



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

**AVALIAÇÃO DO DANO AO DNA PELO ENSAIO COMETA E  
ANÁLISE DOS PONTOS DE VARIAÇÃO DOS GENES *CYP2E1*, *CYP1A1*  
E *OGG1* EM ETILISTAS DO MUNICÍPIO DE GOIÂNIA-GO**

Mariana Paiva Lopes

Orientadora: Profa. Dra. Daniela de Melo e Silva

Goiânia

2018

**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: Mariana Paiva Lopes

Título do trabalho: AVALIAÇÃO DO DANO AO DNA PELO ENSAIO COMETA E ANÁLISE DOS PONTOS DE VARIAÇÃO DOS GENES CYP2E1, CYP1A1 E OGG1 EM ETILISTAS DO MUNICÍPIO DE GOIÂNIA-GO.

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento  SIM     NÃO<sup>1</sup>

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

Mariana Paiva Lopes  
Assinatura do(a) autor(a)<sup>2</sup>

Ciente e de acordo:

Daniela de Melo - M  
Assinatura do(a) orientador(a)<sup>2</sup>

Data: 12 / 06 / 2018

<sup>1</sup> 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.

<sup>2</sup> A assinatura deve ser escaneada.



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

**AVALIAÇÃO DO DANO AO DNA PELO ENSAIO COMETA E  
ANÁLISE DOS PONTOS DE VARIAÇÃO DOS GENES *CYP2E1*, *CYP1A1*  
E *OGG1* EM ETILISTAS DO MUNICÍPIO DE GOIÂNIA-GO**

Mariana Paiva Lopes

Orientadora: Profa. Dra. Daniela de Melo e Silva

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal de Goiás como requisito para obtenção do título de Doutor em Genética e Biologia Molecular.

Goiânia

2018

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

Paiva Lopes, Mariana

AVALIAÇÃO DO DANO AO DNA PELO ENSAIO COMETA E ANÁLISE DOS PONTOS DE VARIAÇÃO DOS GENES CYP2E1, CYP1A1 E OGG1 EM ETILISTAS DO MUNICÍPIO DE GOIÂNIA-GO [manuscrito] / Mariana Paiva Lopes, Daniela de Melo e Silva. - 2018. 84 f.

Orientador: Prof. 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, 2018.

Inclui lista de figuras, lista de tabelas.

1. Pontos de variação. 2. Etilistas. I. de Melo e Silva, Daniela . II. de Melo e Silva, Daniela , orient. III. Título.

CDU 575



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

**ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE TESE DE Nº 011**

1  
2 Aos 28 dias do mês de maio do ano de dois mil e dezoito (28/05/2018), às  
3 08hs30min, no Mini auditório do ICB IV /UFG, reuniram-se os componentes da  
4 banca examinadora: Profa. Dra. Daniela de Melo e Silva, orientadora; Profa.  
5 Dra. Michelle Rocha Parise; Prof. Dr. Hugo Freire Nunes; Profa. Dra. Emília  
6 Oliveira Alves Costa e Profa. Dra. Juliana Boaventura Avelar para, em sessão  
7 pública presidida pela primeira examinadora citada, procederem à avaliação  
8 da defesa de tese intitulada: "**AVALIAÇÃO DO DANO AO DNA PELO**  
9 **ENSAIO COMETA E ANÁLISE DOS PONTOS DE VARIAÇÃO DOS GENES**  
10 **CYP2E1, CYP1A1 E OGG1 EM ETILISTAS DO MUNICÍPIO DE GOIÂNIA-**  
11 **GO**", em nível de doutorado, área de concentração em **Genética e Biologia**  
12 **Molecular**, de autoria de **Mariana Paiva Lopes**, discente do Programa de  
13 Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal de  
14 Goiás. A sessão foi aberta pela presidente da banca, Profa. Dra. Daniela de  
15 Melo e Silva, que fez a apresentação formal dos membros da banca. A  
16 palavra, a seguir, foi concedida à autora da tese que, em cerca de \_\_\_\_\_  
17 minutos, procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a  
18 apresentação, cada membro da banca arguiu a examinada, tendo-se adotado  
19 o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se a  
20 avaliação da tese. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº 1294 de  
21 06 de Junho de 2014 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura  
22 (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Genética e  
23 Biologia Molecular, a tese foi APROVADA, considerando-se  
24 integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de  
25 Doutor (a) em Genética e Biologia Molecular pela Universidade Federal de  
26 Goiás. A conclusão do curso dar-se-á quando da entrega da versão  
27 definitiva da tese na secretaria do programa, com as devidas correções



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

28 sugeridas pela banca examinadora, no prazo de trinta dias a contar da data da  
29 defesa. Cumpridas as formalidades de pauta, às 11 horas e 00  
30 minutos, encerrou-se a sessão de defesa e, para constar, a presidente da  
31 Banca lavrou a presente ata que, após lida e aprovada, será assinada pelos  
32 membros da banca examinadora em três vias de igual teor.

33

34

*Daniela de Melo e Silva*

35

Profa. Dra. Daniela de Melo e Silva

36

**Presidente da Banca**

37

**UFG/GO**

38

39

*Michelle Rocha Parise*

40

Prof.ª. Dra. Michelle Rocha Parise

41

**UFG/GO**

42

43

*Hugo Freire Nunes*

44

Prof. Dr. Hugo Freire Nunes

45

**UFG/GO**

46

47

*Emília Oliveira Alves Costa*

48

Prof.ª. Dra. Emília Oliveira Alves Costa

49

**PUC/GO**

50

51

*Juliana Boaventura Avelar*

52

Prof.ª. Dra. Juliana Boaventura Avelar

53

**UFG/GO**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a minha Orientadora, Profa. Dra. Daniela de Melo e Silva, pelo apoio, confiança, pelo exemplo em pesquisa e por incentivar o meu crescimento na pós-graduação.

Ao meu noivo Thalles Abrão Doehler por todo apoio, incentivo e força nos momentos difíceis.

Aos meus queridos amigos de laboratório pelos momentos de descontração, ao grupo de graduandos, mestres, doutorandos e doutores do Laboratório de Mutagênese (LabMut) da Universidade Federal de Goiás por todo auxílio, suporte e disposição no desenvolvimento e padronização da metodologia utilizada nesse trabalho. Ao Dr. Leandro de Prado Felício pelo auxílio com as análises dos dados gerados.

Ao Laboratório de Genética e Biodiversidade (LGBio) da Universidade Federal de Goiás (UFG) pelo auxílio principalmente com os sequenciamentos. Ao Núcleo de Pesquisas Replicon do Departamento de Biologia da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-GO).

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal de Goiás e ao seu corpo docente pelos ensinamentos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás – FAPEG, pela Bolsa, que possibilitou a realização desse doutorado.

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

Aos membros da banca avaliadora por se disporem a oferecer seu tempo para contribuírem com a minha formação.

E a todos aqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para que o trabalho pudesse ser concluído, meu muito obrigada.

## RESUMO

O etanol é considerado a droga mais consumida no mundo, cujo o consumo crônico tornou-se um problema social e de saúde pública, pois traz graves consequências a saúde, sendo fator risco a diversas doenças e mortalidade. O gene *CYP2E1* codifica uma enzima que é a principal constituinte do sistema microssomal de oxidação do etanol. O gene *CYP1A1* codifica uma enzima que como a *CYP2E1* atua na biotransformação oxidativa de substratos de fase I do metabolismo de xenobióticos como o etanol. Além disso, genes relacionados ao reparo de DNA como o *OGG1* também são de grande importância, pois estão envolvidos na proteção do genoma auxiliando na manutenção das funções celulares dos organismos. Problemas no processo de reparo podem interferir negativamente no envelhecimento e promover o desenvolvimento de doenças como vários tipos de câncer. Variações genéticas presentes nesses genes resultam em diferenças significativas na atividade enzimática. Porém, ainda não existe uma correlação evidente entre o significado funcional dessas variações tanto no metabolismo do etanol quanto no reparo em etilistas. No presente estudo, a variabilidade de regiões específicas dos genes *CYP2E1*, *CYP1A1* e *OGG1* foram analisadas em amostras de etilistas de um Centro de Atenção Psicossocial (CAPS) do município de Goiânia, do Estado de Goiás e os resultados foram comparados com os dados obtidos pelo projeto *1000Genomas*. Foi realizado um estudo de associação entre pontos de variação desses genes e o dano ao DNA em etilistas, para isso foram realizadas reações de sequenciamento e o ensaio cometa, respectivamente. Não houve relação entre os dados dos pontos de variação encontrados com o dano ao DNA. Entretanto, na análise do dano ao DNA entre os grupos caso e controle foi observado maior dano nos etilistas em relação ao grupo controle. As frequências genotípicas aderiram ao esperado pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg para todos os pontos de variação nas amostras brasileiras. Com base nos pontos de variação do gene *CYP2E1*, 15 haplótipos foram inferidos. Desses, apenas 4 haplótipos foram frequentes em todas as populações. Enquanto que com base nos dois pontos de variação dos genes *CYP1A1* e *OGG1*, foram inferidos 3 haplótipos para cada gene, todos presentes na população brasileira de estudo.

**Palavras-chave:** etanol; metabolismo; reparo; pontos de variação, ensaio cometa.

## ABSTRACT

Ethanol is considered the most consumed drug in the world, is part of several cultures. However, chronic ethanol consumption has become a social and public health problem, since it has serious health consequences and is a risk factor for several diseases and mortality. The *CYP2E1* gene encodes an enzyme that is the main constituent of the microsomal oxidation system of ethanol. The *CYP1A1* gene encodes an enzyme that, like *CYP2E1*, acts on the oxidative biotransformation of phase I substrates of the metabolism of xenobiotics such as ethanol. In addition, genes related to DNA repair such as *OGG1* are also of great importance as they are involved in protecting the genome by helping to maintain the cellular functions of organisms. Problems in the repair process can interfere with aging and promote disease development. Genetic variations in these genes result in significant differences in enzyme activity. However, there is still no clear correlation between the functional significance of these variations in both ethanol metabolism and ethylene repair. In the present study, the variability of specific regions of the *CYP2E1*, *CYP1A1* and *OGG1* genes were analyzed in samples of alcoholics from a Psychosocial Care Center (CAPS) of the State of Goiás, in the city of Goiânia, and the results were compared with the data obtained by the 1000Genomas project. A study of the association between the polymorphism of these genes and the damage to the DNA in ethanol was carried out. Sequencing reactions and the comet assay were performed. There was no relation between the data of the polymorphism found with DNA damage. However, in the analysis of the DNA damage between the case and control groups, greater damage was observed in the alcoholics in relation to the control group. The genotypic frequencies adhered to that expected by the Hardy-Weinberg Equilibrium for all the polymorphism in the Brazilian samples. Based on the polymorphism of the *CYP2E1* gene, 15 haplotypes were inferred. Of these, only 4 haplotypes were common in all populations. While based on the two polymorphism of the *CYP1A1* and *OGG1* genes, 3 haplotypes were inferred for each gene, all present in the Brazilian study population.

**Palavras-chave:** ethanol; metabolism; repair; polymorphism.

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1.</b> Representação esquemática das vias oxidativas do metabolismo do etanol.....	18
<b>Figura 2.</b> Ciclo Funcional do Citocromo P450.....	20
<b>Figura 3.</b> Representação esquemática da análise dos cometas no programa <i>CometScore</i> (versão 1.5) .....	36
<b>Figura 4.</b> Representação dos danos ao DNA detectados pelo Ensaio Cometa.....	45
<b>Figura 5.</b> DL entre os pares de SNPs no gene <i>CYP2E1</i> .....	53

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Nomenclatura dos alelos do gene <i>CYP2E1</i> .....	22
<b>Tabela 2.</b> Nomenclatura dos alelos do gene <i>CYP1A1</i> .....	23
<b>Tabela 3.</b> Reagentes e concentrações utilizadas para a amplificação do gene <i>CYP2E1</i> .....	37
<b>Tabela 4.</b> Ciclagem de temperaturas utilizadas para o gene <i>CYP2E1</i> .....	37
<b>Tabela 5.</b> Reagentes e concentrações utilizadas para a amplificação do gene <i>CYP2E1</i> .....	38
<b>Tabela 6.</b> Ciclagem de temperaturas utilizadas para o gene <i>CYP1A1</i> . ....	38
<b>Tabela 7.</b> Reagentes e concentrações utilizadas para a amplificação do gene <i>OGG1</i> . ....	38
<b>Tabela 8.</b> Ciclagem de temperaturas utilizadas para o gene <i>OGG1</i> .....	38
<b>Tabela 9.</b> Reagentes e concentrações utilizadas na reação de sequenciamento .....	40
<b>Tabela 10.</b> Características dos grupo caso e controle. ....	44
<b>Tabela 11.</b> Comparação dos danos ao DNA entre os grupos caso e controle. ....	45
<b>Tabela 12.</b> Correlação dos parâmetros do ensaio cometa com as variáveis de tabagismo e etilismo para o grupo caso.....	46
<b>Tabela 13.</b> SNPs da região promotora do gene <i>CYP2E1</i> , do éxon 6 e 7 do gene <i>CYP1A1</i> e do éxon 6 do gene <i>OGG1</i> identificados nesse estudo. ....	46
<b>Tabela 14.</b> Comparação dos genótipos entre os grupos caso e controle. ....	47
<b>Tabela 15.</b> Estimativas da correlação dos parâmetros do ensaio cometa (média $\pm$ desvio padrão) e os genótipos individuais entre os etilistas. ....	48
<b>Tabela 16.</b> Estimativas da correlação dos parâmetros do ensaio cometa e os genótipos individuais entre o grupo controle. ....	49
<b>Tabela 17.</b> Pontos de variação dos genes <i>CYP2E1</i> , <i>CYP1A1</i> , <i>OGG1</i> e suas frequências em diferentes populações do projeto <i>1000Genomes</i> e em uma amostra de Goiânia. ....	51
<b>Tabela 18.</b> Aderência das frequências do genótipos ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg considerando as populações do projeto <i>1000Genomes</i> e a população brasileira. ....	52
<b>Tabela 19.</b> Haplótipos encontrados considerando os pontos de variação presentes na região promotora do gene <i>CYP2E1</i> .....	54
<b>Tabela 20.</b> Frequência relativa dos 15 haplótipos encontrados para o gene <i>CYP2E1</i> dos dados do projeto <i>1000Genomes</i> e das amostras brasileiras.....	55
<b>Tabela 21.</b> Haplótipos encontrados considerando os pontos de variação presentes na região estudada do gene <i>CYP1A1</i> .....	55
<b>Tabela 22.</b> Frequência relativa dos 3 haplótipos encontrados para o gene <i>CYP1A1</i> dos dados do projeto <i>1000Genomes</i> e das amostras brasileiras. ....	56
<b>Tabela 23.</b> Haplótipos encontrados considerando os pontos de variação presentes na região estudada do gene <i>OGG1</i> .....	56

**Tabela 24.** Frequência relativa dos 3 haplótipos encontrados para o gene *OGGI* dos dados do projeto *1000Genomes* e das amostras brasileiras. ....56

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
1.1	METABOLISMO DO ETANOL.....	17
1.2	CITOCROMO P4502E1 ( <i>CYP2E1</i> ).....	22
1.3	CITOCROMO P4501A1 ( <i>CYP1A1</i> ).....	24
1.4	OGG1.....	27
1.5	ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	29
1.6	ENSAIO COMETA E AVALIAÇÃO DO DANO AO DNA.....	30
1.7	PROJETO <i>1000Genomes</i> .....	31
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>33</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	33
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>34</b>
3.1	DESCRIÇÃO DAS AMOSTRAS.....	34
3.2	ENSAIO COMETA.....	34
3.3	OBTENÇÃO DOS DADOS MOLECULARES.....	36
3.3.1	PURIFICAÇÃO DO PRODUTO AMPLIFICADO.....	39
3.3.2	REAÇÕES DE SEQUENCIAMENTO.....	39
3.3.3	ANÁLISE DOS PRODUTOS DO SEQUENCIAMENTO.....	40
3.4	OBTENÇÃO DOS DADOS PÚBLICOS DO PROJETO <i>1000Genomes</i> .....	41
3.5	FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E ADERÊNCIA AO EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG.....	41
3.6	AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO E INFERÊNCIA COMPUTACIONAL DE HAPLÓTIPOS.....	42
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>44</b>
4.1	CARACTERIZAÇÃO DO GRUPO DE ESTUDO.....	44
4.2	DANOS AO DNA DETECTADOS PELO ENSAIO COMETA.....	45
4.3	PONTOS DE VARIAÇÃO ENCONTRADOS NO SEQUENCIAMENTO.....	46
4.4	COMPARAÇÃO DOS GENÓTIPOS ENTRE OS GRUPOS CASO E CONTROLE.....	47
4.5	DANOS AO DNA DETECTADOS PELO ENSAIO COMETA NOS GRUPOS CASO E CONTROLE DISTRIBUÍDOS DE ACORDO OS PONTOS DE VARIAÇÃO DOS GENES <i>CYP2E1</i> , <i>CYP1A1</i> E <i>OGG1</i> .....	48
4.6	FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E ADERÊNCIA AO EQUILÍBRIO DE HARDY-WEIBERG 50	50
<b>5</b>	<b>DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO</b> .....	<b>53</b>
<b>6</b>	<b>DIVERSIDADE, FREQUÊNCIA E RELAÇÕES ENTRE OS HAPLÓTIPOS</b> .....	<b>54</b>
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>57</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>62</b>
<b>9</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>63</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O etanol é um xenobiótico psicoativo com propriedades que podem levar a dependência. É comumente consumido por diversas culturas. No Brasil o consumo do etanol iniciou-se com a instalação dos primeiros engenhos para produção de açúcar através da cana, obtendo-se a aguardente. Com o decorrer dos anos a cachaça tornou-se popular, e dessa forma, o consumo de álcool aumentou na população brasileira (Pinheiro et al., 2011). O consumo crônico do etanol tem se tornado cada vez mais comum, e provocando assim, o etilismo, uma doença multifatorial na qual há interação de fatores genéticos e ambientais (Kohnke, 2008), está relacionada a diversos problemas sociais e de saúde, e impõe um alto custo a sociedade (Rehm et al., 2009; Organização Mundial de Saúde, 2015).

O consumo crônico de bebidas alcoólicas tornou-se um sério problema de saúde pública, é um fator de risco de grande impacto sobre a morbidade, mortalidade e incapacidades, atinge pessoas cada vez mais jovens, de todas as classes sociais e aumenta progressivamente. Morrem no Brasil e no Mundo em torno de 3,3 milhões (5,9%) de pessoas por ano vítimas do consumo abusivo de etanol. Doenças como câncer, cirrose, pancreatite aguda e crônica, doenças cardiovasculares, neurológicas, disfunções fisiológicas, diabetes *mellitus*, desordens mentais e comportamentais, incluindo acidentes de trânsito, violências e suicídios, são frequentemente associados ao consumo dessa substância (Dey & Cederbaum, 2006; Apte et al., 2009; WHO, 2014; Garcia & Freitas, 2015). A fisiopatologia do etilismo envolve vários processos bioquímicos, em que os sistemas de neurotransmissores e enzimas metabolizadoras podem ser afetados (Zakhari, 2006; Clapp et al., 2008). O etanol interfere na síntese e na atividade de neurotransmissores e seus receptores, como o glutamato, GABA e dopamina (Clapp et al., 2008; Kohnke, 2008; Moussas et al., 2009).

Em 1951 a Organização Mundial de Saúde (OMS) definiu o etilismo como problema médico e em 1956 foi admitido pela Associação Psiquiátrica Americana (APA, 1994) como uma doença psiquiátrica. Atualmente a OMS o define como uma doença caracterizada pela perda de controle sobre a bebida em que o indivíduo consome o etanol de forma crônica (OMS, 2014). A dependência em relação ao etanol é acompanhada de uma série de perturbações físicas, mentais e comportamentais (Mckay, 2011).

Os mecanismos pelos quais o consumo de etanol pode aumentar o risco de desenvolvimento de câncer estão associados à carcinogenicidade do acetaldeído, um metabólito que forma adutos de proteínas, inativa enzimas e resulta em prejuízos ao sistema de reparo do

DNA. O etanol pode agir como solvente e facilitar a penetração de carcinógenos nos tecidos. Além disso, pode aumentar o número de danos ao material genético, a peroxidação de lipídios e conseqüentemente levar a produção de radicais livres (Dobrossy, 2005; Choi, 2008). Quanto aos danos ao material genético, o ensaio cometa é um ensaio mutagênico de avaliação genotóxica utilizado como um marcador de exposição, a partir desse teste é possível medir as quebras simples, dano ao DNA dentro de células individuais (Lynch et al., 2011).

Várias enzimas metabólicas estão envolvidas na ativação e detoxificação de compostos carcinogênicos ou pró-carcinogênicos, como as enzimas de Fase I (álcool desidrogenase e citocromo P450) e de Fase II (glutathionas S-transferases e N-acetil-transferases). Porém, essas enzimas são polimórficas na população, e essa variação entre os indivíduos na metabolização dos carcinógenos e pró-carcinógenos tem sido relacionada com a suscetibilidade de cada indivíduo a doenças como câncer (Gattas et al., 2006; Boccia et al., 2008).

Mutações que ocorrem nos genes que codificam as enzimas de biotransformação podem levar a capacidade alterada do organismo em metabolizar xenobióticos (De Abreu Gaspar et al., 2003). Há influência genética em relação a dependência alcoólica e isso aumenta o interesse por estudos moleculares em indivíduos que fazem uso crônico ou que têm dependência ao etanol (Messas & Vallada Filho, 2004).

Os Citocromos P450 (*CYP450*) são heme-proteínas envolvidas nas biotransformações de vários compostos de origem endógena e exógena como xenobióticos. Biologicamente estas enzimas modificam, de forma química, moléculas exógenas lipofílicas, tornando-as mais solúveis e de fácil excreção pelo organismo. Porém, muitas moléculas, após sofrerem biotransformação, tornam-se reativas e causam danos teciduais. Além disso, alguns xenobióticos têm a capacidade de induzir ou inibir a produção de certos citocromos P450 (Marcon et al., 2003). As enzimas codificadas pelos genes *CYP2E1* e *CYP1A1* da superfamília do CYP450, atuam na biotransformação oxidativa de substratos de fase I do metabolismo de xenobióticos e são importantes na ativação de pró-carcinógenos. Variações genéticas nos genes que codificam essas enzimas determinam diferenças interpopulacionais na prevalência do etilismo (Vieira, 2012).

O gene *CYP2E1* participa de uma das vias envolvidas no metabolismo oxidativo do etanol e atinge níveis máximos de expressão após o consumo crônico de etanol, principalmente em tecidos mais vulneráveis aos danos causados por essa substância. A presença de regiões polimórficas neste gene e a influência que a enzima exerce no metabolismo do etanol tem estimulado estudos com o objetivo de descobrir o eventual papel de pontos de variação do gene *CYP2E1* na etiologia do etilismo (Marques, 2010).

A enzima codificada pelo gene *CYP1A1* tem atividade oxidativa. Catalisa a oxidação de PAHs (hidrocarbonetos aromáticos policíclicos) em produtos fenólicos e epóxicos. Quando ocorre a ligação de um composto indutor ao receptor de aril-hidrocarbono (Ah) *CYP1A1* é induzido e ativa a transcrição de vários genes que participam da metabolização de xenobióticos. A enzima *CYP1A1* é associada com a ativação de pro-carcinógenos principalmente em casos de cânceres de boca. Existem pontos de variação nesse gene que estão relacionados ao aumento da produção dessa enzima, isso resulta em produtos altamente reativos que estão relacionados a doenças como câncer (Indulski & Lutz, 2000).

O consumo concomitante de etanol e fumo constitui o principal fator de risco para o desenvolvimento de câncer de cabeça e pescoço. Por um lado, muitos indivíduos estão expostos a estes fatores de risco, por outro, somente alguns desenvolvem câncer, portanto existem diferenças genéticas individuais que influenciam a carcinogênese (Boccia et al., 2008). Existem variantes de *CYP1A1* sendo necessária a verificação dos haplótipos e do possível impacto de cada um deles como moduladores da susceptibilidade a doenças.

Além de genes envolvidos no metabolismo de xenobióticos como *CYP2E1* e *CYP1A1*, genes relacionados ao reparo de DNA também são de grande importância, pois estão envolvidos na proteção do genoma auxiliando na manutenção das funções celulares dos organismos (De Ruyck et al., 2007). Problemas no processo de reparo podem interferir no envelhecimento e promover o desenvolvimento de doenças. O organismo humano possui por volta de 150 genes responsáveis pelo reparo do DNA e 4 principais vias de regulação (Pramanik et al., 2011).

As principais vias de reparo são: o reparo por excisão de nucleotídeos (NER), que atua em lesões que geram distorção na hélice; reparo por excisão de bases (BER), repara danos a bases específicas em um único nucleotídeo e também em quebras na fita simples da cadeia de DNA (SSB, do inglês, single-strand break); reparo de mau emparelhamento (MMR), corrige mal emparelhamento em bases normais tentando manter o emparelhamento padrão proposto por Watson e Crick. E reparo de quebra de dupla fita (DSBR), que são reparados por dois mecanismos distintos: por junção de fitas não homólogas (NHEJ) e através de recombinação homóloga (HR). NHEJ repara diretamente pontas quebradas, enquanto que HR usa a cromátide irmã intacta como sequência base para reparar a que foi lesionada (Jeppesen et al., 2011).

Pontos de variação em genes de reparo, como o *OGG1* (8-Oxoguanina), podem representar fatores de suscetibilidade que promovem a redução na capacidade de reparo do DNA, danificam sua integridade, e assim aumentam os riscos de desenvolvimento de determinados cânceres (Zijno et al., 2006; Decordier et al., 2010). Ainda, podem modificar a

função desses genes e alterar a atividade de reparo do DNA, daí a importância em estudar o gene *OGGI* e relacioná-lo a indivíduos com histórico de consumo crônico de etanol.

Ponto de variação é denominado como a variação que é encontrada com frequência igual ou superior a 1% em uma população (Klug et al., 2011). Os cromossomos homólogos são similares dentro das espécies, mas em alguns *loci* pode haver essa variabilidade na sequência de DNA (Balasubramanian et al., 2004). Os SNPs (Pontos de Variação de Base Única) representam em torno de 90% de todas as variações no genoma humano. Por serem comuns podem ser utilizados como marcadores genéticos, ser aplicados na identificação de genes que estão associados a doenças, auxiliar na compreensão das diferenças na evolução clínica e resposta terapêutica entre diferentes pacientes atingidos pela mesma doença e que tem o mesmo tratamento. Além disso, pontos de variações genéticas permitem a avaliação da diversidade genética em uma população (Tardin et al., 2009; Pramanik et al., 2011).

Pontos de variação em genes que codificam enzimas envolvidas no metabolismo do etanol e em genes de reparo do DNA, bem como a interação entre eles, podem ser fatores genéticos que alteram a saúde do etilista e pode se tornar um fator favorável ou não ao desenvolvimento de doenças como, por exemplo, câncer (Gattas et al., 2006; Zakhari, 2006; Datta et al., 2007; Curioni, 2008; Cabral et al., 2010).

Assim, o estudo de pontos de variação nos genes *CYP2E1*, *CYP1A1* e *OGGI* possibilita avanços no conhecimento da genética molecular, podendo incorporá-los como novos biomarcadores, auxiliando no diagnóstico e no tratamento de doenças, aumentando os benefícios e minimizando os riscos individuais (Monçores et al., 2008). Estudos sobre a relação entre o consumo crônico de etanol, a gênese e os efeitos do etilismo ainda são insuficientes, sendo um campo que necessita de investigação (Mangueira, 2015).

## 1.1 METABOLISMO DO ETANOL

O álcool etílico ou etanol, fórmula química  $C_2H_5OH$ , possui densidade de 0,789g/ml a 20°C, é uma molécula pequena de peso molecular de 46,07, é um composto orgânico derivado de um grupo hidroxila (Garcia, 2009; Takamori, 2012; Vieira, 2012).

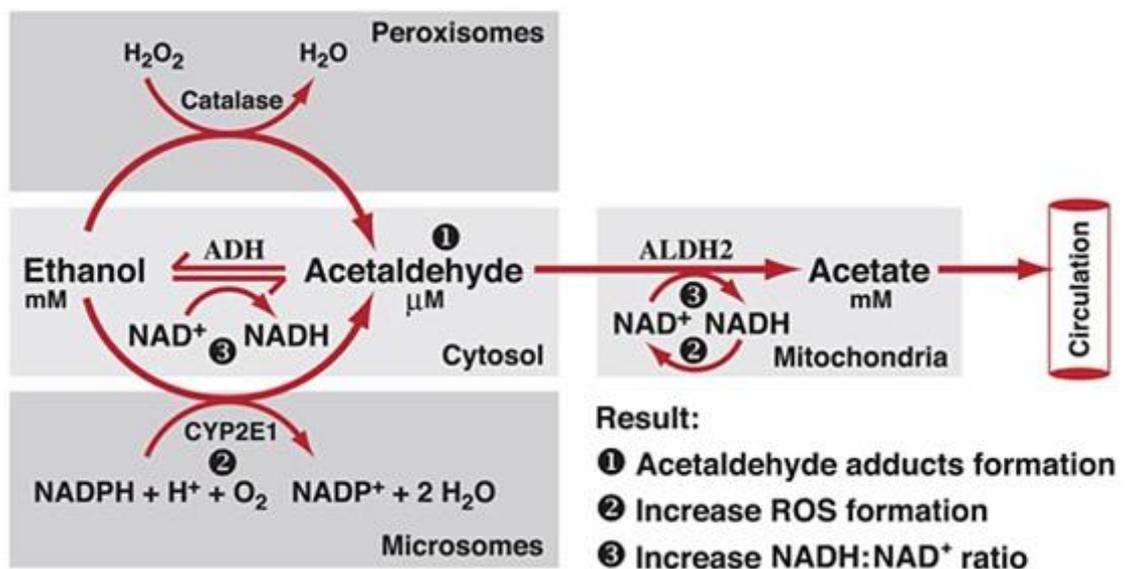
Por volta de 80% do etanol ingerido é absorvido de forma rápida pelo trato gastrointestinal, não existem enzimas digestivas para o etanol, portanto, não sofre processos de digestão (Cederbaum, 2012; Ramchandani, 2013). Essa absorção depende de fatores como volume e concentração do etanol, ingestão de alimentos, taxa de esvaziamento gástrico, perfusão sanguínea no estômago e duodeno, temperatura corporal e ciclo menstrual (Seitz & Mueller, 2010). Em torno de 2-10% do etanol ingerido é absorvido e excretado de forma

inalterada através dos pulmões, pele e rins. A maior parte é absorvida no fígado através da veia porta, onde é oxidado em acetaldeído, a partir deste em acetato e posteriormente convertido a acetil-Coenzima A (Mello et al., 2001; Zakhari, 2006; Seitz & Mueller, 2010; Vieira, 2012).

O metabolismo do etanol ocorre nos hepatócitos através de três sistemas enzimáticos distintos: via desidrogenase alcoólica, sistema microsossomal de oxidação (MEOS) e catalase, acontecem no citosol, retículo endoplasmático e peroxissomos, respectivamente (Setshedi et al, 2010; Vatsis, 2014) (Figura 1).

O etanol que se biotransforma no organismo passa por um processo oxidativo que ocorre em duas fases, a primeira ocorre ainda no citoplasma da célula, onde a enzima álcool desidrogenase (ADH) converte o etanol em acetaldeído, uma substância tóxica ao organismo humano e altamente reativa que pode contribuir para uma lesão tecidual (Zakhari, 2006; Cederbaum, 2012); e a segunda fase, em que a enzima aldeído desidrogenase (ALDH), localizada principalmente na mitocôndria hepática, converte o acetaldeído em acetato, que é convertido em dióxido de carbono e água liberando energia (Tseng, 2007; Seitz & Mueller, 2010; Taniguchi, 2011).

**Figura 1.** Representação esquemática das vias oxidativas do metabolismo do etanol (Adaptado de Zakhari, 2006).



A quebra do etanol pela enzima álcool desidrogenase (ADH) e então conversão a acetaldeído ocorre em indivíduos com ingestão moderada e ocasional. Nessa reação um próton de hidrogênio ( $H^+$ ) é removido da molécula do etanol e transferido para uma outra molécula, cofator nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD), que é reduzida a NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida). Essa reação fornece um alto valor energético proveniente da

NADH, que também participa de outras reações metabólicas passando o H<sup>+</sup> para outros compostos (Koop, 2006; Garcia, 2009; Vieira, 2012).

Nos indivíduos em que a ingestão de etanol é elevada e crônica o sistema microssomal de oxidação do etanol (MEOS) tem grande importância na metabolização desse composto. O principal componente do MEOS é a enzima Citocromo P450 isoforma 2E1, esta converte o etanol em acetaldeído e gera alto gasto de energia (ATP) (Vieira, 2012; Ramchandani, 2013). Nesta reação há liberação de um oxigênio e uma molécula reduzida, a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) que resulta em calor e na formação de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP) e água (Koop, 2006; Vogel, 2007; Leung & Nieto, 2013; Cederbaum, 2015).

Radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ROS) são gerados durante essas reações metabólicas e contribuem para o estresse oxidativo. As ROS podem interagir com lipídios, proteínas e DNA em um processo chamado de peroxidação, que pode ter consequências nocivas como a inativação de proteínas e danos ao DNA levando a morte celular (Koop, 2006; Vogel, 2007; Plemenitas, 2015).

Por volta de 2% de todo o etanol ingerido pode ser metabolizado através da enzima catalase e ocorre via peroxissomos (Cederbaum, 2012; Vieira, 2012; Waszkiewicz, 2012). Nesse sistema a oxidação do etanol ocorre com o consumo de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), posteriormente transformado em água, não há formação de ATP (WEBB et al., 2011; Ramchandani, 2013). Na fase final do metabolismo do etanol o acetato é convertido em acetil coenzima A (acetil CoA) com o desdobramento de ATP para AMP (adenosina monofosfato). A acetil CoA poderá entrar no ciclo do ácido cítrico (Ciclo de Krebs) transformando-se em dióxido de carbono e água (Zakhari, 2006; Cederbaum, 2012; Vieira, 2012).

O etanol é um composto que pode causar deficiências nutricionais devido a falhas na absorção intestinal e alterações em vias metabólicas, além disso, o acetaldeído é um possível promotor tumoral (Zheng et al., 2007; Silva et al., 2012).

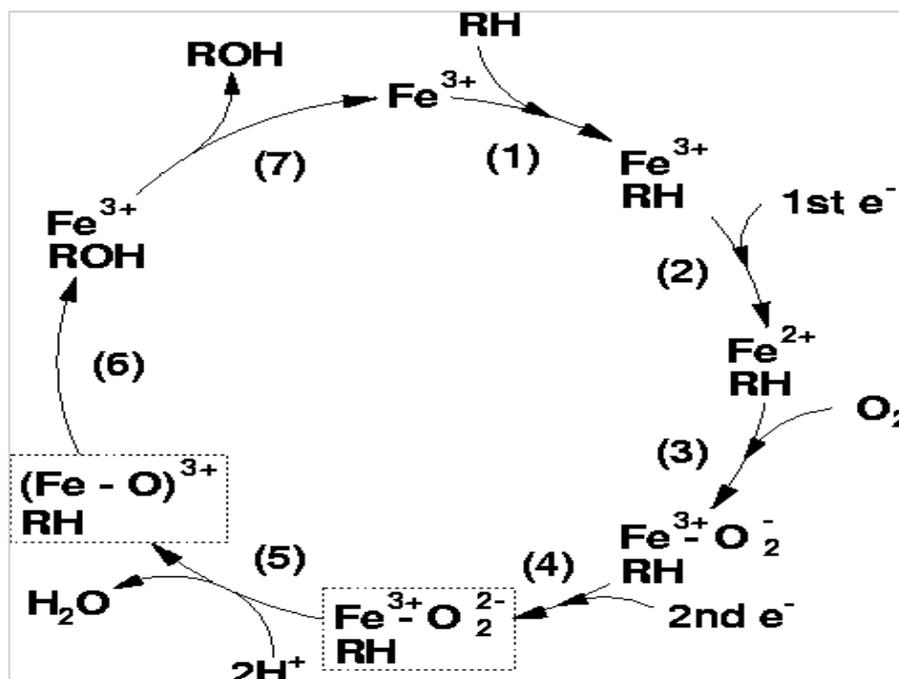
Enzimas componentes do Citocromo P450 (CYP450) atuam na metabolização do etanol. O CYP450 é uma superfamília de enzimas, classificadas como heme-proteínas, que possui atividade catalítica muito diversificada, essas enzimas estão envolvidas nas biotransformações de vários compostos de origem endógena e exógena bem como nas vias metabólicas do etanol (Cederbaum, 2008; Bozina et al., 2009; Cederbaum, 2015). É denominado CYP450 devido ao fato de estas enzimas se ligarem às membranas da célula (*cyto*) e por possuírem um grupamento tiol-heme, responsável pela absorção de luz a comprimentos

de onda próximos aos 450nm quando estão na presença de monóxido de carbono (Drummond, 2005; Marques, 2010; Cederbaum, 2015).

As enzimas CYP450 encontram-se ligadas à bicamada lipídica do retículo endoplasmático das células de vários órgãos como intestino, pulmões, cérebro e principalmente fígado. Participam do metabolismo de ácidos graxos, drogas, esteróides, carcinógenos e xenobióticos, possibilitando a excreção destes compostos pela inserção de um átomo de oxigênio (Cartmell et al., 2005; Drummond, 2005; Bibi, 2008; Cederbaum, 2008).

A reação ocorre quando o substrato se liga ao ferro heme da enzima, levando a uma alteração na conformação da enzima, que conseqüentemente leva a um aumento no potencial de redução, permitindo assim que esta seja reduzida pelo recebimento inicial de um elétron em sua molécula. Esse elétron promove a redução do íon férrico do grupo heme para íon ferroso, assim ocorre a fixação do oxigênio molecular, facilitando a transferência de um segundo elétron. O recebimento desse segundo elétron leva a ativação do oxigênio molecular, este se cliva, permitindo que um átomo de oxigênio seja inserido ao substrato, e o outro se combine com prótons e dois elétrons para formar água. Os dois elétrons requeridos pela enzima para a reação de monoxigenação são doados pela coenzima Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato em seu estado reduzido (NADPH) (Devlin, 2002) (Figura 2).

**Figura 2.** Ciclo Funcional do Citocromo P450.



As diversas CYP450 possuem uma nomenclatura baseada na homologia da sequência de aminoácidos. Os genes e as enzimas recebem a designação de CYP (citocromo P450), seguida da atribuição sequencial de um número árabe, letra e número árabe, correspondendo à

família, subfamília e gene específico dentro da subfamília respectivamente (Drummond, 2005; Cederbaum, 2008; Marques, 2010).

Em humanos são identificadas 18 famílias gênicas, 44 subfamílias, 58 pseudogenes, e 57 genes funcionais do CYP450. Os membros das subfamílias CYP1, CYP2 e CYP3 são descritos como sendo os mais envolvidos com o metabolismo de xenobióticos e participam da fase I (Hines, 2008; Bozina et al., 2009; Zanger & Schwab, 2013). Os genes *CYP1A1* e *CYP2E1* têm grande importância quando se trata do processo de carcinogênese humana. A mudança na expressão ou na função da enzima codificada pode resultar na ativação de pró-carcinógenos (Bozina et al., 2009).

O gene *CYP2E1* tem grande relevância no processo de metabolização de xenobióticos como o etanol, e o fato de haver variabilidade nos níveis de produção da enzima a torna uma fonte de diferença na suscetibilidade a ação dos xenobióticos. O gene *CYP1A1* possui as variantes *CYP1A1m1* e *CYP1A1m2*, que estão associadas a tumores como os de câncer de boca, cabeça e pescoço, também em indivíduos que consomem etanol de forma crônica (Reis, 2010).

O consumo de etanol é um dos fatores de risco para o desenvolvimento de câncer de boca. Quando há consumo com concentrações elevadas ocorre aumento da permeabilidade da mucosa bucal, promovendo a penetração de possíveis carcinógenos, além de promover aumento da proliferação epitelial e a modificação do processo de maturação das células (Llewellyn et al., 2004).

O consumo crônico do etanol pode reduzir a capacidade de reparo de DNA, pois a metabolização do etanol aumenta a produção de radicais livres, diminuindo mecanismos antioxidantes levando ao estresse oxidativo. O gene *OGG1* codifica a enzima de reparo 8-oxoguanina DNA glicosilase, que desempenha papel importante na via de Reparo por Excisão de Bases (BER) (Vidal et al., 2001), remove lesões ao DNA como bases reduzidas ou oxidadas e quebras de fitas simples.

Pontos de variação em genes que codificam as enzimas responsáveis pelo metabolismo do etanol podem causar diferenças entre indivíduos em relação ao acúmulo de metabólitos tóxicos como o acetaldeído. Assim como pontos de variação nos genes de reparo ao DNA são de grande importância, por ter a possibilidade de alterar a atuação da enzima de reparo e assim afetar a integridade do DNA, e desta forma aumentar o risco do organismo desenvolver doenças (Zijno et al., 2006).

Existe grande variabilidade genética nos genes que codificam essas enzimas, dessa forma se faz necessário estudos desses genes como possíveis fatores de risco para o etilismo e para o desenvolvimento de doenças (Zintzaras et al., 2006; Edenberg, 2007).

## 1.2 CITOCROMO P4502E1 (*CYP2E1*)

O gene que codifica o Citocromo P4502E1 (*CYP2E1*) está localizado em 10q24.3. De acordo com a sequência genômica NG\_008383.1 (número de acesso do NCBI), *CYP2E1* apresenta 9 éxons, 8 íntrons, codifica uma proteína de 493 aminoácidos e de aproximadamente 57 KDa (Drummond, 2005; Liao et al., 2011; Takamori, 2012). A enzima *CYP2E1* está envolvida na oxidação de uma série de componentes orgânicos de baixo peso molecular, incluindo benzeno, N-nitrosamina e etanol (Vogel, 2007; Zeng et al., 2013).

*CYP2E1* é uma enzima microsomal, principal constituinte do MEOS, induzida pelo etanol e responsável pela sua oxidação, é expressa em altos níveis no tecido hepático de indivíduos etilistas (Kato et al., 2003). A enzima atinge níveis máximos de expressão no fígado, principalmente nas regiões mais vulneráveis aos danos causados pelo etanol. Representa 7% do conteúdo total de CYP450 no fígado quando o consumo de etanol é elevado, é expressa em menores quantidades em outros locais, como o trato gastrointestinal e o cérebro (Cartmell et al., 2005; Marques, 2010; Takamori, 2012). Quando o etanol está presente no organismo em concentrações muito elevadas, exerce um forte efeito indutor na atividade catalítica da *CYP2E1* (Cartmell et al., 2005; Drummond, 2005).

O etanol promove um efeito indutor na atividade da enzima, o que pode levar a um aumento da transcrição e da estabilidade dessa enzima através de mecanismos transcricionais, pós-transcricionais e pós-traducionais. Por um lado, desempenha funções importantes ao nível do metabolismo, como na gliconeogênese, e na destoxificação de uma grande variedade de xenobióticos como o etanol, por outro, a atividade da *CYP2E1* promove a ativação de carcinogênicos, radicais livres e outros compostos tóxicos (Albano, 2006; Vogel, 2007; Marques, 2010).

Outros compostos endógenos ou exógenos, além do etanol, podem induzir a atividade de *CYP2E1*. Fatores como o estado nutricional e metabólico do organismo, obesidade ou diabetes também influenciam nos complexos mecanismos de regulação da atividade desta enzima (Cederbaum, 2012; Celorrio et al. 2012; Zanger & Schwab, 2013).

Foram descritos 7 alelos e 14 variantes alélicas para o gene *CYP2E1* essas variantes alélicas, presentes na Tabela 1, podem apresentar diferentes níveis de expressão da enzima, podendo influenciar a suscetibilidade individual a carcinógenos (Zanger & Schwab, 2013).

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

<b>ALELO</b>	<b>ALTERAÇÃO NUCLEOTIDICA</b>
<i>CYP2E1</i> * 1A	-1295G>C
<i>CYP2E1</i> * 1B	9896C>G
<i>CYP2E1</i> * 1C	6 repetições
<i>CYP2E1</i> * 1Cx2	
<i>CYP2E1</i> * 1D	8 repetições
<i>CYP2E1</i> * 2	1132G>A
<i>CYP2E1</i> * 3	10023G>A
<i>CYP2E1</i> * 4	4768G>A
<i>CYP2E1</i> * 5A	-1055C> T; 7632T>A
<i>CYP2E1</i> * 5B	-1295G>C; -1055C>T
<i>CYP2E1</i> * 6	7632T>A
<i>CYP2E1</i> * 7A	-333T>A
<i>CYP2E1</i> * 7B	-71G>T; -333T> A
<i>CYP2E1</i> * 7C	-333T>A; -352A>G

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

Neste estudo analisamos parte da região promotora do gene *CYP2E1*, que possui pontos de variação importantes, alguns parecem afetar a expressão da proteína, podem impedir a ligação do fator de transcrição Fator Hepatocítico Nuclear (HNF-1) e afetar a transcrição do gene (Drummond, 2005).

Nas posições -1055 a transição C/T, e -1295 a transversão G/C são pontos de variação localizados no sítio de ligação do fator de transcrição HNF-1 e podem estar relacionados com a expressão gênica do *CYP2E1* (Carvalho, 2012). Os dois pontos de variação estão associados com atividade de transcrição quase dez vezes maior, levando a um aumento da atividade catalítica da enzima quando comparados com indivíduos que não possuem essas alterações. Esses pontos de variação, -1295 e -1055, estão presentes na região 5', possuem alta prevalência e estão em desequilíbrio de ligação em algumas populações (Drummond, 2005; Bozina et al., 2009; Deka et al., 2010; Garcia-Banuelos et al., 2012; Ramchandani, 2013). Além disso, podem estar associados ao aumento da produção de acetaldeído endógeno em etilistas (Takamori, 2012).

O alelo selvagem, posição -1295, equivale a *CYP2E1*\*1A e o alelo mutante, com substituição G/C, corresponde a *CYP2E1*\*1B. O alelo selvagem, posição -1055 corresponde a *CYP2E1*\*5A e o alelo mutado, substituição C/T, corresponde a *CYP2E1*\*5B (Marichalar-Mendia et al., 2010; Ramchandani, 2013; Zanger & Schwab, 2013).

Existem diferenças nos resultados que foram obtidos em estudos que associam pontos de variação nesse gene e o etilismo. Fatores como diferenças étnicas entre as populações,

interação com outros genes e combinações de pontos de variação podem contribuir para esta diversidade de resultados. Por exemplo, diferentes grupos étnicos possuem diferenças nas frequências da distribuição das variantes alélicas do gene *CYP2E1* (Khan et al., 2009; Tang et al., 2010). Alguns alelos são mais frequentes em Asiáticos do que em Europeus. O alelo *CYP2E1\*5B* tem sido descrito com uma prevalência maior em populações asiáticas (cerca de 40% são homocigotos ou heterocigotos) em comparação com populações caucasianas (inferior a 8%) (Ramchandani, 2013) e em afro-americanos tem prevalência de 0,3% a 7% (Gemma et al., 2006; Deka et al., 2010).

Estudos sobre as variantes do gene *CYP2E1* estão sendo realizados para melhor interpretação do mecanismo biológico de ação das mutações, para assim compreender os mecanismos de regulação da transcrição e pós-tradução do gene e seu papel na metabolização do etanol (Cederbaum, 2008; Marques, 2010; Ramchandani, 2013).

### 1.3 CITOCROMO P4501A1 (*CYP1A1*)

O gene que codifica o Citocromo P4501A1 (*CYP1A1*) está localizado no braço longo do cromossomo 15 na região 15q22-24. De acordo com a sequência genômica NG\_008431.2 (número de acesso do NCBI), possui 7 éxons e 6 íntrons e um total de 5810 pb (Unsal et al., 2009). Do ponto de vista evolutivo o gene é bem conservado. É expresso principalmente em tecidos extra-hepáticos, tecidos epiteliais (Wen et al., 2011).

A transcrição de *CYP1A1* é induzida por agentes ambientais e tem expressão diferente em cada tipo de célula. É importante no metabolismo carcinogênico, catalisa a oxidação de potentes carcinógenos presentes no tabaco como Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) e o benzopireno, como de outros xenobióticos como teofilina, cafeína e substâncias endógenas como estradiol e estrona (Bozina et al., 2009; Reis, 2010).

A expressão do *CYP1A1* é induzida por vários xenobióticos que são bioativados, e podem ser transformados em carcinógenos, e estes se ligam a molécula de DNA formando adutos (Danesi et al., 2008; Shah et al., 2008).

Pontos de variação no gene *CYP1A1* afetam a regulação e a estrutura do gene. De acordo com o Banco de Dados de nomenclatura dos alelos do Citocromo P450 (CYP) humano (<http://www.cypalleles.ki.se/cyp1a1.htm>), foram descritos 13 alelos e 15 variantes alélicas para o gene *CYP1A1* (Tabela 2).

**Tabela 2.** Nomenclatura dos alelos do gene *CYP1A1*.

ALELO	ALTERAÇÃO NUCLEOTIDICA
<i>CYP1A1</i> * 1	Nenhuma
<i>CYP1A1</i> * 2A	3798T>C
<i>CYP1A1</i> * 2B	2454A>G; 3798T>C
<i>CYP1A1</i> * 2C	2454A>G
<i>CYP1A1</i> * 3	3204T>C
<i>CYP1A1</i> * 4	2452C>A
<i>CYP1A1</i> * 5	2460C>A
<i>CYP1A1</i> * 6	1635G>T
<i>CYP1A1</i> * 7	2345_2346insT
<i>CYP1A1</i> * 8	2413T>A
<i>CYP1A1</i> * 9	2460C>T
<i>CYP1A1</i> * 10	2499C>T
<i>CYP1A1</i> * 11	2545C>G
<i>CYP1A1</i> * 12	184G>C
<i>CYP1A1</i> * 13	134G>A

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

Embora alguns alelos como *CYP1A1*\*2B, \*2C, \*3, \*4, \*5, \*6, \*7, \*8, \*9, \*11, tenham demonstrado mudanças de aminoácidos em regiões polimórficas, não está claro se estas provocam alterações nas reações de oxidação de xenobióticos (Bozina et al., 2009). Em virtude da regulação polimórfica, o gene *CYP1A1* se mostrou um promissor biomarcador para a suscetibilidade a doenças, como o câncer de pulmão (Masson et al., 2005; Bufalo et al., 2006).

As variantes *CYP1A1m1* e *CYP1A1m2* têm sido associadas a diferentes tumores, incluindo os cânceres de cabeça e pescoço, e boca (Reis, 2010). E os alelos *CYP1A1*\*2A, \*2B, \*3 e \*4 foram analisados quanto a uma possível associação com a susceptibilidade ao câncer (Smart & Daly, 2000; Chevalier et al., 2001; Saito et al., 2003; Amorin et al., 2004).

O consumo de etanol constitui o principal fator de risco para o desenvolvimento de câncer de cabeça e pescoço (Boffetta & Hashibe, 2006). Embora muitos indivíduos estejam expostos a esse fator de risco, somente uma parcela desenvolve câncer, isso sugere que diferenças genéticas individuais influenciam a carcinogênese (Boccia et al., 2008).

O consumo de etanol é um dos fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de boca, mas os mecanismos envolvidos no dano gerado pelo álcool são parcialmente compreendidos. Determinadas concentrações de álcool causam aumento da permeabilidade da mucosa bucal, potencializando a penetração de carcinógenos. Além disso, é responsável por um aumento na proliferação epitelial, bem como pela modificação do seu processo de maturação. Outras alterações, como redução da capacidade de reparo do DNA, distúrbios do sistema imune e do estado nutricional podem contribuir na sua relação com o desenvolvimento do câncer bucal (Carrard et al., 2007).

Fatores genéticos exercem importante influência no processo de lesões bucais benignas para carcinomas de cavidade bucal (Lichtenstein et al., 2000). Visto que a superfamília CYP450 abrange um conjunto de isoformas envolvidas na biotransformação de xenobióticos ativados por reações de Fase I (Ogden et al., 2005), pontos de variação no gene *CYP1A1* demonstraram diferenças na capacidade de metabolização de xenobióticos entre os indivíduos, e esses pontos de variação foram associados ao aumento do risco de câncer oral (Leichsenring, 2005; Guembarovski, 2007).

O gene *CYP1A1* também está envolvido na ativação de vários pró-carcinógenos, como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH), os quais estão presentes na fumaça do cigarro e em certos alimentos. Variantes alélicas desse gene são associadas com aumento ou diminuição da atividade da enzima (<http://www.cypalleles.ki.se/cyp1a1.htm>) (Kawajiri et al., 1990; Shah et al., 2008).

O ponto de variação na região flanqueadora 3', na posição 3798, rs4646903, transição de T/C, abaixo do sítio de poliadenilação de *CYP1A1*, gera um sítio de restrição para a enzima Msp1, ponto de variação m1, também conhecida como variante alélica *CYP1A1\*2A* (Smith et al., 2001), confere aumento da atividade catalítica do gene, (Garte et al., 2001), é associado com maior suscetibilidade a neoplasias de pulmão, mama, próstata e de cabeça e pescoço (Gattas, 2006), foi associado a cirrose hepática em indivíduos etilistas (Burim et al., 2004).

No *CYP1A1* os pontos de variação rs4646903, substituição de timina por citosina (T/C, variante *CYP1A1\*2C*) presente na cauda poli (A) da região 3' não traduzida do gene, e rs1048943, transição de adenina para guanina (A/G), que leva a substituição de isoleucina por valina, estão relacionados a uma maior transcrição do gene. Dessa forma, esses pontos de variação estão relacionados a um aumento da atividade da enzima sendo então considerados indicadores de suscetibilidade ao desenvolvimento de câncer (Ulusoy et al., 2007; Kristiansen et al., 2011).

A variante *CYP1A1\*2C* está em desequilíbrio de ligação com *CYP1A1\*2A* e a combinação dessas variantes é *CYP1A1\*2B* ou *CYP1A1 m1m2* (San Jose et al., 2010).

A enzima CYP1A1 se encontra em níveis aumentados na mucosa oral de fumantes (Gumus et al., 2008). Pontos de variação do gene *CYP1A1* foram associados com maior risco de desenvolver câncer (Gattas et al., 2006; Leichsenring et al., 2006). *CYP1A1 m1m2* associada ao uso do tabaco desempenha papel significativo no câncer oral e de faringe (Varela-Lema et al., 2008).

As variantes *CYP1A1*\*3 (T/C, m3) e *CYP1A1*\*4 (C/A, m4) demonstraram aumento da atividade enzimática (Kato et al., 2009; San Jose et al., 2010). O aumento da atividade da enzima CYP1A1 promove aumento do estresse oxidativo nas células (Sharma et al., 2010).

Pontos de variação no gene *CYP1A1* foram associados ao desenvolvimento de diversos tipos de câncer, como o de pulmão (Zhan et al., 2011), próstata (Li et al., 2012), leucemia aguda e câncer cervical (Zhou et al., 2012). Assim como em doenças inflamatórias crônicas (Horiuchi et al., 2009; Kiyohara et al., 2012).

O ponto de variação na região 3' (T6235) do gene *CYP1A1* está envolvido com o risco de desenvolver cânceres, pois promove a produção da enzima de forma mais reativa o que leva a uma atividade oxidativa elevada e resulta em maior produção de metabólitos reativos associados ao dano ao DNA (Smith et al., 2001). Esse ponto de variação foi relacionado com câncer de mama (Shen et al., 2006), cólon (Pande et al., 2008), esôfago (Zhuo et al., 2009) e de pulmão (Zhan et al., 2010).

Existem evidências de que hormônios como glicocorticóides, estrógeno, progesterona, andrógenos, insulina e glucagon, receptores hormonais e até outros fatores como vitamina D e retinóides interferem na modulação da expressão de *CYP1A1* (Monostory et al., 2009). Além de evidências de que haja um efeito modulador do gênero do indivíduo sobre a atividade do *CYP1A1*, porém, mais estudos são necessários para que isso seja comprovado (Scandlyn, Stuart & Rosengren, 2008).

Deficiências na ação das enzimas conferem risco aumentado para o desenvolvimento de tumores, dessa forma há maior suscetibilidade para aqueles indivíduos que possuem alterações na Fase I da metabolização, principalmente devido a alterações no gene *CYP1A1* (Geisler & Olshan 2001).

#### **1.4 OGG1**

O gene *OGG1* está localizado no cromossomo 3p25. De acordo com a sequência genômica NG\_012106 possui 8 éxons e codifica a enzima de reparo 8-oxoguanina DNA glicosilase (NCBI).

A oxidação de bases nitrogenadas é uma ameaça à integridade do genoma e ocorre principalmente pela ação de espécies reativas de oxigênio (ROS). O produto mais frequente da oxidação do DNA é a 7,8-dihidro-8-oxoguanina (8-oxoguanina). Essa lesão é deletéria pois a guanina oxidada pode parear com uma adenina, o que provoca uma mutação por transversão (Elahi et al., 2002; Li et al., 2011).

A enzima codificada pelo gene *OGGI* catalisa a excisão da base modificada 8-oxoguanina do DNA que tenha sido danificado pela exposição a espécies reativas de oxigênio na via de reparo BER. A enzima possui atividade de glicosilase, que remove o dano 8-oxodG do DNA, e a AP-endonuclease cliva os sítios abásicos no DNA (Klungland & Bjelland, 2007). Em seguida, a enzima desoxirribose fosfodiesterase retira resíduos de desoxirribose e fosfato na fita reparada, a DNA polimerase reconhece o sitio vazio reparando com a base correta, e então, duas enzimas, a DNA ligase III e XRCC1 restauram a fita danificada (Duan et al., 2012; Ba et al., 2014).

A produção alterada da enzima seja ela em déficit ou excessiva está relacionada ao aumento do desenvolvimento de várias doenças (Markkanen, 2017). Quando a capacidade de excisão da enzima é reduzida, a base que sofreu mutações pode levar ao acúmulo de mutações devido à oxidação (Goodle et al., 2002; Zou et al., 2016).

As vias de reparo por excisão de base (BER) e por excisão de nucleotídeo (NER) desempenham um papel crucial na manutenção da integridade genômica. Pontos de variação em genes das vias BER e NER, que modulam a capacidade de reparo do DNA, podem estar relacionados ao risco de desenvolvimento e prognóstico do câncer oral. O reparo a danos ao DNA depende da atuação de enzimas, que reconheçam uma base alterada, e a remova através de um corte no filamento do DNA. Estima-se que esses mecanismos de reparo corrijam 99,9% dos erros iniciais (Emanuel et al., 2007; Kanaar et al., 2008). Alguns indivíduos têm um sistema de reparo apropriado, enquanto que aqueles com defeitos nesse sistema, tem maior suscetibilidade ao desenvolvimento de doenças (Flores-Obando et al., 2010). Formas variantes de *OGGI* estão relacionadas a maior predisposição ao desenvolvimento de tumores em órgãos como próstata, mama, vias aéreas e bexiga (Mambo et al., 2002; Xu et al., 2002; Ahmed et al., 2017).

O gene *OGGI* é altamente polimórfico, já foram identificados 231 SNPs nesse gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projetos/SNP>), embora, apenas alguns desses SNPs tenham sido associados a suscetibilidade a doenças como câncer. Estudos demonstram que em torno de vinte e cinco SNPs podem alterar função do gene, o que pode ocasionar, por exemplo, a redução da expressão genica do *OGGI* e contribuir para o desenvolvimento de câncer de coloretal (Slyskova et al., 2012). Desses, o ponto de variação rs1052133, resultante da substituição da serina por cisteína, possui maior associação com risco de desenvolvimento cânceres, como o câncer de pulmão (Hung et al., 2005; Kohno et al., 2006; Hill et al., 2007; Karahalil et al., 2008; Li et al., 2008; Kohno et al., 2011; Li et al., 2011; Duan et al., 2012).

Foram realizados estudos que, utilizando o sequenciamento de DNA, avaliaram alterações na função do gene *OGGI* em células tumorais de humanos, e corroboram que a presença da 8-oxoguanina glicosilase é fonte endógena de mutações e pode estar envolvida no desenvolvimentos doenças como o câncer (Karahalil et al., 2012).

## 1.5 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

O consumo abusivo, crônico, de bebidas alcoólicas é considerado um fator de risco para as principais doenças crônicas, não transmissíveis, principalmente no fígado e estômago, assim como é fator de risco para acidentes e violências. O consumo abusivo do etanol pode causar lesão hepática que leva a cirrose, sangramento devido a gastrite ou úlcera, pode ocorrer agressões ao sistema nervoso. Além da deficiência de vitamina B, que pode levar a neuropatias periféricas (Organização Mundial de Saúde – OMS, 2014).

Uso crônico ocorre quando há ingestão de 80g de etanol por dia, em torno de ¼ de garrafa de cachaça. Em torno de 3,3 milhões de pessoas morrem todos os anos pelas consequências da bebida, totalizando 5,9% de todas as mortes no mundo. 25% das mortes de jovens de 20 a 39 anos têm uma relação direta com o consumo crônico de etanol. No Brasil, segundo estatísticas do Relatório Global sobre Álcool e Saúde da Organização Mundial de Saúde (OMS, 2014), o consumo per capita de álcool puro foi de 8,7 litros no ano de 2010, enquanto a média mundial foi de 6,2 litros per capita.

Segundo dados da Pesquisa Nacional de Saúde (PNS), em 2013 na população brasileira, considerando indivíduos a partir dos 18 anos de idade, os quais consumiam bebida alcoólica uma vez ou mais por semana, 36,3% eram homens, e 13,0% mulheres (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE). Da mesma forma, em 2014, o levantamento da Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel), demonstrou que a frequência do consumo abusivo de bebidas alcoólicas foi maior entre os homens (24,8%) do que em mulheres (9,7%).

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

Em um estudo realizado em 2015 a partir dos dados da PNS do ano de 2013, foi observado prevalências maiores entre os fumantes ocasionais, comparados aos fumantes

diários, e tais categorias apresentaram prevalências mais elevadas do que os não fumantes. Entre as regiões, prevalências mais expressivas foram encontradas no Centro-Oeste e Nordeste, enquanto a menor foi no Sul (Garcia & Freitas, 2015).

O custo dos encargos do sistema de saúde é alto, além disso, ocorre um impacto negativo na economia devido a tratamentos de desintoxicação e de patologias associadas ao etilismo (Rehm et al., 2009).

## **1.6 ENSAIO COMETA E AVALIAÇÃO DO DANO AO DNA**

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

Esse teste é aplicado na avaliação do dano ao DNA e do estresse oxidativo em relação a inúmeras doenças, e na avaliação da proteção pela atuação de antioxidantes; é utilizado como ferramenta na investigação do dano e do reparo de DNA em diferentes tipos celulares, em resposta a vários agentes genotóxicos; no biomonitoramento de espécies em sistemas *in vitro* e *in vivo*; na avaliação da proteção pela atuação de antioxidantes; aplicado na genética toxicológica em células humanas, de outros animais e de plantas; e no monitoramento ecológico e toxicologia aquática (Collins et al., 2008; Bagatini & Maluf, 2011).

A técnica consiste em uma corrente elétrica que passa por células lisadas embebidas em gel de agarose de baixo ponto de fusão que estão sobre lâminas de microscopia. As células são englobadas em gel e espalhadas sobre uma lâmina e submetidas a uma corrente elétrica que promove migração dos segmentos de DNA livres, resultantes de quebras, para fora do núcleo. Após a eletroforese, como o DNA tem carga negativa, se estiver rompido (clastogênese), migra para fora do núcleo, ficando com a aparência de um cometa ou cauda (Silva et al., 2000).

A análise pode ser realizada em microscópios ópticos comuns, quando as células são coradas com nitrato de Prata ou corante *Giemsa*, ou em microscópios de fluorescência, quando coradas com brometo de Etídio, Acridine Orange, Syber Green<sup>®</sup> ou iodeto de propídeo.

O ensaio cometa apresenta algumas vantagens: (1) Apresenta sensibilidade em apontar baixo nível de danos ao DNA; (2) Requerimento de baixo número de células por amostras; (3) Flexibilidade; (4) Baixo Custo; (5) Fácil aplicação; (6) Habilidade de conduzir estudos utilizando pequena quantidade de substância; e (7) Tempo relativamente curto para a realização de experimentos (Tice et al., 2000).

## 1.7 PROJETO 1000GENOMES

O projeto *1000Genomes* (The *1000Genomes* Project Consortium, 2010; 2012), lançado em 2008, é um consórcio internacional que avaliou o genoma completo de 2500 indivíduos oriundos de 26 populações diferentes utilizando técnicas de sequenciamento de nova geração, possui informações a respeito de SNPs, variantes estruturais e haplótipos, possibilitando o estudo da relação entre genótipo e fenótipo. (Durbin et al., 2010; Mcvean et al., 2012; Sudmant et al., 2015). Outros dois consórcios propuseram sequenciar o genoma humano de alguns poucos indivíduos (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001; Venter et al., 2001; Venter, 2003; International Human Genome Sequencing Consortium, 2004), contudo o sequenciamento em larga escala de diferentes indivíduos pode gerar dados mais completos e complementares.

Este projeto tem como objetivo criar uma visão detalhada das variações genéticas humanas, com foco principalmente nas variações genômicas de importância médica. A comparação dos dados obtidos em diferentes indivíduos torna-se uma valiosa fonte para estudos de associação e identificação de genes candidatos para diferentes doenças (Harrow et al., 2012), além de fornecer padrões de diversidade gênica em diferentes populações.

Esse projeto consiste em uma parceria internacional entre Inglaterra, China e Estados Unidos (The *1000Genomes* Project Consortium, 2010; 2012). O Brasil não faz parte desse estudo, em parte porque não ocorreu um consenso entre a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa e os idealizadores do projeto. As informações do *1000Genomes* estão disponíveis para a comunidade científica mundial através de bases de dados públicas.

Inicialmente o projeto 1000 Genomas avaliou 1092 indivíduos distribuídos em 14 populações e um mapa de haplótipos de 38 milhões de SNP's e 1,4 milhão de in/del curtas e mais de 14000 deleções maiores. Atualmente, o projeto foi concluído e tem sequenciado o genoma de 2504 indivíduos de 26 populações mundiais (Mcvean et al., 2012; Sudmant et al., 2015).

As populações que compõem o projeto *1000Genomes* são ACB (Afro-caribenhos em Barbados), ASW (Americanos do sudoeste dos Estados Unidos com ancestralidade africana), ESN (Esan na Nigéria), GWD (Gambianos nos estados do Oeste em Gambia), LWK (Luhya em Webuye, Kenia), MSL (Mende em Serra Leoa), YRI (Yoruba em Ibadan, Nigéria), CLM (Colombianos de Medellin, Colombia), MXL (Americanos com ascendência mexicana em Los Angeles, EUA), PEL (Peruanos de Lima, Peru), PUR (Porto-riquenhos de Porto Rico), CDX (Chineses Dai em Xishuangbanna, China), CHB (Chineses Han de Pequim, China), CHS

(Chineses Han do Sudoeste da China), JPT (Japoneses em Tóquio Japão), KHV (População Kinh na cidade de Ho Chi Minh, Vietnam), CEU (Moradores de Utah com ascendência do Norte e Oeste Europeu), FIN (Finlandeses na Finlândia), GBR (Britânicos da Inglaterra e Escócia), IBS (População Ibérica da Espanha), TSI (Habitantes da Toscana na Itália), BEB (Bengalis de Bangladesh), GIH (Indianos Gujarati de Houston, Texas), ITU (Indianos de Telugu, habitantes do Reino Unido), PJI (Punjabi de Lahore, Paquistão), e STU (Cingaleses de Tamil habitantes do Reino Unido) (The *1000Genomes* Project Consortium, 2016).

Nenhum dos projetos de sequenciamento completo do genoma humano analisou a população brasileira, que é uma população de excelente fonte de estudos, tendo em vista que esta constitui uma das populações mais heterogêneas do mundo. Sendo assim, o estudo dos genes *CYP2E1*, *CYP1A1* e *OGG1* em uma população tão miscigenada como a brasileira, comparados aos dados obtidos pelo projeto *1000Genomes*, pode contribuir para compreensão das relações evolutivas e fornecer dados para esclarecer a relação da região estudada desses genes com etilistas desse estudo. Dessa forma, o presente estudo tem por objetivo avaliar os SNPs presentes em regiões específicas dos genes citocromo *P4502E1* (*CYP2E1*), *CYP1A1*, e *OGG1* em etilistas do município de Goiânia-Goiás, Brasil, associá-los com o dano ao DNA avaliado pelo ensaio cometa, e ainda, comparar a frequência dos pontos de variação desses genes dessa população com populações mundiais presente no projeto *1000Genomes*.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar a ocorrência dos pontos de variação dos genes de metabolismo *CYP2E1* e *CYP1A1*, e do gene de reparo de DNA *OGG1*, com os danos ao DNA de uma amostra da população brasileira situada no município de Goiânia, estado de Goiás.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Associar os pontos de variação dos genes de metabolismo *CYP2E1*, *CYP1A1* e do gene de reparo *OGG1* com o dano ao DNA encontrado no ensaio cometa;
- Relacionar os pontos de variação encontrados com os dados divulgados no projeto *1000Genomes*, que não inclui o Brasil entre as populações avaliadas;
- Identificar os haplótipos existentes na porção avaliada dos genes;
- Relacionar os haplótipos existentes na porção avaliada dos genes com os dados divulgados no projeto *1000Genomes*.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 DESCRIÇÃO DAS AMOSTRAS**

Com vistas ao cumprimento dos aspectos éticos e legais necessários para pesquisa envolvendo seres humanos, preconizados pela Resolução nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (BRASIL, 2013), o projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás (UFG), com o número de protocolo 476.938 (Anexo A).

O grupo de indivíduos utilizado neste estudo é uma amostra da população brasileira residente no município de Goiânia, estado de Goiás. A população brasileira é uma excelente fonte de estudos, já que esta é uma população heterogênea.

Foram utilizadas amostras de sangue de 83 etilistas, escolhidos aleatoriamente, com idade igual ou superior a 18 anos, oriundos do Ambulatório do Centro de Atenção Psicossocial – Álcool e drogas (CAPS Ad/Casa) do município de Goiânia-Goiás, Brasil. O grupo controle foi composto por 83 indivíduos que não consomem etanol de forma crônica, com idade igual ou superior a 18 anos, que apresentaram condições socioambientais (idade, sexo) e estilo de vida semelhante aos etilistas e que residiam no município de Goiânia.

Para este estudo os critérios seguidos para inclusão no grupo caso foram: paciente previamente diagnosticado como etilista pelo Ambulatório do Centro de Atenção Psicossocial – Álcool e drogas (CAPS Ad/Casa) do município de Goiânia-Goiás, Brasil por fazer o uso crônico de álcool, consumir mais que  $\frac{1}{4}$  de uma garrafa de cachaça por dia, possuir mais de 18 anos, ter concordado em participar do estudo e assinado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice A). A Organização Mundial de Saúde (OMS) estabelece que uma unidade de bebida ou dose padrão contém aproximadamente de 10 g a 12 g de álcool puro, o equivalente a uma lata de cerveja (330 ml) ou uma dose de destilados (30 ml) ou ainda a uma taça de vinho (100 ml).

Foi desenvolvido um questionário de estilo de vida onde foram anotados dados como idade, hábitos sociais, tempo de uso e tipos de bebidas alcoólicas consumidas (Apêndice B) para a realização dos dados estatísticos. Foram realizadas análises desses dados utilizando o teste do Qui-quadrado e de Mann-hitney.

#### **3.2 ENSAIO COMETA**

O ensaio cometa em pH alcalino foi realizado em 83 amostras de etilistas, que constituem o grupo caso, e em 83 amostras de indivíduos que constituem o grupo controle. Para a sua realização foi utilizada a metodologia descrita por Singh et al., (1988), com modificações. As lâminas foram limpas e preparadas com uma pré-cobertura de agarose com ponto de fusão

normal (Normal *Melting*) a 1,5%. Foram utilizados 10  $\mu$ L de sangue de cada indivíduo e diluídos em 1 mL de tampão PBS em tubo plástico de 2 mL. Logo depois, foram retirados 10  $\mu$ L desta solução e misturados a 120  $\mu$ L de agarose com baixo ponto de fusão (*Low Melting Point*) a 0,5%, que estava em banho Maria a 37°C. Essa mistura foi colocada em lâmina preparada com a pré-cobertura de agarose com ponto de fusão normal (Normal *Melting*) 1,5% e coberta com uma lamínula.

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

Após o período de 24 horas as lâminas foram retiradas da solução de lise e então colocadas em uma cuba horizontal de eletroforese e fonte eletroforética (Hoefer, EUA). Protegidas da luz foram incubadas em tampão alcalino (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13,0) descansando por 30 minutos. A corrida eletroforética foi realizada por 25 minutos, a 25 volts e 300 mA, enquanto a cuba de eletroforese estava no gelo para manter a temperatura a 4°C e protegida da luz.

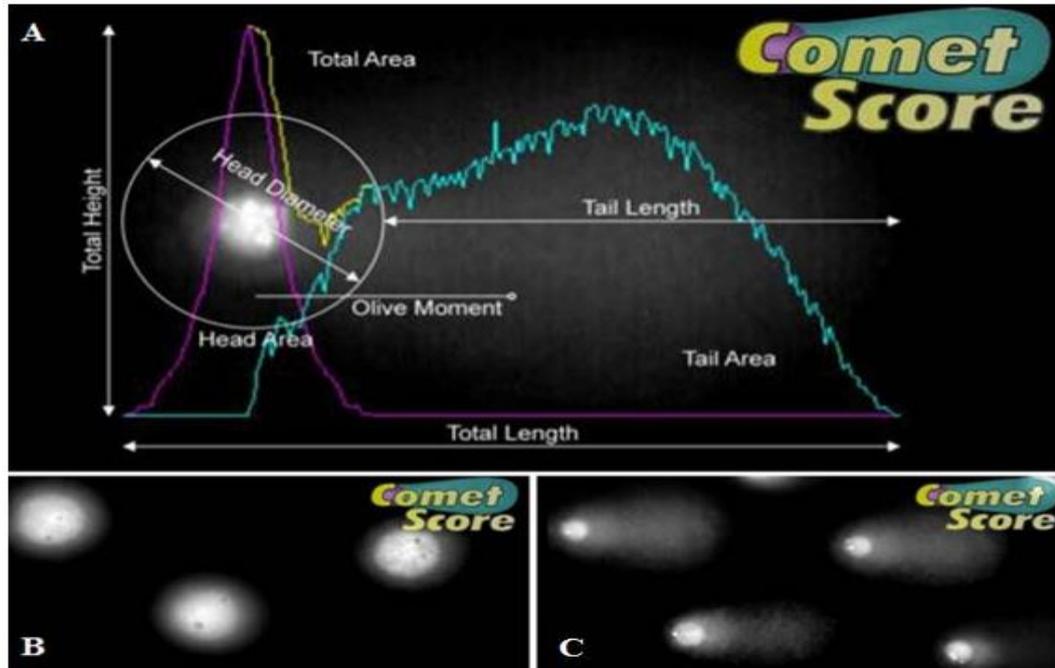
A seguinte etapa foi a neutralização, utilizando uma solução Tampão Tris a 0,4M (pH 7,5) por três vezes, durante 5 minutos. Logo depois as lâminas foram lavadas duas vezes com água destilada e colocadas para secar “*overnight*” em temperatura ambiente na posição inclinada. A fixação foi realizada com etanol absoluto por 5 minutos e o DNA foi corado com 20  $\mu$ L da solução de brometo de etídio a 10 ng/ $\mu$ L. Após a fixação a lamínula foi novamente colocada sobre a lâmina deixando descansar por aproximadamente 5 minutos.

As lâminas foram analisadas por microscopia de epifluorescência Axio Imager 2<sup>®</sup> (Carl Zeiss, Alemanha) utilizando um conjunto de filtros de excitação 515-560 nm, para fluorescência vermelha. Os núcleos das células foram visualizados utilizando a objetiva de 10X e a imagem fluorescente foi captada utilizando o *software* ISIS<sup>®</sup>. Foram analisadas duas lâminas para cada indivíduo e foram contadas um total de 100 nucleóides por indivíduo.

As imagens do ensaio Cometa foram analisadas através do programa *CometScore*<sup>®</sup> versão 1.5 (Figura 3) que foi desenvolvido para avaliar cometas produzidos no processo de eletroforese em gel de células individualizadas. Os parâmetros utilizados para avaliar o dano ao DNA foram: comprimento da cauda do cometa, porcentagem de DNA na cauda e momento da cauda de Olive (Lovell et al., 2008), sendo este último o que melhor representa a quantidade real de dano sofrido pela célula (Collins, 2004).

A avaliação dos danos ao DNA foi calculada com a utilização dos parâmetros descritos anteriormente e os resultados foram obtidos com a análise da média  $\pm$  DP (desvio padrão).

**Figura 3.** Representação esquemática da análise dos cometas no programa *CometScore*<sup>®</sup> (versão 1.5) (A): Nucleóides não apresentando lesões no DNA, (B): Cometas com o DNA migrado após a eletroforese, (C): indicando danos ao DNA.



### 3.3 OBTENÇÃO DOS DADOS MOLECULARES

A variabilidade de parte da região promotora do gene *CYP2E1*, do éxon 6 e parte do éxon 7 do gene *CYP1A1*, e éxon 6 do gene *OGG1* foram avaliadas pelo sequenciamento direto do produto de amplificação. As regiões foram escolhidas com base em artigos que relatam a importância de pontos de variação nestas regiões.

Inicialmente, as regiões escolhidas desses genes foram amplificadas pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando pares de iniciadores específicos que foram desenvolvidos especificamente para este estudo pelo grupo do Laboratório de Mutagênese da Universidade Federal de Goiás.

Os iniciadores utilizados foram: *CYP2E1 primer forward* CCGTGAGCCAGTCGAGTCTA e *primer reverse* AACAGAGATTAACCTTTCTCAGAATT; *CYP1A1: primer forward* CCCACAGCCAGATAGCAA e *primer reverse* GGAAGCTCAGTCAGGCTCAG; *OGG1: primer forward* CCTGTGGGGACCTTATGCTG e *primer reverse* AGAGGATCATGACCCGAGGT. Desta forma, foi produzido um fragmento de 768-pb, compreendendo os nucleotídeos -1415 até -648 do gene *CYP2E1*. Fragmento de

739-pb, compreendendo os nucleotídeos 2014 até 2752 do gene *CYP1A1*, e um fragmento de 748-pb, compreendendo os nucleotídeos 6840 até 7587 do gene *OGG1*.

A PCR foi realizada em um volume final de 25  $\mu\text{L}$ , utilizando-se uma DNA Polimerase denominada *Taq Platinum* (Invitrogen). Os reagentes utilizados para a PCR foram misturados em tubo separado em quantidades específicas conforme as Tabelas 3, 5 e 7. Em cada tubo para PCR de 0,2 mL, previamente identificado, foi adicionado 20  $\mu\text{L}$  da mistura de reagentes e mais 5  $\mu\text{L}$  de amostra de DNA diluído a 20 ng/ $\mu\text{L}$ . Em cada reação realizada, um controle negativo contendo apenas os reagentes (sem DNA) foi adicionado para garantir a ausência de contaminação dos componentes da PCR.

A ciclagem de temperaturas utilizada está apresentada nas Tabelas (4, 6 e 8). O produto de PCR foi armazenado em freezer  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento de sua utilização.

**Tabela 3.** Reagentes e concentrações utilizadas para a amplificação do gene *CYP2E1*.

<b>Componentes da Reação</b>	<b>[ ] Solução de Uso</b>	<b>1 x (uL)</b>	<b>[ ] Final</b>
Água	-	15,30	
PCR Buffer – Long	10X	2,50	1 X
Sal - MgCl <sub>2</sub>	25 mM	0,75	1,5 mM
dNTPs	5 mM	0,50	0,2 mM
Iniciador F	10 pM	0,50	1 mM
Iniciador R	10 pM	0,50	1 mM
DNA Polimerase – Platinum	5 U	0,20	1 U
Volume de amostra (10 ng/ $\mu\text{L}$ )	-	5,00	100 ng
Volume Total	-	25,00	100 ng

**Tabela 4.** Ciclagem de temperaturas utilizadas para o gene *CYP2E1*.

<b>CICLOS</b>	<b>TEMPERATURA (°C)</b>	<b>TEMPO</b>
1	95	05'
40	95	10"
	61	20"
	72	25"
	72	05'
1	4	$\infty$

**Tabela 5.** Reagentes e concentrações utilizadas para a amplificação do gene *CYP11A1*.

Componentes da Reação	[ ] Solução de Uso	1 x (uL)	[ ] Final
Água	-	10	
PCR Buffer – Long	10X	2,50	1 X
Sal - MgCl <sub>2</sub>	25 mM	0,75	1,5 mM
dNTPs	5 mM	0,50	0,2 mM
Iniciador F	10 pM	0,50	1 mM
Iniciador R	10 pM	0,50	1 mM
DNA Polimerase – Platinum	5 U	0,20	1 U
Volume de amostra (10 ng/μL)	-	5,00	100 ng
Volume Total	-	25,00	

**Tabela 6.** Ciclagem de temperaturas utilizadas para o gene *CYP11A1*.

CICLOS	TEMPERATURA (°C)	TEMPO
1	95	05'
	95	10"
35	57	20"
	72	25"
1	72	05'
1	4	∞

**Tabela 7.** Reagentes e concentrações utilizadas para a amplificação do gene *OGG1*.

Componentes da Reação	[ ] Solução de Uso	1 x (uL)	[ ] Final
Água	-	15,30	
PCR Buffer – Long	10X	2,50	1 X
Sal - MgCl <sub>2</sub>	25 mM	0,50	1,5 mM
dNTPs	5 mM	0,50	0,2 mM
Iniciador F	10 pM	0,50	1 mM
Iniciador R	10 pM	0,50	1 mM
DNA Polimerase – Platinum	5 U	0,20	1 U
Volume de amostra (10 ng/μL)	-	5,00	100 ng
Volume Total	-	25,00	

**Tabela 8.** Ciclagem de temperaturas utilizadas para o gene *OGG1*.

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

As reações de amplificação foram avaliadas em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Para cada amostra foi aplicado um volume de 5 μL de produto de PCR e 1 μL de

tampão de carregamento 6x *Loading Dye*<sup>TM</sup> (Fermentas – Vilnius, Lituânia). Em cada corrida foi adicionada uma escada alélica *GeneRuler*<sup>TM</sup> (Fermentas – Vilnius, Lituânia) para conferência do tamanho aproximado dos produtos de amplificação gerados pela reação de PCR, e adicionado o controle negativo como um parâmetro de ausência de contaminação. Em seguida, a corrida eletroforética foi realizada em uma cuba de eletroforese com voltagem fixada em 90 V, durante 45 minutos (10V/cm). Os géis foram expostos à luz ultravioleta (UV) e posteriormente fotografadas em um fotodocumentador.

### 3.3.1 PURIFICAÇÃO DO PRODUTO AMPLIFICADO

O produto amplificado foi purificado com EXO-SAP, utilizando as enzimas Exonuclease I e Fosfatase Alcalina (do inglês, *Shrimp Alkaline Phosphatase*) (GE HealthCare® - Buckinghamshire, Reino Unido). Foram utilizados 5 µL de produto da PCR adicionados a 1µL de solução EXO-SAP (0,5 µL Exonuclease I, 0,5 µL SAP). Logo após foram colocados em um termociclador utilizando um programa com as seguintes temperaturas: 37°C por 90 minutos e 80°C por 20 minutos, para eliminação dos resíduos de dNTPs não incorporados, DNA polimerase e outros constituintes da reação de PCR.

### 3.3.2 REAÇÕES DE SEQUENCIAMENTO

Os produtos de amplificação foram sequenciados por eletroforese capilar utilizando o método de Sanger com o uso do kit de sequenciamento *BigDye*<sup>®</sup> *Terminator* v.3.1 *Cycle Sequencing* (Applied Biosystems - Foster City, Estados Unidos) e com os *primers* desenhados para este sequenciamento, os mesmos utilizados para a PCR. Os reagentes foram misturados em quantidades específicas (Tabela 9) em um único tubo para garantir a homogeneidade das reações.

Foram acrescentados 1 µL do produto de PCR purificado e 9 µL da mistura de reagentes na placa de 96 poços devidamente identificada. O programa de ciclagem utilizado foi: 25 ciclos de 95°C por 20 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

**Tabela 9.** Reagentes e concentrações utilizadas na reação de sequenciamento (para uma corrida utilizando um primer específico).

<b>Componentes da Reação</b>	<b>1 x (µL)</b>
<b>Água ultrapura autoclavada</b>	3,5
<b>Tampão <i>BigDye 5X</i></b>	2,0
<b>Primer (1 ng/µL)</b>	2,5
<b><i>BigDye 3.1</i></b>	1,0
<b>Volume Total</b>	9,0
<b>Volume de produto de PCR normalizado</b>	1,0

Após o sequenciamento, as reações foram precipitadas utilizando-se protocolo recomendado pela empresa produtora do kit de sequenciamento. Neste protocolo foram utilizados isopropanol (álcool isopropílico) 65% e etanol 60%, conforme procedimento descrito: o produto final foi precipitado com a adição de 40 µL de isopropanol (álcool isopropílico) 65%. A mistura foi agitada durante 30 segundos, incubada por 20 minutos à temperatura ambiente e centrifugada a 2.000rcf por 45 minutos. Logo após, o sobrenadante foi retirado e desprezado e, em seguida, a placa foi vertida e centrifugada novamente por 1 minuto a 300rpm. O precipitado foi lavado com 250 µL de etanol a 60% e centrifugado a 2.000rcf por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, verteu-se a placa e centrifugou-se por 1 minuto a 400rpm. Foram adicionados 100 µL de etanol 60% e a placa centrifugada invertida por 10 minutos a 2.000rcf e descartado o sobrenadante. O precipitado foi centrifugado por 1 minuto a 500rpm e por fim, a placa foi secada em um termociclador com temperatura de 95°C por 1 minuto.

As amostras foram ressuspensas em 10 µL de formamida Hi-Di, desnaturadas por 5 minutos a 95°C e posteriormente aplicadas no sequenciador ABI 3500 Genetic Analyser (Applied Biosystems) para a leitura do sequenciamento.

### **3.3.3 ANÁLISE DOS PRODUTOS DO SEQUENCIAMENTO**

A qualidade dos produtos do sequenciamento foi examinada em um primeiro momento visualizando-se os eletroferogramas no programa *Sequence Analyzer*<sup>®</sup> versão 6 (Applied Biosystems<sup>®</sup>), as regiões de nucleotídeos com valor PHRED inferiores a 25 foram descartados e logo depois reavaliados. Os dados fornecidos pelo sequenciador foram avaliados e editados no *software* SeqScape<sup>®</sup> versão 3 (Applied Biosystems<sup>®</sup>). Posteriormente, os arquivos contendo os dados de sequenciamento foram alinhados com a sequência genômica de cada gene (*CYP2E1*: NG\_008383.1; *CYP1A1*: NG\_008431.2; *OGGI*: NG\_0120106) para fins de referência e editadas manualmente para a correção de possíveis erros utilizando o programa

Bioedit (Sequence Alignment Editor versão 7.2.5) (Hall et al., 1999). A leitura e interpretação dos sequenciamentos e alinhamentos foi realizada manualmente por dois observadores.

Cada SNP detectado foi anotado individualmente e comparado com as variações já descritas para a sequência genômica de cada gene por meio do software CLC *Sequence Viewer*<sup>®</sup> versão 7.6.1 (CLC bio, Aarhus, Dinamarca). Cada SNP teve sua posição correta definida a partir da comparação com a sequência referência de cada gene (*CYP2E1*: NG\_008383.1; *CYP1A1*: NG\_008431.2; *OGGI*: NG\_0120106). As posições dos pontos de variação de todos os genes foram normalizadas neste trabalho considerando a adenina do primeiro ATG traduzido como nucleotídeo +1. Nucleotídeos da região 5' regulatória anteriores ao primeiro ATG traduzido são representados com valores negativos. As bases analisadas em cada sequenciamento que não apresentaram variação foram definidas como sendo igual à sequência padrão de comparação. Cada ponto de variação detectado foi anotado individualmente para posterior análise.

### **3.4 OBTENÇÃO DOS DADOS PÚBLICOS DO PROJETO 1000GENOMES**

Os dados do projeto *1000Genomes* referentes aos genes estudados foram obtidos no site oficial do projeto, [www.1000Genomes.org](http://www.1000Genomes.org) (*The 1000Genomes Project Consortium*, 2010; 2017). A região avaliada neste estudo foi filtrada a partir dos arquivos .vcf baixados do site oficial do projeto *1000Genomes* e concatenados com os dados obtidos para as amostras brasileiras. O arquivo .vcf resultante foi convertido para o formato GENEPOP e ARLEQUIN usando o programa PGDSpider 2.0.19 (Lischer & Excoffier, 2012).

As frequências alélicas e genotípicas de cada loco foram estimadas por contagem direta. A aderência das frequências genotípicas em relação às proporções teóricas de Hardy-Weinberg foi avaliada pelo teste exato de Guo e Thompson (Guo & Thompson, 1992), utilizando-se o *software* GenePop<sup>®</sup> 4.0 (Raymond & Rousset, 1995).

Os haplótipos desse grupo já estavam em fase gamética, a provável constituição de cada um dos cromossomos estava definida, para posterior análise foi feita a comparação entre os resultados das corridas realizadas pelo método PHASE com os dados em fase do *1000Genomes*.

### **3.5 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E ADERÊNCIA AO EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG**

As frequências alélicas de cada loco foram estimadas por contagem direta. A aderência das frequências genotípicas em relação às proporções teóricas de Hardy-Weinberg foi avaliada pelo teste exato de Guo e Thompson (Guo & Thompson, 1992), utilizando-se o *software* GenePop<sup>®</sup> 4.0 (Raymond & Rousset, 1995).

### 3.6 AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO E INFERÊNCIA COMPUTACIONAL DE HAPLÓTIPOS

A inferência do padrão de desequilíbrio de ligação dos genes foi realizada usando o programa Haploview® 4.2 (Barrett et al., 2005). As imagens de DL foram geradas pelo Haploview utilizando-se os SNPs com uma frequência alélica mínima (MAF) de 0,01. O padrão de desequilíbrio de ligação inferido através do cálculo  $D'$ .

O desequilíbrio de ligação foi avaliado nas populações agrupadas da seguinte forma: a) população global, dados de todas as populações avaliadas no projeto *1000Genomes* e os dados das amostras brasileiras; b) brasileiros controles que não consomem etanol de forma crônica, amostras de Goiânia, estado de Goiás; c) brasileiros etilistas, que consomem etanol de forma crônica, amostras de Goiânia, estado de Goiás d) americanos, população residente em Los Angeles (CA) incluindo aqueles com ancestralidade mexicana, porto-riquenhos e colombianos de Medellín; e) europeus, incluindo residentes de Utah com ancestrais do norte e oeste da Europa, Toscana na Itália, britânicos da Inglaterra e Escócia, finlandeses e populações ibéricas na Espanha; f) africanos, população da Nigéria, Quênia, e afrodescendentes americanos no sudoeste dos EUA; g) asiáticos, chineses da população Han em Pequim e população Han do sul da China, e a população japonesa de Tóquio.

A população brasileira não foi incluída no grupo de americanos pois este estudo avaliou o padrão encontrado na análise das diferentes populações mundiais e comparou com os dados e padrões obtidos para a população brasileira.

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

Para a inferência dos haplótipos, foi empregado o método computacional *software* PHASE v2 (Stephens et al., 2001; Stephens e Donnelly, 2003) que implementa um método *Bayesiano* para reconstrução do haplótipo mais provável. Foram realizadas 10 corridas independentes e os resultados então comparados entre si através de um *script* em Perl denominado HaploRunner (desenvolvido por E. C. Castelli – disponível em <http://castelli-lab.net>), versão 1.1b. Este script executa 10 corridas independentes e compara os resultados obtidos em todas as corridas. As inferências de haplótipos que atenderam a dois requisitos foram aceitas: a) tiveram probabilidade de inferência superior a 90%; b) obtiveram o mesmo haplótipo inferido em todas as corridas.

Os haplótipos foram inferidos na população global (população brasileira e do *1000Genomes*), pois os métodos computacionais são probabilísticos e quanto maior o número amostral mais confiabilidade terá a inferência dos haplótipos.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DO GRUPO DE ESTUDO

Os dados referentes às características sócio demográficas, faixa etária, sexo, hábito tabagista dos grupos caso e controle foram avaliados. Há diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,01$ ) entre os grupos caso e controle quanto a faixa etária e o hábito tabagista. Além disso, houve diferença estatisticamente significativa em relação à distribuição dos grupos de acordo com o sexo, mas isso, provavelmente, se deve ao fato de que as coletas realizadas para compor o grupo de estudo foram realizadas, em grande parte, em indivíduos do sexo masculino. A faixa etária  $\geq 40$  anos foi mais frequente no grupo caso ( $p < 0,01$ ), nesse grupo a idade mínima foi de 25 anos e a máxima de 60 anos e para o grupo controle a idade variou entre 20 a 56 anos (Tabela 10).

Estudos dos efeitos do consumo de etanol encontram algumas dificuldades, dentre elas, o fato de que os indivíduos geralmente ingerem diferentes graduações alcoólicas e são imprecisos ao informar a respeito das doses ingeridas.

Em relação ao tabagismo houve predominância de fumantes no grupo caso e não fumantes no grupo controle ( $P < 0,01$ ) (Tabela 10).

**Tabela 10.** Características dos grupo caso e controle.

Variáveis	Grupos n (%)		Total	$\chi^2$	p
	Caso	Controle			
<b>Faixa etária</b>					
< 40 anos	21 (25,3)	63 (75,9)	84 (50,6)	42,51	<0,001*
$\geq 40$ anos	62 (74,7)	20 (24,1)	82 (49,4)		
<b>Sexo</b>					
Feminino	12 (14,5)	33 (39,8)	45 (27,1)	13,44	<0,001*
Masculino	71 (85,5)	50 (60,2)	121 (72,9)		
<b>Tabagismo</b>					
Não	20 (24,1)	67 (80,7)	87 (52,4)	53,45	<0,001*
Sim	63 (75,9)	16 (19,3)	79 (47,6)		
<b>Etilismo</b>					
Não	0 (0,0)	83 (100,0)	83 (50,0)	NA	NA
Sim	83 (100,0)	0 (0,0)	83 (50,0)		
Número de cigarros por dia	12.8 $\pm$ 11.9	1.8 $\pm$ 3.8	7.3 $\pm$ 10.4	7,58	<0,001**
Tempo como tabagista (anos)	17.3 $\pm$ 14.4	2.2 $\pm$ 4.9	9.7 $\pm$ 13.2	7,74	<0,001*
Consumo de Álcool por dia	2.7 $\pm$ 2.6	0,0 $\pm$ 0,0			NA
Tempo de etilismo	24.8 $\pm$ 8.8	0,0 $\pm$ 0,0			NA

\*Qui-quadrado; \*\*Mann-hitney.

## 4.2 DANOS AO DNA DETECTADOS PELO ENSAIO COMETA

A avaliação dos danos ao DNA foi calculada pelos parâmetros *Tail Length* (Comprimento da Cauda - CC), porcentagem de DNA na cauda (%DNA) e *Olive Tail Moment* (Momento da Cauda de Olive - MCO), e estão representados na Tabela 11. Os resultados obtidos pela análise da média  $\pm$  DP (desvio padrão) mostraram que há um dano ao DNA quase 2 vezes maior no grupo caso em relação ao grupo controle, quando analisados os parâmetros comprimento da cauda (CC) ( $P=0,002$ ), a porcentagem de DNA na cauda ( $p=0,004$ ) e momento da cauda de Olive (MCO) ( $P < 0,001$ ) (Figura 4).

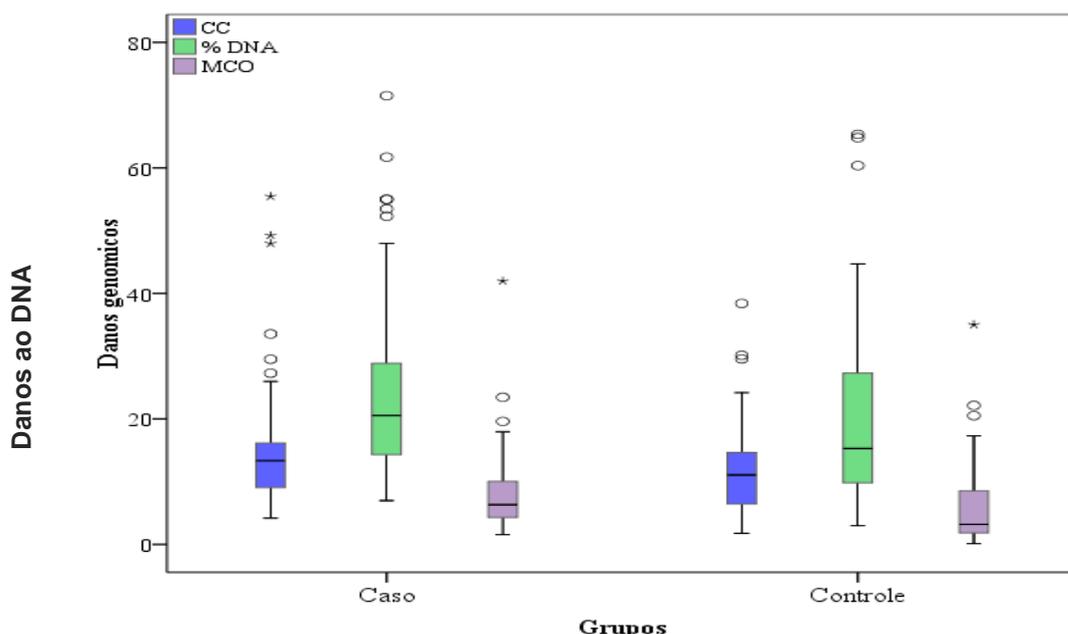
Considerando o parâmetro comprimento da cauda (CC) foram obtidos os resultados de  $14.87 \pm 9.01$  para o grupo caso e  $11.54 \pm 6.55$  para o grupo controle. Quanto ao parâmetro porcentagem de DNA na cauda (%DNA) os resultados obtidos foram  $23.72 \pm 13.42$  para o grupo caso e  $19.46 \pm 12.89$  para o grupo controle. Os resultados obtidos para o parâmetro momento da cauda de Olive (MCO) foram  $7.81 \pm 5.81$  no grupo caso e  $5.69 \pm 5.63$  no grupo controle (Figura 4).

**Tabela 11.** Comparação dos danos ao DNA entre os grupos caso e controle.

Danos ao DNA	Grupos (Média $\pm$ DP)		Z	p*
	Caso	Controle		
CC	$14.87 \pm 9.01$	$11.54 \pm 6.55$	2,80	0,002
% DNA	$23.72 \pm 13.42$	$19.46 \pm 12.89$	2,51	0,004
MCO	$7.81 \pm 5.81$	$5.69 \pm 5.63$	3,67	0,001

\*ANCOVA (Covariáveis: Faixa etária, sexo).

**Figura 4.** Representação dos danos ao DNA detectados pelo Ensaio Cometa.



O dano ao DNA do grupo caso não mostrou associação com o tempo de tabagismo e etilismo, carga tabágica e quantidade de álcool/dia e os parâmetros do ensaio cometa (Tabela 12).

**Tabela 12.** Correlação dos parâmetros do ensaio cometa com as variáveis de tabagismo e etilismo para o grupo caso.

	CC	% DNA	MCO
Número de cigarros/dia	$r = 0.05; p = 0.64$	$r = 0.01; p = 0.95$	$r = 0,01; p = 0,99$
Tempo como tabagista (anos)	$r = 0.13; p = 0.25$	$r = 0.03; p = 0.78$	$r = 0.09; p = 0.44$
Consumo de Álcool (dia)	$r = -0.04; p = 0.75$	$r = 0.16; p = 0.15$	$r = 0.05; p = 0.63$
Tempo de etilismo	$r = 0.13; p = 0.24$	$r = 0,01; p = 0,99$	$r = 0.03; p = 0.79$

### 4.3 PONTOS DE VARIAÇÃO ENCONTRADOS NO SEQUENCIAMENTO

Os produtos obtidos das reações de sequenciamento foram examinados em um primeiro momento visualizando-se os eletroferogramas nos programas *Sequence Analyzer* versão 6 (Applied Biosystems) e Chromas<sup>®</sup> Lite.

Foram encontrados 8 pontos de variação no gene *CYP2E1*, 2 pontos de variação no gene *CYP1A1* e 2 pontos de variação no gene *OGGI*. A Tabela 13 apresenta os SNPs encontrados, seus respectivos números de referência, alteração nucleotídica e a posição genômica tomando como referência o primeiro ATG traduzido como base +1. Todos eles foram anotados individualmente para as análises posteriores.

**Tabela 13.** SNPs da região promotora do gene *CYP2E1*, do éxon 6 e 7 do gene *CYP1A1* e do éxon 6 do gene *OGGI* identificados nesse estudo.

GENE	SNP ID	ALTERAÇÃO NUCLEOTÍDICA	POSIÇÃO GENÔMICA
	rs3813867	G/C	-1295
	rs6413422	A/C	-1129
	rs2031920	C/T	-1055
	rs2031921	C/T	-1027
<i>CYP2E1</i>	rs181373843	G/A	-1009
	rs147346339	A/G	-1005
	rs3813870	A/G	-930
	rs2031922	T/C	-807
<i>CYP1A1</i>	rs1048943	A/G	2454
	rs1799814	C/A	2452
<i>OGGI</i>	rs1052133	C/G	7146
	rs293795	A/G	7486

#### 4.4 COMPARAÇÃO DOS GENÓTIPOS ENTRE OS GRUPOS CASO E CONTROLE

A comparação dos genótipos dos genes entre os grupos caso e controle está apresentada na Tabela 14. Foi observado que os pontos de variação rs3813867, rs6413422, rs2031920, rs2031921, rs181373843 e rs147346339 do gene *CYP2E1* tiveram maior frequência do alelo não mutado tanto no grupo caso quanto no controle, nenhum homocigoto mutado foi detectado para essas 6 regiões. Nos pontos de variação dos genes *CYP1A1* e *OGG1*, embora tenham apresentado o alelo mutado, estes aparecem com frequência baixa.

**Tabela 14.** Comparação dos genótipos entre os grupos caso e controle.

	Grupos n (%)		Total	$\chi^2$	p*
	Caso	Controle			
<i>CYP2E1</i>					
<b>rs3813867</b>					
Heterocigoto GC	6 (7,2)	8 (9,6)	14 (8,4)	0,31	0,57
Homocigoto normal GG	77 (92,8)	75 (90,4)	152 (91,6)		
<b>rs6413422</b>					
Heterocigoto AC	1 (1,2)	1 (1,2)	2 (1,2)	0,01	0,98
Homocigoto normal AA	82 (98,8)	82 (98,8)	164 (98,8)		
<b>rs2031920</b>					
Heterocigoto CT	6 (7,2)	9 (10,8)	15 (9,0)	0,66	0,41
Homocigoto normal CC	77 (92,8)	74 (89,2)	151 (91,0)		
<b>rs2031921</b>					
Heterocigoto TC	6 (7,2)	9 (10,8)	15 (9,0)	0,66	0,41
Homocigoto normal TT	77 (92,8)	74 (89,2)	151 (91,0)		
<b>rs181373843</b>					
Heterocigoto GC	0 (0,0)	1 (1,2)	1 (0,6)	1,06	0,31
Homocigoto normal GG	83 (100,0)	82 (98,8)	165 (99,4)		
<b>rs147346339</b>					
Heterocigoto AG	0 (0,0)	1 (1,2)	1 (0,6)	1,06	0,31
Homocigoto normal AA	83 (100,0)	82 (98,8)	165 (99,4)		
<b>rs3813870</b>					
Heterocigoto AG	10 (12,0)	10 (12,0)	20 (12,0)	1,07	0,60
Homocigoto mutado GG	0 (0,0)	1 (1,2)	1 (0,6)		
Homocigoto normal AA	73 (88,0)	72 (86,7)	145 (87,3)		
<b>rs2031922</b>					
Heterocigoto TC	13 (15,7)	13 (15,7)	26 (15,7)	3,87	0,14
Homocigoto mutado CC	8 (9,6)	2 (2,4)	10 (6,0)		
Homocigoto normal TT	62 (74,7)	68 (81,9)	130 (78,3)		
<i>CYP1A1</i>					
<b>rs1048943</b>					
Heterocigoto AG	15 (18,1)	17 (20,5)	32 (19,3)	1,13	0,56
Homocigoto mutado GG	1 (1,2)	0 (0,0)	1 (0,6)		
Homocigoto normal AA	67 (80,7)	66 (79,5)	133 (80,1)		
<b>rs1799814</b>					
Heterocigoto CA	13 (15,7)	12 (14,5)	25 (15,1)	1,04	0,59
Homocigoto mutado AA	0 (0,0)	1 (1,2)	1 (0,6)		

Homozigoto normal CC <i>OGG1</i> <b>rs1052133</b>	70 (84,3)	70 (84,3)	140 (84,3)		
Heterozigoto CG	30 (36,1)	27 (32,5)	57 (34,3)		
Homozigoto mutado GG	1 (1,2)	4 (4,8)	5 (3,0)	195	0,37
Homozigoto normal CC <b>rs293795</b>	52 (62,7)	52 (62,7)	104 (62,7)		
Heterozigoto AG	22 (26,5)	21 (25,3)	43 (25,9)		
Homozigoto mutado GG	4 (4,8)	4 (4,8)	8 (4,8)	0,32	0,98
Homozigoto normal AA	57 (68,7)	58 (69,9)	115 (69,3)		

\*Qui-quadrado

#### 4.5 DANOS AO DNA DETECTADOS PELO ENSAIO COMETA NOS GRUPOS CASO E CONTROLE DISTRIBUÍDOS DE ACORDO COM OS PONTOS DE VARIAÇÃO DOS GENES *CYP2E1*, *CYP1A1* E *OGG1*.

Ao comparar os resultados das análises do sequenciamento com os danos de DNA entre os grupos caso e controle não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes (Tabelas 15 e 16). No entanto, nos etilistas, foram encontradas associações entre o MCO nos pontos de variação rs3813867, rs2031920 e rs2031921 para heterozigotos (Tabela 15). Os pontos de variação rs181373843 e rs147346339 não foram analisados por apresentarem somente o genótipo homozigoto normal.

**Tabela 15.** Estimativas da correlação dos parâmetros do ensaio cometa (média  $\pm$  desvio padrão) e os genótipos individuais entre os etilistas.

	CC	% DNA	MCO
<i>CYP2E1</i>			
<b>rs3813867*</b>	<b><math>p = 0,11</math></b>	<b><math>p = 0,19</math></b>	<b><math>p = 0,04</math></b>
Heterozigoto	16,73 $\pm$ 4,1	30,13 $\pm$ 14,33	10,25 $\pm$ 3,98
Homozigoto normal	14,73 $\pm$ 9,29	23,22 $\pm$ 13,32	7,62 $\pm$ 5,91
<b>rs6413422*</b>	<b><math>p = 0,89</math></b>	<b><math>p = 0,36</math></b>	<b><math>p = 0,31</math></b>
Heterozigoto	14,08 $\pm$ 0,00	35,34 $\pm$ 0,00	11,76 $\pm$ 0,00
Homozigoto normal	14,88 $\pm$ 9,07	23,58 $\pm$ 13,44	7,76 $\pm$ 5,83
<b>rs2031920*</b>	<b><math>p = 0,11</math></b>	<b><math>p = 0,19</math></b>	<b><math>p = 0,04</math></b>
Heterozigoto	16,73 $\pm$ 4,10	30,13 $\pm$ 14,33	10,25 $\pm$ 3,98
Homozigoto normal	14,73 $\pm$ 9,29	23,22 $\pm$ 13,32	7,62 $\pm$ 5,91
<b>rs2031921*</b>	<b><math>p = 0,11</math></b>	<b><math>p = 0,19</math></b>	<b><math>p = 0,04</math></b>
Heterozigoto	16,73 $\pm$ 4,10	30,13 $\pm$ 14,33	10,25 $\pm$ 3,98
Homozigoto normal	14,73 $\pm$ 9,29	23,22 $\pm$ 13,32	7,62 $\pm$ 5,91
<b>rs3813870*</b>	<b><math>p = 0,41</math></b>	<b><math>p = 0,62</math></b>	<b><math>p = 0,30</math></b>
Heterozigoto	12,33 $\pm$ 5,02	20,54 $\pm$ 9,72	5,82 $\pm$ 3,09
Homozigoto normal	15,22 $\pm$ 9,40	24,16 $\pm$ 13,85	8,08 $\pm$ 6,05

<b>rs2031922**</b>	<b><i>p</i> = 0,87</b>	<b><i>p</i> = 0,31</b>	<b><i>p</i> = 0,40</b>
Heterozigoto	15,78 ± 11,41	18,79 ± 8,16	6,35 ± 3,94
Homozigoto mutado	14,69 ± 4,46	28,65 ± 13,44	9,36 ± 4,18
Homozigoto normal	14,70 ± 9,00	24,12 ± 14,14	7,91 ± 6,29
<i>CYP1A1</i>			
<b>rs1048943**</b>	<b><i>p</i> = 0,60</b>	<b><i>p</i> = 0,63</b>	<b><i>p</i> = 0,75</b>
Heterozigoto	15,48 ± 7,97	24,10 ± 12,27	8,12 ± 5,54
Homozigoto mutado	11,55 ± 0,00	29,74 ± 0,00	8,95 ± 0,00
Homozigoto normal	14,78 ± 9,34	23,54 ± 13,83	7,72 ± 5,95
<b>rs1799814*</b>	<b><i>p</i> = 0,62</b>	<b><i>p</i> = 0,55</b>	<b><i>p</i> = 0,75</b>
Heterozigoto	15,61 ± 13,09	25,04 ± 13,88	9,34 ± 10,18
Homozigoto normal	14,73 ± 8,16	23,47 ± 13,43	7,52 ± 4,64
<i>OGGI</i>			
<b>rs1052133*</b>	<b><i>p</i> = 0,91</b>	<b><i>p</i> = 0,50</b>	<b><i>p</i> = 0,43</b>
Heterozigoto	16,81 ± 10,50	26,10 ± 12,42	8,51 ± 4,32
Homozigoto mutado	14,19 ± 0,00	31,65 ± 0,00	11,46 ± 0,00
Homozigoto normal	13,77 ± 8,03	22,20 ± 13,97	7,33 ± 6,55
<b>rs293795**</b>	<b><i>p</i> = 0,41</b>	<b><i>p</i> = 0,32</b>	<b><i>p</i> = 0,52</b>
Heterozigoto	15,70 ± 10,65	23,59 ± 15,50	8,15 ± 8,44
Homozigoto mutado	10,48 ± 3,75	16,13 ± 7,95	4,83 ± 3,47
Homozigoto normal	14,86 ± 8,60	24,30 ± 12,88	7,88 ± 4,63

\*Mann-Whitney; \*\*Kruskal-Wallis

**Tabela 16.** Estimativas da correlação dos parâmetros do ensaio cometa (média ± desvio padrão) e os genótipos individuais entre o grupo controle.

	CC	% DNA	MCO
<i>CYP2E1</i>			
<b>rs3813867*</b>	<b><i>p</i> = 0,07</b>	<b><i>p</i> = 0,95</b>	<b><i>p</i> = 0,96</b>
Heterozigoto	15,50 ± 7,82	21,37 ± 17,30	6,17 ± 6,39
Homozigoto normal	11,12 ± 6,32	19,26 ± 12,47	5,64 ± 5,59
<b>rs6413422*</b>	<b><i>p</i> = 0,12</b>	<b><i>p</i> = 0,50</b>	<b><i>p</i> = 0,41</b>
Heterozigoto	3,98 ± 0,00	9,78 ± 0,00	1,64 ± 0,00
Homozigoto normal	11,63 ± 6,54	19,58 ± 12,93	5,74 ± 5,65
<b>rs2031920*</b>	<b><i>p</i> = 0,06</b>	<b><i>p</i> = 0,59</b>	<b><i>p</i> = 0,59</b>
Heterozigoto	15,23 ± 7,36	22,78 ± 16,72	6,76 ± 6,23
Homozigoto normal	11,09 ± 6,36	19,06 ± 12,43	5,56 ± 5,59
<b>rs2031921*</b>	<b><i>p</i> = 0,06</b>	<b><i>p</i> = 0,59</b>	<b><i>p</i> = 0,59</b>
Heterozigoto	15,23 ± 7,36	22,78 ± 16,72	6,76 ± 6,23
Homozigoto normal	11,09 ± 6,36	19,06 ± 12,43	5,56 ± 5,59
<b>rs181373843*</b>	<b><i>p</i> = 0,74</b>	<b><i>p</i> = 0,79</b>	<b><i>p</i> = 0,89</b>
Heterozigoto	8,23 ± 0,00	16,82 ± 0,00	2,88 ± 0,00
Homozigoto normal	11,58 ± 6,58	19,49 ± 12,97	5,73 ± 5,66
<b>rs147346339*</b>	<b><i>p</i> = 0,28</b>	<b><i>p</i> = 0,43</b>	<b><i>p</i> = 0,26</b>
Heterozigoto	4,60 ± 0,00	9,28 ± 0,00	1,49 ± 0,00

Homozigoto normal	11,63 ± 6,55	19,58 ± 12,92	5,74 ± 5,65
<b>rs3813870**</b>	<b>p = 0,83</b>	<b>p = 0,30</b>	<b>p = 0,34</b>
Heterozigoto	11,85 ± 8,22	15,63 ± 10,61	4,34 ± 4,06
Homozigoto mutado	11,07 ± 0,00	12,28 ± 0,00	2,92 ± 0,00
Homozigoto normal	11,50 ± 6,41	20,09 ± 13,21	5,92 ± 5,84
<b>rs2031922**</b>	<b>p = 0,32</b>	<b>p = 0,49</b>	<b>p = 0,56</b>
Heterozigoto	12,88 ± 6,93	16,42 ± 8,69	4,48 ± 3,29
Homozigoto mutado	13,26 ± 12,34	34,09 ± 37,16	10,97 ± 13,51
Homozigoto normal	11,23 ± 6,42	19,61 ± 12,69	5,77 ± 5,75
<i>CYP1A1</i>			
<b>rs1048943*</b>	<b>p = 0,78</b>	<b>p = 0,44</b>	<b>p = 0,54</b>
Heterozigoto	10,80 ± 5,18	17,03 ± 10,36	4,79 ± 4,37
Homozigoto normal	11,73 ± 6,88	20,09 ± 13,46	5,92 ± 5,92
<b>rs1799814*</b>	<b>p = 0,32</b>	<b>p = 0,49</b>	<b>p = 0,10</b>
Heterozigoto	15,01 ± 4,89	28,89 ± 18,76	9,02 ± 7,53
Homozigoto mutado	5,78 ± 0,00	7,12 ± 0,00	1,69 ± 0,00
Homozigoto normal	11,03 ± 6,66	18,02 ± 11,03	5,18 ± 5,12
<i>OGGI</i>			
<b>rs1052133**</b>	<b>p = 0,14</b>	<b>p = 0,15</b>	<b>p = 0,40</b>
Heterozigoto	12,27 ± 6,56	19,02 ± 10,30	5,89 ± 4,35
Homozigoto mutado	7,57 ± 4,26	11,10 ± 1,98	1,97 ± 0,58
Homozigoto normal	11,47 ± 6,67	20,33 ± 14,37	5,87 ± 6,34
<b>rs293795**</b>	<b>p = 0,39</b>	<b>p = 0,40</b>	<b>p = 0,52</b>
Heterozigoto	12,82 ± 7,83	22,94 ± 16,37	7,23 ± 8,11
Homozigoto mutado	7,75 ± 5,71	15,56 ± 14,55	4,48 ± 5,87
Homozigoto normal	11,34 ± 6,08	18,47 ± 11,29	5,22 ± 4,42

\*Mann-Whitney; \*\*Kruskal-Wallis

#### 4.6 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E ADERÊNCIA AO EQUILÍBRIO DE HARDY-WEIBERG

Nas amostras coletadas na cidade de Goiânia foram encontrados 8 pontos de variação para o gene *CYP2E1*, 2 pontos de variação para o gene *CYP1A1*, e 2 pontos de variação para o gene *OGGI*. Foram inseridos os dados dos mesmos pontos de variação das amostras do projeto *1000Genomes*, esses e as suas frequências estão apresentados na Tabela 17.

**Tabela 17.** Pontos de variação dos genes *CYP2E1*, *CYP1A1* e *OGG1* e suas frequências em diferentes populações do projeto *1000Genomes* e em uma amostra brasileira de Goiânia, Goiás.

Gene	Superpopulação			Brasil		Africanos						Europeus					Leste asiáticos					Sul asiáticos					Americanos				GLOBAL		
	População			Contr	Caso	YRI	LWK	GWD	MSL	ESN	ASW	ACB	CEU	TSI	FIN	GBR	IBS	CHB	JPT	CHS	CDX	KHV	PJL	BEB	STU	ITU	GIH	MXL	PUR	CLM		PEL	
	SNP ID	SNP	n	103	85	108	99	113	85	99	61	96	99	107	99	91	107	103	104	105	93	99	96	86	102	102	103	64	104	94		85	2692
			Alelo	Frequência alélica																													
<i>CYP2E1</i>	rs3813867	G/C	G	0,946	0,965	0,917	0,975	0,920	0,935	0,919	0,926	0,943	0,949	0,960	0,973	0,977	0,939	0,762	0,808	0,800	0,839	0,783	0,990	0,988	0,995	0,990	0,990	0,844	0,938	0,872	0,835	0,918	
<i>CYP2E1</i>	rs6413422	A/C	A	0,995	0,994	0,995	0,995	0,978	0,965	0,995	0,984	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,996	
<i>CYP2E1</i>	rs2031920	C/T	C	0,946	0,965	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,984	1,000	0,949	0,960	0,973	0,977	0,939	0,762	0,808	0,800	0,839	0,783	0,990	0,988	0,995	0,990	0,990	0,844	0,942	0,888	0,841	0,935	
<i>CYP2E1</i>	rs2031921	T/C	T	0,941	0,965	0,921	0,980	0,934	0,965	0,929	0,934	0,943	0,949	0,960	0,973	0,977	0,939	0,762	0,808	0,800	0,839	0,783	0,990	0,988	0,995	0,990	0,990	0,844	0,942	0,872	0,835	0,920	
<i>CYP2E1</i>	rs181373843	G/C	G	0,995	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,995	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,995	0,995	1,000	1,000	0,995	1,000	0,999		
<i>CYP2E1</i>	rs147346339	A/G	A	0,995	1,000	0,991	0,955	0,991	0,994	1,000	0,967	0,984	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,996		
<i>CYP2E1</i>	rs3813870	A/G	A	0,931	0,935	0,838	0,894	0,814	0,853	0,894	0,893	0,875	0,967	0,980	0,989	0,963	0,975	0,772	0,736	0,776	0,613	0,773	0,755	0,686	0,672	0,721	0,728	0,922	0,875	0,904	0,906	0,842	
<i>CYP2E1</i>	rs2031922	T/C	T	0,887	0,818	0,657	0,636	0,690	0,676	0,626	0,803	0,734	0,916	0,955	0,956	0,958	0,919	0,762	0,808	0,800	0,839	0,783	0,990	0,988	0,995	0,980	0,990	0,805	0,875	0,851	0,800	0,840	
<i>CYP1A1</i>	rs1799814	C/A	C	0,923	0,923	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,979	0,975	0,986	0,995	0,962	0,916	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,990	1,000	0,985	0,985	0,995	0,977	0,938	0,973	0,994	0,982	
<i>CYP1A1</i>	rs1048943	A/G	A	0,880	0,887	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,943	0,990	0,960	0,967	0,949	0,967	0,981	0,733	0,793	0,757	0,710	0,742	0,870	0,860	0,863	0,877	0,893	0,664	0,856	0,718	0,292	0,868	
<i>OGG1</i>	rs1052133	C/G	C	0,791	0,800	0,852	0,813	0,858	0,818	0,843	0,844	0,880	0,798	0,813	0,808	0,753	0,808	0,442	0,500	0,424	0,392	0,500	0,620	0,645	0,672	0,637	0,646	0,664	0,813	0,681	0,635	0,705	
<i>OGG1</i>	rs293795	A/G	A	0,825	0,818	0,671	0,697	0,681	0,624	0,662	0,672	0,656	0,854	0,874	0,813	0,885	0,846	0,961	0,966	0,943	0,989	0,944	0,854	0,791	0,873	0,912	0,908	0,875	0,798	0,878	0,912	0,830	

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

As frequências genotípicas aderiram ao esperado pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg para todos os pontos de variação ( $p > 0,05$ ), exceto para os pontos de variação destacados na Tabela 18. Não foram detectados desvios para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg nas amostras brasileiras (Tabela 18).

**Tabela18.** Aderência das frequências do genótipos ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg considerando as populações do projeto *1000Genomes* e a população brasileira ( $P \leq 0.05$  indica fuga do Equilíbrio de Hardy-Weinberg).

Gene	Superpopulação	Brasil		Africanos							Europeus					Leste asiáticos					Sul asiáticos					Americanos						
	População	Controle	Caso	YRI	LWK	GWD	MSL	ESN	ASW	ACB	CEU	TSI	FIN	GBR	IBS	CHB	JPT	CHS	CDX	KHV	PJL	BEB	STU	ITU	GIH	MXL	PUR	CLM	PEL			
	SNP ID	103	85	108	99	113	85	99	61	96	99	107	99	91	107	103	104	105	93	99	96	86	102	102	103	64	104	94	85			
		<b>P</b>																														
CYP2E1	rs3813867	1,000	1,000	0,538	1,000	1,000	0,292	1,000	1,000	0,262	1,000	1,000	0,137	1,000	1,000	0,007	1,000	0,355	0,698	1,000	1,000	1,000	-	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
CYP2E1	rs6413422	-	-	-	-	1,000	1,000	-	1,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CYP2E1	rs2031920	1,000	1,000	-	-	-	-	-	1,000	-	1,000	1,000	0,137	1,000	1,000	0,007	1,000	0,355	0,698	1,000	1,000	1,000	-	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
CYP2E1	rs2031921	1,000	1,000	0,495	1,000	1,000	0,087	1,000	1,000	0,262	1,000	1,000	0,137	1,000	1,000	0,007	1,000	0,355	0,698	1,000	1,000	1,000	-	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	
CYP2E1	rs181373843	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
CYP2E1	rs147346339	-	-	1,000	1,000	1,000	-	-	1,000	1,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
CYP2E1	rs3813870	0,380	1,000	0,472	0,071	0,023	1,000	0,594	1,000	0,156	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,779	0,320	0,778	0,513	0,093	0,266	0,456	0,823	1,000	1,000	0,316	1,000	0,189	0,147	0,147	0,147	
CYP2E1	rs2031922	0,109	0,000	0,834	0,199	0,047	0,459	0,831	0,099	0,600	1,000	1,000	0,173	1,000	1,000	0,007	1,000	0,355	0,698	1,000	1,000	1,000	-	1,000	1,000	0,432	0,358	1,000	0,505	0,505		
CYP11A1	rs1799814	0,471	1,000	-	-	-	-	-	-	1,000	1,000	1,000	-	1,000	0,543	-	-	-	-	-	1,000	-	1,000	1,000	-	1,000	0,326	1,000	-	-	-	
CYP11A1	rs1048943	0,355	1,000	-	-	-	-	-	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,452	0,553	0,418	0,806	1,000	0,183	0,660	0,686	0,642	1,000	0,397	0,431	1,000	0,120	0,120		
OGG1	rs1052133	0,763	0,178	1,000	0,325	0,000	0,458	1,000	0,329	0,126	0,757	0,115	1,000	0,783	0,350	0,312	0,558	0,422	0,048	0,040	0,196	0,245	0,365	0,673	0,831	0,097	0,191	1,000	0,642	0,642		
OGG1	rs293795	0,181	0,458	1,000	0,808	0,667	0,816	0,367	1,000	0,364	0,687	0,061	1,000	0,322	1,000	1,000	1,000	1,000	0,250	0,415	1,000	0,660	0,164	0,598	0,237	0,119	1,000	1,000	1,000	1,000		

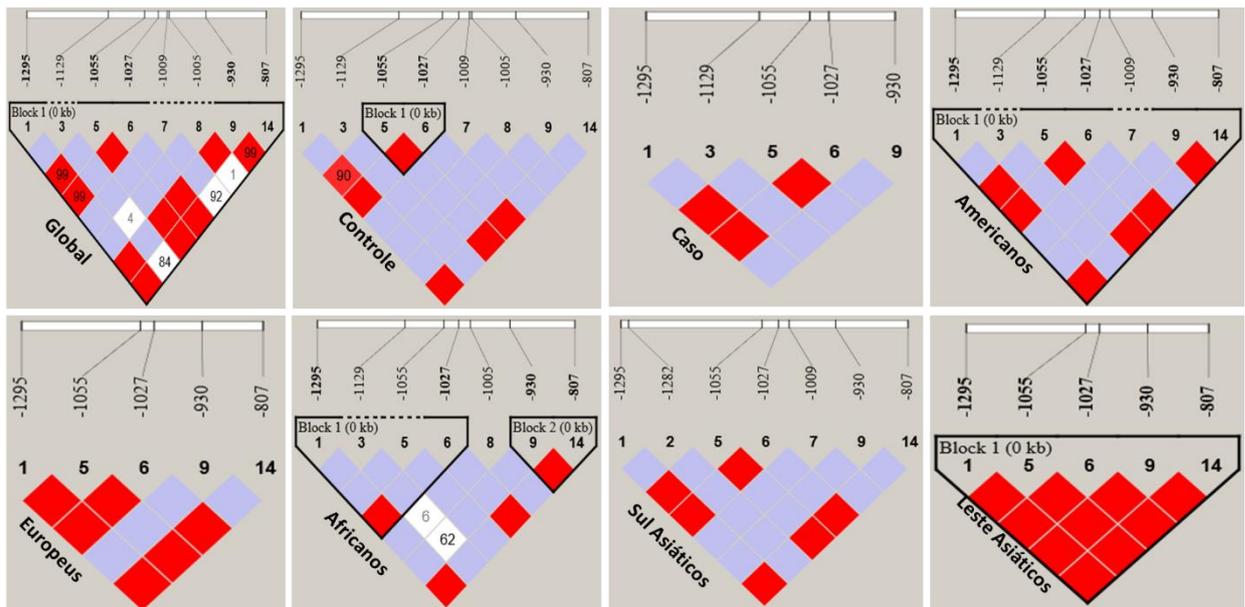
YRI (Yoruba em Ibadan, Nigéria), LWK (Luhya em Webuye, Kenia), GWD (Gambianos nos estados do Oeste em Gambia), MSL (Mende em Serra Leoa), ESN (Esan na Nigéria), TSI (Habitantes da Toscana na Itália), FIN (Finlandeses na Finlândia), GBR (Britânicos da Inglaterra e Escócia), IBS (População Ibérica da Espanha),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

- O teste não pôde ser realizado devido à baixa variabilidade ou a presença de somente um alelo nesta população.

## 5 DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO

O Desequilíbrio de Ligação (DL), foi mensurado utilizando o software Haploview 4.1 (Barrett et al., 2005) utilizando pontos de variação que apresentaram frequência alélica mínima (MAF) de 1%. Na população global (união das populações do *1000Genomes* e brasileiros), um único bloco de DL foi detectado envolvendo toda a extensão da região promotora do gene *CYP2E1*. Em relação aos subgrupos estratificados pelo continente de origem, foi detectado um elevado DL principalmente entre o ponto de variação -1295 e os demais pontos de variação (Figura 5). A avaliação do DL apresentados pelos grupos caso e controle e populações americana, europeia e asiática indicou a presença de regiões cujos pontos de variação -1295 e -1055 apresentam um forte desequilíbrio. Os padrões de DL variam entre os grupos avaliados, especialmente entre as amostras das populações americana e leste asiática.

**Figura 5.** DL entre os pares de SNPs no gene *CYP2E1*.



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

## 6 DIVERSIDADE, FREQUÊNCIA E RELAÇÕES ENTRE OS HAPLÓTIPOS

Os haplótipos foram inferidos pelo método probabilístico PHASE como descrito anteriormente. A inferência de haplótipos foi realizada usando 2670 amostras (2504 amostras do projeto *1000Genomes* e 166 amostras brasileiras). A análise revelou a presença de 15 haplótipos diferentes considerando os 8 pontos de variação encontrados na região avaliada do gene *CYP2E1*, e 3 haplótipos diferentes considerando os dois pontos de variação encontrados nas regiões avaliadas tanto do gene *CYP1A1* quanto do gene *OGG1*. As Tabelas 19, 21 e 23 apresentam os haplótipos encontrados considerando todas as populações em conjunto. As Tabelas 20, 22 e 24 apresentam a frequência relativa dos haplótipos encontrados nos dados do projeto *1000Genomes* e nas amostras brasileiras para cada um dos genes estudados.

**Tabela 19.** Haplótipos encontrados considerando os pontos de variação presentes na região promotora do gene *CYP2E1*.

Haplótipos	Pontos de variação <sup>a</sup>								População mundial
	-1295	-1129	-1055	-1027	-1009	-1005	-903	-807	
<b>H01</b>	G	A	C	T	G	A	A	T	0,6730
<b>H02</b>	G	A	C	T	G	A	G	T	0,1580
<b>H03</b>	G	A	C	T	G	A	A	C	0,0775
<b>H04</b>	C	A	T	C	G	A	A	C	0,0646
<b>H05</b>	C	A	C	C	G	A	A	C	0,0147
<b>H06</b>	G	A	C	T	G	G	A	T	0,0041
<b>H07</b>	G	C	C	T	G	A	A	T	0,0035
<b>H08</b>	C	A	C	T	G	A	A	C	0,0024
<b>H09</b>	G	A	C	T	C	A	A	T	0,0009
<b>H10</b>	G	A	T	C	G	A	A	C	0,0002
<b>H11</b>	C	A	T	C	G	A	A	T	0,0002
<b>H12</b>	G	A	T	T	G	A	A	T	0,0002
<b>H13</b>	C	A	C	T	G	A	G	C	0,0002
<b>H14</b>	G	A	C	T	G	A	G	C	0,0000
<b>H15</b>	G	A	C	G	A	T	A	T	0,0000

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

**Tabela 20.** Frequência relativa dos 15 haplótipos encontrados para o gene *CYP2E1* dos dados do projeto *1000Genomes* e das amostras brasileiras.

Superpopulação	Brasil		Africanos							Europeus					Leste asiáticos					Sul asiáticos					Americanos				Global
População	CONTROLE	CASO	YRI	LWK	GWD	MSL	ESN	ASW	ACB	CEU	TSI	FIN	GBR	IBS	CHB	JPT	CHS	CDX	KHV	PJL	BEB	STU	ITU	GIH	MXL	PUR	CLM	PEL	
2n	206	170	216	198	226	170	198	122	192	198	214	198	182	214	206	208	210	186	198	192	172	204	204	206	128	208	188	170	5384
Haplótipo																													
H01	0,8040	0,7470	0,4810	0,4800	0,4730	0,4880	0,5150	0,6480	0,5940	0,8940	0,8830	0,9340	0,9400	0,9160	0,5340	0,5430	0,5760	0,4520	0,5560	0,7450	0,6740	0,6620	0,6960	0,7180	0,7190	0,7450	0,7550	0,7060	0,6730
H02	0,0686	0,0588	0,1620	0,1060	0,1860	0,1470	0,1060	0,1070	0,1250	0,0253	0,0327	0,0202	0,0110	0,0374	0,2280	0,2640	0,2240	0,3870	0,2270	0,2450	0,3140	0,3280	0,2790	0,2720	0,0781	0,1200	0,0957	0,0941	0,1580
H03	0,0539	0,1410	0,2590	0,3380	0,2300	0,2590	0,2930	0,1230	0,2080	0,0202	0,0327	0,0051	0,0165	0,0234	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0391	0,0625	0,0213	0,0353	0,0775
H04	0,0490	0,0353	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0164	0,0000	0,0606	0,0514	0,0404	0,0275	0,0187	0,2380	0,1920	0,2000	0,1610	0,2170	0,0104	0,0116	0,0049	0,0098	0,0097	0,1480	0,0577	0,1120	0,1590	0,0646
H05	0,0049	0,0000	0,0787	0,0202	0,0664	0,0353	0,0707	0,0492	0,0573	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0078	0,0000	0,0160	0,0059	0,0147
H06	0,0049	0,0000	0,0093	0,0455	0,0089	0,0059	0,0000	0,0328	0,0156	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0041
H07	0,0049	0,0059	0,0046	0,0051	0,0221	0,0353	0,0051	0,0164	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0048	0,0000	0,0000	0,0035
H08	0,0000	0,0000	0,0046	0,0051	0,0133	0,0294	0,0101	0,0082	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0024
H09	0,0049	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0049	0,0049	0,0000	0,0000	0,0048	0,0000	0,0000	0,0009
H10	0,0049	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0002
H11	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0047	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0002
H12	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0078	0,0000	0,0000	0,0002
H13	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0048	0,0000	0,0000	0,0002
H14	0,0000	0,0059	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
H15	0,0000	0,0059	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

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

**Tabela 21.** Haplótipos encontrados considerando os pontos de variação presentes na região estudada do gene *CYP1A1*.

Haplótipos	Pontos de variação <sup>a</sup>		População mundial
	2452	2454	
H01	C	A	0,8460
H02	C	G	0,1320
H03	A	A	0,0182

a Posição genômica referenciada tendo a base A do primeiro ATG traduzido como a +1.

**Tabela 22.** Frequência relativa dos 3 haplótipos encontrados para o gene *CYP11A1* dos dados do projeto *1000Genomes* e das amostras brasileiras.

Superpopulação	Brasil		Africanos							Europeus					Leste asiáticos					Sul asiáticos					Americanos				Global
População	CONTROLE	CASO	YRI	LWK	GWD	MSL	ESN	ASW	ACB	CEU	TSI	FIN	GBR	IBS	CHB	JPT	CHS	CDX	KHV	PJL	BEB	STU	ITU	GIH	MXL	PUR	CLM	PEL	
2n	206	170	216	198	226	170	198	122	192	198	214	198	182	214	206	208	210	186	198	192	172	204	204	206	128	208	188	170	5384
Haplótipo																													
H01	0,8028	0,8093	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,9430	0,9690	0,9340	0,9530	0,9440	0,9290	0,8970	0,7330	0,7930	0,7570	0,7100	0,7420	0,8590	0,8600	0,8480	0,8630	0,8880	0,6410	0,7930	0,6910	0,2860	0,8460
H02	0,1200	0,1130	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0574	0,0104	0,0404	0,0327	0,0505	0,0330	0,0187	0,2670	0,2070	0,2430	0,2900	0,2580	0,1300	0,1400	0,1370	0,1230	0,1070	0,3360	0,1440	0,2820	0,7080	0,1320
H03	0,0769	0,0774	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0208	0,0253	0,0140	0,0051	0,0385	0,0841	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0104	0,0000	0,0147	0,0147	0,0049	0,0234	0,0625	0,0266	0,0060	0,0182

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

**Tabela 23.** Haplótipos encontrados considerando os pontos de variação presentes na região estudada do gene *OGGI*.

Pontos de variação <sup>a</sup>				
Haplótipos	6803	7143	População mundial	
H1	C	A	0,534	
H2	G	A	0,295	
H3	C	G	0,170	

a Posição genômica referenciada tendo a base A do primeiro ATG traduzido como a +1.

**Tabela 24.** Frequência relativa dos 3 haplótipos encontrados para o gene *OGGI* dos dados do projeto *1000Genomes* e das amostras brasileiras.

Superpopulação	Brasil		Africanos							Europeus					Leste asiáticos					Sul asiáticos					Americanos				Global
População	CONTROLE	CASO	YRI	LWK	GWD	MSL	ESN	ASW	ACB	CEU	TSI	FIN	GBR	IBS	CHB	JPT	CHS	CDX	KHV	PJL	BEB	STU	ITU	GIH	MXL	PUR	CLM	PEL	
2n	206	170	216	198	226	170	198	122	192	198	214	198	182	214	206	208	210	186	198	192	172	204	204	206	128	208	188	170	5384
Haplótipo																													
H01	0,617	0,618	0,523	0,510	0,540	0,441	0,505	0,516	0,536	0,652	0,687	0,621	0,637	0,654	0,403	0,466	0,367	0,382	0,444	0,474	0,436	0,544	0,549	0,553	0,539	0,611	0,559	0,547	0,534
H02	0,209	0,200	0,148	0,187	0,142	0,182	0,157	0,156	0,120	0,202	0,187	0,192	0,247	0,192	0,558	0,500	0,576	0,608	0,500	0,380	0,355	0,328	0,363	0,354	0,336	0,188	0,319	0,365	0,295
H03	0,175	0,182	0,329	0,303	0,319	0,376	0,338	0,328	0,344	0,146	0,126	0,187	0,115	0,154	0,039	0,034	0,057	0,011	0,056	0,146	0,209	0,127	0,088	0,092	0,125	0,202	0,122	0,088	0,170

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

## 7 DISCUSSÃO

O etanol é considerado a droga mais consumida no mundo, o consumo crônico dessa substância é um problema social e de saúde pública, uma vez que traz graves consequências, tornou-se um dos principais fatores risco a doenças como cirrose, câncer hepático, miocardiopatia alcoólica, homicídios, acidentes, sendo responsável por 3,2% de todas as mortes no mundo (OMS, 2014). No Brasil o consumo crônico do etanol é um dos principais fatores causa de doença e mortalidade, e tornou-se um problema de saúde pública (Meloni e Laranjeira, 20014; World Health Report, 2002).

A análise das amostras dos etilistas e dos indivíduos que constituíram o grupo controle demonstrou, assim como em outros estudos, que o consumo crônico de etanol é predominantemente realizado por homens com idade acima de 40 anos (Pastorelli et al., 2001; Soya et al., 2008; Marques, 2010; Ballarin et al., 2011; Freitas et al., 2012). A maior frequência do sexo masculino no consumo abusivo de etanol pode estar relacionada, principalmente, devido ao fato de as mulheres serem mais vulneráveis aos efeitos adversos do consumo excessivo de etanol, por possuírem menor índice de massa e quantidade de água corporal, maior quantidade de gordura, levando, conseqüentemente a uma taxa de metabolização do álcool diferente em relação a indivíduos do sexo masculino (Marques, 2010).

A partir da comparação dos parâmetros avaliados pelo ensaio cometa entre o grupo caso e grupo controle, o maior dano ao DNA encontrado ocorreu no grupo caso. Isso pode ser devido ao consumo de etanol em grandes quantidades e de forma crônica, que expõem os etilistas a níveis elevados de acetaldeído por longos períodos. O acetaldeído é tóxico ao organismo e induz ao estresse oxidativo e danos ao DNA. Além disso, é fator de risco na susceptibilidade ao câncer de cabeça e pescoço (Garcia, 2010; Hakenewertha et al., 2013), carcinoma de boca (Takamori, 2012) e doenças hepáticas (Khan et al., 2009).

Em relação ao hábito tabagista, notou-se diferença entre os grupos, no grupo caso houve predominância de fumantes ao comparar com o grupo controle em que houve predominância de não fumantes. O uso associado de etanol e tabaco ocorreu em 76% dos indivíduos etilistas. O consumo crônico de etanol e o tabagismo são comuns em indivíduos etilistas e tem associação com a maior produção de acetaldeído (Pastorelli et al., 2001; Soya et al., 2008). O hábito tabagista pode interferir na análise da relação entre o dano ao DNA e o consumo crônico de etanol. No entanto, este estudo não demonstrou que o dano ao DNA do grupo caso estava associado com o tempo de tabagismo e etilismo, carga tabágica e quantidade de álcool/dia ( $p > 0,05$ ). Isso provavelmente porque os grupos estão heterogêneos, no grupo caso os etilistas

possuem faixa etária mais elevada e grande parte são do sexo masculino, enquanto que no controle os indivíduos são mais jovens.

As análises dos genótipos demonstraram que dos 8 pontos de variação encontrados no gene *CYP2E1* (rs3813867, rs6413422, rs2031920, rs2031921, rs181373843, rs147346339, rs3813870 e rs2031922), os rs3813867, rs6413422, rs2031920, rs2031921, rs181373843 e rs147346339 tiveram maior frequência do alelo não mutado, tanto no grupo caso quanto no controle, sendo que nenhum homozigoto mutado foi detectado para essas regiões. Os rs1048943 e rs1799814 do gene *CYP1A1*, e os rs1052133 e rs293795 do gene *OGGI* apresentaram o alelo mutado, com frequências muito baixas (Tabela 14). Estudos demonstraram que esses pontos de variação nos genes *CYP2E1* e *CYP1A1* são relevantes quanto ao metabolismo de xenobióticos, como o etanol, sendo associados a um aumento do desenvolvimento de doenças (Vogel, 2007; Bozina et al., 2009; Reis, 2010; Carvalho, 2012; Garcia-Banuelos et al., 2012; Ramchandani, 2013). O ponto de variação rs2031920, por exemplo está associado a um aumento nos níveis de expressão do gene *CYP2E1*, e a maior atividade enzimática (Arif et al., 2007; Ramchandani, 2013). Outros grupos de estudo demonstraram que apesar de os indivíduos consumirem etanol de forma crônica, estes apresentaram o genótipo homozigoto normal mais frequente dentro do grupo dos etilistas (Vogel 2007; Khan et al., 2009, Marques, 2010).

Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os genótipos nos pontos de variação rs3813867, rs2031920, rs2031921 do gene *CYP2E1* e os danos ao DNA. Esses pontos de variação podem estar relacionados com a expressão alterada deste gene e podem provocar danos ao DNA (Charlier, 2012; Carvalho, 2012). Há relação entre o uso crônico de tabaco e o surgimento de câncer bucal e colo-retal com a presença genótipos homozigotos mutados e heterozigotos para o ponto de variação rs3813867 e do genótipo não mutado (C/C) para o ponto de variação rs2031920. O rs2031920 está relacionado à suscetibilidade de desenvolvimento de câncer oral e de pulmão em indivíduos expostos a xenobióticos, como etanol e o tabaco (Anantharaman et al., 2011; Peng et al., 2013; Kakino et al. 2016).

Indivíduos etilistas heterozigotos para os pontos de variação rs3813867, rs2031920, rs2031921 do gene *CYP2E1* apresentaram um dano ao DNA superior em relação ao alelo homozigoto não mutado quando analisado o parâmetro Momento da Cauda de Olive (MCO), o que não ocorreu no grupo controle. Os alelos mutados estão associados com o aumento da atividade de transcrição enzimática, e o aumento da atividade da enzima CYP2E1 promove a ativação de carcinogênicos, produção mais elevada de espécies reativas de oxigênio (ROS) e outros compostos tóxicos provocando então maior dano ao DNA (Albano, 2006; Gemma et al.,

2006; Vogel, 2007; Bozina et al., 2009; Deka et al., 2010; Marques, 2010; Garcia-Banuelos et al., 2012; Ramchandani, 2013). Porém, percebe-se uma tendência de menor dano ao DNA nos etilistas que apresentam genótipo homozigoto não mutado, devido à falta de significância estatística não é possível afirmar que este efeito seja uma vantagem conferida ao genótipo. A falta de significância estatística nesse estudo pode ser explicada pela baixa frequência do alelo variante porque a amostra é limitada, dessa forma, se faz necessário avaliar mais indivíduos.

Em relação aos dois pontos de variação encontrados no gene *CYP1A1*, rs1048943 e rs1799814, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os genótipos e os danos ao DNA, apesar de estes pontos de variação estarem relacionados a uma maior transcrição do gene, aumento da atividade da enzima e serem indicadores de suscetibilidade ao desenvolvimento de doenças (Ulusoy et al., 2007; Kristiansen et al., 2011). O ponto de variação rs1048943, uma transição de adenina para guanina (A/G) leva a substituição de isoleucina por valina, e está relacionado a maior transcrição do gene.

Nos dois pontos de variação do gene *OGGI*, rs1052133 e rs293795, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os genótipos e os danos ao DNA. Embora o alelo mutado no ponto de variação rs1052133 tenha apresentado diferenças significativamente importantes quando associado a susceptibilidade ao câncer (Li et al., 2008). Outros estudos demonstraram que a frequência elevada, quando comparada aos controles, do alelo mutado para esse ponto de variação em *OGGI* afeta a suscetibilidade ao câncer (Park et al., 2004; Kohno et al., 2009; Le Marchand et al., 2002; Chang et al., 2009; Janik et al., 2011).

Estudos demonstram a importância do ponto de variação rs1052133 no risco ao desenvolvimento de doenças. Estudo com portadores de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço e indivíduos saudáveis da Índia, apresentou baixa frequência genotípica de homozigotos mutados (0,08) para o rs1052133 do gene *OGGI*, no entanto, observaram que há associação entre genótipos homozigotos mutados (G/G) e heterozigotos (C/G) e a presença do carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (Mitra et al., 2011). Houve associação entre o rs1052133 e o aumento do risco dos pacientes em desenvolver câncer gástrico, e demonstraram que rs1052133 está associado a diminuição da atividade da enzimática de OGG1 (Lu et al., 2016). No entanto, esta associação não foi apresentada em outros estudos (Karahalil et al., 2008; Qian et al., 2011).

Os resultados desse estudo demonstram correlação entre os genótipos encontrados nos pontos de variação rs3813867, rs2031920 e rs2031921 do *CYP2E1* e o dano ao DNA quando analisado o parâmetro Momento da Cauda de Olive (MCO) no grupo dos etilistas, mas sem correlação entre os genótipos encontrados nos pontos de variação rs1048943 e rs1799814 do

gene *CYP1A1*, e os genótipo encontrados nos pontos de variação rs1052133 e rs293795 do gene *OGG1* e o dano ao DNA. Porém, isso não exclui a possibilidade de esses genótipos exercerem alguma influência no dano, visto que a combinação desses e outros genes do metabolismo do etanol também pode contribuir de alguma forma para o dano ao DNA.

As amostras brasileiras de Goiânia foram comparadas às frequências das 26 populações do projeto *1000Genomes*, esta abordagem permitiu uma avaliação global da variabilidade dessas regiões específicas dos genes desse estudo no mundo. Observando a frequência dos pontos de variação rs3813867, rs2031920 e rs2031921 do gene *CYP2E1* percebe-se que há maior proximidade genética entre as amostras da população brasileira com as subpopulações Britânicos da Inglaterra e Escócia, População Ibérica da Espanha. Em relação as frequências dos pontos de variação do gene *CYP1A1* das amostras brasileiras, rs1048943 demonstrou maior proximidade genética com a subpopulação de Finlandeses na Finlândia e rs1799814 com Porto-riquenhos de Porto Rico. E quanto as frequências dos pontos de variação do gene *OGG1* das amostras brasileiras, os pontos de variação rs1052133 e rs293795 demonstraram maior proximidade genética com a população de europeus.

As frequências genótípicas aderiram ao esperado pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg para todos os pontos de variação ( $P > 0,05$ ) nas amostras brasileiras. Exceto para os pontos de variação rs3813867, rs2031920, rs2031921, rs3813870 e rs2031922 do gene *CYP2E1*, e exceto para o ponto de variação rs1052133 do gene *OGG1* em subpopulações africanas e leste asiáticas do *1000Genomes*.

O Desequilíbrio de Ligação foi medido e no geral, os pontos de variação frequentes no gene *CYP2E1* apresentaram DL entre si, foi detectado um elevado DL principalmente entre o ponto de variação -1295 e os demais pontos de variação, evidenciado principalmente pelo baixo número de haplótipos frequentes. Na população americana foi detectado um bloco envolvendo toda a região promotora do *CYP2E1*. Também foi observado um bloco com elevado DL na população leste asiática. Na população africana, dois blocos de DL foram detectados envolvendo as extremidades da região promotora do gene *CYP2E1*.

Com base nos pontos de variação do gene *CYP2E1*, 15 haplótipos foram inferidos. Desses, apenas 4 haplótipos foram frequentes em todas as populações, aqui denominados H01, H02, H3 e H4, sugerindo que provavelmente estes são os mais antigos e originados antes da dispersão do homem à partir da África. Enquanto que com base nos dois pontos de variação dos genes *CYP1A1* e *OGG1*, foram inferidos 3 haplótipos para cada gene, todos presentes na população brasileira de estudo. Nenhum haplótipo composto apenas por alelos mutados foi apresentado nos pontos de variação dos genes *CYP1A1* e *OGG1*. Embora, tenha ocorrido

haplótipos com ao menos um alelo mutado para ambos genes (para *CYP1A1*, C/G com frequência de 0,1320 e A/A com frequência de 0,0182; e para o *OGGI*, G/C com frequência de 0,170 e A/G com frequência de 0,295 na população mundial) (Tabelas 21 e 23).

Há diferença entre cada uma das superpopulações quando analisados os 14 haplótipos inferidos para o gene *CYP2E1*, o haplótipo H03 tem uma frequência elevada nas superpopulações africanas, enquanto que nas outras populações mundiais a frequência deste é um pouco menor. O haplótipo H01, na Europa, tem frequência muito elevada quando comparada com as frequências das outras populações mundiais. O haplótipo H02 tem frequência maior nas subpopulações orientais. As populações americanas e brasileiras deste estudo tem um componente de população africano alta, isso mostra que a frequência desses haplótipos que são bastante comuns na África, como o haplótipo H03, está presente em grande frequência nas populações que tem um componente africano em relação à miscigenação. A população brasileira estudada não possui frequência para os seguintes: H08 (YRI, LWK, GWD, ESN, ASW e MSL), H11 (IBS), H12 (MXL), H13 (PUR) (Tabela 20), esses haplótipos estão presentes em baixa frequência nessas populações africanas, mexicanas e europeias.

## 8 CONCLUSÃO

A avaliação da variabilidade da região promotora do gene *CYP2E1* apresentou 8 pontos de variação na população brasileira deste estudo, e 2 pontos de variação para o gene *CYP1A1* e para o *OGG1*.

A maior parte dos etilistas desse estudo é do sexo masculino, a faixa etária mais frequente foi igual ou superior a 40 anos e apresentam histórico de tabagismo. Esse grupo apresentou dano ao DNA quase 2 vezes maior comparado ao grupo controle quando analisados os parâmetros do ensaio cometa. Porém, o dano ao DNA observado nos etilistas não mostrou associação com o tempo de tabagismo e etilismo, carga tabágica e quantidade de álcool/dia.

A partir das reações de sequenciamento foram identificados 8 pontos de variação no gene *CYP2E1*, 2 pontos de variação no gene *CYP1A1* e 2 pontos de variação no gene *OGG1* nas amostras de Goiânia. A partir da comparação dos genótipos dos genes entre os grupos caso e controle foi observado que os pontos de variação rs3813867, rs6413422, rs2031920, rs2031921, rs181373843 e rs147346339 do gene *CYP2E1* tiveram maior frequência do alelo não mutado tanto no grupo caso quanto no controle, nenhum homocigoto mutado foi detectado para essas 6 regiões. Os rs1048943 e rs1799814 do gene *CYP1A1*, e os rs1052133 e rs293795 do gene *OGG1* apresentaram o alelo mutado, com frequências muito baixas. Ao comparar os resultados das análises dos genótipos com os danos ao DNA entre os grupos caso e controle foram encontradas associações entre o MCO nos pontos de variação rs3813867, rs2031920 e rs2031921 do gene *CYP2E1* para heterocigotos do grupo dos etilistas.

Foram encontrados 15 haplótipos quando avaliado o gene *CYP2E1* e 3 haplótipos para cada um dos genes *CYP1A1* e *OGG1*.

A relação entre os haplótipos da população brasileira e do *1000Genomes* demonstrou que as amostras brasileiras apresentaram frequências similares as frequências da população europeia e africana.

## 9 REFERÊNCIAS

- AHMED, TAYYABA; NAWAZ, S., NOREEN, RABIA; BANGASH, KASHIF SARDAR; RAUF, ABDUR; YOUNIS, M., ANWAR, K., & KHAWAJA, MUHAMMAD ATHAR; AZAM, MALEEHA; QURESHI, ABID ALI; AKHTER, SAEED; KIEMENEY, LAMBERTUS A; QAMAR, RAHEEL; ALI, S. H. B. (2017). A 3' untranslated region polymorphism rs2304277 in the DNA repair pathway gene OGG1 is a novel risk modulator for urothelial bladder carcinoma. **Annals of Human Genetics**.
- ALBANO E. Alcohol, oxidative stress and free radical damage. **Proc Nutr Soc**. 2006. 65:278-90.
- ANANTHARAMAN, D. et al. Polymorphisms in tobacco metabolism and DNA repair genes modulate oral precancer and cancer risk. **Oral Oncology**, v. 47, n. 9, p. 866–872, 2011.
- APTE M.V., PIROLA R.C. e J.S. WILSON (2009). Pancreas: alcoholic pancreatitis--it's the alcohol, stupid. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**. 6:321-2.
- BA, X. et al. The Role of 8-Oxoguanine DNA Glycosylase-1 in Inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 15, n. 9, p. 16975–16997, 23 set. 2014.
- BAGATINI, P. B.; MALUF, S. W. Ensaio Cometa. In: MALUF, S. W. *Citogenética Humana*. 1ª edição. Porto Alegre: **Artmed**, 2011. p.194-201.
- BANDELT H.J., FORSTER P., ROHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Mol. Biol. Evol.** 1999; 16:37–48.
- BARRETT, J. C. et al. Haploview: analysis and visualization of DL and haplotype maps. **Bioinformatics**, v. 21, n. 2, p. 263-5, 2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Vigitel Brasil 2014: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico*. Brasília: Ministério da Saúde; 2015. 165 p. Disponível em: <[http://www.ans.gov.br/images/stories/Materiais\\_para\\_pesquisa/Materiais\\_por\\_assunto/2015\\_vigitel.pdf](http://www.ans.gov.br/images/stories/Materiais_para_pesquisa/Materiais_por_assunto/2015_vigitel.pdf)>. Acesso em 2015-10-11.
- BOCCIA S, CADONI G, SAYED-TABATABAEI FA, VOLANTE M, ARZANI D, DE LAURETIS A, CATTEL C, ALMADORI G, VAN DUIJN CM, PALUDETTI G, RICCIARDI G. CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, GSTT1, EPHX1 exons 3 and 4, and NAT2 polymorphisms, smoking, consumption of alcohol and fruit and vegetables and risk of head and neck cancer. **J Cancer Res Clin Oncol** 2008 Jan;134(1):93-100.
- BOFFETTA P, HASHIBE M. Alcohol and câncer. **Lancet Oncol**. 2006;7:149-56.
- BOZINA N, BRADAMANTE V AND LOVRIC M 2009. Genetic polymorphism of metabolic enzymes p450 (cyp) as a susceptibility factor for drug response, toxicity, and cancer risk. **Arh Hig Rada Toksikol** 60:217-242.
- BUFALO, NE. et al. Smoking and susceptibility to thyroid cancer: an inverse association with CYP1A1 allelic variants. **Endocr Relat Cancer**. v. 13, n.4, p.1185-93, 2006.
- BURIM R.V., CANALLE R., MARTINELLI ADE L. & C.S. TAKAHASHI (2004). Polymorphisms in glutathione S-transferases GSTM1, GSTT1 and GSTP1 and cytochromes P450

CYP2E1 and CYP1A1 and susceptibility to cirrhosis or pancreatitis in alcoholics. **Mutagenesis** 19(4):291-8.

CABRAL RE, CALDEIRA-DE-ARAÚJO A, CABRAL-NETO JB, COSTA CARVALHO MDA G. Analysis of GSTM1 and GSTT1 polymorphisms in circulating plasma DNA of lung cancer patients. **Mol Cell Biochem.** May;338(1-2):263-9. 2010.

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

CARRARD, V.C., PIRES, A.S., PAIVA, R.L., CHAVES A.C.M., SANT'ANA M. Alcohol and Oral Cancer: Comments on Related Mechanisms. Revisão de Literatura. **Álcool e Câncer Bucal**

CARVALHO, M. T. P. M. Polimorfismos nos genes NAT2, CYP2E1, GSTT1, GSTM1 e ABCB11 e hepatotoxicidade induzida pela isoniazida. 2012. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra, Portugal, 2010. Disponível em: <<https://estudogeral.sib.uc.pt/handle/10316/24985#>>. Acesso em: 2016-03-10.

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

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

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

CELORRIO, D., BUJANDA, L., CASO, C., LANDABASO, M., ORIA, J. C., OGANDO, J., & DE PANCORBO, M. M. A comparison of Val81Met and other polymorphisms of 65 alcohol metabolising genes in patients and controls in Northern Spain. **Alcohol**, v. 46(5), p. 427–431, 2012.

CHANG CH, HSIAO CF, CHANG GC, TSAI YH, CHEN YM, et al (2009) Interactive effect of cigarette smoking with human 8-oxoguanine DNA N-glycosylase 1 (hOGG1) polymorphisms on the risk of lung cancer: a case-control study in Taiwan. **Am J Epidemiol** 170: 695–702.

CHOI S, MYERS JN. Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: implications for therapy. *J Dent Res* 2008 Jan;87(1):14-32. Review. **Erratum J Dent Res** 2008 Feb;87(2):191.).

CLAPP P., BHAVE S.V. & P.L. HOFFMAN (2008). How Adaptation of the Brain to Alcohol Leads to Dependence. A pharmacological perspective. **Alcohol Res Health** 31:310-39.

COLLINS, A.R., 2004. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. **Mol. Biotechnol.** 26, 249–61. Doi:10.1385/MB:26:3:249.

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

DALY, A.K.; CHOLERTON, S.; GREGORY, W.; IDLE, J.R. Metabolic polymorphisms.

Pharmac. **Ther.** 57: 129-160, 1993.

DANESIR., DI PAOLO A., BOCCI G., CREA F., DEL TACCA M., Pharmacogenetics in oncology, **EJC Supplements** (2008) 6,74-78.

DATTA S, MAJUMDER M, BISWAS NK, SIKDAR N, ROY B. Increased risk of oral cancer in relation to common Indian mitochondrial polymorphisms and Autosomal GSTP1 locus. **Cancer.** Nov 1;110(9):1991-9. 2007.

DECORDIER, I., LOOCK, K.V., KIRSCH-VOLDERS, M., 2010. Phenotyping for DNA repair capacity. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research** 705, 107-129.

DEKA M, BOSE M, BARUAH B et al (2010) Role of CYP2E1 gene polymorphisms association with hepatitis risk in Northeast India. **World J Gastroenterol** 16:4800–4808.

DEVLIN, THOMAS. Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas, Tradução da sexta edição americana, **Editora Blucher**, 2002.

DEY A. E A.I. CEDERBAUM (2006). Alcohol and oxidative liver injury. **Hepatology.** 43:S63-74.

DE ROBERTIS, E M.F; HIB, J. De Robertis Bases da Biologia Celular e Molecular. **Editora Guanabara Koogan**; Rio de Janeiro.2001.

DE RUYCK, K., VAN EIJKEREN, M., CLAES, K., MORTIER, R., DE PAEPE, A., VRAL, A., DE RIDDER, L., THIERENS, H., 2005. Radiation-induced damage to normal tissues after radiotherapy in patients treated for gynecologic tumors: Association with single nucleotide polymorphism in XRCC1, XRCC3 and OGG1 genes and *in vitro* chromosomal radiosensitivity in lymphocytes. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics** 62, 1140-1149.

DÖBROSSY, L. Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem. **Cancer Metastasis Rev** 2005 Jan;24(1):9-17.

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

DUAN, W.-X. et al. The Association between OGG1 Ser326Cys Polymorphism and Lung Cancer Susceptibility: A Meta-Analysis of 27 Studies. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. e35970, 23 abr. 2012.

EDENBERG H.J. 2007. The Genetics of Alcohol Metabolism. Role of Alcohol Dehydrogenase and Aldehyde Dehydrogenase Variants. **Alcohol Res Health** 30:5-13.

ELAHI, A., ZHENG, Z., PARK, J., EYRING, K., MCCAFFREY, T., LAZARUS, P. (2002). The human Ogg1 DNA repair enzyme and its association with orolaryngeal cancer risk. **Carcinogenesis**, 23: 1229-1234.

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

EMANUEL, P.; SCHEINFELD, N. A review of DNA repair and possible DNA-repair adjuvants and selected natural anti-oxidants. **Dermatol Online J**, v. 13, n. 3, p. 10, 2007.

FLORES-OBANDO, R. E.; GOLLIN, S. M.; RAGIN, C. C. Polymorphisms in DNA damage response genes and head and neck cancer risk. **Biomarkers**, v. 15, n. 5, p. 379-99, 2010.

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

GARCÍA-BAÑUELOS, J., PANDURO, A., GORDILLO-BASTIDAS, D., GORDILLO-BASTIDAS, E., MUÑOZ-VALLE, J. F., GURROLA-DÍAZ, C. M., SÁNCHEZ-ENRÍQUEZ, S., RUIZ-MADRIGAL, B., BASTIDAS-RAMÍREZ, B. E. Genetic Polymorphisms of Genes Coding to Alcohol-Metabolizing Enzymes in Western 66 Mexicans: Association of CYP2E1\*c2/CYP2E1\*5B Allele with Cirrhosis and Liver Function. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 36(3), p. 425-431, 2012.

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

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

GARCIA SM, CURIONI OA, DE CARVALHO MB, GATTÁS GJ. Polymorphisms in alcohol metabolizing genes and the risk of head and neck cancer in a Brazilian population. **Alcohol**. 2010 Jan-Feb;45(1):6-12.

GARTE S, GASPARI L, ALEXANDRIE AK, AMBROSONE C, AUTRUP H, AUTRUP JL, BARANOVA H, BATHUM L, BENHAMOU S, BOFFETTA P et al. (2001) Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 10:1239-1248.

GATTAS GJF, CARVALHO MB, SIRAQUE, MS, CURIONI OA, KOHLER P, ELUF-NETO J, et al. Genetic polymorphisms of CYP1A1, CY2PE1, GSTM1, and GSTT1 associated with head and neck cancer. **Head Neck** 2006 Sep;28(9):819-26).

GEISLER AS., OLSHAN AF. GSTM1, GSTT1, and the risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a mini- HuGE review. **Am J Epidemiol**. 2001 Jul. 15;154(2):95-105. Review

GEMMA S, VICHI S AND TESTAI E (2006) Individual susceptibility and alcohol effects: biochemical and genetic aspects. **Ann Ist Super Sanita** 42:8-16.

GONTIJO, A.M.M.C., TICE, R., 2003. Teste do cometa para detecção de dano ao DNA e reparo em células individualizadas In: Mutagênese Ambiental. **Canoas: ULBRA**.

GUEMBAROVSKI, RL. Análise de associação dos genes CYP1A1, GSTM1, GSTT1 e da perda de heterozigose em 3p em portadores de carcinomas bucais. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná. Curitiba-PR. 151 p, 2007.

GUMUS ZH, DU B, KACKER A, BOYLE JO, BOCKER JM, MUKHERJEE P, SUBBARAMAIAH K, DANNENBERG AJ, WEINSTEIN H. Effects of tobacco smoke on gene expression and cellular pathways in a cellular model of oral leukoplakia. **Cancer Prev Res (Phila Pa)**. Jul;1(2):100-11.

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

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

HARROW, J. et al. GENCODE: the reference human genome annotation for The ENCODE Project. **Genome Res**, v. 22, n. 9, p. 1760-74, 2012.

HILL JW, EVANS MK (2007) A novel R229Q OGG1 polymorphism results in a thermolabile enzyme that sensitizes KG-1 leukemia cells to DNA damaging agents. **Cancer Detect Prev** 31: 237–243.

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

HORIUCHI T, WASHIO M, KIYOHARA C, TSUKAMOTO H, TADA Y, ASAMI T, IDE S, KOBASHI G, TAKAHASHI H; KYUSHU SAPPORO et al.(2009) Combination of TNF-RII, CYP1A1 and GSTM1 polymorphisms and the risk of Japanese SLE: findings from the KYSS study. **Rheumatol (Oxford)** 48:1045-1049.

HUNG RJ, BRENNAN P, CANZIAN F, SZESZENIA-DABROWSKA N, ZARIDZE D, LISSOWSKA J et al. Large-scale investigation of base excision repair genetic polymorphisms and lung cancer risk in a multicenter study. **J Natl Cancer Inst**. 2005: p. 567-576.

INDULSKI, J.A., LUTZ, W., 2000. Metabolic genotype in relation to individual susceptibility to environmental carcinogens. **Int Arch Occup Environ Health** 73, 71-85.

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

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

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

JANIK J, SWOBODA M, JANOWSKA B, CIESLA JM, GACKOWSKI D, et al. (2011) 8-Oxoguanine incision activity is impaired in lung tissues of NSCLC patients with the polymorphism of OGG1 and XRCC1 genes. **Mutat Res** 709–710: 21–31.

JEPPESEN DK, BOHR VA, STEVNSNER T. DNA repair deficiency in neurodegeneration. **Progress Neurobiology**. 94:166-200, 2011.

KAKINO, K. et al. CYP2E1 rs2031920, COMT rs4680 Polymorphisms, Cigarette Smoking, Alcohol Use and Lung Cancer Risk in a Japanese Population. **Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP**, v. 17, n. 8, p. 4063–70, 2016.

KANAAR, R.; WYMAN, C.; ROTHSTEIN, R. Quality control of DNA break metabolism: in the 'end', it's a good thing. **EMBO J**, v. 27, n. 4, p. 581-8, 2008.

KARAHALIL B, EMERCE E, KOCER B, HAN S, ALKIS N, et al. (2008) The association of OGG1 Ser326Cys polymorphism and urinary 8-OHdG levels with lung cancer susceptibility: a hospital-based case-control study in Turkey. **Arh Hig Rada Toksikol** 59: 241–250.

KARAHALIL B, BOHR VA, WILSON III DM. Impact of DNA polymorphisms in key DNA base excision repair proteins on cancer risk. *Hum Exp Toxicol*. 2012 oct; p. 981-1005.

KATO S, TAJIRI T, MATSUKURA N, MATSUDA N, TANIAI N, MAMADA H, YOSHIDA H, KIYAM T, NAITO Z. Genetic polymorphisms of aldehyde dehydrogenase 2, cytochrome p450 2E1 for liver cancer risk in HCV antibody-positive Japanese patients and the variations of CYP2E1 mRNA expression. Levels in the liver due to its polymorphism. **Scand J Gastroenterol**. 2003; 38: 886-93.

KAWAJIRI K, NAKACHI K, IMAI K, et al. Identification of genetically high risk individuals to lung cancer by DNA polymorphisms of the cytochrome P450 1A1 gene. **FEBS Lett**, (1990) 263:131-133.

KHAN, A. J., RUWALI, M., CHOUDHURI, G., MATHUR, N., HUSAIN, Q., & PARMAR, D. Polymorphism in cytochrome P450 2E1 and interaction with other genetic risk factors and susceptibility to alcoholic liver cirrhosis. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 664(1), p. 55–63, 2009. 67.

KIMURA, M. The Neutral Theory of Molecular Evolution. **Cambridge University Press, Cambridge, MA**, 384 pp, 1983.

KIYOHARA C, WASHIO M, HORIUCHI T, ASAMI T, IDE S, ATSUMI T, KOBASHI G, TAKAHASHI H, TADA Y AND KYUSHU SAPPORO SLE (KYSS) Study Group (2012) Risk modification by CYP1A1 and GSTM1 polymorphisms in the association of cigarette smoking and systemic lupus erythematosus in a Japanese population. **Scand J Rheumatol** 41:103-109.

KLUG, W. et al. **Concepts of Genetics**. décima ed. San Francisco, California: Pearson, 2011.

KÖHNKE M.D. 2008. Approach to the genetics of alcoholism: A review based on pathophysiology. **Biochem Pharmacol** 75:160-177.

KOHNO T, KUNITOH H, TOYAMA K, YAMAMOTO S, KUCHIBA A, SAITO D et al. Association of the OGG1–326Cys polymorphism with lung adenocarcinoma risk. **Cancer Sci**. 2006: p. 724-728.

KOHNO T, KUNITOH H, MIMAKI S, SHIRAISHI K, KUCHIBA A, et al. (2011) Contribution of the TP53, OGG1, CHRNA3, and HLA-DQA1 genes to the risk for lung squamous cell carcinoma. **J Thorac Oncol** 6: 813–817.

KRISTIANSES W, HAUGEN TB, WITCZAK O. CYP1A1, CYP3A5 And CYP3A7 polymorphisms and testicular cancer susceptibility. **Int J Androl**. 2011;34(1):77-83.

KLUNGLAND, A., BJELLAND, S., 2007. Oxidative damage top urines in DNA: Role of mammalian OGG1. **DNA Repair** 6, 481-488.

LE MARCHAND L, DONLON T, LUM-JONES A, SEIFRIED A, WILKENS LR (2002) Association of the hOGG1 Ser326Cys polymorphism with lung cancer risk. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 11: 409–412.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger princípios de bioquímica. 4.ed. **São Paulo: Sarvier**, 2006.

LEICHSENDRING, A. Investigação de polimorfismos dos genes CYP1A1 e GSTP1 em portadores de tumores de cavidade bucal. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Paraná. Curitiba-PR. 81 p., 2005.

LEICHSENDRING A, LOSI-GUEMBAROVSKI R, MACIEL ME, LOSIGUEMBAROVSKI A, OLIVEIRA BW, RAMOS G, CAVALCANTI TC, BICALHO MG, CAVALLI IJ, CÓLUS IM, RIBEIRO EM. CYP1A1 and GSTP1 polymorphisms in na oral cancer case-control study. **Braz J Med Biol Res**. Dec;39(12):1569-74. 2006.

LEUNG, TUNG-MING, AND NATALIA NIETO. CYP2E1 and oxidant stress in alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease. **Journal of hepatology** 58.2: 395-398, 2013.

LI H, HAO X, ZHANG W, WEI Q, CHEN K (2008) The hOGG1 Ser326Cys polymorphism and lung cancer risk: a meta-analysis. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 17: 1739–1745.

LI H, XIAO D, HU L AND HE T (2012) Association of CYP1A1 polymorphisms with prostate cancer risk: an updated meta-analysis. **Mol Biol Rep** 39:10273-10284.

LIAO LH, ZHANG H, LAI MP, CHEN SL, WU M, AND SHEN N. 2011 Singlenucleotide polymorphisms and haplotype of CYP2E1 gene associated with systemic lupus erythematosus in Chinese population. **Arthritis Res Ther** 13:R11.

LICHTENSTEIN, P.; HOLM, N.V.; VERKASALO, P.K. Environmental and heritable factors in the causation of cancer: analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. **N. Engl. J. Med.**, 343: 78-85, 2000.

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

LLEWELLYN CD, JOHNSON NW, WARNAKULASURIYA KA. Risk factors for oral cancer in newly diagnosed patients aged 45 years and younger: a case-control study in Southern England. **J Oral Pathol Med**. 2004;33(9):525-32.

LOVELL, D.P., OMORI, T., 2008. Statistical issues in the use of the comet assay. *Mutagenesis* 23, 171–82. Doi:10.1093/mutage/gen015.

LYNCH, A.M., SASAKI, J.C., ELESURU, R., JACONBSON-KRAM, D., 2011. New and Emerging Technologies for Genetic Toxicity Testing. **Environ Mol Mutagen** 52, 19.

- MAMBO, E., NYAGA, S. G., BOHR, V. A., EVANS, M. K. (2002). Defective repair of 8-hydroxyguanine in mitochondria of MCF-7 and MDA-MB-468 human breast cancer cell lines. **Cancer Res.**, 62:1349-1355.
- MANGUEIRA, S. O., GUIMARÃES, F. J., MANGUEIRA, J. O., FERNANDES, A. F. C., LOPES, M. V. O. Promoção da saúde e políticas públicas do álcool no Brasil: revisão integrativa da literatura. **Psicol. Soc.**, Belo Horizonte, v. 27, n. 1, p. 157-168, 2015.
- MARCON, F., ANDREOLI, C., ROSSI, S., VERDINA, A., GALATI, R., CREBELLI, R., 2003. Assessment of individual sensitivity to ionizing radiation and DNA repair efficiency in a healthy population. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 541, 1-8.
- MARICHALAR-MENDIA, X., RODRIGUEZ-TOJO, M. J., ACHA-SAGREDO, A., REY-BARJA, N., & AGUIRRE-URIZAR, J. M. Oral cancer and polymorphism of ethanol metabolising genes. **Oral Oncology**, v.46(1), p. 9–13, 2010.
- MARQUES, A. T. da S. 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.
- MARKKANEN, E. Not breathing is not an option: How to deal with oxidative DNA Damage, 2017. **DNA Repair**, 59(September), 82–105.
- MASSON, LF. et al. Cytochrome P-450 1A1 Gene Polymorphisms and Risk of Breast Cancer: A HuGE Review. **Am. J. Epidemiol.** v. 22, n. 61, p.901–915, 2005.
- MCKAY, JAMES R., AND SUSANNE HILLER-STURMHÖFEL. Treating alcoholism as a chronic disease: approaches to long-term continuing care. **Alcohol Research & Health** 33.4: 356, 2011.
- MESSAS, G. P.; VALLADA FILHO, H. P. O papel da genética na dependência do álcool. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, São Paulo, v. 26, supl. 1, p. 54-58, 2004.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. (2004c). A política do Ministério da Saúde para Atenção Integral a Usuários de Álcool e Outras Drogas. 2.ed. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde.
- MONÇORES MW, PEREIRA SB, GOUVEA LSF. Medicina individualizada aplicada à cardiologia. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado do Rio de Janeiro**, 21:184-193, 2008.
- MONOSTORY K, PASCUSI JM, KÓBORI L, DVORAK Z. Hormonal regulation of CYP1A expression. **Drug Metab Rev.** 41(4):547-72. 2009.
- MOUSSAS G., CHRISTODOULOU C. & A. DOUZENIS (2009). A short review on the aetiology and pathophysiology of alcoholism. **Ann Gen Psychiatry** 8:10.
- OGDEN GR. Alcohol and oral cancer. **Alcohol**, 2005;35(3):169-173.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Alcohol. Geneva, Switzerland: World Health Organization. Disponível em: <[http://www.who.int/topics/alcohol\\_drinking/en/](http://www.who.int/topics/alcohol_drinking/en/)>. Acesso em: 2015-08-15.

PARK J, CHEN L, TOCKMAN MS, ELAHI A, LAZARUS P (2004) The human 8-oxoguanine DNA N-glycosylase 1 (hOGG1) DNA repair enzyme and its association with lung cancer risk. **Pharmacogenetics** 14: 103–109.

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

PENG, H. et al. Associations of CYP2E1 rs2031920 and rs3813867 polymorphisms with colorectal cancer risk: A systemic review and meta-analysis. **Tumor Biology**, v. 34, n. 4, p. 2389–2395, 2013.

PRAMANIK S, DEVI S, CHOWDHARY S, SURENDRAN S, KRISHNAMURTHI K, CHAKRABARTI T. DNA repairs gene polymorphisms at XRCC1, XRCC3, XPD and OGG1 loci in Maharashtrian population of central India. **Chemosphere** 82, 941-946, 2011.

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

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

REHM J., MATHERS C., POPOVA S., THAVORNCHAROENSAP M., TEERAWATTANANON Y. & J. PATRA (2009). Global burden of disease and injury and economic cost attributable to alcohol use and alcohol-use disorders. **The Lancet** 373:2223 – 33.

REIS, AAS. Estudo da associação do polimorfismo genético em carcinomas da tiróide. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO 98 p. 2010.

REPETTO, M.; KUHN REPETTO, G.; 2009. **Toxicologia Médica**. Ediciones Díaz de Santos.

ROHR, P., 2008. Influência de polimorfismos em genes de reparo no risco ocupacional de Viticultores do Rio Grande do Sul. Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular. Vol. Master. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

SCANDLYN MJ, STUART EC, ROSENGREN RJ. Sex-specific differences in CYP450 isoforms in humans. **Expert Opin Drug Metab Toxicol**. Apr;4(4):413-24. 2008.

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

SETSHEDI, M., et al. Acetaldehyde adducts in alcoholic liver disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 3:(3), pp. 178-185, 2010.

SHAH P, SINGH A, SINGH M, MATHUR N, PANT M, MISHRA N, PARMAR D, Interaction of cytochrome P4501A1 genotypes with other risk factors and susceptibility to lung cancer. **Mutation Research** (2008) 639:1-10.

SHARMA R, AHUJA M, PANDA NK, et al. Combined effect of smoking and polymorphisms in tobacco carcinogen-metabolizing enzymes CYP1A1 and GSTM1 on the head and neck cancer risk in North Indians. **DNA Cell Biol.** 2010;29: 441–448.

SLYSKOVA J, KORENKOVA V, COLLINS AR, PROCHAZKA P, VODICKOVA L, SVEC J, et al. Functional genetic and epigenetic aspects of base nucleotide excision repair in colorectal carcinomas. **Clin Cancer Res.** 2012;18(21):5878-87.

SMART, J.; DALY, A.K. Variation in induced CYP1A1 levels: relationship to CYP1A1, Ah receptor and GSTM1 polymorphisms. **Pharmacogenetics**, 10: 11-24, 2000.

SOYA SS, VINOD T, REDDY KS, GOPALAKRISHNAN S, ADITHAN C. 2008. CYP2E1 polymorphisms and gene-environment interactions in the risk of upper aerodigestive tract cancers among Indians. **Pharmacogenomics** 9:551–560.

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

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

TANG, K., LI, X., XING, Q., LI, W., FENG, G., HE, L., & QIN, S. Genetic polymorphism analysis of cytochrome P4502E1 (CYP2E1) in Chinese Han 69 populations from four different geographic areas of Mainland China. **Genomics**, v. 95(4), p. 224–229, 2010.

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

TANIGUCHI, CULLEN, AND F. Peter Guengerich. Drug metabolism. Principles of Pharmacology: **The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy**: 43, 2011.

TARDIN OMA, VELOZO M, BERNARDEZ S, BALIEIRO H et al., Estudo de Polimorfismos Genéticos na Insuficiência Cardíaca (GenetIC): delineamento do estudo e metodologia. **Rev Socerj.** 22, 36-42, 2009

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

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

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

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

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

ULUSOY G, ARINÇ E, ADALI O. Genotype and allele frequencies of polymorphic CYP2E1 in the Turkish population. **Arch Toxicol**. 2007;81 (10):711-8.

VATSIS, K. P., B. CHANCE, AND M. P. SCHULMAN. Studies on the characterization of the enzyme components participating in the hepatic-microsomal oxidation of aliphatic alcohols. Alcohol and ADLehyde Metabolizing Systems: **Enzymology and Subcellular Organelles**: 361, 2014.

VIDAL, A.E., BOITEUX, S., HICKSON, I.D., RADICELLA, J.P., 2001. XRCC1 coordinates the initial and late stages of DNA abasic site repair through protein-protein interactions. **EMBO J** **20**, 65306539.

VIEIRA, J. M. F. Metabolismo do etanol. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2012. Disponível em: <<http://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/3757/1/Joana%20Vieira.pdf>>. Acesso em: 2016-03-11.

VOGEL, C. I. G. Estudo citogenético e molecular de uma população de etilistas. 2007. Tese (Doutorado em Genética) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/17/17135/tde-17082007-164428/>>. Acesso em: 2016-03-10.

XU, J., ZHENG, S. L., TURNER, A., ISAACS, S. D., WILEY, K. E., HAWKINS, G. A., CHANG, B. L., BLEECKER, E. R., WALSH, P. C., MEYERS, D. A., ISAACS, W. B. (2002). Association between OGG1 sequence variants and prostate câncer susceptibility. **Cancer Res.**, 62: 2253-2257.

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

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

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

ZHAN P, WANG Q, QIAN Q, WEI SZ AND YU L (2011) CYP1A1 MspI and exon7 gene polymorphisms and lung cancer risk: An updated meta-analysis and review. **J Exp Clin Cancer Res** 30:99.

ZIJNO, A., VERDINA, A., GALATI, R., LEOPARDI, P., MARCON, F., ANDREOLI, C., ROSSI, S., CRELELLI, R., 2006. Influence of DNA repair polymorphisms on biomarkers of genotoxic damage in peripheral lymphocytes of healthy subjects. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis** 600, 184-192.

ZINTZARAS E., STEFANIDIS I., SANTOS M. & F. VIDAL 2006. Do alcohol-metabolizing enzyme gene polymorphisms increase the risk of alcoholism and alcoholic liver disease. **Hepatology** 43:352-61.

ZHOU X, LEE JE, ARNETT FC, XIONG M, PARK MY, YOO YK, SHIN ES, REVEILLE JD, MAYES MD, KIM JH. (2009) HLA-DPB1 and DPB2 are genetic loci for systemic

ZOU H, LI QING, XIA W, LIU Y, XI W, WANG D. Association between the OGG1 Ser326Cys polymorphism and cancer risk: evidence from 152 case-control studies. **J Cancer**. 2016; 7(10):1273-1280.

WASZKIEWICZ, NAPOLEON, et al. Alcohol abuse and glycoconjugate metabolism. **Folia Histochemica et Cytobiologica** 50.1: 1-11, 2012.

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

WEN J, FU J, ZHANG W, GUO M,. Genetic and Epigenetic changes in Lung carcinoma and their clinical implications. **Modern Pathology** (2011) 24, 932-943.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, (WHO). Global status report on alcohol and health 2014. Geneva, Switzerland: **World Health Organization**. Disponível em: <[http://www.who.int/substance\\_abuse/publications/global\\_alcohol\\_report/en/](http://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/en/)>. Acesso em: 2015-08-15. 71.

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

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
GOIÁS - UFG



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

**Pesquisador:** Caroline Oliveira de Araújo Melo

**Área Temática:** Genética Humana:

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

**Versão:** 2

**CAAE:** 20625113.8.0000.5083

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

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

#### 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:** GOIÂNIA

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

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

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

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
GOIÁS - UFG



Continuação do Parecer: 475.938

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 esfollado 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.propg.ufg@gmail.com

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
GOIÁS - UFG



Continuação do Parecer: 476.608

**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 a coleta de células estofadas da mucosa da boca. É necessário incluir no projeto. Autorizar ligações a cobrar. Informar no TCLE como serão tomados públicos os resultados da pesquisa.

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

Aprovado, salve melhor julzo 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: 74.001-670

UF: GO

Município: GOIANIA

Telefone: (62)3521-1215

Fax: (62)3521-1163

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

## APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

### TÍTULO DO PROJETO: UTILIZAÇÃO DE BIOMARCADORES PARA AVALIAÇÃO DO DANO GENÉTICO INDUZIDO PELO CONSUMO ABUSIVO DE ÁLCOOL

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS PELO PROJETO:

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

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

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

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

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

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

Prezado (a) senhor (a),

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ressalta-se que todos os dados que permitam sua identificação pessoal serão mantidos em sigilo profissional e científico. Sendo-lhe garantido que todos os resultados aqui obtidos serão utilizados somente para estudo científico e não irão prejudicar em algum tratamento que o participante já esteja submetido (a), nem tão pouco na sua condição profissional.

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

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

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

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

- Desejo saber os resultados
- Não desejo saber os resultados

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

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

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

Declaro verdadeiras as informações acima citadas,

---

Caroline Oliveira de Araújo Melo Pesquisadora Responsável

### **TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO**

Eu \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_ R.G. n°: \_\_\_\_\_, abaixo assinado, tendo recebido as informações acima, e ciente dos meus direitos abaixo relacionados, concordo em participar.

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

Tenho ciência do exposto acima

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

\_\_\_\_\_

Assinatura do paciente

### **APÊNDICE B - QUESTIONÁRIO DE ESTILO DE VIDA**

#### **1 - Dados de identificação**

N° do prontuário:

Nome do Paciente:

.....  
 .....  
 Diagnóstico principal ( ) caso ( ) controle

## 2 – Informações gerais

Data da entrevista:.....

Coleta de sangue: ( ) sim ( ) não

Sexo: ( ) Feminino ( ) Masculino

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

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

Endereço:

Bairro:

Cidade

CEP:

Telefone:

Data de nascimento: .....

Qual a sua idade? .....

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

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

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

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

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

Selecione a opção mais elevada quanto ao grau de instrução:

( ) alfabetizado ( ) fundamental incompleto ( ) fundamental completo

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

### 3 – História de Tabagismo

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

sim, ainda fuma - Quantos cigarros por dia:

nunca fumou

somente no passado – Quantos cigarros fumava por dia:

Idade de início:

Idade em que parou:

### 4 – História de Etilismo

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

Sim, ainda bebe  Nunca  Só no passado

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

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

Idade de início:

Quantidade e tipo de bebida:

Idade em que parou:

Idade em que tomou o primeiro porre:

Quando começou a notar dependência alcoólica:

Tempo de consumo pesado de álcool:

Situações decorrentes por causa do consumo de álcool:

foi atropelado

acidente de carro/moto/bicicleta por estar embriagado

queimou alguma coisa ao cozinhar

perdeu o dia de trabalho

machucou alguém

entrou em uma discussão por estar embriagado

perdeu documentos/dinheiro

acordou sem saber onde estava ou como havia chegado lá

fica deprimido

História familiar

Alguém na família possui problemas com álcool?



<b>Chiadeira torácica</b>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<b>Cansaço fácil nas</b>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
<b>Confusão</b>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<b>Diarréias</b>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
<b>Dor de</b>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<b>Falta de</b>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
<b>Formigame nto de</b>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<b>Formigame nto de</b>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
<b>Fotofobia</b>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<b>Irritação da pele</b>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
<b>Fraqueza muscular</b>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<b>Irritação de mucoso</b>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
<b>Hipertensão</b>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<b>Náusea</b>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
<b>Incontinênci</b>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<b>Salivação</b>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
<b>Incontinênci a urinária</b>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<b>Sangrament os</b>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
<b>Irritabilida</b>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<b>Suor</b>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
<b>Lacrimagem</b>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<b>Taquicardia</b>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
<b>Tontura</b>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<b>Tosse</b>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
<b>Visão turva</b>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<b>Vômito</b>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
<b>Tremor</b>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<b>Falta de ar</b>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
<b>Outros:</b>									

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

( ) não ( ) sim