13-14. *Ann. Hum. Genet.* v. 53, p. 205–213, 1989.

BOSRON, W.F.; EHRIG, T.; LI, T.K. Genetic factors in alcohol metabolism and alcoholism. *Seminars in Liver Disease.* v. 13, p. 126–135, 1993.

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>.

BRIANEZI, G.; CAMARGO, J. L. V.; MIOT, H. A. Desenvolvimento e validação de técnica quantitativa de análise de imagem para avaliação do teste do cometa corado pela prata. *Bras Patol Med Lab*, p. 325-334, 2009.

BUCH, S.C.; NOTANI, P.N.; BHISEY, R.A. Polymorphism at GSTM1, GSTM3 and GSTT1 gene loci and susceptibility to oral cancer in an Indian population. *Carcinogenesis*, v. 23, p. 803-807, 2002.

BUGANO, D.; CONFORTI-FROES, N.; YAMAGUCHI, N.; BARACAT, E. Genetic polymorphisms, the metabolism of estrogens and breast cancer: a review. *European journal of gynecological oncology*, v. 29, p. 313, 2008.

BURIM, R. V.; CANALLE R.; MATINELLI A. L.C.; Takahashi C. S. Polymorphisms in glutathione S-transferases GSTM1, GSTT1 and GSTP1 and cytochromes P450 CYP2E1 and CYP1A1 and susceptibility to cirrhosis or pancreatitis in alcoholics. *Mutagenesis*, v. 19, n. 4, p. 291-298, 2004.

BUSTIN, S. A. Real-Time PCR. *Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics* University of London, London, U.K. 2005.

BUTKIEWICZ, D. *et al.* Genetic polymorphisms in DNA repair genes and risk of lung cancer. *Carcinogenesis*, v. 22, n.4, p. 593-597. 2001.

CAETANO, A. R. Marcadores SNP: conceitos básicos, aplicações no manejo e no melhoramento animal e perspectivas para o futuro. *R. Bras. Zootec.*, v.38, p.64-71, 2009.

CALVO, J.H.; MARTÍNEZ-ROYO, A.; SILVERI, L. *et al.* Isolation, mapping and identification of SNPs for four genes (ACP6, CGN, ANXA9, SLC27A3) from a bovine QTL region on BTA3. *Cytogenetics and Genome Research*, v.114, p.39-43, 2006.

CARVALHO, F. P. Estudo de danos oxidativos espontâneos no DNA de pacientes com lesões malignas e benignas de mama. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Departamento de Genética. 2011.

CASSON, A. G.; ZHENG, Z.; EVANS, S. C. Polymorphisms in DNA repair genes in the molecular pathogenesis of esophageal (Barret) adenocarcinoma. *Carcinogenesis*. v. 26, n. 9, p.1536-1541. 2005.

CENTRO, R. A. F. Avaliação Toxicológica de Nanopartículas. Universidade do Vale do Itajai, Itajai-SC. 2007.

CHANG-MING, G.; JIAN-HUA, D.; SU-PING, L.; YAN-TING, L.; HAI-XIA, C.; JIAN-ZHONG, W.; JIN-HAI, T. Polymorphisms in XRCC1 Gene, Alcohol drinking, and Risk of Colorectal Cancer: a Case-control Study in Jiangsu Province of China. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, v. 14, 2013.

CHING, A.; CALDWELL, K.S.; JUNG, M.; DOLAN, M.; SMITH, O.S.H; TINGEY, S; MORGANTE, M. & RAFALSKI, A. J. SNP frequency, haplotype structure and linkage disequilibrium in elite maize inbred lines. *BMC Genetics*. v. 3, 2002.

CHRISTMANN, M.; TOMICIC, M. T.; ROSS, W. P.; KAINA, B. Mechanisms of human DNA repair, an update. *Toxicology*, v. 193, p. 3-34, 2003.

CISA – Centro de informações sobre Saúde e Álcool. Disponível em: www.cisa.org.br/artigo/4429/relatorio-global-sobre-alcool-saude-2014.php. Acessado em: 03/03/2016

CORREIA, F.L.A. Desenho e montagem de método rápido para diagnóstico da Borreliose de Lyme por PCR em tempo real. Tese de Mestrado, Universidade Fernando Pessoa. Porto, 70 p, 2007.

CURIONI O. A.; CARVALHO, M. B. ; DEDIVITIS, R. A.; RAPPORT, A.; GATTAS, G. J. F. The Influence of Gene Polymorphisms on Tobacco and Alcohol-Induced Oral Cancer Risk. *Journal of Cancer Therapy*, v. 4, p. 978-988, 2013.

DUELL, E. J.; Holly, E. A.; BRACCI, P. M.; LIU, M. *et al.* A population-based, case-control study of polymorphisms in carcinogen-metabolizing genes, smoking, and pancreatic adenocarcinoma risk. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 94, n. 4, p. 297-306, 2002.

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.

FLORES-OBANDO, R.E; GOLLIN, S. M.; RAGIN, C.C. Polymorphisms in DNA damage response genes in head and neck cancer risk. *Biomarkers*, v. 15. n. 5, p.379-399. 2010.

FREITA, V.S. *et al.* Efeitos genotóxicos de fatores considerados de risco para o câncer bucal. *Revista Baiana de Saúde Pública*, v. 29, p. 189-199, 2005.

FREITA, 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 Droga*. (Ed. port.), Ribeirão Preto, v. 8, n. 2, p. 56-63, 2012.

FROSINA, G. Commentary: DNA base excision repair defects in human pathologies. *Free Radic Res*, v. 38, p. 1037–1054, 2004.

FRYER, A.A.; BIANCO, A.; HEPPLER, M.; PETER, W.J.; STRANGE, R.C.; SPITERI, M.A. Polymorphism at the Glutathione S-transferase GSTP1 Locus. *Am J Respir Crit Care Med* v.161, p. 1437-42, 2000.

GAO, C.M.; DING, J.H.; LI, S.P. *et al.* Polymorphisms in XRCC1 gene, alcohol drinking, and risk of colorectal cancer, a case- control study in Jiangsu Province of China. *Asian Pac J Cancer Prev*, v. 14, p. 6613-8, 2013.

GARTE, S., Gaspari, L., Alexandrie, A.K., *et al.* Metabolic Gene Polymorphism Frequencies in Control Populations. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, v. 10, p. 1239-1248, 2001.

GATTAS, G. J.; KATO, M.; SOARES-VIEIRA, J.A.; SIRAQUE, M.S.; KOHLER, P.; GOMES, L., REGO, M.A.; Bydlowski, S.P. Ethnicity and glutathione S-transferase (GSTM1/GSTT1) polymorphisms in a Brazilian population. *Braz J Med Biol Res*, v.337, p. 451-458, 2004.

GARCIA, L. P. & FREITAS, L. R. S. Consumo abusivo de álcool no Brasil: resultados da Pesquisa Nacional de Saúde. *Epidemiol. Serv. Saúde*, v. 24, p. 227-237, 2015.

GENETICS HOME REFERENCE - <https://ghr.nlm.nih.gov/> Genomic Research. Acessado em janeiro de 2017.

GHOSH, S.; BANKURA, B.; SAHA, M.L.; MAJI, S.; GHATAK, S.; PATTANAYAK, A. K. SADHUKHAN, S.; GUHA, M.; NACHIMUTHU, S.K.; PANDA, C.K.; MAITY, B.; DAS M. Association of DNA repair and xenobiotic pathway gene polymorphisms with genetic susceptibility to gastric cancer patients in West Bengal, India. *Tumour Biol.* v. 37, n. 7, p. 9139-49. 2016.

GIGLIOTTI, M. P.; TOLENTINO; E. S. MITA, N. E.; CHINELLATO, L. E. M. Principais mecanismos de atuação do álcool no desenvolvimento do câncer oral. *Odontologia Clínica Científica*, v. 7, p. 107-112, 2008.

GINSBERG, G.; ANGLE, K.; GUYTON, K.; SONAWE, B. Polymorphism in the DNA repair enzyme XRCC1: utility of current database and implications for human health risk assessment. *Mutation Research.* v. 727, p. 1-15, 2011.

GOODE, E.L.; ULRCH, C. M.; POTTER, J. D. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, v. 11, p. 1513-1530. 2002.

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.

HANDLER, J.A. & THURMAN, R.G. Redox interactions between catalase and alcohol dehydrogenase pathways of ethanol metabolism in the perfused rat liver. *Journal of Biological Chemistry*, v. 265, p.1510–1515, 1990.

HARADA, S.; MISAWA, S.; NAKAMURA, T.; TANAKA, N. *et al.* Detection of GST1 gene deletion by the polymerase chain reaction and its possible correlation with stomach cancer in Japanese. *Human genetics*, v. 90, p. 62-64, 1992.

HATAGIMA, A.; COSTA, E. C. G.; MARQUES, C. F. S. R. J. Koifman, P. Boffetta and S. Koifman, “Glutathione S-Transferase Polymorphisms and Oral Cancer: A Case-Control Study in Rio de Janeiro, Brazil,” *Oral Oncology*, v. 44, n. 2, p. 200-207, 2008.

HAYES, J.D.; FLANAGAM, J.U.; JOWSEY, I.R. Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* v. 45, p. 51-88, 2005.

HIGUCHI, R., FOCKLER, C., DOLLINGER, G., WATSON, R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology Nature Publishing Company* v. 11, p. 1026-1030, 1993.

HU, J.J.; SMITH, T.R.; MILLER, M.S.; MOHRENWEISER, H.W.; GOLDEN, A. *et al.* Amino acid substitution variants of APE1 and XRCC1 genes associated with ionizing radiation sensitivity. *Carcinogenesis* 22: 917-922. 2001.

HUBER, P. C. & ALMEIDA, W. P. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. *Química Nova*, v. 31, p. 1170-1179. 2008.

HUNG, R.J.; BOFFETTA, P., BROCKEMOLLER, J. *et al.* CYP1A1 and GSTM1 genetic polymorphisms and lung cancer risk in Caucasian non-smokers: a pooled analysis. *Carcinogenesis*, v. 24, p. 875- 882, 2003.

HUTCHISON, C.A., 3rd, DNA sequencing: bench to bedside and beyond. *Nucleic Acids Res*, v. 35, p. 6227-37, 2007.

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.

ISRAEL, Y.; HURWITZ, E.; NIEMELA, O.; ARNON, R. Monoclonal and polyclonal antibodies against acetaldehyde-containing epitopes in acetaldehyde-protein adducts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 83, p. 7923–7927, 1994.

JAREMKO, M.; JUSTENHHOVEN, C.; SSHORTH, W.; ABRAHAM, B.K.; FRITZ, P.; VOLLMERT, C.; ILLIG, T.; SIMON, W.; SCHWAB, M.; BRAUCH, H. Polymorphism of the DNA repair enzyme XRCC1 is associated with treatment prediction in anthracycline and cyclophosphamide/methotrexate/5-fluorouracil-based chemotherapy of patients with primary invasive breast cancer. *Pharmacogenet Genomics*. v. 17, p. 529-38, 2007.

JEHAN; T. & LAKHANPAUL, S. Single nucleotide polymorphism (SNP) - methods and applications in plant genetics: a review. *Indian J Biotechnol.* v. 5, p. 435–459, 2006.

KABZINSKI, J.; PRZBYLOWSKA, K.; MIK, M., *et al.* An association of ARG399GLN polymorphism of XRCC1 gene with a risk of colorectal cancer. *Polish J Surg*, 82, p. 677-80, 2010.

KELADA, S. N.; KARDIA, S. L. R.; WALKER, A. H.; WEIN, A. J. *et al.* The Glutathione S-Transferase- μ and- θ Genotypes in the Etiology of Prostate Cancer: Genotype-Environment Interactions with Smoking. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, v. 9, p. 1329-1334, 2000.

KIM, Sook-Un Kyoung-Mu Lee, Sue-Kyung Park, Keun-Young Yoo, Dong-Young Noh, Kook-Jin Choe, Sei-Hyun Ahn, Ari Hirvonene Daehee Kang. Genetic Polymorphism of Glutathione S-transferase P1 and Breast Cancer Risk. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 2004.

KOPUN, M. & PROPPING, P. The kinetics of ethanol absorption and elimination in twins and supplementary repetitive experiments in singleton subjects. *European Journal of Clinical Pharmacology*. v. 11, p. 337–344, 1977.

LANDI, S. 2000. Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review.

LARANJEIRA *et al.* (2013). Levantamento Nacional de Álcool e Drogas < INPAD > [Internet].

LENAD – Segundo Levantamento Nacional de Álcool e Drogas. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Políticas Públicas do Álcool e Outras Drogas. Universidade Federal de SÃO Paulo- UNIFESP. Relatório de 2012.

MACKAY, I. M.; MACKAY, J.F.; NISSEN, M.D.; SLOOTS, T.P. Real-time PCR: History and Fluorogenic Chemistries in Mackay, p.1-40, I.M. (Ed.), Real-Time PCR in Microbiology, From Diagnosis to Characterization. *Caister Academic Press Norfolk*, 2007.

MAGALHÃES, V. D. Efeito Radiomodificador do Resveratrol em Cultura de Células de Rbdomiossarcoma Humano (Rd) Aplicando O Teste do Cometa. Tese de Mestrado (Título de Mestre na Área de Tecnologia Nuclear) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - Autarquia associada à Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

MALUF, W. M. Citogenética Humana. Porto Alegre: Artmed, 2011.

MARQUES, A. T. da S. Etilismo 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

MARTINS, O. A. Efeito Do Consumo De Bebidas Alcoólicas No Organismo –Uma Revisão. *Revista Eletrônica de Educação e Ciência*, 2013.

MASCARENHAS, M. D. M.; NEVES, A C. M; MONTEIRO, R. A.; SILVA, M. M. A; MALTA, D. C. Atendimentos de emergência por causas externas e consumo de bebida alcoólica - capitais e Distrito Federal, Brasil. 2011. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 20, p. 1037-1046, 2015.

MATHIAS, C.; JAHNKE, V.; FRYER, A.A; STRANGE, R.C. First results on the influence of polymorphisms at glutathione S-transferase, cytochrome P450 and tumor necrosis factor gene loci on the development of multiple head and neck cancer. *Laryngorhinootologie*, v. 82, p.25-30, 2002.

MCCOUCH, S.R.; ZHAO, A.O. K., WRIGHT, M.; TUNG, C-W.; EBANA, K.; THOMSON. M.; REYNOLDS, A.; WANG, D.; DECLERCK, G.; Ali, M.D.L.; MCCLUNG, A.; EIZENGA, G. & Bustamante, C. Development of genome-wide SNP assays for rice. *Breeding Sci.* v. 60, 524–535, 2010.

MEIRELES, G. Avaliação Eco/Genotoxicológica dos Corantes Têxteis Reactive Blue 4 e Reactive Blue 15. Tese de Mestrado (Título de Mestre em Toxinologia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2013.

MESSAS, G. P. & Vallada Filho, H. P. O papel da genética na dependência do álcool. Rev. Bras. Psiquiatr., São Paulo, v. 26, p. 54-58, 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Saúde Mental no SUS: Os Centros de Atenção Psicossocial. Brasília-DF. Secretaria de Atenção à Saúde Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. 2004.

MITRUNEN, K.; JOURENKOVA, N.; KATAJA, V.; ESKELINEN, M.; KOSMA, V. M.; BENHAMOU, S.; VAINIO, H.; USITUPA, M.; HIIVONEN, A.. Glutathione S-transferase M1, M3, P1 and T1 genetic polymorphisms and susceptibility to breast cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, v. 10, p. 229-236, p. 2001.

NISSAR, S.; SAMEER, A. S.; RASOOL, R.; NISSAR, A. C.; Rashid, F. .Polymorphism of the DNA Repair Gene XRCC1 (Arg194Trp) and its role in Colorectal Cancer in Kashmiri Population: a Case Control Study. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, v. 16, 2015.

NORJMAA B.; SAITOH, T.; KASAMATSU, T.; MINATO, Y.; MURAKAMI, H. XRCC1 Arg194Trp and XRCC1 Arg399Gln Polymorphisms Affect Clinical Features and Prognosis of Myelodysplastic Syndromes. *The Kitakanto Medical Journal*, v. 65, p 11-19, 2015.

OCHIAI H. Single-Base Pair Genome Editing in Human Cells by Using Site Specific Endonucleases. *Int J Mol Sci* 16: 21128-37, 2015.

OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J.A.O. *Fundamentos de toxicologia*. 4ª edição. Editora Atheneu. São Paulo, 2014.

OLIVEIRA, S. F. V. Análise dos genes CYP1A1, CYP2D6 e GSTP1 em portadores de câncer de mama esporádico. UFP. 2006

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Alcohol. Geneva, Switzerland: World Health Organization. Disponível em: http://www.who.int/topics/alcohol_drinking/en/

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Global status report on alcohol and health. Geneva: WHO; 2011.

ÖSTLING, O., JOHANSON, K.J. Microeletrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 136, p. 291-298, 1984.

PASTORELLI, R.; BARDAZZI, G.; SAIEVA, C.; CERRI, A.; GESTRI, D.; ALLAMANI, A.; AIROLDI, L.; PALLI, D. Genetic determinants of alcohol addiction and metabolism: a survey in Italy. *Alcohol Clin Exp Res*. v. 25. p. 221–227, 2001.

PÖSCHL G.; SEITZ, H. K. Alcohol and cancer. *Alcohol.*, v. 39, n. 3, p. 155-65. 2004.

PRADO, B.B.F. Influência dos hábitos de vida no desenvolvimento do câncer. *Ciência e Cultura*, v. 66, 2014.

RADOÏ, L.; PAGET-BAILLY, S.; CYR, D.; PAPADOPOULOS, A.; GUIDA, F.; SCHMAUS, A.; CÉNÉE, S.; MENVIELLE, G.; CARTON, M.; LAPÔTRE-LEDoux, B.; DELAFOSSE, P.; STÜCKER, I.; LUCE, D. Tobacco smoking, alcohol drinking and risk of oral cavity cancer by subsite: results of a French population-based case–control study, the ICARE study. *European Journal of Cancer Prevention*, v. 3, p 268–276, 2013.

RAMOS, J. S. ANALISE DE POLIMORFISMOS NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *CITOCROMO P4502E1 (CYP2E1)* EM INDIVÍDUOS ETILISTAS DO MUNICÍPIO DE GOIÂNIA-GO. Dissertação de mestrado. Pontifícia Universidade Católica de Goiás. 2016.

RATNASINGHE D.; YAO, S.X.; TANGREA, J.A. *et al.* Polymorphism of the DNA repair gene XRCC1 and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, v. 10, p. 119-23. 2001.

REGITANO, L. C. A.; MÉO-NICIURA, S. C.; IBELLI, A. M. G.; GOUVEIA, J. J. S. Protocolos de biologia molecular aplicada à produção animal. 1. ed. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 66 p, 2007.

REIS, A. A. S. Estudo da associação do polimorfismo genético em carcinomas da tiróide. *Revista de Biologia Neotropical*, v. 7, p. 61-62, 2011.

RESZKA E.; CZEKAJ P.; ADAMSKA, J.; WASOWICZ, W. “Relevance of Glutathione S-Transferase M1 and Cytochrome P450 1A1 Genetic Polymorphisms to the Development of Head and Neck Cancers,” *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, v. 46, n. 8, p. 1090-1096, 2008.

ROUSE, J.; JACKSON, S.P. Interfaces between the detection, signaling, and repair of DNA damage. *Science*, v. 297, n. 547–551. 2002.

ROUSSI, K.; OUERHANI, S.; MARRAKCHI, R.; SLAMA, M. R. B. *et al.* Combined effect of smoking and inherited polymorphisms in arylamine Nacetyltransferase 2, glutathione S-transferases M1 and T1 on bladder cancer in a Tunisian population. *Cancer genetics and cytogenetics*, v. 190, n. 2, p. 101-107, 2009.

SAADAT, M. Haplotype analysis of XRCC1 (at codons 194 and 399) and susceptibility to breast cancer, a meta-analysis of the literatures. *Breast Cancer Res Treat.* 2010.

SANGER, F., *et al.*, Nucleotide sequence of bacteriophage [phi] X174 DNA. *Nature*, v. 265, p. 687-695. 1977.

SANTOS, D. F. 2013. Uma embriaguez patológica. *Revista Frontal*. Portugal. revistafrontal@ae.fcm.unl.pt. Acesso em maio de 2017.

SCHIMIDT, M.I. *et al.* Chronic non-communicable diseases in Brazil: burden and current challenges. *The Lancet*, v. 377, n.9781, p.1949–1961, 2011.

SCHNAKENBERG, E.; BREUR, R.; WERDIN, R.; DREIKORN, K.; SCHLOOT, W. Susceptibility genes: GSTM1 and GSTM3 as genetic risk factors in bladder cancer. *Cytogenet. Cell Genet*, v. 91, p. 234-238, 2000.

SCHNEIDER J.; CLASSEN V.; HELMIG S. XRCC1 polymorphism and lung cancer risk. *Expert Rev Mol Diagn* 8: 761-780, 2008.

SEITZ, H.K.; STICKEL, F.; HOMAN, N. Pathogenetic mechanisms of upper aerodigestive tract cancer in alcoholics. *International Journal of Cancer*, v. 108, p. 483–487, 2004.

SETSHEDI, M.; WANDS, J. R.; R.; MONTE, S. M. Acetaldehyde adducts in alcoholic liver disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 3, n. 3, p. 178-185. 2010.

SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*, v. 175, p. 184–191. 1988.

SITIMAZIRAS, M.; AZLAN, H.; ABDUL, A. B.; RAVINDRAM, A. Association of GSTM1, GSTT1 and GSTP1 Ile105Val polymorphisms with clinical response to Imatinibmesylate treatment among Malaysian Chronic Myeloid Leukemia patients, v. 96, n. 1, 2017.

SOARES, J. P.; CORTINHAS, A.; BENTO, T.; LEITÃO, J. C.; COLLINS, A. R.; GAIVÃ, I e Mota, M.M. Aging and DNA damage in humans: a meta-analysis study. *Aging (Albany NY)*. v,6. n. 6,p. 432–439, 2014.

SOBBI, R. L. *et al.* Genetic polymorphisms of the CYP1A1, CYP2E1, GSTM1 and GSTT1 genes and lung cancer susceptibility in a north Indian population. *Mol. Cell Biochem*, v. 266, p. 1-9, 2004.

SOUSA, H. Técnicas de diagnóstico em virologia. Unidade local de saúde do nordeste. 2012.

SPEIT, G. Protocol for the application of the alkaline single cell gel test (SCG – Test or Comet – Assay) to detection of DNA damage in eukaryote cells. Publicação Avulsa, 1995.

STERPONDE, S.; COZZI, R. Influence of XRCC1 genetic polymorphisms on ionizing radiation-induced DNA damage and repair. *J nucleic acids*, p. 1-6, 2010.

STRANGE, R. C.; SPITERI, M. A.; RAMACHANDRAN, S.; Fryer, A. A. Glutathione S-transferase family of enzymes. *Mut. Res.* v. 482, p.21–26, 2001.

VARGAS, D; BITTECOURT, M. N. Álcool e etilismo: atitudes de estudantes de Enfermagem. *Rev Bras Enferm*, v. 66, p. 84-89, 2013.

WENG, Z. Y., LU, *et al.* Effects of XRCC1 gene-environment interactions on DNA damage in healthy Japanese workers. *Environmental Molecular Mutagenesis*, v. 49, n.9, p. 708-719, 2009.

WHALEN, R & T. BOYER, “Human Glutathione S-Transferase,” *Seminars in Liver Disease*, v. 18, n. 4, p. 345-358, 1998.

WANG, L.; YIN, F.; XU, X.; HU, X; ZHAO, D. X-ray repair cross-complementing group 1 (XRCC1) genetic polymorphisms and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis. *PLoS One*, v. 7. 2012.

ZHANG, Y.; LI-PING, S.; CHENG-ZHONG, X., QIAN, X., CAI-YUN, H;, PING, L.; YUE-HA, G.; YUN-PENG, L.; YUAN, Y. Interaction between *GSTP1* Val Allele and *H. pylori* Infection, Smoking and Alcohol Consumption and Risk of Gastric Cancer among the Chinese Population. *PLoS One*, v. 7, n. 10, e47178, 2012.

YAN, L.D.; YANAN, *et al.* Polymorphisms of XRCC1 gene and risk of gastric cardiac adenocarcinoma. *Dis Esophagus*, v. 22, n. 5, p. 396-401, 2009.

YI, Z.; ZHEN, W,; QUIANG, W.; YIXIA, L. Genetic Polymorphisms of DNA Repair Genes XRCC1 and XRCC3 and Risk of Colorectal Cancer in Chinese Population. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, v. 13, 2012.

YIN, M.; TAN, D.F.; WEI, Q.Y. Genetic variants of the XRCC1 gene and susceptibility to esophageal cancer: a metaanalysis. *Int J Clin Exp Med*, 2, 26–35, 2009.

YU, H.; XIE, W.; WANG, J.; XING, Y.; XU, C. Gains in QTL Detection Using an Ultra-High Density SNP Map Based on Population Sequencing Relative to Traditional RFLP/SSR Markers. *PLoS ONE*. v.6, 2011.

ZAKHARI, S. Alcohol Metabolism and Epigenetics Changes. *Alcohol Research: Current Reviews*, v. 35 n. 1, 2013.

ZAKHARI, S. Overview: How Is Alcohol Metabolized by the Body? *Alcohol Research & Health*. v. 29, 2006.

ANEXO I

COMITÊ DE ÉTICA

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 Álcool

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: 20625113.8.0000.5083

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 Reitoria Térreo Cx. Postal 131

Bairro: Campus Samambaia

CEP: 74.001-970

UF: GO

Município: GOIANIA

Telefone: (62)3521-1215

Fax: (62)3521-1163

E-mail: cep.prppg.ufg@gmail.com

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
GOIÁS - UFG



Continuação do Parecer: 476.938

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 esfoliado 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 abstêmios 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 à 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 Reitoria Térreo Cx. Postal 131
Bairro: Campus Samambaia **CEP:** 74.001-970
UF: GO **Município:** GOIANIA
Telefone: (62)3521-1215 **Fax:** (62)3521-1163 **E-mail:** cep.prppg.ufg@gmail.com

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
GOIÁS - UFG



Continuação do Parecer: 476.938

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 tornados 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.

GOIANIA, 03 de Dezembro de 2013

Assinador por:
João Batista de Souza
(Coordenador)

Endereço: Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131
Bairro: Campus Samambaia **CEP:** 74.001-970
UF: GO **Município:** GOIANIA
Telefone: (62)3521-1215 **Fax:** (62)3521-1163 **E-mail:** cep.prppg.ufg@gmail.com

ANEXO II**PROTOCOLO DE ENSAIO COMETA - METODOLOGIA ALCALINA, ADAPTADO DE SING, 1988**

Equipamentos, Materiais, Reagentes e Metodologia

Ensaio Cometa Metodologia Alcalina**Equipamentos:**

- | | |
|--|-------------------------|
| 1. Banho-Maria Horizontal | 7. Cuba de eletroforese |
| 2. Agitador Magnético | 8. Fonte |
| 3. Pipetas P20 e P200 | 9. Máquina de gel |
| 4. Deionizador (H ₂ O deionizada) | 10. Peagâmetro |
| 5. Microcentrífuga | 11. Balança de precisão |
| 6. Microscópio ótico e fluorescência | |

Materiais:

- | | |
|---------------------------|--|
| 1. Lâminas de ponta fosca | 11. Pisseta |
| 2. Pinças | 12. Erlenmeyer 1000mL |
| 3. Placa de petri | 13. Berço horizontal |
| 4. Papel alumínio | 14. Provetas de 100mL e 1000mL |
| 5. Rolo de papel | 15. Estantes para tubos eppendorf e falcon |
| 6. Lamínulas 24x60 mm | 16. Caixa para armazenamento de lâminas |
| 7. Ponteiros P20-P200 | 17. Bequer de 50mL, 100mL, 200mL e 1000mL |
| 8. Tubos eppendorf de 2mL | 18. Vidraria para armazenamento de soluções com âmbar de 1000mL |
| 9. Tubos falcon de 50mL | 19. Caixa de isopor que caiba a cuba de eletroforese e que tampe |
| 10. Pipeta de Pauster | |

Reagentes:

- | | |
|--------------------------------|--|
| 1. Brometo | 9. DMSO |
| 2. Álcool absoluto | 10. Lauril Sarcosinato de Sódio |
| 3. H ₂ O deionizada | 11. Agarose |
| 4. NaCl | 12. Agarose Low Meltin |
| 5. EDTA | 13. PBS (se necessário preparo com KCl, KH ₂ PO ₄ , NaCl, Na ₂ HPO ₄) |
| 6. NaOH | |
| 7. TRIS | |
| 8. TRITON X-1000 | |

Preparo de Soluções

Solução de Lise (Estoque) 1000mL			
Passo	Quantidade	Reagente	PM
1	890 mL	H ₂ O deionizada (Milique)	
2	146,1g	NaCl (Cloreto de Sódio) 2,5M	
3	37,2g	EDTA (Ácido Etilenodiaminotetracético) 100mM	372,24
4	1,2g	TRIS 10 mM	121,14
5	8g	NaOH (Hidróxido de sódio)	40,0
6	10g	Lauril Sarcosinato de sódio	

Preparo: Dissolver os reagentes do passo 2 ao 5 na água e homogeneizar no agitador com bailarina (bem lentamente para não haver a formação de grumos) acertar o **pH para 10** com NaOH e após dissolver o reagente 6 aos poucos na solução.

- A. Todo o procedimento é realizado sem aquecimento da solução
- B. A solução deve ser estocada na temperatura ambiente, e no escuro (nessas condições a solução pode ser mantida até seu uso total)
- C. 8g de NaOH é suficiente para ajuste de pH

Solução de Lise (Uso) 100mL			
Passo	Quantidade	Reagente	PM
1	1 mL	TRITON X-100	
2	10 mL	DMSO	
3	89 mL	Solução Estoque	

Preparo: Misturar bem, invertendo a proveta. Essa solução é preparada na hora de uso, não podendo ser armazenada de um dia para outro. Após realizada, deverá ser abrigada fora do alcance da luz (embalar com papel alumínio). Como essa solução é utilizada gelada coloca-se a solução nos berços embalados em papel alumínio na geladeira por volta de 40 min a 60min. Trabalhar com a luz apagada, se possível.

- A. A solução é feita na hora e armazenada no escuro (embalar com papel alumínio)
- B. Deixar a solução no berço de lâminas no escuro por volta de 40-60 min em temperatura de 4°C, antes de colocar as lâminas. A solução tem que ficar gelada.
- C. Utiliza-se uma micropipeta para pegar o TRITON, mas devido a sua viscosidade corta-se a ponta da ponteira.

Tampão de Eletroforese					
Passo		2L	1L	Reagente	PM
1	Quantidade	21,6g	10,8g	NaOH (300mM)	
2		9mL	4,5mL	EDTA (200mM)	
3		1800mL	900mL	Água deionizada	

Preparo: Para cada corrida de eletroforese preparar o tampão no dia da corrida e guardar na geladeira. Misturar bem o os reagentes. Acertar o pH para 13 (**pH≥13**) com NaOH.

- A. Volume total de tampão depende da capacidade da cuba de eletroforese
- B. Acertar a amperagem e a voltagem acrescentando ou tirando tampão
- C. Aproximadamente = 25 V e 300 mA.

Tampão de Neutralização			
Passo	Quantidade	Reagente	PM
1	24,25 g	TRIS	
2	475ML	Água deionizada	

- A. Acertar o pH para 7,5 com HCl.
- B. Estocar em temperatura ambiente
- C. Esta solução pode fugir facilmente

Solução de Coloração (Estoque) 20%			
Passo	Quantidade	Reagente	PM
1	10 mg	Brometo de Etídio	
2	50 ml	Água deionizada	

- A. Estocar em temperatura ambiente

Solução de Coloração (Uso) 2%			
Passo	Quantidade	Reagente	PM
1	1 mL	Solução Estoque	
2	9 mL	Água Deionizada	

- A. Filtrar, se necessário

PBS 1000mL			
Passo	Quantidade	Reagente	PM
1	0,2g	H ₂ O deionizada (Milique)	
2	0,2g	NaCl (Cloreto de Sódio) 2,5M	
3	8g	EDTA (Ácido Etilenodiaminotetracético) 100mM	372,24
4	1,15g	TRIS 10 mM	121,14
5	1000mL	NaOH (Hidróxido de sódio)	40,0

Obs.: Acertar o pH para 7,4, sendo que normalmente atinge esse valor. Caso isso não ocorra é possível que os reagentes estejam com problemas ou houve erro na pesagem destes. Estocar em refrigerador e fazer no balão volumétrico.

Agarose normal – 1,5%			
Passo	Quantidade	Reagente	PM
1	1,5g	Agarose normal	
2	100 mL	PBS	

Preparo: Dissolver bem a agarose no agitador com bailarina por volta de 2 a 3h. Aquecer no micro-ondas e quando levantar fervura desligar. Transferir para o tubo falcon 50 mL e levar para o banho-maria a 80 °C.

Agarose de Baixo Ponto de fusão-Low melting (LMR)			
Passo	Quantidade	Reagente	PM
1	0,1 g	Agarose LMR	
2	20 mL	PBS	

Preparo: Dissolver bem a agarose e leva-la ao micro-ondas e quando levantar fervura desligar. Levar para o banho-maria a 40°C para que a agarose permaneça na forma liquida se necessário aquecer novamente no micro-ondas.

Antes de Começar a Metodologia

Preparar as soluções:

- A. Solução de lise estoque
- B. Tampão de neutralização
- C. Solução de coloração
- D. PBS se houver necessidade de preparo caseiro, normalmente se compra pronto para uso.

Preparo da Lâmina

- A. Utilizar lâminas novas (nunca reutilize lâminas).
- B. Lavar as lâminas com agua e sabão. Deixar secar na vertical a T.A.
- C. Limpar com álcool 70%.
- D. Preparar **Agarose Normal A 1,5%**.
- E. Transferi-la para tubo falcon de 50 mL (esse tubo cabe certinho a lâmina).
- F. Levar para o Banho Maria a **80 °C** para que a agarose se mantenha na forma liquida.

- G. Mergulhar as **Lâminas** na agarose com auxílio da Pinça até chegar na ponta fosca.
- H. Colocar as Lâminas na horizontal.
- I. Procurar formar uma camada bem fina e homogeneia, cuidado ao retirar a lâmina e mantendo-a bem reta.
- J. Limpar o outro lado da lâmina para tirar o excesso da agarose.
- K. Deixar a lâmina secar “**overnight**” na horizontal em temperatura ambiente.
- L. Armazenar na geladeira.
- M. Poder durar até 1 mês.

Metodologia 1º dia

1. Preparar a Solução De Lise Para Uso deixar na geladeira
 2. Pegar 15 µL de amostra colocar em um novo Eppendorf
- Obs.:** Homogeneizar bastante as amostras antes.
3. Pegar 120µl de Agarose Low Melting e homogeneizar junto com a amostra
 4. E colocar na Lâmina pré-preparada fazendo uma linha de fora a fora na lâmina
 5. Colocar a Lamínula para espalhar a amostra sobre a lâmina
- Obs.:** As etapas 18 a 20 tem que ser Rápida porque corre o risco de a agarose começar a solidificar o que dificulta espalhar a amostra.
6. Levá-la para a geladeira e esperar um pouco (1-5min)
 7. Tirar a Lamínula com bastante cuidado.
 8. Colocar as lâminas no Berço que contém a Solução De Lise Para uso na geladeira, ao abrigo da luz e aguardar 24 horas.
- Obs.:** Dependendo do ensaio esse tempo varia 1-48 horas. Normalmente 3h é o mínimo e 48h é o máximo.
9. Após o uso jogar fora o restante da solução de lise para uso.

Metodologia 2º Dia

1. Eletroforese
 2. Durante todo o procedimento manter **pouca luz** no laboratório, de preferência uma luz de fundo.
 3. Colocar no Erlenmeyer **900mL de H₂O Destilada** e deixar na Geladeira
- OBS.:** Essa água tem que estar gelada para preparo do **Tampão de Corrida**

4. Preparar a Cuba De Eletroforese

5. Colocar a **Cuba de Eletroforese** no **Isopor**
6. Fazer **Gelo** pra preencher o isopor sendo preencha o fundo e a Lateral da **Cuba de Eletroforese**.
7. Com a agua já gelada preparar o **Tampão de Eletroforese**.
8. Tirar a **Lâminas** da geladeira.

Obs.: As Lâminas estão na **Solução De Lise Para Uso**.

9. Coloca-las na cuba
10. Colocar sempre o lado **Fosco das Lâminas** para o sentido do Catodo (positivo)
11. Colocar o tampão de corrida de eletroforese com bastante cuidado

OBS.: Evitar a formação de bolhas, colocar até cobrir as **Lâminas** com uma camada **fina** de **Tampão de Eletroforese**.

12. Deixar as **Lâminas** em imersão no tampão de eletroforese por 30 minutos
13. Ajustar a amperagem na fonte para **25V e 0300mA**.
14. **OBS.:** para esse ajuste, altera-se a quantidade de tampão, se não atingiu a voltagem **retira-se** tampão de eletroforese, se não atingiu a mili amperagem, coloca-se tampão de eletroforese.
15. Deixa correr **30 minutos**

OBS.: esse tempo pode varia de **25-30 minutos**

16. Após a corrida, lavar as **Lâminas com Tampão de Neutralização** por **3-5 minutos**.
Repetir esse procedimento **3 vezes**.

OBS.: Essa lavagem pode realizada usando Berço, ou Suporte De Lâminas com auxílio da Pipeta de Pauster. Esse tampão não pode ser reutilizado, pois, a variação do pH.

17. Lavar as **lâminas** com **água destilada** com cuidado e deixar secar inclinado. Utilizar a Pisseta.
18. Fixar com **Álcool Absoluto** por **10 minutos**.
19. Deixar a **Lâmina** secar
20. Armazenar e **Caixa para Lâminas** a T.A.
21. Essas **Lâminas** podem ser armazenadas para leitura por até 4 meses

Leitura dos Danos Genéticos

1. Coloração da Lâmina
2. Preparar a solução de Coloração para Uso.
3. Colocar de 10 a 15 μ L de Brometo a 2% fazendo uma linha de fora a fora na Lâmina

OBS.: Fazer a linha bem no centro tomando cuidado para não sair fora da Lâmina.

4. Por a Lamínula

5. Levar ao Microscópio De Fluorescência imediatamente.

6. Fazer a captura na objetiva de 10x, aumento de 100x com filtro de 515-560nm e filtro de barreira de 590nm.

OBS.: Em relação a objetiva e o aumento vai de acordo com a quantidade de célula por campo que se deseja analisar e os filtros e de acordo com o microscópio do laboratório.

7. Analisa 100 células de cada amostra classificando conforme a forma e tamanho da cauda.

OBS.: 0 sem danos/ 1 poucos danos/ 2 médio dano/3 muitos danos

8. Depois da análise descartar a Lâmina

OBS.: Lâmina pode ser armazenada após a captura, porém, essa captura não pode demorar, pois é necessário a retirada da lamínula (retirar levantando, não arrastando).

APÊNDICE I

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 (pesquisadora responsável): *Profa. Daniela Melo e Silva, Dra.*

Doutoranda: Caroline Oliveira de Araújo Melo, MSc

Telefones: (62)9954-9591 (Pesquisadora responsável); (62) 3946-1385 (REPLICON)

Email: *silvadanielamelo@gmail.com*

O consumo abusivo de álcool traz inúmeras consequências para a saúde e qualidade de vida do indivíduo. O etilismo, 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 etilistas.

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 sigilo. 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,

Daniela de Melo e Silva
 Doutora em Biologia Animal
 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 acerca 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 II**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 etilismo. 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="checkbox"/> Diabetes | <input type="checkbox"/> Hipertensão | <input type="checkbox"/> Câncer |
| <input type="checkbox"/> Alergias | <input type="checkbox"/> Aborto | <input type="checkbox"/> Alterações congênicas |
| <input type="checkbox"/> 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	Logo após consumo		Nunca	Às vezes	Sempre	Logo 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	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Cansaço fácil	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Confusão mental	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Diarréias	<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 Fecal	<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"/>
Lacrimejamento	<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