

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

JORGE LUIS SILVEIRA JUNIOR

**NÍVEIS GLOBAIS DE 5-METILCITOSINA (5-mC) NO TRANSTORNO POR USO
DE ÁLCOOL**

Porto Alegre

2019

JORGE LUIS SILVEIRA JUNIOR

**NÍVEIS GLOBAIS DE 5-METILCITOSINA (5-mC) NO TRANSTORNO POR USO
DE ÁLCOOL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas com ênfase em genética na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Claiton Henrique Dotto Bau
Co-orientadoras: Me. Cibele Edom Bandeira e Me. Diana Müller

Porto Alegre

2019

CIP - Catalogação na Publicação

Silveira Junior, Jorge Luis
NÍVEIS GLOBAIS DE 5-METILCITOSINA (5-mC) NO
TRANSTORNO POR USO DE ÁLCOOL / Jorge Luis Silveira
Junior. -- 2019.
22 f.
Orientador: Claiton Henrique Dotto Bau.

Coorientadoras: Cibele Edom Bandeira, Diana Müller.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Biociências, Bacharelado em Ciências Biológicas,
Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Transtorno por Uso de Álcool. 2. Epigenética. 3.
Metilação Global. I. Dotto Bau, Claiton Henrique,
orient. II. Edom Bandeira, Cibele, coorient. III.
Müller, Diana, coorient. IV. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

Começo agradecendo a minha família, a minha mãe Marilena Pacer, as minhas irmãs Patrícia e Marcia, meu gato Benedito e a todos os meus sobrinhos por sempre estarem do meu lado em todas as escolhas que fiz e que independentemente de tudo, sempre me incentivarem a nunca desistir. Amo vocês.

Fiz o vestibular, elaborando uma redação que falava sobre amizade. Dentre lágrimas e sorrisos, pensei que soubesse o que era “amizade”. Mas percebi que tenho muito que aprender sobre o que é “amizade”. Vocês têm me ensinado todos os dias o quão importante é ombro amigo, o abraço apertado, as gargalhadas, o tapa na cara, não sei o que seria de mim sem vocês. Obrigado Kewen, Maria, Luane, Eduardo, Bruna, Bruno, Francielly, Camille e Arthur. Agradeço também ao meu melhor amigo Carlos, por me inspirar e me impulsionar. Por isso e por tudo, te amo.

Finalmente, mas não menos importante, aos meus colegas de laboratório, por todos os ensinamentos compartilhados. A matilha mais feminina de todas, as cientistas mais brilhantes que já conheci: Natasha, Pâmela, Duda, Gabi, Bruna, Djeni, Rê e Jaque e em especial, a Cibele e Diana, as minhas mentoras, as maiores responsáveis por isso tudo ter acontecido. Aos meus colegas, João, Robson e Diego. Ao meu orientador Claiton, pela oportunidade de desenvolver esse trabalho.

ARTIGO CIENTÍFICO

Em preparação para submissão na Revista Brasileira de Biociências.

NÍVEIS GLOBAIS DE 5-METILCITOSINA (5-mC) NO TRANSTORNO POR USO DE ÁLCOOL

Júnior Pacer^{1,2}, Cibele Edom Bandeira^{1,2}, Diana Müller^{1,2}, Natasha Figueira Assis^{1,2}, Bruna Santos da Silva^{1,2}, Felix Henrique Paim Kessler³, Lisia von Diemen³, Eduardo Barbosa⁴, Mariele Feiffer Charão⁴, Eugenio Horácio Grevet², Jaqueline Bohrer Schuch^{2,3}, Diego Luiz Rovaris^{1,2}, Claiton Henrique Dotto Bau^{1,2}.

Título resumido: NÍVEIS GLOBAIS DE 5-METILCITOSINA NO TUA

¹Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil;

²Programa de Déficit de Atenção e Hiperatividade, Divisão de Adultos (PRODAH), Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil;

³Centro de Pesquisa em Álcool e Drogas, Unidade Álvaro Alvim, Hospital de Clínicas, Porto Alegre, RS, Brasil;

⁴Programa de Graduação em Toxicologia e Toxicologia, Universidade Feevale, Novo Hamburgo, RS, Brasil.

Autor correspondente:

Prof. Dr. Claiton H. D. Bau

Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UFRGS

Avenida Bento Gonçalves, 9500 - Porto Alegre, RS, Brazil

CEP: 91501-970

Email: claiton.bau@ufrgs.br

Telefone: +55 (51) 3308-6718; Fax: +55 (51) 3308-7311

RESUMO: NÍVEIS GLOBAIS DE 5-METILCITOSINA (5-mC) NO TRANSTORNO POR USO DE ÁLCOOL

O Transtorno por Uso de Álcool (TUA) é altamente prevalente em todo o mundo, com um impacto crítico sobre questões sociais e de saúde. O TUA tem uma etiologia multifatorial; desta forma, além dos fatores genéticos, fatores ambientais também contribuem na suscetibilidade. Sabe-se que o uso de substâncias pode alterar a expressão gênica através de modificações epigenéticas. A marca epigenética mais estudada é a metilação do DNA a qual já foi associada a vários distúrbios psiquiátricos. Apesar de diversos estudos terem investigado o papel da metilação no TUA, poucos avaliaram sua influência em nível global. O objetivo deste trabalho foi investigar a influência dos níveis globais de 5-metilcitosina (5-mC) no diagnóstico de TUA em homens. Para isso, utilizamos uma amostra composta por 113 homens diagnosticados com TUA (DSM-5) e por 220 controles doadores de sangue com triagem negativa para TUA a partir de Entrevista Clínica Estruturada para Transtornos do DSM-IV, axis I (SCID-I). Os níveis de 5-mC foram avaliados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Tanto idade quanto uso de nicotina se mostraram associadas com o TUA e com maiores níveis de metilação global, sendo então usadas como covariáveis. Verificou-se que pacientes com TUA apresentaram maiores níveis de metilação (média = 3,774; DP = 0,214) do que os indivíduos controles (média = 3,617; DP = 0,254). Essa evidência de hipermetilação global em indivíduos diagnosticados com TUA deve ser confirmada em estudos posteriores com um maior tamanho amostral, mas já se mostra como uma perspectiva promissora no entendimento da fisiopatologia do TUA.

Palavras-chave: Metilação Global, Epigenética, Transtorno por Uso de Álcool.

ABSTRACT: GLOBAL 5-METHYLCYTOSINE (5-mC) LEVELS IN ADULTS WITH ALCOHOL USE DISORDER

Alcohol Use Disorder (AUD) is highly prevalent worldwide, with a critical impact on health and social issues. AUD has a multifactorial etiology; Thus, in addition to genetic factors, environmental factors also contribute to susceptibility. Substance use is known to alter gene expression through epigenetic modifications. The most studied epigenetic mark is DNA methylation, which has been associated with various psychiatric disorders. Although several studies have investigated the role of methylation in AUD, few have evaluated its influence globally. This study aimed to investigate the influence of global 5-methylcytosine (5-mC) levels on the diagnosis of AUD in men. For this, we used a sample of 113 men diagnosed with AUD (DSM-5) and 220 TUA negative screening blood donor controls from the Structured Clinical Interview for DSM-IV, Axis I (SCID-I). 5-mC levels were assessed by High-Performance Liquid Chromatography. Both age and nicotine use were associated with AUD and with higher levels of global methylation and were then used as covariates. It was found that patients with TUA had higher levels of methylation (mean = 3.774; SD = 0.214) than control subjects (mean = 3.617; SD = 0.254). This evidence of global hypermethylation in individuals diagnosed with AUD should be confirmed in later studies with larger sample size, but it is already shown as a promising perspective in understanding the pathophysiology of AUD.

Keywords: Global Methylation, Epigenetics, Alcohol Use Disorder.

INTRODUÇÃO

O Transtorno por Uso de Álcool (TUA) tem alta prevalência no mundo todo e está relacionado a uma série de prejuízos em diferentes áreas da vida do indivíduo, resultando em um elevado custo pessoal e social. Nos Estados Unidos, estima-se que sua prevalência seja de 8,5% em adultos, com taxas maiores entre homens (12,4%) do que entre mulheres (4,9%) (Apa 2013). Em 2016, mais de 3 milhões de mortes por ano resultaram do uso nocivo do álcool, representando quase 5,3% de todas as mortes no mundo, sendo responsável por um significativo ônus global por doenças atribuídas ao álcool (Who 2018). O TUA se caracteriza por um agrupamento de sintomas físicos e comportamentais que incluem abstinência, fissura e tolerância ao álcool (Apa 2013).

Para fins de diagnóstico, mede-se a gravidade do transtorno a partir da quantidade de critérios preenchidos em uma avaliação psiquiátrica seguindo o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5, Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, em inglês) (Apa 2013). Para que indivíduos preencham os critérios diagnósticos, é necessário que apresentem ao menos 2 dentre 11 sintomas, e que os mesmos persistam por no mínimo 12 meses. O nível de gravidade é medido de acordo com a quantidade de sintomas pontuados. O TUA, assim como outros transtornos psiquiátricos, apresenta etiologia multifatorial. Então, por definição, está sob influência de vários genes, além de uma complexa interação destes fatores com uma série de influências ambientais. Sendo assim, qualquer tentativa no sentido de pesquisar por um agente etiológico único para o TUA deve ser considerada precipitada (Bau 2005).

A herdabilidade do TUA é estimada em cerca de 50-60% (Zhang et al. 2013). Os estudos genéticos conduzidos até o momento foram capazes de explicar apenas uma pequena parte da variabilidade observada, devido em parte, ao fato das variantes genéticas associadas apresentarem um tamanho de efeito pequeno (Deak, Miller & Gizer 2019; Zhang & Gelernter

2017). A partir de estudos de GWAS, pode-se captar parte da variância genética aditiva, com herdabilidade molecular estimada em 5.6% (Kranzler et al. 2019). Curiosamente, homens e mulheres parecem apresentar bases genéticas diferentes, enquanto para homens a herdabilidade molecular foi de 5.4%, para mulheres foi de 11%. (Kranzler et al. 2019).

Uma vez que estudos de fatores genéticos ou ambientais apresentam-se pouco explicativos de forma isolada, metodologias capazes de capturar o efeito combinado dos fatores ambientais sobre o arcabouço genético do indivíduo podem auxiliar no melhor entendimento de mecanismos biológicos do TUA. A partir dessa perspectiva, a avaliação de mecanismos epigenéticos se faz promissora.

A epigenética compreende modificações herdáveis sem alteração na sequência nucleotídica. Essas modificações são potencialmente reversíveis, alterando o nível de expressão gênica em resposta à estímulos ambientais (Rivas, Teixeira, & Krepschi 2019). Existem três principais categorias de regulação epigenética: metilação do DNA, modificações de histonas e modificações de RNAs não codificantes (Hamza et al. 2019; Portela & Esteller 2010). Dentre estes, a metilação do DNA é o mecanismo mais explorado e tem apresentado diversos achados que corroboram o entendimento de seu papel na manifestação e desenvolvimento de patologias complexas como o câncer (Klutstein et al. 2016; Wajed, Laird & Demeester 2001) e de diversos transtornos psiquiátricos como, por exemplo, a esquizofrenia, a depressão, transtorno bipolar e o próprio TUA (Shimabukuro et al. 2007; Hamza et al. 2019; Teroganova et al. 2016; Zhang & Gelernter 2017).

A metilação do DNA envolve a adição de um grupo metil (CH₃) em resíduos de citosina, geralmente no contexto em que uma citosina (C) é seguida por uma guanina (G) (Stuffrein-Roberts, Joyce & Kennedy 2008). Cerca de 60-80% de todas as ilhas CpGs do genoma humano se encontram metiladas (Hamza et al. 2019), sendo que as que não se

encontram metiladas se situam principalmente em regiões promotoras de genes ativamente transcritos (Stuffrein-Roberts, Joyce & Kennedy 2008). Assim, a hipermetilação em regiões promotoras geralmente resulta na condensação da cromatina, silenciando os genes, enquanto que a hipometilação promove uma maior disponibilidade do DNA aos seus fatores de transcrição e conseqüente aumento na taxa de transcrição daquele gene (Portela & Esteller 2010). Porém, a metilação também já foi associada com maior expressão gênica quando ocorre no corpo gênico (Ball et al. 2009; Yang et al. 2014).

Diversos estudos envolvendo transtornos psiquiátricos têm avaliado os níveis globais de citosina metilada, chamada de 5-metilcitosina (5-mC), em indivíduos portadores de esquizofrenia, depressão entre outros (Shimabukuro et al. 2007; Hamza et al. 2019; Teroganova et al. 2016). Em um estudo conduzido por Tseng e colaboradores (2014) com indivíduos diagnosticados com Transtorno Depressivo Maior, examinou-se os níveis de 5-mC em pacientes em diferentes estados da doença. Verificou-se que os pacientes com gravidade alta apresentavam níveis de metilação menores em comparação a indivíduos controle. Além disso, constataram que os níveis de 5-mC se correlacionaram inversamente com a gravidade do transtorno. Um estudo de Shimabukuro e colaboradores (2007) comparou pacientes esquizofrênicos em relação a um grupo controle, e relatou menores níveis de 5-mC em indivíduos esquizofrênicos. Outro estudo (Bönsch et al. 2012) comparou gêmeos discordantes (com esquizofrenia ou sem), gêmeos concordantes (ambos com esquizofrenia), controles psiquiátricos (com outros transtornos) e controles saudáveis (com nenhum transtorno). O grupo de gêmeos concordantes apresentou os menores níveis de metilação global, quando comparado aos demais grupos.

Tratando-se especificamente dos níveis globais de metilação do DNA em indivíduos diagnosticados com TUA, também podemos destacar evidências de alterações nos níveis de

metilação quando comparados a indivíduos que não apresentam o transtorno. Em uma análise de sangue periférico, os pacientes com TUA, demonstraram estarem hipermetilados em relação aos controles (Bönsch et al. 2004; Kim et al. 2016). Em células tronco isoladas de cérebros de camundongos, uma única administração de etanol durante o início do desenvolvimento do sistema nervoso central não foi capaz de alterar os níveis de 5-mC, enquanto que uma exposição crônica aumentou seus níveis significativamente (Liyanage et al. 2015). Também há achados demonstrando que pacientes com hepatite alcoólica apresentam hipermetilação em células do fígado em relação a controles (Shen et al. 2015).

A partir dos dados encontrados até o momento, é possível observar que, apesar de poucos, os estudos que avaliaram a dosagem dos níveis de 5-mC demonstraram uma tendência à hipometilação em transtornos psiquiátricos como o Transtorno Depressivo Maior e Esquizofrenia, enquanto que em transtornos por uso de substâncias como álcool, parecem apontar para uma hipermetilação (Bönsch et al. 2004; Kim et al. 2016). O objetivo do presente estudo foi avaliar os níveis de 5-mC em homens com TUA.

MATERIAIS E MÉTODOS

Caracterização da amostra

A amostra de casos compreendeu um total de 113 homens provenientes do Centro de Pesquisa em Álcool e Drogas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CPAD - HCPA), diagnosticados com TUA de acordo com os critérios estabelecidos pelo DSM-5 (Apa 2013). A amostra de controles compreendeu 220 homens acessados no Banco de Sangue do mesmo hospital (HCPA), com triagem negativa para TUA através de uma versão adaptada da Entrevista Clínica Estruturada para Transtornos do DSM-IV, axis I (SCID-I). Ambas as amostras englobam diferentes etnias.

Tanto em casos quanto em controles, os critérios de exclusão foram a presença de doenças neurodegenerativas e/ou patologias neurológicas graves que possam afetar o processo cognitivo. Todos os indivíduos assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, aprovado pelo Comitê de Ética das instituições envolvidas.

Protocolo de tratamento para quantificação de níveis globais de 5-mC

O DNA de cada indivíduo foi extraído de sangue periférico a partir da técnica de precipitação por alta concentração de sal, também conhecida como *salting-out* (Lahiri & Nurnberger 1991). O produto da extração foi quantificado quanto aos níveis de concentração de DNA, além de se verificar os parâmetros de qualidade das amostras utilizando o equipamento de espectrofotômetro NanoDrop™. Então, 2 microgramas de DNA foram aliquotados em 200 microlitros de água para injeção.

As alíquotas foram tratadas para a dosagem dos níveis globais de 5-mC seguindo adaptações do protocolo de tratamento dos trabalhos de Ramsahoye (2002) e Rozhon et. al. (2008). As alterações se deram com a finalidade de obter um maior aproveitamento de tempo em laboratório e do material genético, bem como viabilizar o tratamento de mais amostras. Brevemente, o procedimento consiste da remoção enzimática do RNA, seguida da hidrólise do DNA e análise das quantidades dos diferentes nucleotídeos pelo método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência a 280 nm. Os níveis de 5-mC foram obtidos pela seguinte fórmula: $5\text{-mC}/(C + 5\text{-mC}) \times 100$. Mais detalhes das adaptações realizadas podem ser obtidas no trabalho de Barbosa e colaboradores (Barbosa et al. 2019).

Análises estatísticas

Todas as análises foram realizadas no software SPSS versão v.18 (Chicago, IL, USA). Foi testado se havia diferença nas frequências étnicas entre os casos e controles por ANOVA. Regressões logísticas binárias foram realizadas para testar possíveis covariáveis. As análises

de caso-controle foram realizadas por regressão linear. A idade e o uso de nicotina foram incluídos como covariáveis, uma vez que foram implicados com o desfecho (TUA) e com os níveis globais de 5-mC ($p < 0,2$).

RESULTADOS

Na Tabela 1 são apresentados os dados demográficos da amostra. Quanto à idade, os indivíduos com TUA foram significativamente mais velhos do que controles ($p < 0,001$). Ainda na Tabela 1, é possível observar uma maior frequência do uso de nicotina em casos do que em controles (81,4% vs. 20,9%) ($p = 0,004$).

Antes de realizar a análise de comparação dos níveis globais de 5-mC entre casos e controles testamos se os níveis de metilação diferiam por etnia. As médias não diferiram entre os grupos étnicos ($p = 0,999$ nos casos; $p = 0,596$ nos controles) (Tabela 2).

O resultado da análise caso-controle está apresentado na tabela 3, onde indivíduos com TUA apresentaram níveis mais elevados de metilação global (média = 3,774; DP = 0,214) em relação a controles (média = 3,617; DP = 0,254; $p < 0,001$).

DISCUSSÃO

O presente trabalho foi um dos primeiros a avaliar uma possível diferença nos níveis globais de 5-mC no fenótipo de TUA. Em uma amostra da região da Grande Porto Alegre, composta por diferentes etnias, foi encontrada evidência de hipermetilação global em indivíduos diagnosticados com TUA com relação a indivíduos controles.

Apesar de a literatura sugerir que possa haver diferenças de metilação global em função do grupo étnico, tal achado não foi replicado neste estudo. Evidência de hipometilação em indivíduos negros foi obtida em uma amostra populacional norte-americana de indivíduos não-hispânicos brancos e não-hispânicos negros (Zhang et al. 2011). Outro estudo detectou níveis menores de 5-mC em afro-americanos comparados a

caucasianos (Zhu et al. 2016). Entretanto, também há relatos de uma tendência oposta. Por exemplo, dentro de uma amostra controle para câncer o grupo de não caucasianos estava hipermetilado em comparação aos indivíduos caucasianos (Ting Hsiung et al. 2007). Assim, mesmo havendo relatos que apoiem a existência de efeito da etnia sobre os níveis de metilação do DNA, este ainda não foi bem estabelecido, podendo inclusive não existir. Além disso, sabendo-se que em função da miscigenação há um predomínio de contribuição europeia na população afro-descendente da região estudada (Zembrzusi, Callegari-Jacques & Hutz 2006), pode ter ocorrido uma diminuição nas possíveis diferenças na metilação global entre os grupos.

No presente estudo foi observada uma maior prevalência de tabagismo em indivíduos com TUA. Um estudo recente estimou uma prevalência duas vezes maior do tabagismo em indivíduos com o TUA em relação a controles (Weinberger, Gbedemah & Goodwin 2017). Além disso, também foi demonstrado que o consumo de álcool e o tabagismo em pacientes com TUA apresentam correlação positiva quanto ao aumento dos níveis globais de metilação do DNA (Semmler et al. 2015). Porém, dados preliminares do nosso grupo sugerem que o tabagismo não influencia a metilação global avaliada com a metodologia aqui utilizada (Müller et al. comunicação pessoal). Infelizmente na amostra do presente estudo não é possível avaliar o efeito isolado do alcoolismo ou do tabagismo, já que a vasta maioria dos casos são tabagistas e dos controles são não tabagistas.

Quanto à análise caso-controle, indivíduos com TUA apresentaram níveis maiores de 5-mC. Dois outros estudos avaliaram metilação global em TUA e também relataram hipermetilação em casos (Bönsch et al. 2004; Kim et al. 2016). Um estudo mostrou que o aumento da metilação em pacientes alcoolistas pode estar relacionado ao nível elevado de homocisteína em função do consumo de álcool (Bönsch et al. 2004). Porém, outros trabalhos relacionaram níveis aumentados de homocisteína com hipometilação (Kruman & Fowler

2014; Murillo-Fuentes et al. 2005). Uma possível explicação para tal divergência foi sugerida no trabalho de Kim e colaboradores (2016), que relacionaram uma resposta diferencial à homocisteína aumentada em função do consumo de álcool por indivíduos saudáveis e indivíduos com TUA. Sabendo que a metabolização da homocisteína pode resultar tanto em metionina (que disponibiliza grupo metila para a metilação) quanto em cistationina (participando em outros processos) (Bleich & Hillemacher 2009), indivíduos com e sem TUA podem diferir quanto à via metabólica de destino principal da homocisteína.

Como em todo estudo de associação, é difícil estabelecer relações de causa e consequência. Nesse sentido, a hipermetilação poderia já estar presente antes do desenvolvimento do TUA, ou por outro lado ser uma consequência da exposição ao álcool durante muitos anos. Tal dúvida teria implicações importantes também no entendimento da fisiopatologia da Síndrome Alcoólica Fetal, já que o álcool é um dos principais teratógenos humanos e os poucos dados atualmente disponíveis sobre metilação global nesse fenótipo são conflitantes (Portales-Casamar et al. 2016).

Como conclusão, o presente estudo demonstrou um aumento da metilação em pacientes com TUA, reforçando a importância de se estudar os mecanismos envolvidos na manifestação de transtornos psiquiátricos complexos, como a metilação. Ainda, no âmbito genético-psiquiátrico há carência de estudos que contribuam para a compreensão da heterogeneidade de diversos transtornos. Nesse sentido, os resultados aqui apresentados podem contribuir para o delineamento de futuros estudos.

AGRADECIMENTOS

Quanto ao fomento para o desenvolvimento desta pesquisa, gostaria de agradecer as instituições que tornaram este estudo possível, como a Pró-Reitoria de Pesquisa da UFRGS (PROPESQ), o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

REFERÊNCIAS

- APA. 2013. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. 5^a ed. ed. [s.l.] American Psychiatric Association, Arlington, VA.
- BALL, M. P., LI, J. B., GAO, Y., LEE, J., LEPROUST, E. M., PARK, I., XIE, B., DALEY, G. Q. & CHURCH, G. M. 2009. Targeted and genome-scale strategies reveal gene-body methylation signatures in human cells. *Nature Biotechnology*, v. 27, n. 4, p. 361–368.
- BARBOSA, E., SANTOS, A. L. A., PETEFFI, G. P., SCHNEIDER, A., MÜLLER, D., ROVARIS, D., BAU, C. H. D., LINDEN, R., ANTUNES, M. V., CHARÃO, M. F. 2019. Increase of global DNA methylation patterns in beauty salon workers exposed to low levels of formaldehyde. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 26, n. 2, p. 1304–1314.
- BAU, C. H. D. 2005. Estado atual e perspectivas da genética e epidemiologia do alcoolismo. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 7, n. 1, p. 183–190.
- BLEICH, S. & HILLEMACHER, T. 2009. Homocysteine, Alcoholism and its Molecular Networks. *Pharmacopsychiatry*, v. 42, n. S 01, p. S102–S109.
- BÖNSCH, D., LENZ, B., REULBACH, U., KORNHUBER, J. & BLEICH, S. 2004. Homocysteine associated genomic DNA hypermethylation in patients with chronic alcoholism. *Journal of Neural Transmission*, v. 111, n. 12, p. 1611–1616.
- BÖNSCH, D., WUNSCH, M., LENZ, B., JANSSEN, G., WEISBROD, M. & SAUER, H. 2012. Methylation matters? Decreased methylation status of genomic DNA in the blood of schizophrenic twins. *Psychiatry Research*, v. 198, n. 3, p. 533–537.
- DEAK, J. D.; MILLER, A. P. & GIZER, I. R. 2019. Genetics of alcohol use disorder: a review. *Current Opinion in Psychology*, v. 27, p. 56–61.

SHIMABUKURO, M., SASAKI, T., IMAMURA, A., TSUJITA, T., FUKE, C., UMEKAGE, T., TOCHIGI, M., HIRAMATSU, K., MIYAZAKI, T., ODA, T., SUGIMOTO, J., JINNO, Y. & OKAZAKI, Y. 2007. Global hypomethylation of peripheral leukocyte DNA in male patients with schizophrenia : A potential link between epigenetics and schizophrenia. *Journal of Psychiatric Research*, v. 41, p. 1042–1046.

GARRO, A. J., MCBETH, D. L., LIMA, V. & LIEBER, C. S. 1991. Ethanol Consumption Inhibits Fetal DNA Methylation in Mice: Implications for the Fetal Alcohol Syndrome. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, v. 15, n. 3, p. 395–398.

HAMZA, M., HALAYEM, S., BOURGOU, S., DAOUL, M., CHARFI, F. & BELHADJ, A. 2019. Epigenetics and ADHD: Toward an Integrative Approach of the Disorder Pathogenesis. *Journal of Attention Disorders*, v. 23, n. 7, p. 655–664.

KIM, D. S., KIM, Y. H., LEE, W. K., NA, Y. K. & HONG, H. S. 2016. Effect of alcohol consumption on peripheral blood Alu methylation in Korean men. *Biomarkers*, v. 21, n. 3, p. 243–248.

KLUTSTEIN, M., NEJMAN, D., GREENFIELD, R. & CEDAR, H. 2016. DNA methylation in cancer and aging. *Cancer Research*, v. 76, n. 12, p. 3446–3450.

KRANZLER, H. R., ZHOU, H., KEMBER, R. L., SMITH, R. V., JUSTICE, A. C., DAMRAUER, S., TSAO, P. S., KLARIN, D., BARAS, A., REID, J., OVERTON, J., RADER, D. J., CHENG, Z., TATE, J. P., BECKER, W.C., CONCATO, J., XU, K., POLIMANTI, R., ZHAO, H. & GELERNTER, J. 2019. Genome-wide association study of alcohol consumption and use disorder in 274,424 individuals from multiple populations. *Nature Communications*, v. 10, n. 1, p. 1–11.

KRUMAN, I. I. & FOWLER, A. K. 2014. Impaired one carbon metabolism and DNA methylation in alcohol toxicity. *Journal of Neurochemistry*, v. 129, n. 5, p. 770–780.

LAHIRI, D. & NURNBERGER, J. 1991. A rapid-non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies 1358. *Nucleic Acids Research*, v. 19, n. 19, p. 5444.

LIYANAGE, V. R. B., ZACHARIAH, R. M., DAVIE, J. R. & RASTEGAR, M. 2015. Ethanol deregulates Mecp2/MeCP2 in differentiating neural stem cells via interplay between 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine at the Mecp2 regulatory elements. *Experimental Neurology*, v. 265, p. 102–117.

MURILLO-FUENTES, M. L., ARTILLO, R., UBEDA, N., VARELA-MOREIRAS, G., MURILLO, M. & CARRERAS, O. 2005. Hepatic S-adenosylmethionine after maternal alcohol exposure on offspring rats. *Addiction Biology*, v. 10, n. 2, p. 139–144.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Global status report on alcohol and health 2018*. Geneva.

PAUWELS, S., DUCA, R. C., DEVLIEGER, R., FRESON, K., STRAETMANS, D., HERCK, E. V., HUYBRECHTS, I., KOPPEN, G. & GODDERIS, L. 2016. Maternal methyl-group donor intake and global DNA (Hydroxy) methylation before and during pregnancy. *Nutrients*, v. 8, n. 8.

PORTALES-CASAMAR, E., LUSSIER, A., JONES, M., MACLSAAC, J., EDGAR, R., MAH, S., BARHDADI, A., PROVOST, S., LEMIEUX-PERREAULT, L., CYNADER, M., REYNOLDS, J., PAVLIDIS, P. & KOBOR, M. 2016. DNA methylation signature of human fetal alcohol spectrum disorder. *Epigenetics & Chromatin*, v. 9, n. 1, p. 25.

PORTELA, A. & ESTELLER, M. 2010. Epigenetic modifications and human disease. *Nature Biotechnology*, v. 28, n. 10, p. 1057–1068.

RAMSAHOYE, B. H. 2002. Measurement of genome wide DNA methylation by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Methods*, v. 27, n. 2, p. 156–161.

RESENDIZ, M., MASON, S., LO, C. & ZHOU, F. C. 2014. Epigenetic regulation of the neural transcriptome and alcohol interference during development. *Frontiers in Genetics*, v. 5, n. AUG, p. 1–15.

RIVAS, M. P., TEIXEIRA, A. C. B. & KREPISCHI, A. C. V. 2019. Epigenética : conceito, mecanismos e impacto em doenças humanas. v. 14.

ROZHON, W., BAUBEC, T., MAYERHOFER, J., SCHEID, O. M. & JONAK, C. 2008. Rapid quantification of global DNA methylation by isocratic cation exchange high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*, v. 375, n. 2, p. 354–360.

SEMMLER, A., HEESE, P., STOFFEL-WAGNER, B., MUSCHLER, M., HEBERLEIN, A., BIGLER, L., PROST, J., FRIELING, H., KORNHUBER, J., BANGER, M., BLEICH, S., HILLEMACHER, T. & LINNEBANK, M. 2015. Alcohol abuse and cigarette smoking are associated with global DNA hypermethylation: Results from the German Investigation on Neurobiology in Alcoholism (GINA). *Alcohol*, v. 49, n. 2, p. 97–101.

SHEN, H., FRENCH, B. A., TILLMAN, B. C., LI, J. & FRENCH, S. W. 2015. Increased DNA methylation in the livers of patients with alcoholic hepatitis. *Experimental and Molecular Pathology*, v. 99, n. 2, p. 326–329.

STUFFREIN-ROBERTS, S., JOYCE, P. R. & KENNEDY, M. A. 2008. Role of epigenetics in mental disorders. *Australian and New Zealand Journal*, n. 787618296.

TEROGANOVA, N., GIRSHKIN, L., SUTER, C. M. & GREEN, M. J. 2016. DNA methylation in peripheral tissue of schizophrenia and bipolar disorder: A systematic review. *BMC Genetics*, v. 17, n. 1.

TING HSIUNG, D., HOUSEMAN, E., EDDY, K., FURNISS, C., McCLEAN, M. & KELSEY, K. 2007. Global DNA Methylation Level in Whole Blood as a Biomarker in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, v. 16, n. 1, p. 108–114.

TSENG, P. T., LIN, P., HUNG, C., LUNG, F., CHEN, C. & CHONG, M. 2014. Age-associated decrease in global DNA methylation in patients with major depression. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, v. 10, p. 2105–2114.

WAJED, S. A., LAIRD, P. W. & DEMEESTER, T. R. 2001. DNA methylation: An alternative pathway to cancer. *Annals of Surgery*, v. 234, n. 1, p. 10–20.

WEINBERGER, A. H., GBEDEMAH, M. & GOODWIN, R. D. 2017. Cigarette smoking quit rates among adults with and without alcohol use disorders and heavy alcohol use, 2002–2015: A representative sample of the United States population. *Drug and Alcohol Dependence*, v. 180, p. 204–207.

YANG, X., HAN, H., DECARVALHO, D., LAY, F., JONES, P. & LIANG, G. 2014. Gene Body Methylation Can Alter Gene Expression and Is a Therapeutic Target in Cancer. *Cancer Cell*, v. 26, n. 4, p. 577–590.

ZEMBRZUSKI, V. M., CALLEGARI-JACQUES, S. M. & HUTZ, M. H. 2006. Application of an African Ancestry Index as a Genomic Control Approach in a Brazilian Population. *Annals of Human Genetics*, v. 70, n. 6, p. 822–828.

ZHANG, F. F., CARDARELLI, R., CARROLL, J., FULDA, K. G., KAUR, M., GONZALEZ, K., VISHWANATHA, J. K., SANTELLA, R. M. & MORABIA, A. 2011. Significant differences in global genomic DNA methylation by gender and race/ethnicity in peripheral blood. *Epigenetics*, v. 6, n. 5, p. 623–629.

ZHANG, H., HERMAN, A. I., KRANZLER, H. R., ANTON, R. F., ZHAO, H., ZHENG, W. & GELERNTER, J. 2013. Array-Based Profiling of DNA Methylation Changes Associated with Alcohol Dependence. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, v. 37, p. E108–E115.

ZHANG, H. & GELERNTER, J. 2017. Review: DNA methylation and alcohol use disorders: Progress and challenges. *The American Journal on Addictions*, v. 26, n. 5, p. 502–515.

ZHOU, F. C., CHEN, Y. & LOVE, A. 2011. Cellular DNA methylation program during neurulation and its alteration by alcohol exposure. *Birth Defects Research Part A – Clinical and Molecular Teratology*, v. 91, n. 8, p. 703–715.

ZHU, H., BHAGATWALA, J., HUANG, Y., POLLOCK, N. K., PARIKH, S., RAED, A., GUTIN, B., HARSHFIELD, G. A. & DONG, Y. 2016. Race/Ethnicity-Specific Association of Vitamin D and Global DNA Methylation: Cross-Sectional and Interventional Findings. *PLOS ONE*, v. 11, n. 4, p. e0152849.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Tabela 1. Descrição demográfica da amostra.

	Casos (n=113)	Controles (n=220)	Valor-p
Idade - média (DP)	50,06 (10,11)	35,95 (11,43)	<0,001
Etnia (%)	Branços (61,9%)	Branços (69,5%)	0,247
	Negros (15,9%)	Negros (15,4%)	
	Pardos (22,1%)	Pardos (15%)	
Uso de nicotina (%)	92 (81,4%)	46 (20,9%)	<0,001

Tabela 2. Análise dos níveis de 5-mC entre os diferentes grupos étnicos.

Etnia	5-mC global - média (DP)	Valor-p
Casos		
Branco	3,773 (0,205)	0,999
Negro	3,776 (0,288)	
Pardo	3,772 (0,181)	
Total	3,773 (0,213)	
Controles		
Branco	3,622 (0,260)	0,596
Negro	3,631 (0,219)	
Pardo	3,576 (0,257)	
Total	3,617 (0,253)	

Tabela 3. Comparação dos níveis globais de 5-mC entre indivíduos casos e controles.

	N	5-mC global - média (DP)	Beta	Valor-p
Casos	113	3,774 (0,214)	2,769	<0,001
Controles	220	3,617 (0,254)		

A idade e o uso de nicotina foram usados como covariáveis para a análise caso-controle.