



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CAMPUS MINISTRO REIS VELLOSO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

SARAH IZABELLY ALVES LEMOS

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DOS GENES *GSTM1*, *GSTT1* E
GSTP1 COM SUSCETIBILIDADE AO USO ABUSIVO DO ÁLCOOL EM UMA
POPULAÇÃO DO NORDESTE BRASILEIRO**

**PARNAÍBA – PI
MAIO/2016**

SARAH IZABELLY ALVES LEMOS

ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DOS GENES *GSTM1*, *GSTT1* E
GSTP1 COM SUSCETIBILIDADE AO USO ABUSIVO DO ÁLCOOL EM UMA
POPULAÇÃO DO NORDESTE BRASILEIRO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro Reis Velloso, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas.

Área de Concentração: Medicina Investigativa e Marcadores Epidemiológicos
Linha de Pesquisa: Genética Humana e Médica

Orientadora: Prof. Dra. Renata Canalle

PARNAÍBA – PI
MAIO/2016

SARAH IZABELLY ALVES LEMOS

ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DOS GENES *GSTM1*, *GSTT1* E
GSTP1 COM SUSCETIBILIDADE AO USO ABUSIVO DO ÁLCOOL EM UMA
POPULAÇÃO DO NORDESTE BRASILEIRO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Ministro Reis Velloso, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas.

APROVADA EM ___/___/___

BANCA EXAMINADORA:

Profª. Dra. Renata Canalle
Departamento de Biomedicina
Universidade Federal do Piauí - UFPI
ORIENTADORA E PRESIDENTE

Profª. Dra. Cintia Martins Perinotto
Departamento de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Piauí - UFPI

Prof. Dr. Fábio José Nascimento Motta
Departamento de Biomedicina
Universidade Federal do Piauí - UFPI

PARNAÍBA – PI
MAIO/2016

AGRADECIMENTOS

Início esse discurso agradecendo aqueles a quem renunciei o convívio diário, a minha mãe por seu exemplo de bravura e força, ao Gessé por dividir com ela sua caminhada, obrigada pelos valores transmitidos que me servem como exemplo a ser seguido e principalmente por entender minhas escolhas, mesmo sem compreender muito bem o significado da pesquisa em minha vida.

Ao meu irmão e eterno amor Eduardo, nunca ficamos tão distantes fisicamente como nesses dois anos, tantas vezes me ligou só pra ouvir minha voz, saber como eu estava e pra saber quando eu voltava, sempre dava-me forças pra continuar, gato obrigada por ser o irmão que és, amo tu.

Aos demais familiares por aceitarem e se orgulharem dessa minha inquietude.

As amigas Esmeralda e Marijane por sonharem esse sonho louco comigo, por não me deixarem perder a fé em deixar tudo pra trás e seguir em busca de dias melhores.

Aos amigos Flávia, Yuri, Douglas e Edésio pelo companheirismo e acolhimento nas primeiras e longas noites de estudo, o café, o conhecimento compartilhado, as risadas, os lanches e a amizade que seguiu por esses dois anos, sem vocês não teria a força necessária.

A dona Fátima e seu Roberto, que me acolheram com muito amor, como uma filha, nas semanas loucas de disciplinas integrais.

Ao John “John”, Iuly e Itamara pelo apoio durante os primeiros passos no GehMed, obrigada por toda dedicação e zelo durante a parte mais difícil dessa caminhada.

Aos amigos de turma Rayele, Moara, Allan, Luan, Dalva, Diego, Iara, Karliane, Thiago, Valdenise, Rayssa e Teresa, vocês que muitas vezes seguraram a peteca em meio a tantas idas e vindas e me ensinaram um pouco mais sobre pesquisa. Vanessa e Vânia, que por tantas vezes me ensinaram sobre a vida. A vocês minha gratidão e amizade pra toda vida.

Aos ICs Francisco e Loiziana, pela confiança no curto período que trabalhamos juntos.

Hygor e Hianny pela disposição em ensinar, paciência, apoio e plantões tira dúvida, obrigada.

Aos amigos de laboratório Tâmisa, Felipe, Valéria, Anderson, Jéssica, Raquel e Cristina a quem eu confiei mais do que segredos e medos, mas também minhas dúvidas, angústias, sorrisos, longas tardes e noites no laboratório, loucuras, festas, vinho barato e a amizade em meio a tanta correria, obrigada por caminharem e não deixarem o cansaço tomar

conta desse sonho. A distância vai nos separar, no entanto, sempre seremos a família GehMed, amo vocês e obrigada por tudo.

Karla, pela ajuda na primeira disciplina, e que mesmo distante sempre me lembrou do quanto eu lutei pra estar aqui e por muitas vezes ouvir meu choro ao telefone por não conseguir contê-lo quando a saudade de casa era mais forte que eu. Ao amigo Viana por sempre apontar que meu lugar ao sol é na vida acadêmica e com isso me dar impulso pra continuar. Se por tantas vezes não desisti a força veio de vocês.

A família “coisinhas” Esley, Even e Dany porque mais que dividir aluguel, dividíamos os nossos dramas, alegrias, conquistas e a saudade de casa, obrigada por sempre estarem ali na nossa amada 424, onde até o carteiro era nosso amigo, amo vocês.

Ao Lukas, o baterista mais lindo, pelo abrigo, carinho, mimos incessantes, por todos “você consegue” nessa etapa final que me deram a força e a tranquilidade para enfim concluir esse trabalho, por dividir as noites de sufoco tornando-as mais leves, as noites de sossego que só traziam-me paz, e pelas nossas noites no Torquália que ficarão pra aquele livro que a gente ainda vai escrever. Gato, obrigada.

Aos demais e muitos amigos que fiz nessa jornada de mestranda, obrigada por tornarem os dias longe de casa mais suaves.

Aos técnicos administrativos e aos terceirizados que sempre deixaram o ar da UFPI mais alegre com seu trabalho dedicado e por todos os sorrisos e afeto gratuitos no RU.

Ao professor Dr. Silmar, que levantou dúvidas sobre a estatística me impulsionando a respondê-las.

Ao professor Dr. Giovanni e professora Dra. Keiko por ceder algumas amostras para realização desse trabalho.

Ao professor Dr. Fábio Motta pelo apoio prático no laboratório, com suas dicas de quem já viveu tudo isso, obrigada.

Professora Dra. Renata Canalle, a quem sempre tive uma admiração imensa e hoje um grande respeito e carinho, obrigada pela oportunidade e honra de ser sua orientanda, ainda que tantas vezes não conseguisse acompanhar seu padrão de excelência, seus prazos e sua escrita impecável, não faz ideia de quanto os seus “Está bom.” e “Agora sim!” me faziam saltitar no laboratório de felicidade, e os seus puxões de orelha doíam e o medo de decepcioná-la amedrontava-me. Professora obrigada por toda paciência, organização e dedicação infinita, nunca poderei retribuir a altura tudo o que fez por mim e certamente a sua dedicação e amor pela docência foram decisivos no desenvolvimento e escrita desse trabalho,

sem dúvida a senhora me fez progredir na caminhada acadêmica, fazendo-me uma admiradora da sua postura profissional.

Aos membros da banca examinadora que gentilmente abriram mão de seu precioso tempo para leitura desse trabalho.

Ao CNPq pela concessão da bolsa para realização desse trabalho.

A todos os pacientes do CAPS-AD e controles pela sua contribuição indispensável.

E a quem nada disso seria possível, fonte inesgotável de amor e sabedoria, por iluminar meu caminho, impedindo-me de desistir diante dos percalços, sou grata a Ti, obrigada Senhor.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 - Considerações gerais a respeito do álcool e dependência	17
2.2 - Efeito do álcool no fígado e pâncreas	19
2.3 - Metabolismo do álcool	20
2.4 - Enzimas metabolizadoras de fase II	22
2.4.1 - <i>GSTM1</i> e o polimorfismo de deleção <i>GSTM1*0</i>	23
2.4.2 - <i>GSTT1</i> e o polimorfismo de deleção <i>GSTT1*0</i>	25
2.4.3 - <i>GSTP1</i> e o polimorfismo Ile105val	26
3 OBJETIVOS	29
3.1 - Objetivos gerais	29
3.2 - Objetivos específicos	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 - Análise dos sujeitos e aspectos éticos	30
4.2 - Genotipagem	32
4.3 - Análise estatística	37
5 RESULTADOS	38
6 DISCUSSÃO	45
6.1 - Análise do polimorfismo <i>GSTM1*0</i>	45
6.2 - Análise do polimorfismo <i>GSTT1*0</i>	46
6.3 - Análise do polimorfismo <i>GSTP1</i> Ile105Val.....	48
6.4 - Análise combinada dos genótipos <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i>	49
6.5 - Análise as características demográficas.....	50
6.5 Comparação das frequências genotípicas e alélicas da população em estudo com outras populações.....	53
7 CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS	56

APÊNDICE I - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO....	69
APÊNDICE II – QUESTIONÁRIO APLICADO PARA COLETA DE DADOS.	72
ANEXO I - CARTA DE APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ	75
ANEXO II – PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE SANGUE TOTAL	77

RESUMO

A dependência alcoólica (DA) é definida como um conjunto de fenômenos comportamentais, cognitivos e fisiológicos que se desenvolvem após frequente uso do álcool, culminando em forte desejo de consumo, dificuldade em controlar sua utilização, tolerância, entre outros. Fatores genéticos são responsáveis pela variação na dependência do álcool em alguns grupos e indivíduos vulneráveis. As Glutathionas S-Transferases (GSTs) são enzimas de fase II de metabolização que estão envolvidas na detoxificação de xenobióticos, entre eles o álcool. Polimorfismos em genes codificadores de GSTs, *GSTT1*0*, *GSTM1*0*, e *GSTP1* Ile105Val (rs 1695), estão associados com a diminuição ou perda de função enzimática, ocasionando a diminuição da capacidade de detoxificação, levando ao aumento da sensibilidade aos efeitos dessas genotoxinas. Esse estudo buscou analisar a associação dos polimorfismos *GSTT1*0*, *GSTM1*0* e *GSTP1* Ile105Val (rs 1695), na suscetibilidade ao desenvolvimento de DA em uma população masculina do nordeste brasileiro, num estudo de caso-controle, no qual se incluiu 138 alcoolistas e 145 controles. A detecção dos polimorfismos foi realizada pelas técnicas de PCR multiplex (*GSTM1* e *GSTT1*) e PCR-RFLP (*GSTP1*), seguidas de eletroforese em gel de agarose. As frequências genotípicas e alélicas foram submetidas aos testes do qui-quadrado, exato de Fisher e Odds Ratio com $p < 0,05$. Na presente investigação houve uma associação positiva entre a baixa escolaridade e o uso nocivo de bebidas alcoólicas ($p = 0,05$). Nossos achados evidenciaram que indivíduos com histórico familiar de uso abusivo do álcool apresentaram maior frequência no grupo de alcoolistas em relação ao controle com $p < 0,0001$, sugerindo que exista uma transmissão herdável de transtornos de abuso de álcool em nossos indivíduos bebedores. Não houve significância estatística em nenhuma das associações dos polimorfismos isoladamente ou combinados com DA. Na análise do polimorfismo *GSTT1*0* entre alcoolistas fumantes (31,65%) e controles fumantes (55,56%) houve significância estatística quando comparado os dois grupos ($p = 0,02$). A ausência de associação de risco ou proteção a DA dos polimorfismos neste trabalho, não exclui totalmente a possibilidade de associação destes genes no desenvolvimento de dependência ao álcool.

Palavras-Chave: alcoolismo, genes de metabolização de xenobióticos, polimorfismo genético, dependência alcoólica.

ABSTRACT

Alcohol dependence (AD) is defined as a set of behavioral, cognitive and physiological phenomena that develop after frequent use of alcohol, culminating in a strong desire for consumption, difficulty controlling their use, tolerance, among others. Genetic factors are responsible for the variation in alcohol dependence in some groups and vulnerable individuals. Glutathione S-Transferases (GSTs) are a group of metabolizing phase II enzymes, which are, involved in detoxication of xenobiotics, among them the alcohol. Polymorphisms in coding genes of GSTs, *GSTM1*0*, *GSTM1*0* and *GSTP1* Ile105Val (rs 1965), are associated with a decrease or loss of enzymatic function, leading to decreased detoxication capacity, leading to increased sensitivity to the effects of these genotoxins. This study looked for the analysis of the association of the polymorphisms *GSTP1*0*, *GSTM1*0* and *GSTP1* Ile105Val (1965), in the susceptibility to the development of AD in a male population of the Brazilian Northeast, in a case-control study, which covered 138 alcoholics and 145 controls. The detection of polymorphisms was performed by multiplex PCR techniques (*GSTM1* and *GSTT1*) and PCR-RFLP (*GSTP1*), followed by agarose gel electrophoresis. The genotyped frequencies were submitted to the chi-square test, Fisher's exact and Odds Ratio with $p < 0.05$. In the present investigation there was a positive association between low education and the harmful use of alcoholic beverages ($p = 0.05$). Our findings demonstrate that individuals with a family history of abusive use of alcohol presented higher frequency in the alcoholic group compared to the control with $p < 0.0001$, suggesting that there is a heritable transmission of alcohol abuse disorders in our drinkers individuals. There were no statistical significance in any of the associations of the polymorphisms alone or combined with AD. In the analysis of the *GSTP1*0* polymorphism among smoking alcoholics (31.65%) and smoking controls (55.56%) was statistically significant when compared the two groups ($p = 0.02$). The absence of risk association or protection from AD of the polymorphisms in this study, not excluding totally the possibility of association of these genes in the development of the AD.

Keywords: alcoholism, genes of metabolizing xenobiotics, genetic polymorphism, alcoholic dependence.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática das vias de metabolização do etanol e formação de acetaldeído	20
Figura 2 - Localização estrutural do <i>cluster</i> gênico de 100 kb que codifica para a subfamília GST mu (cromossomo 1p13.3).....	24
Figura 3 - Localização estrutural do <i>cluster</i> gênico que codifica para a subfamília GST teta (cromossomo 22q11.2).....	25
Figura 4 - Localização estrutural da alteração do sítio de reconhecimento de enzimas de restrição que codifica o SNP para a subfamília GST pi (cromossomo 11q13).....	27
Figura 5 - PCR-multiplex em gel de agarose 2% para detecção dos polimorfismos nos genes <i>GSTM1</i> (215 pb) e <i>GSTT1</i> (480 pb), e o gene <i>CYP1A1</i> (312 pb) como controle interno da reação.....	34
Figura 6 - PCR-RFLP em gel de agarose 2% para detecção do polimorfismo Ile105Val do gene <i>GSTP1</i>	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Porcentagem de álcool de acordo com o tipo de bebida	31
Tabela 2 - Quantidade de álcool contido em cada dose de bebida	31
Tabela 3 - Volumes e concentrações dos reagentes utilizados na PCR	33
Tabela 4 - Sequência dos <i>primers</i> utilizados para a amplificação das regiões polimórficas estudadas e o tamanho do produto de PCR	34
Tabela 5 - Parâmetros de ciclagem adotados para as reações de PCR	35
Tabela 6 - Condições da digestão enzimática para detecção do polimorfismo Ile105Val do gene <i>GSTP1</i>	36
Tabela 7 - Padrão de bandas esperado na digestão para detecção do polimorfismo Ile105Val do gene <i>GSTP1</i>	36
Tabela 8 - Características demográficas da amostra.....	39
Tabela 9 - Distribuição genotípica dos alcoolistas e controles para os genes <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i>	39
Tabela 10 - Frequência dos genótipos <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> combinados de alcoolistas e controles.....	40
Tabela 11 - Distribuição genotípica e alélica dos alcoolistas e controles para o gene <i>GSTP1</i>	41
Tabela 12 - Valores de χ^2 e p para verificação do equilíbrio de Hardy – Weinberg.....	41
Tabela 13 - Comparação da frequência dos polimorfismos de <i>GSTM1</i> , <i>GSTT1</i> e <i>GSTP1</i> entre alcoolistas em relação ao histórico familiar.....	42
Tabela 14 - Características genéticas e idade do primeiro uso para alcoolistas para os genes <i>GSTM1</i> , <i>GSTT1</i> e <i>GSTP1</i>	43
Tabela 15 - Comparação da frequência dos polimorfismos de <i>GSTM1</i> , <i>GSTT1</i> e <i>GSTP1</i> entre alcoolistas e controles em relação ao hábito tabagista.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS

ADC - Adenocarcinoma esofágico

ADH - Álcool desidrogenase

ALA - Alanina

ALC - Cirrose hepática alcoólica

ALD - Doença hepática alcoólica

ALDH - Aldeído desidrogenase

CAPS-AD – Centro de Atenção Psicossocial Álcool e Drogas

CID-10 - Classificação Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde

DA - Dependência do álcool

DNA - Ácido desoxirribonucleico

dNTPs – Desoxinucleotídeos trifosfatados

DRD2 - Receptor de dopamina Tipo 2

DSM-IV - Manual Diagnóstico e Estatístico dos Distúrbios Mentais

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

GSTM1 - Glutathione S-transferases família mu, isoenzima 1

GSTT1- Glutathione S transferase da família theta, isoenzima 1

GSTs - Glutathione S-transferases

GSTP1- Glutathione S transferase da família pi, isoenzima 1

HIV - Vírus da imunodeficiência humana

IC - Intervalo de confiança

Ile - Isoleucina

MEOS - Via microsomal

OMS - Organização Mundial de Saúde

OR - Odds Ratio

PA - Pancreatite aguda

PAHs - Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

pb – Pares de base

PC - Pancreatite crônica

PCR - Reação em cadeia da polimerase

RFLP - Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição

ROS - Espécies reativas de oxigênio

SNP - Polimorfismo de nucleotídeo único

Val - Valina

1 INTRODUÇÃO

O uso nocivo e a dependência de álcool são um importante fator de risco para diversas doenças e lesões que ameaçam a saúde, onde 20 a 50% da ocorrência de cirrose hepática, epilepsia, envenenamentos, acidentes de trânsito, violência, vários tipos de câncer e aproximadamente 3,3 milhões de mortes por ano, estão correlacionados com o consumo de álcool (OMS, 2014; 2011).

Após a ingestão de bebidas alcoólicas, o etanol passa por ativação metabólica que envolve enzimas de fase I seguida de detoxificação por enzimas de fase II. A interação entre as enzimas dessas duas fases determina os níveis e a duração de compostos tóxicos ou carcinogênicos bioativados em um órgão. Glutathione S-transferases (GSTs) são enzimas metabolizadoras de xenobióticos de fase II, que catalisam a conjugação de compostos eletrofílicos com glutathione reduzida para produzir metabólitos menos tóxicos ou facilmente excretáveis. Portanto, um desequilíbrio entre estas enzimas em determinadas áreas do fígado ou do pâncreas pode levar a um efeito tóxico (STANDOP et al., 2002; BOYER, 1989).

As variações individuais na ativação metabólica e detoxificação de substâncias carcinogênicas e neurotoxinas químicas, como o etanol, são potenciais determinantes das diferenças interindividuais que definem a suscetibilidade a diversas patologias, entre elas a dependência e cânceres induzidos pelo ambiente. A constituição genética parece desempenhar o papel mais importante neste contexto e na dependência a essas substâncias, visto que estudos mostram a frequência de interação de fatores genéticos de 50 a 60% na dependência ao alcoolismo (DU et al., 2009; BHASKAR et al., 2008; GOLDMAN et al., 2005).

Enzimas metabolizadoras de xenobióticos, tais como GSTs, são polimórficas, ou seja, possuem mudanças na sequência de nucleotídeos (mutações). Estas variações podem levar a diferenças em sua expressão e, por consequência, variações funcionais da proteína gerada por ela. O conhecimento sobre esses polimorfismos e sua interação com fatores ambientais podem auxiliar no tratamento e na prevenção da dependência e doenças secundárias ao alcoolismo, visto que o uso abusivo e a dependência de álcool são umas das principais preocupações dos serviços de saúde, já que se observa um início de uso cada vez mais precoce e muitas vezes associados a situações de risco (MESSAS e VALLADA FILHO, 2004; HIRVONEN, 1995). Portanto, conhecer o perfil genético populacional e individual tem se mostrado uma ferramenta essencial na tomada de decisões, principalmente de tratamento, em Medicina.

Por este motivo, neste estudo foi investigada a associação dos polimorfismos *GSTM1* e *GSTT1* nulos e o polimorfismo *GSTP1* Ile105Val em uma população do Nordeste Brasileiro, a fim de identificar variações de suscetibilidade ao uso abusivo do álcool.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Considerações gerais a respeito do álcool e dependência

O alcoolismo é uma síndrome multifatorial tendo como critérios para seu diagnóstico a Classificação Internacional de Doenças (CID-10) da Organização Mundial da Saúde (OMS, 1993), e o Manual de Diagnóstico e Estatística de Distúrbios Mentais da Associação Norte-Americana de Psiquiatria (DSM-IV; American Psychiatric Association, 1994) (DOTTO-BAU, 2002).

O álcool é uma substância psicoativa com propriedades produtoras de dependência que tem sido amplamente utilizada em muitas culturas ao longo dos séculos (OMS, 2014). A dependência do álcool (DA), também conhecida como alcoolismo crônico ou síndrome de dependência do álcool, é definida como um conjunto de fenômenos comportamentais, cognitivos e fisiológicos que se desenvolvem após repetido uso e que normalmente incluem: um forte desejo de consumo, dificuldades em controlar a sua utilização, persistência em seu uso apesar das consequências nefastas, maior prioridade dada ao uso de álcool do que para outras atividades e obrigações, maior tolerância, e às vezes a um estado de abstinência fisiológica. Já o uso abusivo ou uso nocivo para a saúde, compreende um modo de consumo caracterizado pelas complicações físicas e/ou psíquicas. (DSM-IV, 1994; OMS, 1992).

A variação individual na DA está relacionada a fatores de risco genéticos, e essa arquitetura genética de suscetibilidade a DA pode ser definida como (1) o número de genes envolvidos direta ou indiretamente, (2) a variação interindividual nesses genes, e (3) a magnitude e natureza dos seus efeitos genéticos específicos. Vários genes podem influenciar o início ao uso do álcool, o seu metabolismo e propriedades de reforço, de formas diferentes, essa variabilidade genética associada a fatores ambientais e sociais podem contribuir para o aumento da suscetibilidade a propriedades tóxicas, psicoativas e a dependência em alguns grupos e indivíduos suscetíveis (OMS, 2014; CLARK, 2006; RAMOZ, 2006).

Os genes que controlam o risco para a DA não estão completamente definidos, no entanto há uma associação positiva entre a história familiar de alcoolismo e DA, sugerindo que existe uma predisposição hereditária favorável (VASCONCELOS et al., 2015; DREHER et al., 2009). Estudos sobre as famílias, gêmeos e filhos adotivos, estimam que o componente genético varie entre 50 e 60% (DU et al., 2009; BHASKAR et al., 2008; GOLDMAN et al., 2005), o que nos mostra que a DA é um transtorno psiquiátrico complexo e multifatorial,

envolvendo interações entre fatores de risco ambientais e hereditários (SURAJ-SINGH et al., 2013; BHASKAR et al., 2008).

Diversos estudos encontraram genes que contribuem para o alcoolismo e suas doenças relacionadas, dentre eles: *DRD2/ANKK1*, *SLC6A3*, *ADH1B*, *ALDH2* e genes de receptores GABA (ZHONG et al., 2015; UYS et al., 2014; MIGNINI et al., 2012; LE STRAT et al., 2008; COVOLO et al., 2005; DICK e FOROUD, 2003; OWEN et al., 1997, 2000; CONNEALLY e SPARKES, 1998; HILL, 1998; SCHORK e SCHORK, 1998; BLUM et al., 1990).

O uso abusivo do álcool é significativo em muitos países e está entre os cinco principais fatores de risco para doenças, entre as quais, dependência, cirrose hepática, câncer, lesões e morte, representando um grande fardo social e econômico para as sociedades, ou seja, um problema de saúde pública (OMS, 2011; 2014; SHIELD, et al., 2013; LIM et al., 2012; BAAN et al., 2007). É um fator causal em mais de 200 doenças e ferimentos, como descrito no CID-10 (OMS, 2014). De acordo com a OMS (Organização Mundial de Saúde) o uso abusivo de álcool tende a ser prejudicial não somente a quem o consome em excesso, mas também para os que se relacionam com essas pessoas (OMS, 2011).

O consumo mundial de álcool em 2010 foi igual a 6,2 litros de álcool puro consumido por pessoa \geq 15 anos, o mesmo que 13,5 gramas de álcool puro por dia. Em 2012 houve aproximadamente 3,3 milhões de mortes, correspondendo a 5,9% de todas as mortes globais, sendo 7,6% das mortes entre homens e 4% entre mulheres. Cerca de 5% de doenças e lesões puderam ser atribuídas ao consumo de álcool no ano de 2014 (OMS, 2014).

De acordo com o II LENAD (II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas) aproximadamente 50% do total da população brasileira consome bebida alcoólica, sendo 62% são homens e 38% mulheres, destes, 10,48% dos homens e 3,63% das mulheres são dependentes de álcool. Além disso, houve diferenças no padrão de consumo para as diferentes regiões do país, com um aumento significativo no nordeste brasileiro, associado a uma maior incidência de consumo entre o sexo masculino (LARANJEIRA et al., 2014). Ferreira et al., 2011, constaram que o alto consumo de álcool apresenta característica de maior risco nas cidades de menor porte, pois o lazer nessas está associado ao uso do álcool, levando a uma inclinação ao consumo mais elevado de bebidas alcoólicas, essa tendência se dá pelas dificuldades das cidades menores em desenvolver políticas públicas de cultura, bem como da escassez de equipamentos públicos de lazer e esporte.

No Brasil, 320 mil pessoas entre 25 e 39 anos morrem decorrentes de problemas relacionados ao álcool, o que representa 9% das mortes de indivíduos nesta faixa etária.

Estima-se que 3 a 20% dos trabalhadores no estado do Piauí são alcoolistas de acordo com dados da Secretaria Estadual de Saúde. Na capital Teresina há aproximadamente 120.000 alcoolistas, e dados da Gerência Executiva do Instituto Nacional do Seguro Social (INSS), revelam que, de janeiro de 2003 a abril de 2014, foram concedidos 572 benefícios a segurados com doenças associadas ao alcoolismo. Nos últimos dez anos quase R\$ 1 milhão foi gasto com o pagamento de benefícios às vítimas do alcoolismo no estado. Já na região Norte do Estado especificamente na cidade de Parnaíba, esses dados ainda não foram completamente levantados (MINISTÉRIO DA PREVIDÊNCIA SOCIAL, 2014; OMS, 2011).

2.2 Efeitos do álcool no fígado e pâncreas

O fígado é o principal órgão responsável pelo metabolismo do álcool, tornando-o o principal alvo de metabólitos tóxicos. Diversas condições patológicas, dentre elas a doença hepática, derivam do consumo intenso de álcool, sendo esse consumo responsável por 50% das doenças crônicas do fígado (KHAN et al., 2010).

A doença alcoólica do fígado compreende vários tipos de lesão hepática incluindo esteatose (aumento de gordura no fígado) presente em quase todos os alcoolistas crônicos, hepatite alcoólica (10-35%) e cirrose (10%). Na maioria dos casos a doença progride e se processa nesta ordem, no entanto podem ocorrer simultaneamente (MANN, et al., 2003). Dentre os diversos agravos a saúde, a cirrose hepática merece destaque como uma importante morbidade crônica fatal causada pelo elevado consumo (REHM et al., 2009).

Enquanto cerca de 20% dos indivíduos alcoolistas sobrevivem a toxicidade crônica, sem desenvolver qualquer patologia do fígado, 20% dos alcoólicos crônicos desenvolvem cirrose, sugerindo que a predisposição individual não pode ser explicada apenas por exposição a fatores ambientais (LADERO et al., 2006; BURIM et al., 2004). Estudos com gêmeos têm demonstrado convincentemente que a suscetibilidade individual à cirrose hepática alcoólica é, pelo menos, parcialmente determinada geneticamente (HRUBEC e OMENN, 1981).

O abuso de álcool também é o principal fator etiológico para pancreatite em muitos países, incluindo a Suécia, a Finlândia, Hungria e Estados Unidos (SAND, et al., 2007). No Japão, o álcool é a principal causa de pancreatite aguda (PA) e pancreatite crônica (PC), com 33,5 e 69,7% dos casos, respectivamente (HAMADA, et al., 2014; HIROTA, et al., 2012). Nakamura et al. (2003) relataram que os indivíduos que consumiam bebidas com alto teor alcoólico tinham um risco maior para o desenvolvimento de PC do que aqueles que

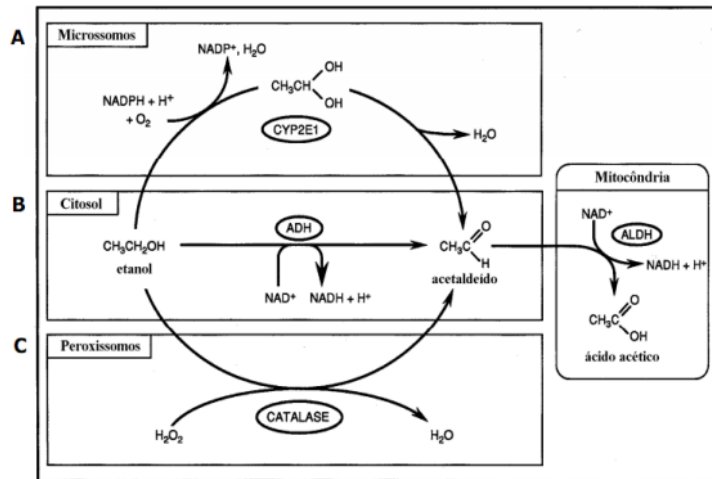
consumiam bebidas de baixo teor alcoólico. Alto consumo de álcool foi associado a um aumento dos riscos, tanto para PA e PC (KUME, 2015). Um estudo japonês de caso-controle conduzido por Li e colaboradores (2001) demonstrou que o consumo prolongado de álcool pesado foi um importante e independente fator de risco para o desenvolvimento de PC.

Há uma relação entre quantidade de álcool consumida e risco de desenvolvimento de doença, onde os homens que consomem mais que 60 gramas de álcool por dia, apresentam risco relativo de 5,0, enquanto que aqueles que consomem de 48 a 60 g/dia têm risco de 2,3 (REHM et al., 2010).

2.3 Metabolismo do álcool

Após a ingestão, o etanol é rapidamente absorvido através do estômago e intestino delgado, segue para a corrente sanguínea, e é principalmente metabolizado no fígado antes da eliminação. A eliminação pulmonar e urinária é mínima (BELL-PARIKH e GUENGERICH, 1999). Dessa parcela que segue para os rins apenas 5 a 15% do etanol ingerido é eliminado diretamente sem sofrer metabolização, do restante, boa parte é oxidado no fígado por diversas reações que envolvem reações de oxidação/redução. A oxidação do álcool nos hepatócitos pode ser realizada por três caminhos diferentes (**Figura 1**): via desidrogenase alcoólica, que ocorre no citoplasma celular; via sistema microsomal de oxidação do álcool (MEOS) no retículo endoplasmático; e a via da catalase nos peroxissomos (VOGEL, 2007; CUNNINGHAN e VAN HORN, 2003; ZIMA, 1993).

Figura 1 - Representação esquemática das vias de metabolização do etanol e formação de acetaldeído.



A: via nos microsossomos (MEOS) mediada pela CYP2E1; B: via no citosol mediada pela ADH; C: via catalase nos peroxissomos; D: metabolismo do acetaldeído na mitocôndria mediada pela ALDH. Fonte: Vogel (2007).

Em indivíduos que ingerem álcool em nível moderado e/ou ocasional em sua maioria e em quantidade regular, a oxidação do etanol se dá principalmente no citoplasma celular pela enzima álcool desidrogenase (ADH). Essa enzima converte o álcool em acetaldeído, o primeiro e principal metabólito do álcool e sua toxicidade é responsável pelos principais danos sofridos no tecido hepático, como também pela presença de rubor facial, náuseas, taquicardia entre outros. Durante essa reação, além da formação do produto acetaldeído, um próton de hidrogênio (H^+) é transferido para uma molécula de NAD, reduzindo a NADH. O excesso de NADH na célula tem efeitos danosos em outras células; além disso, o NADH participa de várias outras reações metabólicas passando o H para outros compostos. Em seguida, na mitocôndria, o acetaldeído é convertido pela enzima aldeído desidrogenase (ALDH) em acetado (CUNNINGHAM e VAN HORN, 2003).

Outro caminho de oxidação do etanol inclui a rota da catalase que tem pouca participação na degradação do etanol e a via da MEOS onde atuam as enzimas do citocromo P450 -as CYPs- que tem sua atividade aumentada (induzida) nos hepatócitos quando o consumo de álcool é elevado. Esta reação leva a formação de acetaldeído por um mecanismo de hidroxilação, liberando um oxigênio e uma molécula reduzida, a NADPH que resulta na formação de NADP e água, tendo como bioprodutos dessa reação, radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (ROS), que contribuem para danos no fígado, ocasionando doenças como a cirrose, proveniente do consumo exacerbado do álcool (CARRARD, 2008; WU e CEDERBAUN, 2003; LIEBER, 2001). A via microsomal somente é ativada em concentrações alcoólicas superiores a 0,20 g/L, sofrendo indução enzimática pelo próprio álcool, o que pode explicar a tolerância aumentada nos bebedores mais assíduos (WALCZAK et al., 2002). Apenas 10% a 15% do etanol consumido é metabolizado pela MEOS. Em indivíduos que bebem regularmente, o metabolismo do álcool é estimulado 510 vezes mais do que em indivíduos que não bebem ou que bebem esporadicamente (CICHOZ-LACH, 2008).

Após passarem pela metabolização de fase I, xenobióticos sofrem reações de fase II que envolvem a conjugação com um substrato endógeno (glutathione, sulfato, glicose, acetato, entre outras) por meio das GSTs, UDP-glucuroniltransferases e N-acetiltransferases (NATs) que agem como enzimas inativadoras dos produtos da fase I, tornando os metabólitos hidrofílicos e passíveis de excreção (HOMRICH, 2006). A interação gene-ambiente na carcinogênese é bem refletida pelas Fases I e II de metabolização e em enzimas envolvidas no metabolismo de agentes carcinogênicos (GRONAU, 2003), ou seja, os fatores genéticos de um indivíduo influenciam a forma como esse interage com carcinógenos ambientais, conferindo, assim, um maior ou menor risco de desenvolver uma patologia em particular

(RAUNIO et al., 1995). Esta suscetibilidade pode estar relacionada com diferentes polimorfismos genéticos entre aqueles que são encontrados em enzimas que estão envolvidas no metabolismo do álcool e de tabaco (MARICHALAR-MENDIA et al., 2011).

2.4 Enzimas metabolizadoras de fase II

Dentre as enzimas denominadas de Fase II, envolvidas nos processos de detoxificação, as GSTs desempenham um papel predominante no metabolismo celular, bem como na modificação de compostos eletrofílicos reativos, resultando em conjugados de glutathione menos reativos e mais facilmente excretados. Estas enzimas são proteínas diméricas solúveis e multifuncionais, que podem conjugar-se com moléculas eletrofílicas tornando-as menos tóxicas, já que catalisam o ataque nucleofílico da glutathione sobre esses compostos (STRANGE et al., 2001; HAYES e PULFORD, 1995).

Elas têm papel importante na ação antioxidante celular, estão envolvidas na defesa contra o estresse oxidativo e sinalização redox, participam da metabolização de drogas, de uma vasta gama de produtos químicos, incluindo agentes carcinógenos ambientais, espécies reativas de oxigênio e agentes quimioterapêuticos. Modulam a proliferação celular, a apoptose, a função imunitária, fibronogênese e atuam na proteção celular (LU, 2013; KELLEN, et al. 2007; HAYES, STRANGE, 2000). Desse modo, tais enzimas desempenham uma função protetora contra compostos carcinogênicos/mutagênicos endógenos e exógenos (NEBERT e VASILIOU, 2004). Isso faz com que os genes da GST sejam importantes candidatos para a exploração nas desordens relacionadas com a via de detoxificação (NAIR, et al., 2013).

Existem duas distintas superfamílias de genes que codificam proteínas com atividade GST. Pelo menos 16 genes codificam enzimas que são expressas no citosol dos tecidos e, pelo menos seis genes são expressos nas membranas (HAYES e STRANGE, 2000). Quanto aos genes que codificam enzimas do citosol, no homem, oito distintas famílias codificam essas GSTs solúveis: alfa (no cromossomo 6), kappa (localização desconhecida), mu (cromossomo 1), ômega (cromossomo 10), pi (cromossomo 11), sigma (cromossomo 4), teta (cromossomo 22) e zeta (cromossomo 14) (STRANGE et al., 2001).

Polimorfismos têm sido descritos em muitos genes dessas famílias, no entanto, uma maior atenção está direcionada ao polialelismo nas famílias mu, teta e pi (STRANGE et al., 2001). A eficiência de detoxificação de enzimas GST é determinada pela presença e quantidade de isoenzimas codificada por genes *GSTT1*, *GSTM1* e *GSTP1* (HAYES e

PULFORD,1995). Os polimorfismos nesses genes são responsáveis pela ausência ou baixa atividade dessas enzimas de metabolização, sendo os exemplos mais conhecidos de genótipos de risco de DA, devido ao aumento da suscetibilidade a propriedades tóxicas, podendo causar sintomas de aversão que inibem a ingestão de álcool e a dependência (GOLAN, 2009).

Na literatura há vários relatos de associação de risco entre genótipos nulos de *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* em pacientes com doença hepática ocasionadas pelo uso abusivo do álcool, como cirrose e pancreatite alcoólica (MARCOS et al., 2011; KHAN et al., 2009; LAREDO et al., 2005; GHOBADLOO et al., 2004; BURIM et al., 2004). Em contrapartida alguns estudos não encontraram associação do uso abusivo do álcool em patologias comumente relacionadas ao seu uso (VIJAYAKRISHNAN e HOULSTON, 2010; BRIND, et al., 2004; HENRION-CAUDE et al., 2002; FRENZER et al., 2002).

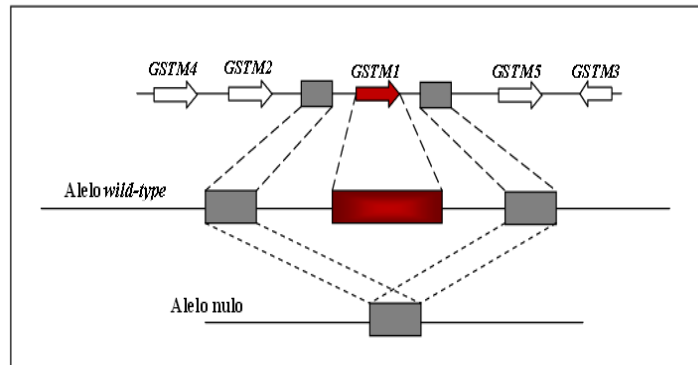
Numerosos estudos levam a hipótese de que a diferença na taxa metabólica das classes M1 e T1 de GST estão associadas ao risco elevado de cânceres de bexiga, pâncreas, trato aerodigestivo superior, pulmão, esôfago, cabeça-pescoço, melanoma e também em pacientes com nefropatia endêmicas balcânica (SENTHILKUMAR et al., 2014; BU et al., 2007; GARCIA-CLOSAS et al., 2005; ABBAS et al., 2004; TONCHEVA et al., 2004; DIALYNA et al., 2003).

2.4.1 *GSTM1* e o polimorfismo de deleção *GSTM1*0*

A *GSTM1*, uma enzima de classe μ , com gene localizado na região cromossômica 1p13.3, que em seres humanos são expressos nas células do fígado e nos linfócitos, tem um papel importante na detoxificação de carcinógenos, como o álcool e os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) presentes no cigarro (VOGEL, 2007; FORD et al., 2000).

A variante nula de *GSTM1* é decorrente da herança de uma deleção homozigótica de todo o gene (ou seja, genótipo nulo) que resulta na perda de atividade funcional da enzima (**Figura 2**) (WIENCKE et al., 1990). Essa perda de função foi associada a uma diminuição na capacidade de detoxificação de indivíduos expostos ao tabaco ou poluentes carcinógenos no ambiente, levando ao aumento da sensibilidade aos efeitos dessas genotoxinas (STRANGE et al., 2001).

Figura 2 - Localização estrutural do *cluster* gênico de 100 kb que codifica para a subfamília GST mu (cromossomo 1p13.3).



Regiões repetidas que flanqueiam o gene *GSTM1*, a recombinação homóloga que pode acontecer e originar o alelo nulo (*GSTM1*0* – ausência de *GSTM1*). Figura adaptada de Parl, 2005.

O genótipo nulo está presente em cerca de 40 a 60% da população caucasiana (NTAIS, et al., 2005), 23 a 48% em populações africanas, 33 a 63% em populações asiáticas, 51 a 54% na população australiana (COTTON et al., 2000), 41,7% da população norte-americana (SEIDEGARD et al., 1990) e 55% na população brasileira (ARRUDA et al., 1998). Harada et al., (1987) em estudo caso-controle sugerem um aumento do risco de alcoolismo em pacientes com o polimorfismo *GSTM1* nulo. *GSTM1*0* tem sido associado com doenças hepáticas, incluindo cirrose biliar primária (DAVIES et al., 1993), hepatite crônica (HARADA et al., 1987; SAVOLAINEN et al., 1996) e hepatite auto-imune (FUKAGAWA et al., 2001). No entanto, outros estudos não conseguiram demonstrar uma associação significativa entre doença hepática e o polimorfismo *GSTM1* nulo (é importante ressaltar que alguns desses estudos tinham um pequeno número amostral) (FRENZER et al., 2002; RODRIGO et al., 1999; GROPPi et al., 1991). Savolainen et al., (1996) encontraram uma redução não significativa nos *GSTM1* nulo em bebedores pesados sem doença do fígado.

Além de patologias em órgãos diretamente ligados ao metabolismo do álcool, vários autores relataram que a deleção do gene *GSTM1* é um fator de risco para o desenvolvimento de carcinoma de células escamosas da boca e do trato aerodigestivo superior (PURNENDU et al., 2014; ZHAO et al., 2014; ZHANG et al., 2011; AMTHA, et al., 2009; GRONAU et al., 2003; SATO et al., 1999). Tanwar et al. (2015) descreveram em seu trabalho que a deleção do gene *GSTM1* pode causar perda de detoxificação resultando em um risco elevado de câncer oral em indivíduos com genótipo nulo quando comparado com controles, especialmente em indivíduos fumantes. Diversos estudos têm demonstrado um aumento do risco de asma ou diminuição da função pulmonar em indivíduos com o genótipo *GSTM1* nulo (LIANG et al., 2013; Li e CHANGETAL, 2013; KARAM et al., 2012), enquanto outros

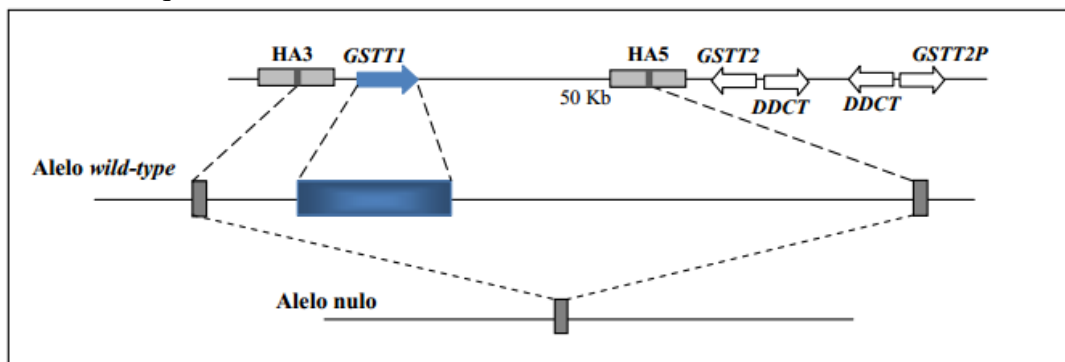
estudos têm relatado nenhuma associação entre o genótipo *GSTM1* e a asma (PIACENTINI et al., 2012; REDDY et al., 2012). Este polimorfismo tem sido associado com aumento de risco em diversos cânceres, como de pulmão, colorretal e uretral (VOGEL, 2007), hiperplasia prostática benigna, câncer de próstata e pode ser útil como biomarcador para identificar doentes com maior risco de câncer de próstata fatal (LIU et al., 2013).

2.4.2 *GSTT1* e o polimorfismo de deleção *GSTT1*0*

O *GSTT1* está localizado na região cromossômica 22q11.23 e codifica a classe teta de GST (SHEN et al., 2013). Os genes da classe teta são expressos nas células do fígado, pulmão, rins, cérebro, músculo esquelético, coração, intestino e no baço (JURONEN et al., 1996).

A variante nula de *GSTT1*0* é também decorrente da herança de uma deleção estrutural homozigótica de todo o gene (ou seja, genótipo nulo) que resulta na perda da atividade funcional da enzima, podendo estar associada a uma diminuição da capacidade de detoxificação de xenobióticos (**Figura 3**) (STRANGE et al., 2001; WIENCKE et al., 1990). Cerca de 20 a 30% dos caucasianos possuem a ausência da atividade enzimática de *GSTT1* (NTAIS, et al. 2005). Aproximadamente 60% dos asiáticos e 40% dos africanos não expressam esta enzima (STRANGE e FRYER, 1999).

Figura 3 - Localização estrutural do *cluster* gênico que codifica para a subfamília GST teta (cromossomo 22q11.2).



Regiões repetitivas que flanqueiam o gene *GSTT1* e que, através de recombinação homóloga, permitem a sua excisão do cromossomo (alelo *GSTT1*0*). Figura adaptada de Parl, 2005.

As consequências biológicas do genótipo *GSTT1* nulo não estão bem esclarecidas, visto que a enzima apresenta propriedades tanto de detoxificação quanto de ativação de muitos poluentes ambientais. Sabe-se que a enzima *GSTT1* detoxifica monohalometanos

(metil brometo) e epóxidos de etileno alcanos e butadieno, mas ela ativa cloreto de metileno e alguns agentes alquilantes bifuncionais (HAYES e PULFORD, 1995). Os constituintes da fumaça do cigarro, tais como halogenetos de alquilo e produtos químicos derivados do fumo de cigarro, tais como diol-epóxido benzo(a)pireno e acroleína são catalisadas por *GSTT1* (KIM, 2002; STRANGE, 2001; HAYES et al., 1995; PEMBLE et al., 1994).

Alguns estudos não encontraram associação significativa entre *GSTT1*0* e doença hepática alcoólica (ALD) ou cirrose hepática alcoólica (ALC) (KHAN et al, 2009; LADERO et al, 2005; FRENZER et al., 2002). Outros estudos relatam a associação entre o polimorfismo do gene *GSTT1* e aumento do risco de câncer de pele, pulmão, estômago, intestino, hepatocelular, próstata, suscetibilidade ao câncer de mama e colorretal na população asiática (RAMALHINHO et al., 2012; XU, et al., 2011; NORPPA, 2004; PARK et al., 2000).

Senthilkumar e Thirumurugan (2014) encontraram efeito protetor do câncer de cabeça e pescoço em fumantes com o polimorfismo *GSTT1*0*.

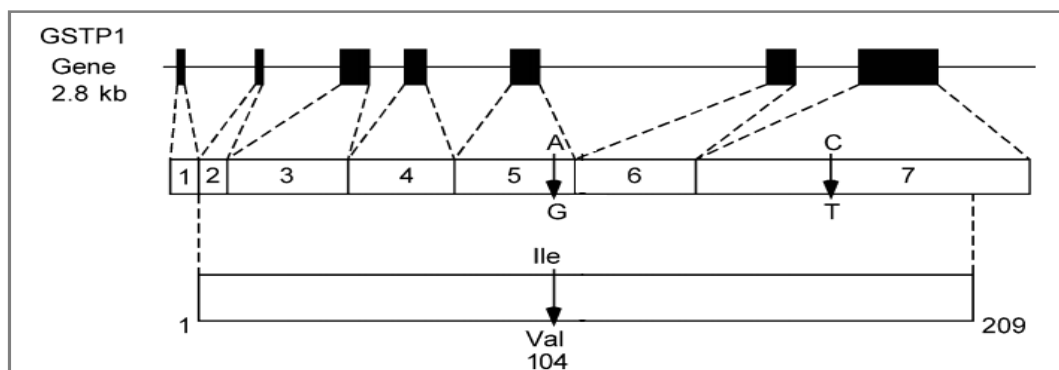
Embora um grande número de estudos tenha tentado associar o risco de câncer com o genótipo nulo dos genes *GSTM1* e *GSTT1*, os resultados são inconclusivos, e muitos não mostraram uma associação significativa. Uma possível explicação dos resultados aparentemente incompatíveis é que outros membros da família de GST venham a compensar a ausência das enzimas *GSTM1* e *GSTT1* funcional (SENTHILKUMAR e THIRUMURUGAN, 2014; BHATTACHARJEE et al., 2013).

2.4.3 *GSTP1* e o polimorfismo Ile105Val

O gene *GSTP1* localiza-se na região cromossômica 11q13, apresentando maior concentração nos pulmões, esôfago e placenta e codifica uma enzima envolvida no metabolismo de compostos halogenados, moléculas de baixo peso molecular e epóxidos reativos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs) (AGUIAR, 2009). O *GSTP1* apresenta um Polimorfismo de Nucleotídeo Único (SNP) que é gerado quando há alteração em um único nucleotídeo, e pode provocar alterações em sítios de reconhecimento de enzimas de restrição. Três diferentes alelos *GSTP1*, *GSTP1a*, *GSTP1b* e *GSTP1c* foram descritos para esse gene: o primeiro alelo variante, denominado *GSTP1*B* difere do *GSTP1*A* (alelo selvagem normal) por apresentar uma transição A>G no nucleotídeo +313 do éxon 5, mudando o códon 105 de ATC (Ile) para GTC (Val) (**Figura 4**). O *GSTP1*C* é caracterizado por duas transições de nucleotídeos, A>G no códon +313, a mesma observada no *GSTP1*B*, e C>T no nucleotídeo +341 do éxon 6, resultando na mudança GCG (Ala) > GTG (Val) no

códon 114. O códon 105 compreende parte do sítio ativo da enzima GSTP1 para ligação de eletrofilos reativos, e a substituição Ile105 > Val105 nas variantes *GSTP1*B* e *GSTP1*C* afeta a atividade catalítica substrato-específica e a estabilidade térmica da proteína codificada (JOHANSSON et al., 2001; PANDYA et al., 2000). Enquanto as variantes de *GSTM1* e *GSTT1* são decorrentes da herança de uma deleção homocigótica de todo o gene (WIENCKE et al., 1990), a variação do alelo de *GSTP1* resulta em uma isoenzima com atividade reduzida (BEDIAGA et al., 2015; NAIR et al., 2013).

Figura 4 - Localização estrutural da alteração do sítio de reconhecimento de enzimas de restrição que codifica o SNP para a subfamília GST pi (cromossomo 11q13).



A seta indica sítio polimórfico que resulta na substituição de aminoácidos no códon 104 (Ile / Val) no éxon 5. Figura adaptada de Parl, 2005.

A variante *GSTP1* Ile105Val tem sido amplamente estudada e ocorre em frequências de 14-20% entre negros africanos, 28-32% entre caucasianos e 14-18% entre asiáticos segundo estudo realizado por Dongping (2010).

Soya e colaboradores (2007) não encontraram risco significativo para câncer do trato aerodigestivo superior na população em estudo na presença do polimorfismo Ile105Val de *GSTP1*. No entanto, houve um aumento da frequência do genótipo variante de *GSTP1* em pacientes com cirrose alcoólica, em relação a controles saudáveis (MARCOS et al., 2011; GHOBADLOO et al., 2004). Burim et al. (2004) identificaram maior frequência do genótipo Val/Val do *GSTP1* em pacientes com doença hepática alcoólica ou pancreatite crônica quando comparados aos alcoolistas sem doença ou os controles saudáveis, e que a variante Val prevalecia em pacientes com cirrose alcoólica, quando comparado com os controles. O gene *GSTP1* foi relacionado com diferentes tipos de câncer como o de cabeça e pescoço (CARRARD, 2008; CURIONI, 2008), próstata (QUADRI, 2011; MO, 2009) mama (SERGENTANIS, 2010; AGUIAR, 2009; KADOURI, 2008) e câncer hepatocelular (YAO-LI, 2010).

Os genes de metabolização podem estar associados ao risco de dependência, visto que esses polimorfismos alteram a atividade enzimática e conseqüentemente o metabolismo de compostos endógenos e exógenos como o álcool e seus metabólitos, causando sintomas de aversão que inibem a ingestão e a dependência (GOLAN, 2009). Os achados no trabalho de Ledesma et al. (2014) fornecem evidências de que a sinalização no estresse oxidativo induzida pela ingestão de álcool além de lesão celular, influenciam em estados motivacionais que levam ao consumo de álcool e que antioxidantes podem reduzir a ingestão do etanol, sugerindo estudos que visam caracterizar o papel das GSTs e seus moduladores no consumo de álcool.

Pessoas com o genótipo para as GSTs que corresponde à baixa atividade enzimática, como por exemplo, o genótipo nulo para *GSTM1* e *GSTT1*, e o alelo polimórfico Val para o gene *GSTP1* podem desenvolver resistência ao consumo do álcool, o mesmo não ocorre em pessoas com um genótipo de alta atividade, pois o álcool pode ter uma taxa mais alta de biotransformação e subseqüente excreção. Alternativamente, pessoas com o gene funcional para as GSTs poderiam se beneficiar, por apresentarem menos efeitos do consumo do álcool pela habilidade destes compostos em induzir a ação de enzimas de detoxificação, facilitando a biotransformação e excreção de substratos danosos (MARCHIONI et al., 2011; CORNELIS et al., 2007).

Embora os genes de fase II sejam altamente polimórficos e numerosos estudos realizados em diferentes populações para determinar se polimorfismos nessas enzimas contribuem para a suscetibilidade genética no desenvolvimento de dependência do álcool, câncer ou outras patologias relacionadas ao consumo abusivo, os resultados dessas associações ainda são inconsistentes (CANOVA et al., 2009).

Por isso se faz necessário mais estudos que consigam identificar genótipos de suscetibilidade ao risco de uso abusivo e/ou desenvolvimento de doenças, entre elas a dependência, ocasionadas pelo alto consumo de bebidas alcoólicas principalmente diante do aumento do consumo de álcool na população brasileira e à escassez de trabalhos realizados no nordeste brasileiro.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar se os polimorfismos de determinadas enzimas metabolizadoras de xenobióticos e de defesa antioxidante estão relacionadas com a suscetibilidade ao uso abusivo do álcool em uma população do Nordeste brasileiro.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar a frequência do polimorfismo de deleção nos genes de metabolização do álcool *GSTM1* e *GSTT1* em uma população de alcoolistas e de controles;
- Determinar a prevalência do polimorfismo Ile105Val do gene de metabolização do álcool *GSTP1* em uma população de alcoolistas e de controles;
- Determinar se as frequências das variantes alélicas propostas, e de seus respectivos alelos, diferem entre os alcoolistas e os indivíduos controles em uma população, a fim de identificar variações de suscetibilidade ao uso abusivo e no desenvolvimento de dependência do álcool;
- Comparar as frequências genotípicas e alélicas observadas para os genes humanos deste estudo na população do nordeste brasileiro com outros estudos populacionais, visando contribuir para um melhor conhecimento da estrutura populacional.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Análise dos sujeitos e aspectos éticos

O tipo do estudo foi um caso-controle. Foram selecionados 283 indivíduos, sendo 145 controles e 138 alcoolistas. Todos os participantes foram do gênero masculino com idade entre 18 e 91 anos e recrutados no município de Parnaíba, PI, Brasil, no período de 2011 a 2013. A avaliação diagnóstica de todos os indivíduos foi realizada por meio de prontuários médicos e uma entrevista e preenchimento do questionário de estudo transversal (APÊNDICE II) estruturado com base na 4ª. edição do Manual de Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais – (*Diagnostic and statistical manual of mental disorders, 4th edition - DSM-IV*) (American Psychiatric Association, 1994). Os alcoolistas selecionados estavam em tratamento no Centro de Apoio psicossocial de álcool e drogas (CAPS-AD) e cumpriram os critérios de diagnóstico para dependência do álcool (303,90) ou o abuso do álcool (305,00) do DSM-IV ou CID-10, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE I), além de concordarem em doar a quantidade necessária de sangue para a genotipagem.

Os critérios de inclusão foram: (i) indivíduos não aparentados; (ii) capacidade cognitiva para compreensão dos objetivos do estudo, dos procedimentos experimentais envolvidos e das questões pertinentes à entrevista, tendo assinado o termo de consentimento livre e esclarecido antes da coleta de sangue e (iii) hereditariedade paterna e materna nordestina brasileira. Os critérios de exclusão para ambos foram: (i) indivíduos portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), hepatite B e C, comorbidades como a esquizofrenia, transtornos do humor ou demência (DSM-IV) e (ii) dependência de outras substâncias químicas além do álcool ou nicotina. Além disso, todos os participantes foram entrevistados com um questionário padrão para coletar as informações básicas, incluindo características sócio-demográficas (como por exemplo, idade e escolaridade) e itens relacionados ao uso do álcool (como por exemplo, idade do primeiro uso, o padrão do consumo de álcool - média de doses por dia, sendo calculado o valor de 1 dose equivalente a 14g de álcool, definido de acordo com a OMS, além dos padrões do hábito tabagista e histórico familiar de alcoolismo ou uso abusivo do álcool conforme descrito anteriormente (KARPYAK et al., 2009). Os controles foram indivíduos que não tiveram problemas com álcool ou que nunca beberam, com idade ≥ 18 anos.

Os dados obtidos da população alcoolista por meio do questionário de estudo transversal serviram para determinar o grau de dependência a fim de correlacionar com os genótipos obtidos, a frequência e a quantidade de álcool consumido, considerando-se em separado os diferentes tipos de bebida de acordo com a **Tabela 1** (VOGEL, 2007).

Tabela 1 - Porcentagem de álcool de acordo com o tipo de bebida

Bebida	Porcentagem de Álcool
Cerveja	5%
Vinho	12%
Uísque/Conhaque/Pinga	40%

Fonte: Divisão de Gastroenterologia - HCRP-FMRP-USP, Departamento de Psicobiologia da UNIFESP/EPM.

Para obter as doses equivalentes de uma determinada bebida, é preciso multiplicar a quantidade consumida por sua concentração alcoólica. Tem-se, assim, a quantidade absoluta de álcool da bebida, como observado na **Tabela 2**.

Tabela 2 - Quantidade de álcool contido em cada dose de bebida

Bebida	Volume	Teor Alcoólico	Quantidade de álcool (Volume x Teor Alcoólico)	Gramas de Álcool/ Dia (Quantidade de Álcool x 0,8*)	Dose 1D=14g
Vinho Tinto	150mL	12%	18ml	14,4g	1
Cerveja	350mL	5%	17,5ml	14g	1
Destilado	40mL	40%	16ml	12,8g	1

(*) Quantidade de álcool em gramas é obtida a partir da multiplicação da quantidade de álcool contido na bebida pela densidade do álcool (d=0,8). Fonte: Núcleo Einstein de Álcool e Drogas do Hospital Israelita Albert Einstein – NEAD.

O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal do Piauí (CAEE: 0234.0.045 – 00 010) de acordo com as diretrizes estabelecidas na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi assinado por todos os voluntários desta pesquisa pós-informados.

4.2 Genotipagem

Foram coletados de todos os indivíduos 4 mL de sangue periférico utilizando seringas individuais e descartáveis, armazenados em tubos contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). O DNA genômico foi extraído a partir dos linfócitos com o kit de Purificação de DNA genômico Wizard™ (Promega Inc., Madison, WI, EUA) de acordo com as especificações do fabricante.

A qualidade do DNA foi determinada por corrida eletroforética em gel de agarose a 0,8%, corado com GelRed™ e visualizadas em transluminador modelo L-PIX-HE (LOCCUS® Biotecnologia, Brasil) à luz ultravioleta. A concentração do DNA foi determinada por meio de espectrofotômetro utilizando-se um comprimento de onda de 260 a 280 nm no equipamento modelo BioSpec-nano (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). Uma vez confirmada a qualidade das amostras, as mesmas foram armazenadas em freezer (-20°C) no Laboratório de Genética e Biologia Molecular, UFPI, *Campus* Ministro Reis Veloso, passando a fazer parte do banco de DNA do Projeto intitulado “Estudo Citogenético e Molecular em uma População de Alcoolistas do Estado do Piauí”, sob a responsabilidade da Profª. Drª. Renata Canalle.

A análise das variantes polimórficas nos genes das enzimas glutationas s-transferases *GSTM1*0*, *GSTT1*0* foi realizada tendo como base o protocolo para técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*) multiplex de Adbel-Rahman et al. (1996). Já a análise de *GSTP1* Ile105Val (rs 1695) foi realizada pela técnica de PCR e polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP, do inglês *Restriction Fragment Length Polymorphism*) *Bsm*I de acordo com Harries et al. (1991), conforme as concentrações apresentadas na **Tabela 3**.

Em todas as PCRs executadas utilizou-se controle negativo (branco) e positivo, a fim de detectar prováveis erros no experimento decorrentes do manuseio inadequado do material ou até mesmo problemas nos reagentes. O controle positivo usado para os genes *GSTT1* e *GSTM1* foi a amplificação constante do gene *CYP1A1*, usado como controle interno de reação. Para controle negativo (branco), utilizou-se todos os reagentes da amplificação exceto o DNA genômico. Todo o procedimento foi realizado dentro de uma cabine de segurança biológica de fluxo unidirecional horizontal da marca VECO, contendo uma Lâmpada de Luz UltraVioleta a fim de eliminar resquícios de DNA de outras amostras que não a de interesse, além de ter ação bacteriostática.

Tabela 3 - Volumes e concentrações dos reagentes utilizados na PCR

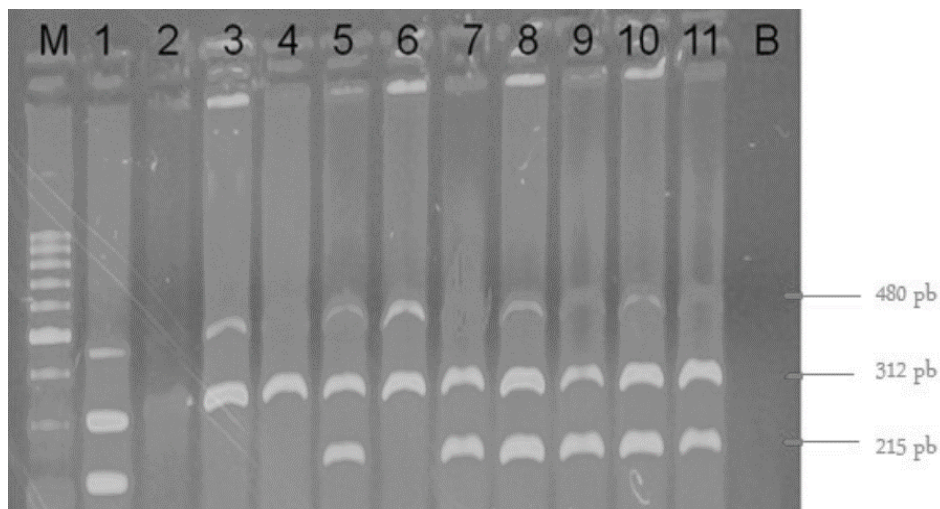
Reagente	<i>GSTT1, GSTT1 e CYP1A1</i>		<i>GSTP1</i>
	Volume e concentração		
H ₂ O estéril	9,2 µL		12,5 µL
Tampão	2,5µL (20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8,4)	2,5µL (20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8,4)	
dNTPs	5,0 µL (2 mM)		5,0 µL (2 mM)
Primer forward	1,0 µL (0,4 µM)		1,5 µL (0,6 µM)
Primer reverse	1,0 µL (0,4 µM)		1,5 µL (0,6 µM)
MgCl ₂	1,0 µL (2 mM)		0,5 µL (1,0 mM)
Taq DNA polimerase	0,25 µL (1,25 U)		0,25 µL (1,25 U)
DNA genômico	1,0 µL (100 ng)		1,0 µL (100 ng)
TOTAL	25 µL		25 µL

A **Tabela 4** apresenta os *primers* utilizados e o tamanho do produto de amplificação de cada um (amplicon). Os *primers* para *CYP1A1* amplificam um fragmento constante de 312 pb, o qual foi usado como controle interno da reação, excluindo a possibilidade de uma falsa interpretação dos resultados devido à ausência da reação de amplificação. O fragmento de 215 pb pode ser visto somente nos casos de indivíduos que possuem o genótipo *GSTM1* positivo. O fragmento de 480 pb pode ser visto somente nos casos de indivíduos que possuem o genótipo *GSTT1* positivo. A ausência de amplificação *GSTM1* (215 pb) ou *GSTT1* (480 pb), na presença de controle interno, indica os respectivos genótipos nulos para cada gene (**figura 5**). O par de *primers* para o gene *GSTP1* P105F e P105R gera um produto de amplificação constante de 176 pb, referente ao genótipo homocigoto para o alelo selvagem (Ile/Ile), o qual não sofre ação da enzima *BsmI*, originando uma banda não clivada.

Tabela 4 - Sequência dos *primers* utilizados para a amplificação das regiões polimórficas estudadas e o tamanho do produto de PCR

<i>Primer</i>	Sequência (5'-3')	<i>Amplicon</i>	Referência
<i>GSTM1-F</i>	GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C	215 pb	Adbel-Rahman et al., 1996
<i>GSTM1-R</i>	GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G		
<i>CYP1A1-F</i>	GAA CTG CCA CTT CAG CTG TCT	312 pb	Adbel-Rahman et al., 1996
<i>CYP1A1-R</i>	CAG CTG CAT TTG GAA GTG CTC		
<i>GSTT1-F</i>	TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC	480 pb	Adbel-Rahman et al., 1996
<i>GSTT1-R</i>	TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA		
<i>GSTP1-F</i>	ACC CCA GGG CTC TAT GGG AA	176 pb	Harries et al., 1991
<i>GSTP1-R</i>	TGA GGG CAC AAG AAG CCC CT		

Figura 5 - PCR-multiplex em gel de agarose 2% para detecção dos polimorfismos nos genes *GSTM1* (215 pb) e *GSTT1* (480 pb), e o gene *CYP1A1* (312 pb) como controle interno da reação.



M = marcador de peso molecular (100 pb) e B = branco (todos os reagentes, exceto DNA). Linhas 1, 5, 8, 9, 10 e 11 todos os genes estão presentes. Linha 2 o gene *GSTM1* e *GSTT1* estão nulos. Linhas 3, 4 e 6 o gene *GSTM1* é nulo. Linha 7 o gene *GSTT1* é nulo

Todos os reagentes utilizados na técnica de PCR, exceto os *primers*, foram comprados na empresa Ludwig Biotecnologia Ltda (Rio Grande do Sul, Brasil).

Após o preparado adequado de todos os reagentes (mix de PCR) e das amostras de DNA genômico dos grupos alcoolistas e controles, seguiu o processo com a inserção dos tubos na placa do termociclador (Thermal Cyclers Amplitherm®, Madison, WI, USA), para a amplificação da região de interesse, sendo o aparelho devidamente programado para a realização dos ciclos (**Tabela 5**).

Tabela 5 - Parâmetros de ciclagem adotados para as reações de PCR

Genes	Desnaturação	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão
	Inicial				final
<i>GSTT1</i> , <i>GSTM1</i> e <i>CYP1A1</i>	95°C/5min.	94°C/2min. (30 ciclos)	58°C/1min.	72°C/1 minuto	72°C/4 min.
<i>GSTP1</i>	95°C/5min.	94°C/30seg. (30 ciclos)	58°C/30 seg.	72°C/30 seg.	72°C/5 min.

Os produtos da PCR juntamente com um controle negativo e com marcador de peso molecular (Ladder - com tamanho de 100 pb) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (na concentração de 2%). Para a corrida foram utilizados 10 µL do produto de PCR dos genes *GSTT1* e *GSTM1* e 5µl do produto de PCR do gene *GSTP1*, corados com 2 µL do corante BLUE (azul de bromofenol + chileno-cianol + glicerol + água) e 2 µL da solução de GelRed™ 0,2% (1 µl de GelRed™ 10.000x + 500 µl de água), a mesma quantidade foi usada para o branco e 2 µL do marcador de peso molecular corado com 2 µL de GelRed™ para a definição do tamanho das bandas formadas, em seguida foram submetidos à eletroforese a uma voltagem de 90V por 30 minutos. As bandas foram visualizadas por foto-documentação pelo transluminador (Loccus Biotecnologia), sob luz ultravioleta, para checagem de amplificação e confirmação de ausência de contaminação na amostra branco. Após isto, a imagem foi enviada para o banco de dados, para posterior análise visual da ausência ou presença de amplificação caracterizada pelo aparecimento de bandas, para análise dos polimorfismos de deleção para os genes *GSTM1* e *GSTT1*.

Os produtos de amplificação confirmados para o estudo do polimorfismo Ile105Val do gene *GSTP1* foram submetidos à técnica de RFLP para a qual foi utilizada a endonuclease *BsmI* 5.000 U/mL (New England Bio Labs, Beverly, MA, USA.). As condições utilizadas para o procedimento de RFLP estão descritas na **Tabela 6**.

Tabela 6 - Condições da digestão enzimática para detecção do polimorfismo Ile105Val do gene *GSTP1*

<i>GSTP1</i>	
PCR	10 µL
Tampão NEBuffer3	1,5 µL
Enzima <i>Bsm</i> I	0,5 µL (2,5 U)
Água estéril	3,0 µL
Volume total	15µL
Temperatura	55°C
Tempo de incubação	2 horas

Todos os reagentes exceto a PCR e a água, eram de fabricação da empresa New England Bio Labs® Inc. e tinham concentrações baseadas nas instruções de uso da enzima recombinante *Bsm* I.

Na presença do alelo polimórfico Ile105Val do gene *GSTP1*, a enzima *Bsm* I, reconhece o sítio de restrição (5'-GTCTC(N)₁▼-3'), corta o fragmento de 176 pb gerando dois fragmentos, um de 91 pb e o outro de 85 pb. O alelo selvagem não possui o sítio para a enzima de restrição e permanece com o mesmo tamanho do produto de amplificação (**Tabela 7**).

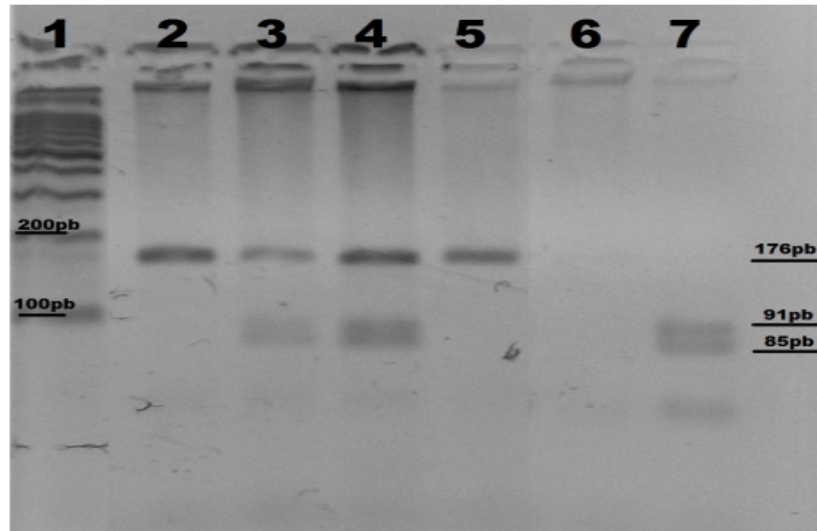
Tabela 7 - Padrão de bandas esperado na digestão para detecção do polimorfismo Ile105Val do gene *GSTP1*

Bandas	Genótipos		
	Ile/Ile	Ile/Val	Val/Val
176 pb	Presente	Presente	Ausente
91 pb	Ausente	Presente	Presente
85 pb	Ausente	Presente	Presente

Após a digestão completa, os produtos de RFLP foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%. A coloração do DNA foi feita utilizando-se o GelRed™. Na cuba de eletroforese horizontal foi utilizada uma corrente de 70V por 30 minutos o que promove a separação das bandas e sua posterior visualização por meio do transluminador com fonte de luz ultravioleta. Para a corrida foram utilizados 10 µL do produto da reação de RFLP, 2 µL do corante BLUE (azul de bromofenol+chileno-cianol+glicerol+água) e 2 µL da solução de

GelRed™. Foi utilizado um marcador de peso molecular (100 pb) corado com 2 µL de GelRed™ para a definição do tamanho das bandas formadas (**figura 3**).

Figura 6 - PCR-RFLP em gel de agarose 2% para detecção do polimorfismo Ile105Val do gene *GSTP1*.



Em 1: Marcador de peso molecular (100 pb); 2 e 5: Ile/Ile; 3 e 4: Ile/Val; 7: Val/Val; 6: branco.

Em cada amplificação, além do controle negativo (branco) havia um controle positivo que consistia em uma amostra sabidamente homozigota polimórfica (genótipo Val/Val) onde ela deveria aparecer corretamente, indicando que na digestão havia uma quantidade de enzima suficiente para digerir todo o DNA.

4.3 Análise estatística

As frequências genotípicas e alélicas foram determinadas por simples contagem. Para testar o equilíbrio de Hardy-Weinberg, as distribuições genotípicas foram comparadas pelo teste do Qui-quadrado. O teste de probabilidade exato de Fisher (bicaudal) foi aplicado na avaliação das diferenças nas distribuições genotípicas e alélicas entre os grupos. O teste t independente foi o método usado para comparar as diferenças dos dados demográficos. A “odds ratio” (OR) e o intervalo de confiança (IC) de 95% foram calculados como uma estimativa de risco relativo e grau de associação. Foi usada uma significância de $p < 0,05$. As análises dos dados foram todas realizadas pelo programa IBM SPSS Statistics 20 (SPSS Inc, EUA) e BioEstat 5.0 *software* (Ayres et al., 2007).

5 RESULTADOS

Foram selecionados no período de 2011 a 2013, 138 pacientes alcoolistas em seguimento clínico em um centro de tratamento de referência (CAPS-AD) e 145 controles saudáveis sem histórico de consumo de álcool de moderado a pesado, todos do gênero masculino e da cidade de Parnaíba – PI. A idade do grupo alcoolista variou de 18 a 83 anos, e grupo controle com idade variando de 18 a 91 anos. No grupo de alcoolistas a idade de início de utilização do álcool foi em média de 14 anos, com consumo médio de 23,50g de álcool puro por dia, além de 57,25% possuir hábito tabagista.

As características clínicas e demográficas quanto à idade dos alcoolistas e controles, escolaridade, idade do primeiro uso, ingestão de álcool médio por dia, hábito tabagista e histórico familiar de uso do álcool foram avaliadas e são apresentadas na **tabela 8**. Alcoolistas e controles não diferiram estatisticamente na idade do primeiro uso, no entanto, foi encontrada diferença significativa ($p < 0,05$) nas demais variáveis presentes. O grupo controle apresentou maior média quanto à escolaridade e o grupo alcoolista quando comparado às doses diárias. Quanto ao hábito tabagista e histórico familiar de uso abusivo do álcool, foi visto em maior frequência no grupo de alcoolistas.

O polimorfismo dos genes *GSTM1* e *GSTT1* levam a uma deleção completa desses genes, conseqüentemente a não produção de enzimas *GSTM1* e *GSTT1*. A análise das frequências genotípicas de *GSTM1* e *GSTT1* são mostradas na **tabela 9**. Ao analisar as frequências genotípicas do polimorfismo *GSTM1*0* observou-se que estava presente em 32,61% dos alcoolistas, não apresentando significância estatística quando comparado com o grupo controle (40,00%), $p = 0,24$. As frequências de *GSTT1*0* para alcoolistas (31,88%) e controles (40,69 %) também não mostraram significância estatística com valor de $p = 0,15$. Para a deleção dos genes *GSTM1* e *GSTT1* o equilíbrio de Hardy-Weinberg não pode ser testado devido à impossibilidade do protocolo de PCR utilizado no presente estudo em separar heterozigotos de homozigotos para essas deleções.

Tabela 8 - Características demográficas da amostra.

Variável	Alcoolistas	Controles	IC 95%	P	T
	Média ± D.P. n=138	Média ± D.P. n=145			
Idade (anos)	39,71 (13,37)	53,69 (21,46)	9,76 - 18,20	<0,05	6,52
Escolaridade (anos)	6,43 (4,52)	11,33 (5,02)	2,76 - 7,23	<0,05	4,57
Idade 1º uso	14, 51 (3,70)	14, 42 (3,12)	- 1,95 - 2,14	0,92	0,10
Doses por dia**	23,50 (17,88)	0,03 (0,30)	20,54 - 26,39	<0,05	15,80
	Numero (%)	Numero (%)	Correção de Yates	p*	
Fumantes	79 (57,25)	36 (24,83)	29,47	<0,0001	
Não fumantes	59 (42,75)	109 (75,17)			
Histórico familiar	105 (76,09)	14 (9,66)	125,34	<0,0001	
Sem histórico familiar	33(23,91)	131 (90,34)			

D.P. = Desvio padrão; p = valor do Teste t para amostras independentes; Significância estatística (P < 0.05); IC = intervalo de confiança; p*-valor do teste do qui-quadrado; ** = padrão de consumo definido de acordo com o Instituto Nacional sobre Abuso de Álcool e Alcoolismo (NIAAA) como 14 g de álcool (<http://rethinkingdrinking.niaaa.nih.gov/WhatCountsDrink/WhatsAstandardDrink.asp>); Significância estatística (P < 0.05).

Tabela 9 - Distribuição genotípica dos alcoolistas e controles para os genes *GSTM1* e *GSTT1*.

Genótipos	Alcoolistas	Controles	p*	OR (95% IC)	P
	Numero (%) n= 138	Número (%) n= 145			
<i>GSTM1</i>					
Presente	93 (67,39)	87 (60,00)	referência	1 (referência)	
Nulo	45 (32,61)	58 (40,00)	0,21	0,72 (0,44-1,18)	0,24
<i>GSTT1</i>					
Presente	94 (68,12)	86 (59,31)	referência	1 (referência)	0,15
Nulo	44(31,88)	59 (40,69)	0,13	0,68 (0,41-1,11)	

Nulo = deleção; p*= os valores foram calculados pelo teste de probabilidade exato de Fisher; OR= odds ratio; IC= intervalo de confiança.

Foi realizada análise combinada entre os polimorfismos *GSTM1* e *GSTT1* entre alcoolistas e controles, a fim de avaliar a ausência ou presença de genótipos de risco e elucidar fatores de risco associados à suscetibilidade ao alcoolismo. Em nossa análise *GSTM1* e *GSTT1* nulos foram considerados genótipos de risco, já a presença dos genes *GSTM1* e *GSTT1* genótipos de baixo risco. A análise dos dados mostrou que quando existe apenas um genótipo de risco, ou seja, a combinação *GSTM1*+/*GSTT1*- e/ou *GSTM1*-/*GSTT1*+, foram encontradas frequências semelhantes entre alcoolistas e controles, não apresentando diferença significativa entre os grupos ($p=0,43$ e $p=0,57$, respectivamente). Quando combinados os dois genótipos nulos *GSTM1*-/*GSTT1*- as frequências foram de 13,04% nos alcoolistas e 20,00% nos controles, mesmo estas apresentando diferença entre os dois grupos não houve significância estatística com $p=0,09$ e $OR=0,52$ (**tabela 10**).

Tabela 10 – Frequência dos genótipos *GSTM1* e *GSTT1* combinados de alcoolistas e controles.

Genótipos	Alcoolistas	Controles	OR (95% IC)	P
	TOTAL (%)			
<i>GSTM1</i> +/ <i>GSTT1</i> +	67 (48,55)	57 (39,31)	1 referência	
<i>GSTM1</i> +/ <i>GSTT1</i> -	26 (18,84)	30 (20,69)	0.73 (0,39 – 1,38)	0,43
<i>GSTM1</i> -/ <i>GSTT1</i> +	27 (19,57)	29 (20,00)	0.79 (0,42 – 1,49)	0,57
<i>GSTM1</i> -/ <i>GSTT1</i> -	18 (13,04)	29 (20,00)	0.52 (0,26 – 1,04)	0,09

+ presença, - ausência (nulo- deleção); OR= odds ratio; IC = intervalo de confiança; Significância estatística ($P < 0.05$).

A **tabela 11** mostra as frequências genotípicas e alélicas para o polimorfismo *GSTP1*(rs1695). Tendo o genótipo homocigoto selvagem Ile/Ile como referência, observou-se uma maior frequência do genótipo heterocigoto Ile/Val no grupo alcoolista (46,38%) e controle (46,90%), não havendo significância estatística entre eles ($p= 0,90$). Ao comparar o genótipo homocigoto mutante Val/Val entre alcoolistas (15,22%) e controles (11,72%) esse mostrou frequência semelhante entre os grupos, não diferindo estatisticamente ($p= 0,48$). Ao comparar as frequências alélicas entre os grupos, observou-se a predominância do alelo Ile em ambos, porém sem significância estatística $p=0,47$. A população em questão estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p>0,05$), uma vez que as frequências genotípicas esperadas e

observadas de *GSTP1* não diferiram estatisticamente, podendo então considerar que as amostras pertencem a uma população em equilíbrio genético (**tabela 12**).

Tabela 11 - Distribuição genotípica e alélica dos alcoolistas e controles para o gene *GSTP1*.

Genótipos/Alelos	Alcoolistas	Controles	p*	OR (95% IC)	p
	Numero (%) n= 138	Número (%) n= 145			
<i>GSTP1</i>					
rs 1695					
Ile/Ile	53 (38,41)	60 (41,38)	referência	1 (referência)	
Ile/Val	64 (46,38)	68 (46,90)	0,89	1,06 (0,64-1,76)	0,90
Val/Val	21 (15,22)	17 (11,72)	0,45	1,39 (0,66-2,92)	0,48
Alelos					
Ile	170 (61,59)	188 (64,83)	referência	1 (referência)	
Val	106 (38,41)	102 (35,17)	0,43	1,14 (0,81-1,61)	0,47

p*= teste de probabilidade exato de Fisher; Ile = alelo selvagem; Val = alelo mutante; OR= odds ratio; IC= intervalo de confiança; Significância estatística (P < 0.05).

Tabela 12 - Valores de χ^2 e p para verificação do equilíbrio de Hardy – Weinberg.

	<i>GSTP1</i>	
	χ^2	p
Alcoolistas	0,053	0,81
Controles	0,116	0,73

χ^2 = qui quadrado; p= significância estatística (p < 0.05).

A história familiar é um importante fator de risco para a síndrome de dependência do álcool, por isso foi analisada a associação dos genótipos de alcoolistas que relatam haver consumo de bebidas alcoólicas por parte de outros membros da família em relação àqueles que relatam não ter parentes que bebem. O genótipo selvagem para *GSTP1* apresentou maior frequência nos alcoolistas com histórico familiar 68,57% quando comparado com os alcoolistas que relataram não ter histórico de abuso do álcool em outros membros da família 63,64%, apesar destas diferenças não serem estatisticamente significativas (p = 0,75) (**tabela**

13). O genótipo *GSTT1* também não apresentou significância estatística quando comparado entre os dois grupos ($p= 0,66$). Quando comparada as frequências genotípicas de *GSTP1* não houve significância estatística para Ile/Val entre alcoolistas (49,52%) e controles (36,36%), $p= 0,31$, e para Val/Val entre alcoolistas (14,29%) e controles (18,18%) com $p= 0,79$.

Tabela 13 - Comparação da frequência dos polimorfismos de *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* entre alcoolistas em relação ao histórico familiar.

Genótipos	Com Histórico familiar	Sem histórico familiar	OR (IC) 95%	p
	Número (%) n= 105	Número (%) n= 33		
<i>GSTM1</i>				
Presente	72 (68,57)	21 (63,64)	1 (referência)	
Nulo	33 (31,43)	12 (36,36)	0,80 (0,35 – 1,82)	0,75
<i>GSTT1</i>				
Presente	70 (66,67)	24 (72,73)	1 (referência)	
Nulo	35 (33,33)	9 (27,27)	1,33 (0,56 – 3,17)	0,66
<i>GSTP1</i>				
Ile/Ile	38 (36,19)	15 (45,45)	1 (referência)	
Ile/val	52 (49,52)	12 (36,36)	1,71 (0,71 – 4,06)	0,31
val/val	15 (14,29)	6 (18,18)	0,98 (0,32 – 3,02)	0,79

Nulo = deleção; Ile = alelo selvagem; Val = alelo mutante; OR= odds ratio; IC = intervalo de confiança; Significância estatística ($P < 0.05$).

Ao analisar as frequências genotípicas entre os alcoolistas que iniciaram o consumo de bebida alcoólica com idade inferior aos 14 anos com os alcoolistas que iniciaram uso após 14 anos, não foi observada significância estatística para os genes *GSTM1* ($p=0,97$) e *GSTT1* ($p=0,38$). Na análise entre os mesmos indivíduos quando comparados os genótipos heterozigoto Ile/Val com homozigoto selvagem Ile/Ile não houve significância estatística ($p=0,27$). Quando se comparou Val/Val com Ile/Ile, houve uma tendência à significância com $p=0,08$ o que sugere que o polimorfismo Val/Val pode conferir risco ao indivíduo que faz uso do álcool antes de 14 anos de 2,82 vezes maior, na suscetibilidade ao uso abusivo do álcool nesta população, entretanto estas diferenças não foram significativas estatisticamente (**tabela 14**).

Tabela 14 - Características genéticas e idade do primeiro uso em alcoolistas para os genes *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1*.

Genótipos	Início de uso < 14 anos	Início de uso > 14 anos	OR (IC) 95%	P
	Numero (%) n= 57	Numero (%) n= 81		
<i>GSTM1</i>				
Presente	38 (66,67)	55 (67,90)	1 (referência)	
Nulo	19 (33,33)	26 (32,10)	1,05 (0,51 – 2,17)	0,97
<i>GSTT1</i>				
Presente	36 (63,16)	58 (71,60)	1 (referência)	
Nulo	21 (36,84)	23 (28,40)	1,47 (0,71 – 3,03)	0,38
<i>GSTP1</i>				
Ile/Ile	17 (29,82)	36 (44,44)	1 (referência)	
Ile/Val	28 (49,12)	36 (44,44)	1,64 (0,77 – 3,51)	0,27
Val/Val	12 (21,05)	9 (11,11)	2,82 (0,99 – 7,98)	0,08

Nulo = deleção; Ile = alelo selvagem; Val = alelo mutante; OR= odds ratio; IC = intervalo de confiança; Significância estatística (P < 0.05).

A **tabela 15** compara as frequências dos genótipos *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* em alcoolistas e controles fumantes e não fumantes. Para o genótipo nulo de *GSTM1* não houve significância estatística quando comparado alcoolistas fumantes e controles fumantes (p = 0,09). Na análise do polimorfismo *GSTT1*0* entre alcoolistas fumantes (31,65%) e controles fumantes (55,56%) os dados mostraram significância estatística quando comparado os dois grupos, com p=0,02, ou seja, a presença do polimorfismo *GSTT1*0* confere proteção ao desenvolvimento do uso abusivo do álcool. Os polimorfismos Ile/Val e Val/Val *GSTP1* (rs1695) não mostraram significância estatística quando comparado alcoolistas e controles em relação ao hábito tabagista. Comparando-se apenas os indivíduos não fumantes para ambos os grupos não foi visto significância estatística para nenhuma das análises.

Tabela 15 - Comparação da frequência dos polimorfismos de *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* entre alcoolistas e controles em relação ao hábito tabagista.

Genótipos	Alcoolistas fumantes	Controles fumantes	OR (95%IC)	P
	Número (%) n= 79	Número (%) n= 36		
<i>GSTM1</i>				
Presente	54 (68,85)	18 (50,00)	1 (referência)	
Nulo	25(31,65)	18(50,00)	0,46 (0,20 - 1,03)	0,09
<i>GSTT1</i>				
Presente	54(68,35)	16(44,44)	1 (referência)	
Nulo	25(31,65)	20(55,56)	0,37 (0,16 – 0,83)	0,02
<i>GSTP1</i>				
Ile/Ile	31(39,24)	14(38,89)	1 (referência)	
Ile/Val	34(43,04)	14(38,89)	1,09 (0,45 – 2,66)	0,98
Val/Val	14(17,72)	8 (22,22)	0,79 (0,27 – 2,31)	0,87
Genótipos	Alcoolistas não fumantes	Controles não fumantes	OR (95%IC)	P
	Número (%) n= 59	Número (%) n= 109		
<i>GSTM1</i>				
Presente	39 (66,10)	69 (63,30)	1 (referência)	
Nulo	20 (33,90)	40 (36,70)	0,88(0,45 – 1,72)	0,84
<i>GSTT1</i>				
Presente	40 (67,80)	70 (64,22)	1 (referência)	
Nulo	19 (32,20)	39 (35,78)	0,85(0,43 – 1,66)	0,76
<i>GSTP1</i>				
Ile/Ile	22 (37,29)	46 (42,20)	1 (referência)	
Ile/Val	30 (50,85)	54(49,54)	1,16 (0,59 – 2,28)	0,79
Val/Val	7 (11,86)	9 (8,26)	1,62 (0,53 – 4,93)	0,56

Nulo = deleção; Ile = alelo selvagem; Val = alelo mutante; OR= odds ratio; IC = intervalo de confiança; Significância estatística (P < 0.05).

6 DISCUSSÃO

6.1 Análise do polimorfismo *GSTM1*0*

No presente estudo, as frequências genotípicas do polimorfismo *GSTM1*0* foram analisadas em alcoolistas em tratamento no CAPS-AD. Mesmo esse genótipo apresentando detoxificação deficiente de metabólitos do álcool, os resultados sugeriram que não houve associação do genótipo nulo *GSTM1*0* com o uso abusivo ou DA em nossos achados, embora as frequências do genótipo nulo mostrando-se maiores em controles do que em alcoolistas, o que poderia sugerir que o aumento desses metabólitos nas células de indivíduos nulos poderia afastar o grupo controle da ingestão de álcool por reações desagradáveis após o consumo, como ocorre na deficiência da enzima ADH, em nossos resultados não foi encontrada associação estatisticamente significativa.

Assim como no trabalho de Plemenitas et al. (2015) com outra enzima de metabolização, onde o polimorfismo de c.-1053C > T de *CYP2E1*, -T não foi associado com DA em uma amostra de 101 pacientes dependentes de álcool, 100 indivíduos ex-dependentes de álcool e 97 controles saudáveis.

Uma possível explicação para essa não associação pode ser a falta de especificidade de ligação da enzima *GSTM1* com metabólitos do álcool ou uma compensação da nulidade desse genótipo por uma GST de outra família nos indivíduos expostos, podendo mascarar a ação dessa enzima na população em estudo, não esquecendo, contudo, que fatores ambientais e um pequeno número amostral podem afetar a função do polimorfismo em questão (BHATTACHARJEE et al., 2013).

Sabendo ainda que a não eliminação dos metabólitos de fase I das células pelas GSTs levam ao acúmulo de ROS causando dano celular, levantou-se a hipótese de que os indivíduos desse estudo estão suscetíveis a outras patologias além da dependência, dentre elas estão as que acometem órgãos específicos responsáveis pela metabolização do álcool, como no trabalho de Savolainen et al. (1996) que encontraram associação estatisticamente significativa de *GSTM1*0* com cirrose hepática alcoólica, e em vários estudos o genótipo nulo foi encontrado com maior frequência entre pacientes com diferentes características de doença hepática alcoólica (KHAN et al., 2009; LADERO et al., 2005; BARANOV et al., 1996; HARADA et al., 1987). Já em outras patologias, diversos relatos tem demonstrado um

aumento do risco de asma ou diminuição da função pulmonar em indivíduos com o genótipo *GSTM1* nulo (LIANG et al., 2013; LI e CHANGETAL, 2013; KARAM et al., 2012).

No entanto, Marcos et. al, (2011), em seus estudos de associação do consumo do álcool a patologias associadas ao uso abusivo, não encontraram associação significativa entre o genótipo nulo e ALD ao comparar pacientes com ALD com controles saudáveis. Vários estudos não conseguiram encontrar uma associação de *GSTM1*0* entre pacientes com diferentes características de doença hepática alcoólica (BURIM et al., 2004; FRENZER et al., 2002; GROPPi et al., 1991).

6.2 Análise do polimorfismo *GSTT1*0*

As consequências biológicas do genótipo *GSTT1* nulo não estão bem esclarecidas, visto que a enzima apresenta propriedades tanto de detoxificação quanto de ativação de muitos poluentes ambientais (HAYES & PULFORD, 1995). Strange et al., 2001 e Wiencke et al., 1990 relatam que, a variante nula *GSTT1*0* resulta na perda da atividade funcional da enzima podendo estar associada a uma diminuição da capacidade de detoxificação de xenobióticos, todavia Landi (2000) sugeriu que indivíduos com genótipo *GSTT1* positivo podem ser mais propensos à ação de genotóxicos metabolizados por meio da via GSTT1.

As frequências genotípicas de *GSTT1*0* foram elevadas no grupo controle em comparação aos alcoolistas, embora não tenha sido encontrada nenhuma significância estatística de associação do genótipo nulo de *GSTT1* com a suscetibilidade ao uso abusivo e DA em nosso estudo. Apesar do acúmulo de produtos da metabolização do álcool traga efeitos adversos ao indivíduo pela não expressão de enzimas de metabolização como a ADH, que o afasta do consumo abusivo do álcool, quando associadas o uso abusivo com *GSTT1*0*, esses dados não foram estatisticamente significantes.

Essa falta de associação em nosso trabalho pode ser resultado do pequeno número amostral que não permitiu a visualização dessa associação, ou então por uma possível não especificidade de ligação da enzima GSTT1 com metabólitos do álcool ou uma compensação da falta dessa enzima por uma GST de outra família (PARL, 2005).

Frente ao intenso consumo de álcool na população em estudo e relatos que indicam que a perda da atividade funcional da enzima causada pela variante nula de *GSTT1*0* leva a uma diminuição da capacidade de detoxificação de xenobióticos, entre eles metabólitos do etanol tais como acetaldeído e ROS que interagem com os ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos, especialmente com DNA mitocondrial, causando dano celular em órgãos como

fígado e pâncreas (STRANGE et al., 2001; LIEBER, 1994; WIENCKE et al., 1990; BOYER, 1989). Sugere-se que os alcoolistas dessa pesquisa estão suscetíveis a patologias como cirrose alcoólica, pacientes e alguns cânceres, visto que, Burim et al. (2004) relataram um aumento na frequência de *GSTT1*0* em alcoolistas com pancreatite em relação aos controles ou alcoolistas sem doença. Ladero et al. (2005) e Khan et al., (2009), relataram um aumento na frequência do genótipo *GSTT1* nulo em pacientes com doença hepática alcoólica, quando comparados com os controles saudáveis. Soya et al. (2007) encontraram associação entre o genótipo nulo de *GSTT1* com um risco de quase 2,5 vezes para câncer do trato aerodigestivo superior.

No entanto, outros estudos que correlacionaram consumo de bebidas alcoólicas e doenças também não apresentam resultados significativos. Frenzer et al. (2002) e Burim et al. (2004) em seus trabalhos não encontraram associação significativa entre a frequência do genótipo nulo de *GSTT1* em pacientes alcoolistas com cirrose alcoólica quando comparados com os controles não alcoolistas, ou pacientes cirróticos não-alcoólicas ou controles alcoolistas.

Abbas et al. (2004), não encontraram diferenças entre os casos de adenocarcinoma esofágico (ADC) sobre as frequências do polimorfismo *GSTT1*0* quando comparados aos controles, sendo visto um efeito protetor dessa deleção em pacientes com ADC. Kim et al. (2002) visualizaram uma associação entre o genótipo nulo de *GSTT1* como um fator de proteção para câncer de bexiga.

Tais resultados contraditórios podem ser explicados por evidências toxicológicas, pois há um aumento do risco de tumores hepáticos e renais em seres humanos com o genótipo *GSTT1* positivo após exposições a solventes halogenados. Curiosamente, o fígado e os rins são dois órgãos que expressam o mais elevado nível de GST classe teta no corpo humano. Assim, o genótipo *GSTT1* positivo pode conferir tanto diminuição ou aumento do risco a DA e outras patologias como o câncer, o que dependeria da fonte de exposição; estudos in vitro, em sua maioria realizados em metabólitos de butadieno, confirmam a ação protetora de *GSTT1* positivo (LANDI, 2000). Essa proteção pode estender-se para DA, pois indivíduos com genótipo positivo ou nulo podem sofrer com efeitos adversos e conseqüentemente afastar-se do consumo do álcool, no entanto esses mesmos indivíduos por possuírem baixa ou alta detoxificação dependendo do composto em questão podem desenvolver sérios problemas a nível celular em determinados órgãos como fígado e rins.

Estes achados podem indicar que indivíduos com genótipo *GSTT1* positivo podem ser mais propensos à ação de genotóxicos metabolizados por meio da via GSTT1. Hayes &

Pulford (1995) indicaram que essa enzima apresenta propriedades tanto de detoxificação quanto de ativação de muitos poluentes ambientais, assegurando ainda mais os resultados apresentados anteriormente.

6.3 Análise do polimorfismo *GSTP1* Ile105Val

Na presente investigação as frequências do genótipo para o gene *GSTP1* homozigoto selvagem (Ile/Ile), heterozigoto (Ile/Val), homozigoto mutante (Val/Val) e frequências alélicas Ile e Val, foram equivalentes entre alcoolistas e controles, evidenciando que possivelmente não há nenhuma associação entre o polimorfismo em questão e o aumento da suscetibilidade ou proteção ao uso abusivo e DA nesta população em estudo.

No entanto as moléculas geradas pela metabolização do álcool que contêm oxigênio são ditas altamente reativas porque quando não detoxificadas por *GSTP1* contribuem com danos ao fígado por meio de diversos mecanismos (WU e CEDERBAUM, 2003). Ghobadloo et al., (2004) e Marcos et al. (2011) evidenciaram um aumento da frequência do genótipo variante de *GSTP1 Val* em pacientes com cirrose alcoólica, quando comparado com os controles. Burim et al. (2004) identificou maior frequência do genótipo Val/Val do *GSTP1* em pacientes com doença hepática alcoólica ou pancreatite crônica quando comparados aos alcoolistas sem doença ou os controles saudáveis, e que a variante Val prevalecia em pacientes com cirrose alcoólica, quando comparado com os controles. O genótipo *GSTP1 Val/Val* também foi associado ao risco no desenvolvimento de hemocromatose hereditária (STICKEL et al., 2005). Dados de Ghobadloo et al., (2004) encontraram associação significativa do polimorfismo Val/Val como fator de risco para a ocorrência de cirrose criptogênica. Apoiando os dados apresentados anteriormente, Wang et al., (2010) sugeriram que estas variantes alélicas estão associadas com outras formas de doenças do fígado, tais como o carcinoma hepatocelular e Sun et al., 2008 evidenciou uma associação desse polimorfismo com lesão hepática induzida por drogas.

Em contrapartida, no estudo de Brind (2004) e seus colaboradores, concluíram que as distribuições de genótipos de *GSTP1* foram semelhantes entre casos e controles, não havendo nenhuma associação significativa entre o genótipo *GSTP1* com susceptibilidade a ALD, assim como Soya e colaboradores (2007) que não encontraram risco significativo para câncer do trato aerodigestivo superior na população em estudo na presença do polimorfismo Ile105val de *GSTP1*.

Esses resultados divergentes quanto proteção/predisposição a dependência ao álcool e diferentes patologias associadas ao uso abusivo podem ser consequência de influências de fatores com o a etnia, número amostral entre os estudos, fatores ambientais como, por exemplo, o estilo de vida do alcoolista, interações com outros genes, explicando assim os dados aqui apresentados e os demais encontrados na literatura.

6.4 Análise combinada dos genótipos *GSTM1* e *GSTT1*

Quando os genótipos nulos para *GSTM1* e *GSTT1* aparecem em homozigose levam a uma perda da função enzimática de ambas as enzimas, conseqüentemente não exercem a detoxificação de carcinógenos ambientais. A somatória da ação desses genes não caracteriza uma atuação qualitativa, indicando a existência ou não de algum traço, mas sim um funcionamento quantitativo, onde o efeito (não patológico por si) de genes favorece o desenvolvimento do transtorno (MESSAS e VALLADA FILHO, 2004; STRANGE et al., 2001). Diversos estudos mostram que a formação de adutos de DNA e as taxas de mutação somática estão aumentadas nos indivíduos com essas deleções (VIJAYAKRISHNAN & HOULSTON, 2010). Dessa forma, os polimorfismos em genes GSTs poderiam constituir fatores que afetam a toxicidade induzida por drogas, dentre elas o álcool (IMANISHI et al., 2007).

Nesse sentido, foi investigada a soma dos genótipos de GSTs de alto risco (*GSTM1* nulo e *GSTT1* nulo) em comparação com genótipos que possivelmente não apresentam risco (genótipos positivos de *GSTM1* e *GSTT1* - referência) no grupo de alcoolistas e controles, na tentativa de explicar uma possível associação desses genótipos que quando somados podem conferir uma suscetibilidade ao uso abusivo do álcool e DA em nossa população.

A análise combinada dos genótipos *GSTM1*+/*GSTT1*-, *GSTM1*-/*GSTT1*+ e *GSTM1*-/*GSTT1*- não detectou nenhuma associação de risco com a suscetibilidade ao uso abusivo do álcool quando comparado indivíduos alcoolistas com controles, o que nos leva a crer que na análise combinada entre polimorfismos, quando apenas um se faz presente ou quando os dois estão nulos não há associação com a suscetibilidade ao uso abusivo do álcool na população em estudo, resultado esse que pode ser explicado por uma compensação da nulidade desse genótipo por uma GST de outra família nos indivíduos alcoolistas visto que o álcool é um indutor de GSTs (BHATTACHARJEE, et al., 2013; PARL, 2005).

Não é de nosso conhecimento até o momento de estudos de associação de polimorfismos de GSTs combinados com a suscetibilidade a DA, contudo a associação de polimorfismos que acarretam uma baixa ou inexistente função enzimática de detoxificação nos leva a crer que os alcoolistas do presente estudo podem estar suscetíveis a outras patologias além da dependência ao álcool, como mostrado por Soya et al., (2007), que ao realizarem essa mesma associação em pacientes com câncer do trato aerodigestivo superior, não encontraram uma associação de risco para essa patologia entre pacientes e controles portadores do genótipo *GSTM1-/GSTT1+*. Frenzer et al., (2002) evidenciaram resultados semelhantes aos nossos na avaliação dos genótipos combinados *GSTM1* e *GSTM1* nulos, não encontrando qualquer efeito destes sobre o risco de cirrose alcoólica.

No entanto, no grupo de pacientes portadores do genótipo *GSTM1+/GSTT1-* a análise realizada por Soya et al., (2007), revelou um risco quase 3 vezes superior para câncer do trato aerodigestivo superior quando comparados aos controles com mesmo genótipo e ao somar *GSTM1-/GSTT1-* observou um risco de 4,6 vezes superior de desenvolvimento desse mesmo câncer quando comparado com indivíduos saudáveis, mostrando que pouca ou nenhuma detoxificação de metabólitos do álcool pode levar a danos a nível celular por acúmulo desses compostos.

Na presente investigação não foi encontrada nenhuma associação dos polimorfismos de *GSTM1*0*, *GSTT1*0* e *GSTP1 Ile105Val* isoladamente ou associados, com uso abusivo do álcool nesta população.

Uma possível explicação para esses resultados pode ser em decorrência do número amostral, das diferenças raciais na distribuição destes genótipos ou de uma população heterogênea etnicamente, uma vez que a frequência genotípica e alélica desses genes possui grandes variações entre os diferentes grupos étnicos, como dentro do mesmo grupo (NELSON et al., 1995; LIN et al., 1994).

6.5 Análise das características demográficas

Na presente investigação as características demográficas de escolaridade mostraram uma associação positiva entre a baixa escolaridade e o uso nocivo de bebidas alcoólicas, revelando que em nossa população há uma prevalência de bebedores com menor grau de instrução quando comparado com controles. Outros estudos visualizaram dados semelhantes com maior proporção de consumo abusivo e alto risco em indivíduos com baixa escolaridade e com menor renda (VASCONCELOS et al. 2015; MORIKAWA et al., 2014;

CASTROAND et al., 2012; FERREIRA et al., 2011; DIAS-DA-COSTA et al., 2004). Estas diferenças de consumo entre grupos com diferente grau de instrução e ocupacionais podem ser reflexos de diferenças em normas culturais para o hábito etilista e outros fatores socioeconômicos, incluindo níveis de escolaridade, uso do álcool para lidar com o estresse no trabalho ou por motivos sócio culturais em associar o consumo do álcool com lazer (MORIKAWA et al., 2014).

Alguns autores relatam que quanto mais jovem ocorrer o primeiro uso, maior será a prevalência no padrão de consumo de bebidas alcoólicas (CASTROAND et al., 2012; KARPYAC et al., 2009; SURAJ SINGH et al., 2013; VASKE et al., 2009). Sabendo que o perfil da idade do primeiro uso de álcool poderá estar associada a uma maior prevalência no uso abusivo, e que em nossas análises o polimorfismo Val/Val mostrou uma tendência a significância estatística em indivíduos que fazem o primeiro uso com idade inferior a 14 anos quando comparado a indivíduos que fazem seu primeiro uso acima de 14 anos, podemos inferir que a presença desse polimorfismo pode conferir risco aumentado na prevalência de um padrão de uso abusivo nesses indivíduos na vida adulta, pois quanto mais jovem ocorrer o primeiro uso, maior será a suscetibilidade ao uso abusivo e dependência. Além disso, quanto mais cedo ocorrer o início do uso do álcool maior será a exposição a seus metabólitos em órgãos específicos, e sua toxicidade.

Apesar de Dawson et al, (2008) e Hingson et al., (2009), evidenciarem que quando o consumo de álcool acontece antes dos 13 anos de idade, está associado com um risco de quatro vezes maior à dependência do álcool na idade adulta, corroborando com nossos dados, são necessários novos estudos com maior número amostral para comprovação desse risco (CASTROAND et al., 2012; KARPYAC et al., 2009; SURAJ SINGH et al., 2013; VASKE et al., 2009).

A herança genética ao alcoolismo é compartilhada em parte com a do tabagismo, o que explica a forte associação entre os dois problemas (AMÂNCIO et al., 2010; BAU, 2002; TRUE et al., 1999). Além disso, o cigarro contém muitas substâncias carcinogênicas, como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH) e N-nitrosaminas que podem ser ativadas ou desativadas pelas GSTs (GOLONI-BERTOLLO et al., 2006).

Nesse sentido analisou-se as características clínicas na amostra estudada, quanto ao hábito tabagista. Pode ser observada uma tendência maior de fumantes entre alcoolistas em relação ao grupo controle com $p < 0,0001$. Quando associados hábito tabagista e alcoolista, a prevalência de câncer oral é elevada em 30 vezes, sendo o etilismo pesado correspondente a

aproximadamente 16% dos óbitos relacionados a este tipo de câncer (BRASIL, 2011; WARNAKULASURIYA, 2008).

Na análise genotípica individual nenhuma associação de risco ou proteção com o genótipo *GSTM1*0* ($p=0,09$ OR=0.46) e os SNPs de *GSTP1* (Ile/Val $p=0,98$ e Val/Val $p=0,87$) entre indivíduos alcoolistas fumantes e controles fumantes foi evidenciada. Já na análise de *GSTT1*0* entre esses mesmos grupos, foi visualizada uma possível proteção conferida aos indivíduos portadores do polimorfismo ($p= 0,02$ OR= 0,37). Corroborando com nossos achados, Senthilkumar e Thirumurugan (2014) encontraram efeito protetor do polimorfismo *GSTT1*0* em fumantes no câncer de cabeça e pescoço e Abbas et al. (2004) em suas pesquisas encontraram efeito protetor de *GSTT1*0* em pacientes com ADC, onde a frequência de *GSTT1*0* era superior em controles sem os hábitos tabagista e etilista quando comparados com pacientes ($p<0,05$).

O fígado e os rins são dois órgãos que expressam o mais elevado nível de GST classe teta no corpo humano. Assim, o genótipo *GSTT1*0* pode conferir diminuição do risco a DA, pois indivíduos com esse genótipo podem ter maiores efeitos adversos ocasionados pela toxicidade aumentada, devido à ausência de detoxificação dos compostos nocivos presentes no álcool e cigarro, fazendo que esse indivíduo não sinta prazer no uso e conseqüentemente afastar-se do consumo do álcool (LANDI, 2000).

Os estudos em famílias vêm demonstrando aumento na prevalência de dependência em parentes de primeiro grau de dependentes quando comparado a indivíduos da população geral, risco esse significativamente maior, com frequência de três a oito vezes superior quando comparados indivíduos com histórico familiar de uso abusivo do álcool com indivíduos sem histórico familiar (MESSAS E VALLADA FILHO, 2004; MERIKANGAS et al., 1998). Em nossos achados, indivíduos com histórico familiar de uso abusivo do álcool apresentaram maior frequência no grupo de alcoolistas em relação ao controle com $p<0,0001$, sugerindo que exista uma transmissão herdável de transtornos de abuso de álcool em nossos indivíduos bebedores. Dados semelhantes aos de Vasconcelos et al., (2015) e Merikangas et al., (1998), que encontraram evidências entre história familiar com risco ao alcoolismo. Outros estudos encontraram influências genéticas em DA para o sexo masculino, com estimativas de herdabilidade que variaram de 40 a 60%, com uma prevalência significativamente maior de dependência do álcool ou de drogas em filhos de pais biológicos com diagnóstico semelhante do que em controles, no sexo masculino (VERMEULEN-SMIT et al., 2012; NIELSEN et al., 2012; MESSAS e VALLADA FILHO, 2004; PRES-COTT & KENDLER, 1999; CADORET et al., 1995).

6.5 Comparação das frequências genóticas e alélicas da população em estudo com outras populações

As variações marcantes entre os polimorfismos do presente estudo causam um grande problema na avaliação de suas frequências em determinadas doenças, porque esses exibem grandes mudanças entre os grupos raciais, particularmente em algumas populações asiáticas (NELSON et al., 1995; HENGSTLER et al., 1998). O Brasil é um país de ancestralidade heterogênea, com origem étnica consistindo de populações de índios e imigrantes da Ásia, África e principalmente da Europa (ALVES-SILVA et al., 2000; CARVALHO-SILVA et al., 2001). Estudos de ancestralidade mostram que a população do nordeste brasileiro apresenta predominância europeia com frequência alélica de 60,6% (PENA et al., 2011) e no estado do Piauí esses valores estão em proporção semelhante 60% (LOPES et al., 2013), visto que o uso indiscriminado do álcool e os problemas relacionados a seu uso apresentam maiores frações notificadas na Região Europeia, verificou-se a frequência dos polimorfismos de *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* na população em estudo e comparou-se com outras populações.

Apesar de estudos de ancestralidade mostrarem que a população do nordeste brasileiro, especificamente da cidade de Parnaíba possui ancestralidade compartilhada em 60% com a população europeia (LOPES et al., 2013), a análise do polimorfismo de *GSTM1**0 na população em estudo foi de 40%, diferente do encontrado na população europeia 47,9% (n=144) (MARCOS et al., 2011). Em outras populações a frequência desse polimorfismo foi de 32% na africana (n=622), 54% na australiana (n=200), asiática 52% (n=3.704) e América do sul 45,7% (221) (EMEVILLE et AL., 2014; MARCOS et al., 2011; BURIN et al., 2004; FRENZER et al., 2002).

A frequência de 40,69% de *GSTT1**0 em nosso estudo foi superior a da população europeia 24,3% (n=144), a africana com 31% (n=622), 11% na australiana (n=200), e em estudo na América do sul 19,5% (n=221) e inferior à frequência na população asiática 50% (n=3.641) (EMEVILLE et AL., 2014; MARCOS et al., 2011; BURIN et al., 2004; FRENZER et al., 2002).

O polimorfismo *GSTP1* Ile/Val em nosso estudo apresentou frequência de 46,90%, frequência semelhante à encontrada nos europeus 45,8% (n=144), brasileiros 46,6%(n=221) e superior a frequência em asiáticos 5,83% (n=120). O genótipo *GSTP1* Val/Val no presente estudo foi de 11,72%, muito próxima a frequência em europeus 12,5%

(n=144), e superior a encontrada em asiáticos 3,33%(n=120) e em outra população brasileira 8,1%(n=221) (MARCOS et al., 2011; LIU et al., 2009; BURIN et al., 2004).

Os dados expostos acima, nos mostram que a divergência em nossos achados parece ser devido à interação gene-gene, gene-ambiente e principalmente pela grande variação étnica desse polimorfismo nas diferentes populações.

Estes dados levantam a questão sobre o verdadeiro impacto da função enzimática nos polimorfismos de GSTs. Genes do biometabolismo não agem isoladamente e a avaliação de múltiplos genes interagindo entre si e com a exposição aos carcinógenos pode ser necessária para compreender este fenômeno. Pesquisas futuras e com maior número amostral são necessárias para elucidar o papel destes e de outros genes, e das interações gene-gene e gene-ambiente na metabolização do álcool, o que seria importante para prevenir ou oferecer uma terapia mais adequada para os indivíduos com suscetibilidade a dependência ao álcool.

7 CONCLUSÃO

No presente estudo foram encontradas frequências genotípicas de 32,61, 31,88 e 15,22% para as variantes *GSTM1*0*, *GSTT1*0* e Val/Val em alcoolistas e 40,00, 40,69 e 11,72% em controles, essas se encontram analogamente distribuídas entre os dois grupos. A frequência do alelo Val esteve presente em 38,41% dos alcoolistas e em 35,71% dos controles, resultados semelhantes aos encontrados em outras populações.

Não foram encontradas associações estatisticamente significativas das variantes genotípicas para *GSTM1*0* e *GSTT1*0* com a suscetibilidade ao uso abusivo e no desenvolvimento da dependência do álcool, contudo a frequência de ambos esteve em maior frequência no grupo controle, podendo esse genótipo estar associado a alterações adversas frente ao uso abusivo do álcool, possivelmente conferindo proteção ao desenvolvimento de DA. Porém, estudos adicionais com maior número amostral precisam ser realizados para poder elucidar esses achados.

Não foram encontradas associações estatisticamente significativas das variantes genotípicas e alélicas, Ile105Val e Val, com a suscetibilidade ao uso abusivo e no desenvolvimento de dependência do álcool.

Na análise do polimorfismo *GSTT1*0* entre alcoolistas fumantes e controles fumantes houve significância estatística quando comparado os dois grupos, evidenciando que a presença do polimorfismo *GSTT1*0* confere proteção ao desenvolvimento do uso abusivo do álcool em fumantes.

A ausência de associação nos polimorfismos apresentados nesse trabalho, não exclui totalmente a possibilidade de estes genes exercerem alguma influência no uso abusivo do álcool ou no desenvolvimento de dependência, tendo em vista que polimorfismos envolvendo os diversos genes do biometabolismo podem contribuir de forma diferenciada para a dependência. Além de um acréscimo no tamanho amostral, para alargar o poder de verificação estatística, estudos envolvendo genes de outras famílias de GSTs e estudos funcionais das demais enzimas codificadas por estes genes também devem ser realizados com o intuito de se obter resultados mais satisfatórios no estudo de associação destes genes do biometabolismo com o desenvolvimento de dependência ao álcool.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. et al. *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* and *Cyp1A1* genetic polymorphisms and susceptibility to esophageal cancer in a French population: different pattern of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. **World J Gastroenterol**, v. 10, n. 23, p. 3389–3393, 2004.
- AGUIAR, E. S. **Fatores de risco para câncer de mama e polimorfismos nos genes *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* em mulheres participantes de um programa de rastreamento mamográfico em Porto Alegre**. 2009. 129 f. Dissertação (mestrado em Ciências Médicas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.
- ALVES-SILVA, J.; DA SILVA SANTOS, M.; GUIMARAÃES, P.E.; FERREIRA, A.C.; BANDELT, H.J.; PENA, S.D.; PRADO, V.F.; The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. **Am. J. Hum. Genet.** 67, 444–461. 2000.
- AMÂNCIO, A.P.; SILVA, D.C.; MELO, C.O.A.; JÚNIOR, R.L.S; CURADO, M.P.; REIS, A.A.S.; CRUZ, A.D. Análise da suscetibilidade alélica do gene *GSTP1* em pacientes com carcinoma espinocelular de laringe. **Estudos**. V.37. P. 811-825. 2010.
- AMTHA, R. et al. *GSTM1*, *GSTT1* and *CYP1A1* polymorphisms and risk of oral cancer: a case-control study in Jakarta, Indonesia. **Asian Pacific journal of cancer prevention**, v. 10, n. 1, p. 21–6, 2009.
- ARRUDA, V.R.; GRIGNOLLI, C.E.; GONÇALVES, M.S. Prevalence of homozygosity for the deleted alleles of glutathione S-transferase mu (*GSTM1*) and theta (*GSTT1*) among distinct ethnic groups from Brazil: relevance to environmental carcinogenesis. **Clin. Genet.** 54: 210-214. 1998.
- AYRES, M., AYRES JÚNIOR, M., AYRES, D.L. & SANTOS, A.A. 2007. **BIOESTAT – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas. Ong Mamiraua**. Belém, PA.
- BAAN, R. et al. Carcinogenicity of alcoholic beverages. **The lancet oncology**, v. 8, n. 4, p. 292–293, 2007.
- BARANOV, V.S.; IVASCHENKO, T.; BAKAY, B.; ASEEV, M.; BELOTSEKOVSKAYA, R.; BARANOVA, H.; MALET, P.; PERRIOT, J.; MOURAIRE, P.; BASKAKOV, V.N.; SAVITSKYI, G.A.; GORBUSHIN, S.; DEYNEKA, S.I.; MICHNIN, E.; BARCHUCK, A.; VAKHARLOVSKY, V.; PAVLOV, G.; SHILKO, V.I.; GUEMBITZKAYA, T.; KOVALEVA, L. Proportion of the *GSTM1* genotype in some Slavic populations and its correlation with cystic fibrosis and some multifactorial diseases. **Hum. Genet.** v 97, p 516–520. 1996.
- BAU, C. H. D. Estado atual e perspectivas da genética e epidemiologia do alcoolismo. **Ciênc saúde coletiva**, v. 7, p. 183–190, 2002.
- BEDIAGA, N. G. et al. Polymorphisms in alcohol and tobacco metabolism genes in head and neck cancer in the Basque Country. **Journal of oral pathology & medicine: official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology**, v. 44, n. 10, p. 769–775, 2015.

- BELL-PARIKH, L. C.; GUENGERICH, F. P. Kinetics of cytochrome P450 2E1-catalyzed oxidation of ethanol to acetic acid via acetaldehyde. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 23833–23840, 1999.
- BHASKAR, L.V.K.S.; THANGARAJ, K.; MULLIGAN, C.J., et al. Allelic variation and haplotype structure of dopamine receptor gene DRD2 in nine Indian populations. **Genet Test** v.12. p.153-160. 2008.
- BHATTACHARJEE, P.; PAUL, S.; BANERJEE, M.; PATRA, D.; BANERJEE, P.; GHOSHAL, N.; BANDYOPADHYAY, A.; GIRI, A. K. Functional compensation of glutathione S-transferase M1 (GSTM1) null by another GST superfamily member, GSTM2. V. 3 : 2704 .**Scientific reports.** 2013.
- BLUM, K. et al. Allelic association of human dopamine D2 receptor gene in alcoholism. **JAMA**, v. 263. p. 2055–2060, 1990.
- BOYER, T. D. The glutathione S-transferases: An update. **Hepatology**, v. 9, 1989.
- BRIND, A. M. et al. The role of polymorphisms of glutathione S-transferases GSTM1, M3, P1, T1 and A1 in susceptibility to alcoholic liver disease. **Alcohol and Alcoholism**, v. 39, n. 6, p. 478–483, 2004.
- BU, H., et al. Significance of glutathione S-transferase M1, T1 and P1 polymorphisms in Swedish melanoma patients. **Oncology Reports**, v. 17, n. 4, p.859–864, 2007.
- BURIM, R. V. et al. Clastogenic effect of ethanol in chronic and abstinent alcoholics. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 560, n. 2, p. 187–198, 2004.
- BURIM, R. V.; CANALLE, R.; MARTINELLI, A. L. C.; TAKAHASHI, C. S. Polymorphisms in glutathione S-transferases GSTM1, GSTT1 and GSTP1 and cytochromes P450 CYP2E1 and CYP1A1 and susceptibility to cirrhosis or pancreatitis in alcoholics. **Mutagenesis**, v. 19, p. 291-298, 2004.
- CADORET, R.; YATES, W.; TROUGHTON, E.; WOODWORTH, G.; STEWART, M. Adoption study demonstrating two genetic pathways to drug abuse. **Arch Gen Psychiatry**, v. 52, p. 42-52, 1995.
- CANOVA, C. et al. Genetic associations of 115 polymorphisms with cancers of the upper aerodigestive tract across 10 European countries: the ARCAGE project. **Cancer Res**, v. 69. p. 2956–65, 2009.
- CARRARD, V. C. et al. Álcool e Câncer bucal: Considerações sobre os Mecanismos Relacionados. Revisão de literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 54, n. 1, p. 49-56, 2008.
- CARVALHO-SILVA, D.R.; SANTOS, F.R.; ROCHA, J.; PENA,S.D. The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. **Am. J. Hum. Genet.** V. 68. P. 281-286. 2001.

CASTROAND, D. S. et al. Sociodemographic characteristics associated with binge drinking among Brazilians. **Drug Alcohol Depend**, v. 126, n. 1-2, p. 272–276, 2012.

CICHOZ-LACH, H.; CELIŃSKI, K.; SŁOMKA, M. Alcohol-metabolizing enzyme gene polymorphisms and alcohol chronic pancreatitis among Polish individuals. **HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association**, v. 10, n. 2, p. 138–43, 2008.

CLARK, D.B. Children at high risk for underage drinking and alcohol use disorders. Frontlines. Bethesda (MD): **National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism**. 2006.

CONNELLY, P. M.; SPARKES, R. S. Molecular genetics of alcoholism and other addiction/compulsive disorders. **Alcohol**, v. 16. p. 85–91, 1998.

CORNELIS, M. C.; EL-SOHEMY, A.; CAMPOS, H. Genotype Modifies the Association Between Cruciferous Vegetable Intake and the Risk of Myocardial Infarction 1–3. **American Journal of Clinical Nutrition**, p. 752–758, 2007.

COTTON, S. C., SHARP, L., LITTLE, J. & BROCKTON, N. Glutathione S-transferase polymorphisms and colorectal cancer: a HuGE review. **Am. J. Epidemiol.** 151, 7–32 2000.

COVOLO, L. et al. Alcohol dehydrogenase 3, glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms, alcohol consumption and hepatocellular carcinoma (Italy). **Cancer Causes and Control**, v. 16, n. 7, p. 831–838, 2005.

CURIONI, O. A. **Polimorfismos genéticos no câncer de cabeça e pescoço: análise de risco e evolução clínica**. 120 f. Tese – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo. 2008.

DAVIES, M. H., ELIAS, E., ACHARYA, S., COTTON, W., FAULDER, G. C., FRYER, A. A. AND STRANGE R. C. GSTM1 null polymorphism at the glutathione S-transferase M1 locus: phenotype and genotype studies in patients with primary biliary cirrhosis. **Gut**, v. 34, p. 549–53, 1993.

DAWSON, D.A.; LI, T.K.; GRANT, B.F. A prospective study of risk drinking: at risk for what? **Drug Alcohol Depend.** V.95. P.62–72. 2008.

DIALYNA, I. A. et al. Genetic polymorphisms of *CYP1A1*, *GSTM1* and *GSTT1* genes and lung cancer risk. **Oncology reports**, v. 10, n. 6. p. 1829–1835, 2003.

DIAS-DA-COSTA, J.S.; SILVEIRA, M.F.; GAZALLE, F.K.; OLIVEIRA, S.S.; HALLAL, P.C.; MENEZES, A.M.B. Consumo abusivo de álcool e fatores associados: estudo de base populacional. *Rev Saúde Pública*. V. 38. P. 284-91. 2004.

DICK, D. M.; FOROUD, T. Candidate Genes for Alcohol Dependence: A Review of Genetic Evidence From Human Studies. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 27. P. 868–879, 2003.

DONGPING, Y. China enviromental desenvolvimento report 2010. **Social Sciences Document Academic Press, Beijing**. 2010.

DOTTO BAU, H. C. Estado atual e perspectivas da genética e epidemiologia do alcoolismo. Current status and perspectives on the genetics and epidemiology of alcoholism. **Pharmacogenetics**, p. 183–190, 2002.

DREHER, J. et al. Variation in dopamine genes influences responsivity of the human reward system. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 2, p. 617–622, 2009.

DU, Y.; WAN, Y.J. The interaction of reward genes with environmental factors in contribution to alcoholism in Mexican Americans. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 33, p. 2103–2112, 2009.

FERREIRA, L. N. et al. Perfil do consumo de bebidas alcoólicas e fatores associados em um município do Nordeste do Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 27, n. 8, p. 1473–1486, 2011.

FORD, J. G. et al. Glutathione S-transferase M1 polymorphism and lung cancer risk in African-Americans. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 11, p. 1971–1975, 2000.

FRENZER, A.; BUTLER, W. J.; NORTON, I. D.; WILSON, J. S.; APTE, M. V.; PIROLA, R. C.; RYAN, P.; ROBERTS-THOMSON, I. C. Polymorphism in alcohol-metabolizing enzymes, glutathione S-transferases and apolipoprotein and susceptibility to alcohol-induced cirrhosis and chronic pancreatitis. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 17, p. 177–182, 2002.

FUKAGAWA, N. K.; LIANG, P.; LI, M.; ASHIKAGA, T.; REDDY, K. R.; KRAWITT, E. L. Glutathione-S-transferase M1 null genotype in autoimmune hepatitis. **Digestive Diseases Science**, v. 46, p. 2080–2083, 2001.

GARCIA-CLOSAS, M. et al. NAT2 slow Acetylation, *GSTM1* null genotype and risk of bladder cancer: results from the Spanish Bladder Cancer Study and meta-analyses. **Lancet**, v. 366, p. 649–659, 2005.

GHOBADLOO, S.M., YAGHMAEI, B., BAKAYEV, V., GOUDARZI, H., NOORINAYER, B., RAD, F.H., SAMIY, S., AGHABOZORGH, S., ZALI, M.R. GSTP1, GSTM1, and GSTT1 genetic polymorphisms in patients with cryptogenic liver cirrhosis. **J. Gastrointest.** V. 4. P. 423–427. 2004.

GOLAN, D. E. **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia.** 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

GOLDMAN, D.; OROSZI, G.; DUCCI, F. The genetics of addictions: uncovering the genes. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, p. 521–532, 2005.

GOLONI-BERTOLLO, E.A. et al. Avaliação da influência da nulidade dos genótipos GSSTT1 e GSTM1 na carcinogênese em cabeça e pescoço. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 52, n. 5, p. 365–368, 2006.

GRONAU, M. et al. Gene polymorphisms in detoxification enzymes as susceptibility factor for head and neck cancer. **Otolaryngol Head Neck Surg**, v.128, p. 674–680, 2003.

- GROPPI, A.; COUTELLE, C.; FLEURY, B.; IRON, A.; BEGUERET, J.; COUZIGOU, P. Glutathione S-transferase class m in French alcoholic cirrhotic patients. **Human Genetics**, v. 87, p. 628–30, 1991.
- HAMADA, S.; MASAMUNE, A.; KIKUTA, K. et al. Nationwide epidemiological survey of acute pancreatitis in Japan. **Pancreas**, v. 43, p. 1244–1248, 2014.
- HARADA, S.; AGARWAL, D. P.; GOEDDE, H. W. Aldehyde dehydro-genase and glutathione-S-transferase polymorphism: association between phenotype frequencies and alcoholism. **Progress in Clinical and Biological Research**, v. 241, p. 241–250, 1987.
- HAYES, J. D.; PULFORD, D. J. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. **Crit Rev Biochem Mol Biol**, v. 30, p. 445–600, 1995.
- HAYES, J. D.; STRANGE, R.C. Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. **Pharmacology.**, v. 61, p. 154–166, 2000.
- HENGSTLER, J.G.; ARAND, M.; HERRERO, M.E.; OESCH, F. Poly- morphisms of N-acetyltransferases, glutathione S-transferases, microsomal epoxide hydrolase and sulfotransferases: influence on cancer susceptibility. **Recent Results Cancer Res**. V. 154. P. 47-85, 1998.
- HENRION-CAUDE, A.; FLAMANT, C.; ROUSSEY, M.; HOUSSET, C.; FLAHAULT, A.; FRYER, A. A.; CHADELAT, K.; STRANGE, R. C.; CLEMENT, A. Liver disease in pediatric patients with cystic fibrosis is associated with glutathione S-transferase P1 polymorphism. **Hepatology**, v. 36, p. 913–917, 2002.
- HILL, S. Y. Alternative strategies for uncovering genes contributing to alcoholism risk: Unpredictable findings in a genetic wonderland. **Alcohol**, v. 16, n. 1, p. 53–59, 1998.
- HINGSON, R.; EDWARDS, E.M.; HEEREN, T.; ROSENBLOOM, D. Age of drinking onset and injuries, motor vehicle crashes, and physical fights after drinking and when not drinking. **Alcohol Clin Exp Res**. 33(5):783–90. 2009.
- HIROTA, M. et al. The sixth nationwide epidemiological survey of chronic pancreatitis in Japan. **Pancreatology**, v. 12, p. 79–84, 2012.
- HIRVONEN, A. Genetic factors in individual responses to environmental exposures. **J. Occup. Environ. Med**, v. 37, p. 37-43, 1995.
- HOMRICH, L. B. **Genes de enzimas de biotransformação e fissuras labio-palatinas em humanos: um estudo da interação genético-ambiental**. 2006. 137 f. Tese (Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- HRUBE, C, Z. E.; OMENN, G. S. Evidence of genetic predisposition to alcoholic cirrhosis and psychosis: twin concordances for alcoholism and its biological end points by zygosity among male veterans. **Alcohol Clin Exp Res**, v.5, p. 207-215, 1981.

JOHANSSON, A.-S.; MANNERVIK, B. Human Glutathione Transferase A3-3, a Highly Efficient Catalyst of Double-bond Isomerization in the Biosynthetic Pathway of Steroid Hormones. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 33061, 2001.

JURONEN, E.; TASA, G.; UUSKÜLA, M.; POOGA, M.; MIKELSAAR, A.V. Purification, characterization and tissue distribution of human class theta glutathione S-transferase T1-1, **Biochem. Mol. Biol. Int.** v.39 p. 21–29. 1996.

KADOURI, L. et al. Glutathione-S-transferase M1, T1 and P1 polymorphisms, and breast cancer risk, in BRCA1/2 mutation carriers. **British journal of cancer**, v. 98, n. 12, p. 2006–10, 2008.

KARAM, R. A.; PASHA, F.; EL-SHAL, A. S.; RAHMAN, H. M. A.; GAD, D. M. Impact of glutathione-S-transferase gene polymorphisms on enzyme activity, lung function and bronchial asthma susceptibility in Egyptian children. **Gene**, v. 497, n. 2, p. 314–319, 2012.

KARPYAK, V.M.; BIERNACKA, J.M.; VANDER WEG, M.W.; STEVENS, S.R.; CUNNINGHAM, J.M.; MRAZEK, D.A.; BLACK, J.L. Interaction of SLC6A4 and DRD2 polymorphism is associated with a history of delirium tremens. **Addiction Biol** 15:23-34. 2009.

KELLEN, E. et al. Pooled analysis and meta-analysis of the glutathione S-transferase P1 Ile 105Val polymorphism and bladder cancer: A HuGE-GSEC review. **Am J Epidemiol**, v. 165, p. 1221-1230, 2007.

KHAN, A. J.; HUSAIN, Q.; CHOUDHURI, G.; PARMAR, D. Association of polymorphism in alcohol dehydrogenase and interaction with other genetic risk factors with alcoholic liver cirrhosis. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 109, p. 190–197, 2010.

KHAN, A. J. et al. Polymorphism in glutathione-S-transferases: A risk factor in alcoholic liver cirrhosis. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 101, n. 3, p. 183–190, 2009.

KIM, N.K.; CHONG, S.Y.; JANG, M.J.; HONG, S.H.; KIM, H.S.; CHO, E.K. Association of the methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism in Korean patients with childhood acute lymphoblastic leukemia. **Anticancer Res** v. 26(4B). p. 2879-81. 2002.

KUME, K. M. D. Alcohol Consumption and the Risk for Developing Pancreatitis: A Case-Control Study in Japan. **Pancreas**, v. 44, p. 53–58, 2015.

LADERO, J. M. et al. Glutathione S-transferase M1 and T1 genetic polymorphisms are not related to the risk of hepatocellular carcinoma: a study in the Spanish population. **European journal of cancer**, v. 42, n. 1, p. 73–7, 2006.

LADERO, J.M., MARTINEZ, C., GARCIA-MARTIN, E., FERNÁNDEZ-ARQUERO, M., LÓPEZ-ALONSO, G., de la CONCHA, E.G. Polymorphisms of the glutathione S-transferases mu-1 (GSTM1) and theta-1 (GSTT1) and the risk of advanced alcoholic liver disease. **Scand. J. Gastroenterol.** 40, 348–353. 2005.

LANDI, S. Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: A review. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 463, n. 3, p. 247–283, 2000.

LARANJEIRA, R et al. **II Levantamento Nacional de Álcool e drogas (LENAD) - 2012..** Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Políticas Públicas de Álcool e Outras Drogas (INPAD), UNIFESP. p. 85, 2014.

LE STRAT, Y. et al. The 3' part of the dopamine transporter gene DAT1/SLC6A3 is associated with withdrawal seizures in patients with alcohol dependence. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 32, p.7–35, 2008.

LEDESMA, J. C.; BALINO, P.; ARAGON, C. M. G. Reduction in Central H₂O₂ Levels Prevents Voluntary Ethanol Intake in Mice: A Role for the Brain Catalase-H₂O₂ System in Alcohol Binge Drinking. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 38, n. 1, p. 60–67, 2014.

LI, F.; LI, S.; CHANG, H.; NIE, Y.; ZENG, L.; ZHANG, X.; WANG, Y. Quantitative assessment of the association between the GSTM1-null genotype and the risk of childhood asthma. **Genet Test Mol Biomarkers**, n. 9, p. 656-61, 2013.

LI, N. Y. et al. Associations of alcohol drinking and nutrient intake with chronic pancreatitis: findings from a case-control study in Japan. **Am J Gastroenterol**, v. 96, p. 2622–2627, 2001.

LIANG, S.; WEI, X.; GONG, C. et al. Significant association between asthma risk and the GSTM1 and GSTT1 deletion polymorphisms: an updated meta-analysis of case-control studies. **Respirology**, v. 18, n.5, p. 774–783, 2013.

LIEBER, C. S. Alcoholic liver injury: pathogenesis and therapy in 2001. **Pathol Biol (Paris)**, v. 49, n. 9, p. 738–52, 2001.

LIEBER, CS. Alcohol and the liver: 1994 update. **Gastroenterology**. V.106. P.1085-1105. 1994.

LIM, S. S.; VOS, T.; FLAXMAN, A.D.; DANAEI, G.; SHIBUYA, K.; ADAIR-ROHANI H. et al. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **Lancet**, v. 380, p. 2224–2260, 2012.

LIU, K. et al. Association of GST Genetic Polymorphisms with the Susceptibility to Hepatocellular Carcinoma (HCC) in Chinese Population Evaluated by an Updated Systematic Meta-Analysis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, 2013.

LIU, Y.; MENG, X.; ZHOU, L.; ZHANG, P.; SUN, X.; ZHANG, P. Genetic polymorphism and mRNA levels of cytochrome P450 II E1 and glutathione S-transferase P1 in patients with alcoholic liver disease in different nationalities. **Hepatobiliary Pancreat Dis Int**, Vol 8. 2009.

- LOPES, T. R. et al. Population data of the 46 insertion-deletion (INDEL) loci in population in Piauí State, Northeastern Brazil. **Forensic Science International: Genetics**, v. 9, n. 1, p. 2013.
- MANN, R. E.; SMART, R. G.; GOVONI, R. The epidemiology of alcoholic liver disease. **Alcohol research & health: the journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism**, v. 27, n. 3, p. 209–219, 2003.
- MARCHIONI, D. M. L.; GATTÁS, G. J. F.; CURIONI, O. A.; CARVALHO, M. B. Interação entre consumo alimentar e polimorfismos da GSTM1 e GSTT1 no risco para o câncer de cabeça e pescoço: estudo caso-controle em São Paulo, Brasil Interaction between dietary intake and GSTM1 and GSTT1 polymorphisms in head and neck cancer risk. **Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro**. v. 27, n. 2, p. 379–387, 2011.
- MARCOS, M. et al. Meta-analysis: Glutathione-S-transferase allelic variants are associated with alcoholic liver disease. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 34, n. 10, p. 1159–1172, 2011.
- MARICHALAR-MENDIA, X. et al. Alcohol-dehydrogenase (ADH1B) Arg48His polymorphism in Basque Country patients with oral and laryngeal cancer: Preliminary study. **Anticancer Research**, v. 31, n. 2, p. 677–680, 2011.
- MERIKANGAS, K.; STOLAR, M.; STEVENS, D.; O'MALLEY, S.; ROUSANVILLE B. Familial trans-mission of substance use disorders. **Arch Gen Psychiatry**, v. 55, p. 973-9, 1998.
- MESSAS, G. P.; VALLADA FILHO, H.P. O papel da genética na dependência do álcool. **Rev Bras Psiquiatria**, v. 26. p. 54-58, 2004.
- MIGNINI, F. et al. DRD2/ANKK1 TaqIA and SLC6A3 VNTR polymorphism in alcohol dependence: association and gene-gene interaction study in a population of Central Italy. **Neurosci Lett**, v. 522, p. 103–107, 2012.
- MINISTÉRIO DA PREVIDÊNCIA SOCIAL, 2014. Disponível em <<http://www.brasil.gov.br/saude/2014/05/doencas-relacionadas-ao-alcoolismo-deixam-inss-em-alerta>> Acesso em 19 ago 2015.
- MO, Z.; CAO, Y.; GAO, F.; JIAN, L. An updating meta-analysis of the *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* polymorphisms and prostate cancer: A HuGE Review. **Prostate**, v. 69, p. 662–688, 2009.
- MORIKAWA, Y. et al. The effect of age on the relationships between work-related factors and heavy drinking. **Journal of Occupational Health**, v. 56, n. 2, p. 141–149, 2014.
- NAIR, R. R.; KHANNA, A.; SINGH, K. Association of GSTT1 and GSTM1 polymorphisms with early pregnancy loss in an Indian population and a meta-analysis. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 26, p. 313–322, 2013.
- NAKAMURA, Y., et al. Spirits and gastrectomy increase risk for chronic pancreatitis in Japanese male alcoholics. **Pancreas**. v. 26. p. 27-31. 2003.

NEBERT, D. W.; VASILIOU, V. Analysis of the glutathione S-transferase (GST) gene family. **Human genomics**, v. 1, n. 6, p. 460–464, 2004.

NELSON, H.; WIENCKE, J. K.; CHRISTIAN, D. C.; Ethnic differences in the prevalence of the homozygous deleted genotype of glutathione S-transferase theta. *Carcinogenesis*, v 16. P 1243-1245. 1995.

NTAIS, C.; POLYCARPOU, A.; IOANNIDIS, J.P. Association of *GSTM1*, *GSTT1*, and *GSTP1* gene polymorphisms with the risk of prostate cancer: a meta-analysis. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 14, n. 1, p. 176–181, 2005.

OMS. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global status report on alcohol and health – 2014**. Geneva, 2014.

OMS. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The global status report on alcohol and health 2011**. Geneva. 2011.

OMS. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The ICD-10 Classification of Mental and Behavioural Disorders Diagnostic criteria for research**. Geneva, 1992.

OWEN, M. J.; CARDNO, A. G.; O'DONOVAN, M. C. Psychiatric genetics: back to the future. **Molecular Psychiatry**, v. 5, p. 22–31, 2000.

OWEN, M. J.; HOLMANS, P.; MCGUFFIN, P. Association studies in psychiatric genetics. **Molecular Psychiatry**, v. 2, p. 270–273, 1997.

PANDYA, U. et al. Activity of allelic variants of Pi class human glutathione S-transferase toward chlorambucil. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 278, n. 1, p. 258–62, 2000.

PARK, L. Y. et al. Comparison of GSTM polymorphisms and risk for oral cancer between African-Americans and Caucasians. **Pharmacogenetics**, v. 10, n. 2, p. 123–131, 2000.

PARL, F.F. Glutathione S-transferase genotypes and cancer risk. **Cancer Lett.** V. 221 (2), p. 123–129. 2005.

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

PLEMENTAS, A.; KASTELIC, M.; PORCELLI, S.; SERRETTI, A.; DOLZAN, V. KORES, P.P. Alcohol dependence and genetic variability in the serotonin pathway among currently and formerly alcohol-dependence and genetic variability in the serotonin pathway among currently and formerly alcohol-dependent males, *Neuropsychobiology*. V. 72. P. 57-64. 2015.

PENA, S. D. J. et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, p. 1–10, 2011.

PIACENTINI, A.; VERROTTI, R.; POLIMANTI et al. Functional polymorphisms of GSTA1 and GSTO2 genes associated with asthma in Italian children. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 50, n. 2, p. 311–315, 2012.

PIACENTINI, S.; POLIMANTI, R.; MOSCATELLI, B.; RE, M.; MANFELLOTTI, D.; FUCIARELLI, M. Lack of association between GSTM1, GSTP1, and GSTT1 gene polymorphisms and asthma in adult patients from Rome, central Italy, **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, v. 22, n.4, p. 252–256, 2012.

PURNENDU, R. et al. GSTM1 polymorphism as risk factor in oral carcinoma in central Indian population: A pilot study. **J Res Adv Dent**, v. 3, p. 251–257, 2014.

QUADRI, Q. et al. Genetic Polymorphism of the Glutathione-S-transferase P1 Gene (*GSTP1*) and Susceptibility to Prostate Cancer in the Kashmiri population. **Genetics and Molecular Research**, v.10, n. 4, p. 3038-3045, 2011.

RAMALHINHO, A. C.; FONSECA-MOUTINHO, J. A. E BREITENFELD, L. A. G. Positive Association of Polymorphisms in Estrogen Biosynthesis Gene, CYP19A1, and Metabolism, GST, in Breast Cancer Susceptibility. **DNA and Cell Biology**, v. 31, p. 1100-1106, 2012.

RAMOZ, N. Genetic and pharmacogenomic aspects of alcohol-dependence. **Current Pharmacogenomics**, v. 4, p. 19–32, 2006.

RAUNIO, H. et al. Diagnosis of polymorphisms in carcinogen-activating and inactivating enzymes and cancer susceptibility-a review. **Gene**, v. 159, n. 1, p. 113–121, 1995.

REDDY, P.; NAIDOO, R. N.; ROBINS, T. G. et al. GSTM1 and GSTP1 gene variants and the effect of air pollutants on lung function measures in South African children, **American Journal of Industrial Medicine**, v. 55, n. 12, p.1078–1086, 2012.

REHM, J. et al. Global burden of disease and injury and economic cost attributable to alcohol use and alcohol-use disorders. **The Lancet**, v. 373, n. 9682, p. 2223–2233, 2009.

REHM, J.; TAYLOR, B.; MOHAPATRA, S.; IRVING, H.; BALIUNAS, D.; PATRA, J.; ROERECKE, M. Alcohol as a risk factor for liver cirrhosis: A systematic review and meta-analysis: Alcohol and liver cirrhosis. **Drug Alcohol Rev**, v. 29, n. 4, p. 437-445, 2010.

RODRIGO, L.; ALVAREZ, V.; RODRIGUEZ, M.; PEREZ, R.; ALVAREZ, R.; COTO, E. N acetyltransferase-2, glutathione S-transferase M1, alcohol dehydrogenase, and cytochrome P4502E1 genotypes in alcoholic liver cirrhosis: a case–control study. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 34, p. 303–307, 1999.

SAND, J.; LANKI, S. C. H. P. G.; NORDBACK, I. Alcohol consumption in patients with acute or chronic pancreatitis. **Pancreatology**, v. 7: p. 147–156, 2007.

SATO, M.; SATO, T.; IZUMO, T.; AMAGASA, T. Genetic polymorphism of drug-metabolizing enzymes and susceptibility to oral cancer. **Carcinogenesis**, v. 20. p. 1927–1931, 1999.

SAVOLAINEN, V. T.; PJARINEN, J.; PEROLA, M.; PENTTILA, A.; KARHUNEN, P. J. Glutathione-S-transferase GST M1 'null' genotype and the risk of alcoholic liver disease. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 20, p. 1340–1345, 1996.

SCHORK, N. J.; SCHORK, C. M. Issues and strategies in the genetic analysis of alcoholism and related addictive behaviors. **Alcohol**, v. 16, n. 1, p. 71–83, 1998.

SENTHILKUMAR, K. P.; THIRUMURUGAN, R. Risk Modulation of *GSTM1* - *GSTT1* interactions to Head and Neck Cancer in tobacco users. **Mol Bio Rep**, v. 41, n. 9, p. 5635–5644, 2014.

SERGENTANIS, T. N.; ECONOMOPOULOS, K. P. *GSTP1* and *GSTP1* polymorphisms and breast cancer risk: a meta-analysis. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 121, n. 1, p. 195–202, 2010.

SHIELD, K. D.; PARRY, C.; REHM, J. Chronic diseases and conditions related to alcohol use. **Alcohol Research Current Reviews**, v. 35, p. 155–171, 2013.

SINGH, H. S.; GHOSH, P. K.; SARASWATHY, K. N. DRD2 and ANKK1 gene polymorphisms and alcohol dependence: A case-control study among a Mendelian population of East Asian ancestry. **Alcohol and Alcoholism**, v. 48, n. 4, p. 409–414, 2013.

SOYA, S. S. et al. Genetic polymorphisms of glutathione-S-transferase genes (*GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1*) and upper aerodigestive tract cancer risk among smokers, tobacco chewers and alcoholics in an Indian population. **European Journal of Cancer**, v. 43, n. 18, p. 2698–2706, 2007.

STANDOP, J. et al. Differences in the expression of xenobiotic-metabolizing enzymes between islets derived from the ventral and dorsal anlage of the pancreas. **Pancreatology**, v. 2, p. 510–518, 2002.

STICKEL, F.; OSTERREICHER, C.H.; DATZ, C.; FERENCI, P.; WOLFEL, M.; NORGAUER, W.; KRAUS, M.R.; WRBA, F.; HELLERBRAND, C.; SCHUPPAN, D. Prediction of progression to cirrhosis by a glutathione S-transferase P1 polymorphism in subjects with hereditary hemochromatosis. **Arch. Intern. Med.** V. 165, p. 1835–1840. 2005.

STRANGE, R. C. et al. Glutathione-S-transferase family of enzymes. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 482, n. 1–2, p. 21–26, 2001.

STRANGE, R.C.; FRYER, A.A. The glutathione S-transferases: influence of polymorphism on cancer susceptibility. **IARC Sci Publ.** v. 148. P. 231–49. 1999.

SURAJ-SINGH, H.; GHOSH, P.K.; SARASWATHY, K.N. DRD2 and ANKK1 gene polymorphism and alcohol dependence: a case-control study among a mendelian population of East Asian ancestry. **Alcohol Alcohol**, v. 4, p. 409–414, 2013.

TANWAR, R. et al. Prevalence of glutathione S-transferase M1 null polymorphism in tobacco users, oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma patients in South Indian population: A polymerase chain reaction study. **Contemp Clin Dent**, v. 6, p. p. 59–64, 2015.

TONCHEVA, D. L. et al. Identification of NQO1 and GSTs genotype frequencies in Bulgarian patients with Balken endemic nephropathy. **J Nephrol**, v.17, p. 384–389, 2004.

TRUE, W. R. et al. Common genetic vulnerability for nicotine and alcohol dependence in men. **Archives of General Psychiatry**, v. 56, p. 655-661, 1999.

UYS, J. D.; MULHOLLAND, P. J.; TOWNSEND, D. M. Glutathione and redox signaling in substance abuse. **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomédecine & pharmacothérapie**, v. 68, n. 6, p. 799–807, 2014.

VASKE, J.; BEAVER, K.M.; WRIGHT, J.P.; BOISVERT, D.; SCHNUPP, R An interaction between DAT1 and having an alcoholics father predicts serious alcohol problems in a sample of males. **Drug and Alcohol Dependence** 104:17-22. 2009.

VASCONCELOS et al. Association Study of the SLC6A3VNTR (DAT) and DRD2/ANKK1Taq1A Polymorphisms with Alcohol Dependence in a Population from Northeastern Brazil. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 39, p. 205–211, 2015.

VERMEULEN-SMIT, E.; KONING, I. M.; VERDURMEN, J. E. E.; VAN DER VORST, H.; ENGELS, R. C. M. E.; VOLLEBERGH, W. A. M. The influence of paternal and maternal drinking patterns within two-partner families on the initiation and development of adolescent drinking. **Addict. Behav**, v. 37, p. 1248–1256, 2012.

VIJAYAKRISHNAN, J.; HOULSTON, R. S. Candidate gene association studies and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia: A systematic review and meta-analysis. **Haematologica**, v. 95, n. 8, p. 1405–1414, 2010.

VOGEL, C. I. G. **Estudo Citogenético e Molecular em uma População de Alcoolistas**. 2007. 74 f. Tese (Doutorado em Genética) Faculdade de Medicina Departamento de Genética, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

WALCZAK, T. A. et al. **Álcool e anestesia**. Serviço de Anestesiologia do Hospital Universitário Cajuru PUCPR, Paraná, 2002.

WARNAKULASURIYA, S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. **Oral Oncol**, v. 45, n. 4–5, p. 309–16, 2008.

WHO [WORLD HEALTH ORGANIZATION]. The CID-10 Classification of Mental and Behavioural Disorders. p. 1–267, 2014.

WIENCKE, J. K., et al. Human glutathione S-transferase deficiency as a marker of susceptibility to epoxide-induced cytogenetic damage. **Cancer**, v.50, p.1585–90, 1990.

WU, D.; CEDERBAUM, A.I. Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. **Alcohol Res Health**, v. 27, p. 277-284, 2003.

XU, K.; THORMALLEY, P. J. **Biochem Pharmacol**, v. 61, p. 165, 2001.

YAO-LI, C. et. al. Glutathione S-Transferase P1 (*GSTP1*) gene polymorphism increases age-related susceptibility to hepatocellular carcinoma. **BMC Medical Genetics**, v.11, p. 46-53, 2010.

ZHANG, Z. J. et al. Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) and glutathione S-transferase T1 (GSTT1) null polymorphisms, smoking, and their interaction in oral cancer: A HuGE review and meta-analysis. **Am J Epidemiol**, v. 173, p. 847–857, 2011.

ZHAO, S.F. et al. GSTM1 null polymorphisms and oral cancer risk: A meta-analysis. **Tumour Biol**, v. 35, p. 287–293, 2014.

ZHONG, Y.; ZOU, R.; CAO, J.; e PENG, M. Glutathione S-transferase M1 and glutathione S-transferase T1 genotype in chronic pancreatitis: A meta-analysis. **Journal of International Medical Research**, v. 43, p. 9–16, 2015.

ZIMA, T. Ethanol metabolism and pathobiochemistry of organ damage-1992. I. Metabolism of ethanol by alcohol dehydrogenase, cytochrome P450IIE1 and catalase, **Sb Lek**, v. 94. 1993.

APÊNDICE I - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

APÊNDICE II - QUESTIONÁRIO APLICADO PARA COLETA DE DADOS

ANEXO I - CARTA DE APROVAÇÃO DESTE TRABALHO PELO COMITÊ DE ÉTICA
EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

ANEXO II – PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE SANGUE
TOTAL

ANEXO II – PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE SANGUE TOTAL

Kit Wizard comercial Promega – 300 µl de sangue total

Soluções e material:

- Kit Wizard de extração DNA
- eppendorf de 1,5 mL
- vórtex
- micropipetador P1000
- isopropanol
- ponteiras P1000 (azul)
- etanol 70%
- descartes para ponteiras (com álcool 70%)
- suporte para eppendorfs
- papel toalha
- microcentrífuga
- tubo vacutainer, seringa e agulha para coleta de sangue

1. Em um eppendorf de 1,5 mL, acrescentar 900 µl de solução de lise celular.
2. Acrescentar o sangue (300 µl). Inverter de 5 a 6 vezes.
3. Incubar por 10 minutos em temperatura ambiente (inverter por 2 a 3 vezes durante a incubação).
4. Centrifugar a 13.000 rpm por 20 segundos à temperatura ambiente.
5. Descartar o sobrenadante (deixar aproximadamente 10 a 20 µl).
6. Vórtex para soltar as células brancas do fundo (10 a 15 segundos).
7. Adicionar solução de lise de núcleo (300 µl) e divulsionar 5 a 6 vezes com micropipeta ou por inversão. A solução deve ficar viscosa. Se ficarem grumos, incubar a 37°C por 1 hora.
8. Adicionar solução de precipitação de proteínas (100 µl) e colocar no vórtex por 10 a 20 segundos. Pequenos grumos de proteínas serão visíveis.
9. Centrifugar a 13.000 rpm por 3 minutos.
10. Transferir o sobrenadante para um tubo limpo contendo 300 µl de isopropanol.
11. Misturar gentilmente por inversão até formar medusa.
12. Centrifugar a 13.000 rpm por 1 minuto à temperatura ambiente.
13. Retirar o sobrenadante (pode inverter).
14. Lavar em etanol 70% (500 µl).
15. Centrifugar a 13.000 rpm por 1 minuto.
16. Retirar o sobrenadante, inverter o tubo em papel absorvente e deixar secar (10-15 minutos).
17. Adicionar a solução de re-hidratação de DNA e incubar a 65°C por uma hora ou em temperatura ambiente (ou 4°C) overnight.
18. Estocar à 2-8°C.