



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

RAQUEL MÁGDA LIMA ARAUJO

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO DE DUPLICAÇÃO DE
120 pb NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE DO RECEPTOR D4 DE
DOPAMINA (*DRD4*) E A DEPENDÊNCIA DO ÁLCOOL EM UMA POPULAÇÃO
DO NORDESTE DO BRASIL**

PARNAÍBA - PI
MARÇO – 2017

RAQUEL MÁGDA LIMA ARAUJO

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO DE DUPLICAÇÃO DE
120 pb NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE DO RECEPTOR D4 DE
DOPAMINA (*DRD4*) E A DEPENDÊNCIA DO ÁLCOOL EM UMA POPULAÇÃO
DO NORDESTE DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBIOTEC) da Universidade Federal do Piauí (UFPI), *Campus* Ministro Reis Velloso, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biologia Molecular

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Renata Canalle

PARNAÍBA - PI
MARÇO – 2017

RAQUEL MÁGDA LIMA ARAUJO

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO DE DUPLICAÇÃO DE
120 pb NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE DO RECEPTOR D4 DE
DOPAMINA (*DRD4*) E A DEPENDÊNCIA DO ÁLCOOL EM UMA POPULAÇÃO
DO NORDESTE DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBIOTEC) da Universidade Federal do Piauí (UFPI), *Campus* Ministro Reis Velloso, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

APROVADA EM 29/03/2017

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Renata Canalle
Departamento de Biomedicina
Universidade Federal do Piauí - UFPI
PRESIDENTE

Prof^a. Dra. Anna Carolina Toledo da Cunha Pereira
Departamento de Biomedicina
Universidade Federal do Piauí – UFPI
MEMBRO

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

PARNAÍBA - PI
MARÇO – 2017

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial Prof. Cândido Athayde – Campus Parnaíba
Serviço de Processamento Técnico

A663e Araujo, Raquel Máгда Lima.

Estudo de associação entre o polimorfismo de duplicação de 120 pb na região promotora do gene do receptor D4 de dopamina (DRD4) e a dependência do álcool em uma população do nordeste brasileiro [manuscrito] / Raquel Máгда Lima Araujo. – 2017.

74 f. : il. color.

Impresso por computador (printout).

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Piauí, 2017.

Orientação: Prof^a. Dr^a. Renata Canalle.

Área de Concentração: Biologia Molecular.

1. Biotecnologia. 2. Variações Genéticas. 3. Sistema Dopaminérgico. 4. Alcoolismo. I. Título.

CDD: 572.8

EPÍGRAFE

Mas quem beber da água que eu lher nunca mais terá sede. Pelo contrário, a água que eu lher se tornará nele uma fonte de água a jorrar para a vida eterna".

João 4:14

DEDICATÓRIA

Dedico a Deus e minha família, Pedro Domingos de Araújo, M^a Elizabeth Lima Freitas Araújo, Natanael Régis Lima Araújo, F^{co} Ezequiel Lima Araújo e Diêgo Passos Aragão.

AGRADECIMENTOS

À Deus por toda honra e toda glória, pois sem minha fé em ti eu nada seria;
Ao Divino Espírito Santo por toda expiração, concentração e calma me concedida;

A minha orientadora, **Prof^a. Dr^a. Renata Canalle**, por todo o ensinamento, apoio, enriquecimento científico, crítico e profissional, paciência e dedicação nas orientações. Exemplo de profissional dedicada, competente e responsável. Agradeço infinitamente tudo o que me ensinastes;

Ao **Prof^o. Dr. Fábio Motta**, por toda sua orientação, me ensinando os fundamentos e técnicas do laboratório, pelas enriquecedoras sugestões, correções realizadas no meu projeto e por ter feito parte da minha banca de qualificação e nesta defesa. Muito Obrigada!

A **Prof^a. Dr^a. Anna Carolina**, pelas valiosas sugestões e correções realizadas no meu projeto de qualificação, e novamente, por ter aceitado o convite de fazer parte da banca examinadora desta defesa. Lhe agradeço muito por isso;

A professora **Dr^a. Keiko** e professor **Dr. Giovanni** por ceder algumas amostras para execução deste estudo.

Ao **Programa de mestrado em Biotecnologia** e **todos os Professores** deste, pelo enriquecimento científico, crítico e profissional que irei levar por toda vida.

Aos amigos e colegas de laboratório, **Loi, Francisco, Jéssica, Tâmisa, Anderson, Yhasmine, Hoanna, Valéria, Karla, Maria Sarah e Cristina** pela ajuda e disposição de tirarem dúvidas e por todo acolhimento prestado.

Aos técnicos administrativos **Hianny** e especialmente ao **Hygor Fernandes** (pai de todos no laboratório) por toda a ajuda e dedicação nos seus ensinamentos e confiança. Tenho muito o que te agradecer Hygor!

A minha amiga de Laboratório, de casa e de rua Sarah Lemos por toda a ajuda e ensinamentos nas análises estatísticas e no laboratório.

Aos **amigos** e **colegas** de turma pela amizade e enriquecimento profissional durante todo o curso.

Ao **GBMOL/UFPI**, laboratório onde realizei todos os meus experimentos e permitiu a realização desta pesquisa.

Ao **Conselho de Apoio à Pesquisa (CAPES)** e **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Piauí (FAPEPI)** pelo apoio financeiro que gerou esse trabalho e minha bolsa durante todo o mestrado.

A minha mamãe querida **Elizabeth** por todo o apoio, carinho, dedicação, amor que me concedestes durante toda a minha vida. Por cada oração que fizestes em meu nome (olha que não foram poucas rsrs). Por ter me ensinado a crê em Deus e seu filho Jesus Cristo a cima de tudo e de todos. Por me alegrar todas as noites com suas gaitadas altas e sua voz calma e feliz sempre cheia de vida. Por me mostrar que se vence uma batalha e as tristezas da vida com um sorriso no rosto e rindo dos acontecimentos. E por todas as frases: “Você consegue Raquel”; “Vai dar tudo certo”; “Você é mais que capaz”; “Minha boneca bonita” e “Te amo minha linda”. Enfim, por tudo!

Ao meu grande herói **Pedro**, por ser meu maior exemplo de honestidade, de companheiro, de filho, de trabalhador e principalmente de pai. Obrigada pai por toda preocupação, amor, carinho e dedicação perante a nossa família. Por todo o apoio que deste para minha formação profissional e principalmente moral.

Ao meu irmão **Ezequiel** por ter sempre acreditado no meu potencial e me ensinado a enxergar isso. Meu psicólogo e arquiteto (para mim sempre será). Por toda a alegria a me proporcionada, com suas interpretações exageradas. Por todo companheirismo ao longo da nossa vida acadêmica. Por todo amor e dengos que me concedestes. Por todos os ensinamentos sobre constelações, apesar de no dia seguinte não lembrar mais de nada. Agradeço por ceder gentilmente as figuras 2 e 3 apresentadas nesta dissertação. Por tudo meu irmão!

Ao meu irmão **Natanael**, por ter nos dado a maior riqueza da “Titiamadrinha”. Por todo amor, preocupação, abraços apertados e beijos no rosto roubados. Por ser essa pessoa que apesar das brutalidades é um ser frágil e bondoso. Pelos risos frouxos que me fizestes dar com suas piadas e brincadeiras. Por ter sido a pessoa culpada por mais fazer a nossa família rir. Pela pessoa que se tornastes e que por mais que suas demonstrações de amor sejam um pouco peculiares, sei o quanto me amas.

Ao meu precioso sobrinho e afilhado **Luiz Miguel**, por toda a alegria que proporcionasse a minha família, desde do dia que foi gerado. Te amo, muito meu príncipe!

Ao meu amor e companheiro de todas as horas, **Diêgo Aragão**, por todas as horas acordado ao meu lado enquanto eu escrevia este trabalho. Por todo amor que me deste a cada dia nesses 3 anos e 10 meses de namoro e que dure o tempo que Deus permitir. Você foi peça fundamental nessa minha vitória, sempre do meu lado e me acalmando quando eu pensava que não iria conseguir. Te amo meu branquelo/preto!

As minhas cunhadinhas e amigas **Suzy** e **Aline** por toda amizade.

A minha afilhada **Karine**, por todo carinho e amor.

As minhas **Tias Benedita** e **Do Carmo**, por sempre terem acreditado no meu potencial e por todo amor eterno que me concederam (in memoriam).

Enfim, a todos meus amigos e aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste meu sonho.

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
LISTA DE TABELAS	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
1. INTRODUÇÃO	15
2. REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1. CONSIDERAÇÕES A RESPEITO DO ÁLCOOL E DEPENDÊNCIA	17
2.2. METABOLISMO DO ÁLCOOL	20
2.3. NEUROANATOMIA DO SISTEMA DOPAMINÉRGICO E RECEPTOR D4 DA DOPAMINA	22
2.4. GENE <i>DRD4</i>	26
2.5. POLIMORFISMO DUPLICAÇÃO DE 120 pb DO GENE <i>DRD4</i>	28
2.6. ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DO GENE <i>DRD4</i> COM O ALCOOLISMO	29
3. OBJETIVOS	33
3.1. OBJETIVO GERAL	33
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4. MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1. SELEÇÃO DOS SUJEITOS DA PESQUISA	34
4.1.1. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	34
4.1.2. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	35
4.2. CÁLCULO DO GRAU DE DEPENDÊNCIA	35
4.3. GENOTIPAGEM	36
4.3.1. EXTRAÇÃO DE DNA	36
4.3.2. PCR	36

4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
5. RESULTADOS.....	40
6. DISCUSSÃO.....	44
7. CONCLUSÃO.....	54
8. REFERÊNCIAS.....	55
APÊNDICE I - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	67
APÊNDICE II - QUESTIONÁRIO APLICADO PARA COLETA DE DADOS.....	70
ANEXO I - CARTA DE APROVAÇÃO DESTE TRABALHO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ	73
ANEXO II – PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE SANGUE TOTAL.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DA:	Dependência do álcool
DRD4:	receptor D4 da dopamina
SAD:	Síndrome de Dependência do Álcool
SNPs:	polimorfismos de nucleotídeo único
VNTR:	número variável de repetição em tandem
WHO:	Organização Mundial de Saúde
ADH:	Álcool desidrogenase
ALDH:	Aldeído desidrogenase
DSM-IV:	Manual Diagnóstico e Estatístico dos Distúrbios Mentais
HIV:	Vírus da imunodeficiência humana
IC:	Intervalo de confiança
MEOS:	vias do sistema microssomal de oxidação do etanol
OR:	Odds Ratio
Pb:	Pares de base
PCR:	Reação em cadeia da polimerase
ROS:	Espécies reativas de oxigênio
NAD:	nicotinamida adenina dinucleotídeo
TDAH:	Transtorno do Déficit de Atenção com Hiperatividade
cAMP:	Monofosfato cíclico de adenosina
ATP:	Trifosfato de adenosina
Gi:	G inibitória
SNC:	sistema nervoso central
SNc:	via substância negra <i>pars compacta</i>
ATV:	via área tegmentar ventral
DSTs:	Doenças Sexualmente Transmissíveis
EDTA:	ácido etilenodiaminotetracético
CNT:	controle interno da reação
TBE:	Tris, Borato e EDTA

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vias de oxidação do etanol	21
Figura 2. Transmissão da dopamina.	23
Figura 3. Receptor D4 da dopamina.....	244
Figura 4. Vias dopaminérgicas..	255
Figura 5. Representação do gene <i>DRD4</i> e seus inúmeros polimorfismos..	277
Figura 6. Representação dos genótipos.....	388

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição da frequência genotípica e alélicas do polimorfismo 120 pb do gene <i>DRD4</i>	299
Tabela 2. Concentração de álcool de acordo com o tipo de bebida	355
Tabela 3. Unidade de álcool contido em cada dose de bebida.....	355
Tabela 4. Volume e concentração dos reagentes empregados na PCR após a padronização.....	377
Tabela 5. Frequência genotípica e alélica dos alcoolistas e controles do polimorfismo de duplicação 120 pb no gene <i>DRD4</i> . Erro! Indicador não definido. 0	
Tabela 6. Características demográficas da amostra.....	401
Tabela 7. Comparação da frequência do polimorfismo entre os dependentes do álcool com relação ao histórico familiar.....	422
Tabela 8. Frequência dos genótipos e idade do primeiro uso dos alcoolistas para o polimorfismo 120 pb.	422
Tabela 9. Comparação da frequência genotípica entre alcoolistas e controles em relação ao hábito tabagista.	433

RESUMO

O álcool é uma droga psicotrópica com propriedades contribuintes no processo de dependência. O seu uso exagerado gera a dependência do álcool (DA), uma enfermidade que atinge negativamente a sociedade. Por ser uma doença com herança multifatorial, a DA tem influência tanto de fatores ambientais como fatores genéticos. Estudos demonstram um papel fundamental do sistema dopaminérgico com abuso de drogas, inclusive do álcool, com intensificação em torno do gene *DRD4*, codificador do receptor D4 da dopamina. Considerado um dos genes humanos com maior número de polimorfismos, estudos mostram que a duplicação 120 pb na região promotora do gene *DRD4* pode influenciar a taxa de transcrição do gene, no entanto, os resultados de estudos de associação de receptores de dopamina e alcoolismo têm sido contraditórios em diferentes populações. Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo avaliar se o polimorfismo de 120 pb no gene *DRD4* tem associação com a susceptibilidade ou dependência do álcool em uma população masculina no Nordeste do Brasil. Como a investigação é um estudo caso-controle, foram genotipados pela técnica de PCR, seguida de eletroforese em gel de agarose, as amostras de 143 alcoolistas e 146 controles. As frequências genotípicas e alélicas foram submetidas aos testes do qui-quadrado, exato de Fisher e Odds Ratio com $p < 0,05$. Os resultados da distribuição alélica entre os grupos mostraram que a frequência do alelo curto (S) foi de 24,13% no grupo de alcoolistas e 22,60% no grupo controle, e do alelo longo (L) foi de 75,87% no grupo de alcoolistas e 77,40% entre os controles. A distribuição dos genótipos e dos alelos do polimorfismo de duplicação de 120 pb do gene *DRD4* não diferiu significativamente entre alcoolistas e controles, sugerindo uma associação negativa com a suscetibilidade a dependência do álcool. Nossos achados revelaram que os alcoolistas possuem menor nível de escolaridade em comparação aos controles e a associação entre alcoolistas e o hábito tabagista foi significativa ($< 0,0001$). Além disso, é possível observar que a DA tem um caráter familiar, visto que, familiares dos que fazem uso abusivo do álcool têm uma frequência significativamente maior ($< 0,0001$) de dependência do que em parentes de não dependentes do álcool. Estudos adicionais são necessários para a confirmação desses resultados e o esclarecimento do papel do gene *DRD4* no risco da DA e na determinação dos fatores que influenciam na sua gênese.

Palavras-chave: variações genéticas, sistema dopaminérgico, alcoolismo.

ABSTRACT

Alcohol is a psychotropic drug with contributing properties in the addiction process. Its exaggerated use generates dependence on alcohol (AD), a disease that negatively affects society. Because it is a disease with multifactorial inheritance, AD has influence both of environmental factors and genetic factors. Studies show a key role of the dopaminergic system with drug abuse, including alcohol, with intensification around the *DRD4* gene, encoding the dopamine D4 receptor. Considered one of the human genes with the highest number of polymorphisms, studies show that 120 bp doubling in the promoter region of the *DRD4* gene may influence the transcription rate of the gene, however, the results of studies of association of dopamine receptors and alcoholism have been contradictory in different populations. Thus, the present study aims to evaluate whether the 120 bp polymorphism in the *DRD4* gene is associated with alcohol susceptibility or dependence in a male population in Northeast Brazil. As the investigation is a case-control study, they were genotyped by the PCR technique, followed by agarose gel electrophoresis, samples of 143 alcoholics and 146 controls. The genotypic and allelic frequencies were submitted to chi-square, Fisher's exact and Odds Ratio tests with $p < 0.05$. Results from the allelic distribution between the groups showed that the frequency of the short allele (S) was 24.13% in the alcoholic group and 22.60% in the control group, and the long allele (L) was 75.87% in the group of alcoholics and 77.40% among controls. The distribution of the genotypes and alleles of the 120 bp doubling polymorphism of the *DRD4* gene did not differ significantly between alcoholics and controls, suggesting a negative association with susceptibility to alcohol dependence. Our findings revealed that alcoholics have a lower level of education compared to controls, and the association between alcoholics and smoking was significant (< 0.0001). In addition, it is possible to observe that AD has a familial character, since relatives of alcohol abusers have a significantly higher frequency (< 0.0001) of dependence than in non-alcohol dependent relatives. Further studies are needed to confirm these results and to clarify the role of the *DRD4* gene in the risk of AD and in determining the factors that influence its genesis.

Key words: genetic variations, dopaminergic system, alcoholism.

1. INTRODUÇÃO

A Síndrome de Dependência do Álcool (SDA) ou popularmente conhecida como alcoolismo se define como um transtorno psiquiátrico que afeta o usuário, a sociedade e a economia de um país. Independentemente do quadro clínico que encontra-se bastante entendido, assim como os fundamentos do diagnóstico serem bem definidos, o alcoolismo ainda continua sendo um notável problema de saúde pública, seja pelas dificuldades de diagnóstico precoce ou tardio ou por obstáculos ao se alcançarem tratamentos efetivos (GIGLIOTTI; BESSA, 2004).

A suscetibilidade a doenças e a resposta ao ambiente são traços particulares de cada indivíduo, conseqüentemente, cada um pode comportar-se de modo desigual a exposição algum tipo de risco. Para que as espécies tornassem capazes de habituar-se em diferentes meios ao longo do processo evolutivo era necessário a existência da variabilidade genética, logo com adaptação ao ambiente houve a formação dos mais variados fenótipos (MILLER et al., 2001). Por exemplo, desde a década de 70 já sabia-se que mongóis são menos tolerantes a bebidas alcoólicas em relação aos caucasianos (GOEDDE, 1979). A presença de variações, conhecidas como polimorfismo, na sequência de DNA são as encarregadas pela resposta individual (MILLER et al., 2001) a exposições a certas condições ou substâncias diversas, como o álcool.

Em sujeitos com Dependência do Álcool a remoção do agente químico equivale a redução do desempenho da dopamina, sendo capaz de contribuir com a recaída e sintomas de abstinência (GILPIN; KOOB, 2008; MELIS et al., 2005;). Os genes codificadores dos receptores de dopamina (DR) são candidatos a uma possível contribuição para o desenvolvimento e/ou grau de dependência do álcool (PRASAD; AMBEKAR; VASWANI, 2013; LEE; RYU, 2002). O agonista do receptor D4, a dopamina, desempenha funções na locomoção, cognição, neuroendócrino e recompensa (RUBINSTEIN, 1997). Os receptores dopaminérgicos foram classificados de acordo com embasamento farmacológico e homologia de sequências, agrupando-se em duas famílias: D1 e D2. O primeiro refere-se aos receptores D1 e D5, já os membros da família D2 compreende as proteínas D2, D3 e D4 (PIERCE; KUMARESAN, 2006; SEEMAN; VAN TOL, 1991). Os receptores de dopamina do tipo D4 são altamente expressos no córtex cerebral e em algumas

ocasiões são capazes de modular a resposta a determinados medicamentos (PRASAD; AMBEKAR; VASWANI, 2013).

Polimorfismos no gene do receptor D4 da dopamina (*DRD4*) têm sido relacionados às características de comportamentos e vários transtornos neuropsiquiátricos (SIMPSON et al., 2010), sinalizando inclusive para o desenvolvimento do alcoolismo (MOTA et al., 2013; PRASAD; AMBEKAR; VASWANI, 2013; MURAMATSU et al., 1996). Codificador de uma proteína com 419 aminoácidos o gene *DRD4* está posicionado na extremidade do braço curto do cromossomo 11 (SIMPSON et al., 2010; OAK; OLDENHOF; VAN TOL, 2000). São encontrados inúmeros polimorfismos em sua estrutura, alguns deles como a deleção 13 pb, inserção/deleção de 12 pb ambos no éxon I, os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) -616 G/C, -521 T/C, o VNTR 48 pb no éxon III e a duplicação em tandem de 120 pb na região promotora do gene (BARR et al., 2001; SEAMAN et al., 1999).

No final dos anos 90, Seaman et al., (1999) observou ser comum a presença de repetição de 120 pb em 11 populações estudadas no mundo, entre elas: Mbuti, Druze, Chinese e Nasioi. Como a duplicação 120 pb está localizada em uma região que se liga vários fatores de transcrição, uma deleção ou inserção em sua estrutura ocasiona diferença na taxa transcricional (SIMPSON et al., 2010; SEAMAN et al., 1999). A eficácia funcional dos receptores de dopamina e o total de receptores presentes na membrana celular, apresentam grande importância, visto que, as funções do agonista no cérebro são mediadas por tais para a tradução de sinais que modificam a atividade neural. Partindo desde princípio e da inexistência de trabalhos que associam o polimorfismo 120 pb com a DA nesta população, além do trabalho desenvolvido na Índia por Prasad e colaboradores (2013) ser o único que obteve uma associação entre o alcoolismo e a duplicação, o presente estudo tem como objetivo investigar uma possível associação da duplicação 120 pb do gene *DRD4* com a susceptibilidade no desenvolvimento da DA em uma população masculina do Nordeste Brasileiro.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. CONSIDERAÇÕES A RESPEITO DO ÁLCOOL E DEPENDÊNCIA

O álcool ou etanol é uma molécula pequena, solúvel tanto em água como em lipídios (LIEBER; ABITTAN, 1999). Pertencente à classe de compostos dos álcoois, forma-se pela ligação de dois carbonos saturado ao um grupo hidroxilo, cuja sua fórmula química é $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ (GIGLIOTTI et al., 2008).

Ingerido por via oral, o álcool é absorvido rapidamente pelo estômago e duodeno. Essa velocidade de absorção diminui quando há presença de alimentos no estômago, pois há aumento do tempo de esvaziamento gástrico. A assimilação é ainda favorecida pelo alto teor alcoólico ou se a bebida está em temperatura ambiente, uma vez que as duas situações promovem uma maior dilatação dos capilares estomacais (HOFFMANNI et al., 1996).

O álcool é uma droga psicotrópica que tem propriedades contribuintes no processo de dependência. O seu uso exagerado gera a DA, uma enfermidade que atinge negativamente a sociedade, tanto a nível social como econômico, (WHO, 2014). O efeito de reforço que o álcool acarreta torna-se o elemento crucial na evolução da dependência, promovendo alterações complexas no cérebro que resulta em adaptações neurais (PRASAD; AMBEKAR; VASWANI, 2013; PIERCE; KUMARESAN, 2006).

Desde o surgimento do comportamento alcoólico vem se estabelecendo várias definições para essa doença, contudo em 2004 a Organização Mundial de Saúde (do inglês, *World Health Organization* - WHO) denominou o alcoolista como: um consumista imoderado de álcool, do qual a dependência é seguida de transtornos mentais, alteração da saúde corporal e desordem no comportamento social.

Com a advento da revolução industrial no século XVIII, a fabricação e comercialização de bebidas alcoólicas cresceram exponencialmente. Nessa época o autor Thomas Trotter teve destaque por tratar, pela primeira vez, o alcoolismo como doença. No mesmo período Magnus Huss definiu o termo “alcoolismo crônico”, como sendo intoxicação por ingestão de etanol com exibição de sintomas físicos e/ou psiquiátrico (GIGLIOTTI; BESSA, 2004).

Atualmente o consumo de álcool não é visto de forma negativa, o que muitas vezes impede que se reconheça quando determinado padrão é considerado uma enfermidade, ao passo que, dificulta a mobilização dos órgãos públicos competente para minimizar os problemas causado pelo uso abusivo do álcool (HECKMANN; SILVEIRA, 2009). O índice global do uso abusivo do álcool tem crescido consideravelmente, não sendo diferente no Brasil. Aproximadamente, 30,0% das internações hospitalares acontecem por decorrência ao consumo exagerado de bebidas alcoólicas (MAFFEI et al., 2002). Segundo a WHO, em 2010 o consumo por pessoas com a faixa etária superior ou igual há 15 anos foi de 6,2 litros de álcool puro por indivíduo, o que significa 13,5 gramas de álcool puro por dia. Esses dados são em termos mundiais, enquanto no Brasil essa quantidade de consumo sobe para 8,7 litros por pessoa.

De acordo com os dados obtidos em 2001 pelo I levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 107 maiores cidades do país, o consumo de álcool entre os brasileiros pesquisados com faixa etária de 12 a 65 anos (47.045.907 habitantes, equivalente a 41,3% da população brasileira) representa 68,7%, com o índice de dependentes de 11,2%, o equivalente a 5.283.000 pessoas (CEBRID, 2001). Posteriormente, um novo levantamento mostrou uma elevação para 74,6% e 12,3% para uso na vida e dependência alcoólica, respectivamente (CEBRID, 2005). Em ambos os estudos, o nordeste brasileiro exibiu o maior indicador de dependentes do álcool entre as cinco regiões do Brasil, em 2001 com 16,9% e 13,8% em 2005. Um outro resultado dos trabalhos demonstrou que homens fazem uso mais frequente da droga do que as mulheres, o que acarreta três vezes mais dependentes de álcool do sexo masculino. Para estas pesquisas o diagnóstico da dependência seguiu os critérios adotados pela Agência de Serviços em Abuso de Substâncias e Saúde Mental dos Estados Unidos (do inglês, *United States Substance Abuse and Mental Health - SAMHSA*).

Considerado um grave problema de saúde pública, a dependência do álcool tem inúmeras consequências na saúde, *status* socioeconômico e na sociedade em geral. O consumo exacerbado ao longo da vida torna-se prejudicial a praticamente todos os órgãos do indivíduo, este resultado é decorrente do desgaste das vias metabólicas e da liberação de tipos reativos de oxigênio o que acarreta em estresse oxidativo (ZAKHARI, 2006). Esse nível de consumo contribui

para surgimento de diversas doenças como: cirrose hepática, doenças cardiovasculares, pancreatite aguda e crônica, distúrbios neurológicos e fisiológicos (MAFFEI et al., 2002). Outra consequência para a saúde e para a sociedade ocasionada por deste consumo são os números de óbitos, em decorrência de doenças causadas pelo álcool cerca de 3,3 milhões de mortes foram registrados em 2012, equivalente a 5,9% de todas as mortes em todo o mundo (WHO, 2014).

Quando indivíduos com DA cessam o uso ou apenas diminui o volume ingerido de álcool, possivelmente irá surgir a Síndrome de Abstinência do Álcool (SAA). Alguns sintomas físicos e psicológicos inespecíficos podem manifestar-se, mas, com a baixa especificidade, sua avaliação e reconhecimento se tornam bastante difíceis. Todavia, um sintoma bastante comum na SAA são os tremores, mais percebido nas mãos e nos braços, mas que podem afetar qualquer outra parte do corpo. Fatores como sexo, quantidade e frequência de consumo do álcool, fatores socioculturais, aspectos biológicos e psicológicos e suscetibilidade genética são elementos que induzem o aparecimento e desenvolvimento da SAA (GIGLIOTTI; BESSA, 2004; LARANJEIRA; PINSKY, 2000).

Além dos fatores ambientais, a influência poligênica também é responsável pelo alcoolismo, caracterizando, portanto, uma herança multifatorial (RATSMA; VAN DER; GUNNING, 2002). Conceito este baseado em pesquisas de adoção, onde filhos cujo os pais biológicos alcoolistas, quando adotados por não-alcoolistas, são mais susceptíveis a se tornarem alcoolistas, comparados aos filhos de não-alcoolistas submetidos à mesma condição de adoção (CLONINGER et al., 1985; BOHMAN et al., 1978; CADORET; GATH et al., 1978; GOODWIN et al., 1973) e estudos com gêmeos (HEATH et al., 1997; REED et al., 1996; TREU et al., 1996; KENDLER et al., 1994; ROMANOV et al., 1991). Esses estudos sugerem ainda que fatores genéticos são responsáveis por cerca de 50 a 60% do risco de desenvolvimento de DA (PRASAD; AMBEKAR; VASWANI, 2013; McGUE, 1999;). Outro indicativo que comprova a influência de componente genético, foi visto no estudo de Schuckit (1991), nesta pesquisa constatou-se que houve redução da sensibilidade ao álcool nos filhos de alcoolistas, quando comparados aos controles, pois, considera-se que uma maior exposição a alteração fisiológica esteja relacionada com a maior suscetibilidade de se tornar dependente do álcool.

2.2. METABOLISMO DO ÁLCOOL

A toxicidade do etanol é inferior ao metanol, porém não deixa de ser venenoso. Anualmente, várias pessoas vêm a óbito com intoxicação por esta primeira substância. A oxidação é um dos mecanismos fisiológicos existentes nos animais desenvolvido para remoção do etanol ingerido do organismo, desintoxicando-o antes que se acumule e envenene o cérebro (*BRITANNICA ACADEMIC*, 2015).

A concentração e o tempo de exposição ao álcool são os determinantes para medir o efeito que a bebida consumida provoca nos diversos órgãos, como por exemplo, o cérebro. Além disso, estas duas características são afetadas pela taxa de absorção e metabolismo do etanol (HURLEY; EDENBERG; LI, 2002). Em alguns tecidos, principalmente no fígado, ocorre a metabolização do etanol. No hepatócito, a oxidação ocorre por três caminhos distintos, catalisada por enzimas específicas, são elas: enzimas do citocromo P450, catalase e álcool desidrogenase (ADH), na qual quebram a molécula de etanol em acetaldeído (CH_3CHO), um metabólito altamente tóxico e carcinogênico (EDENBERG, 2007).

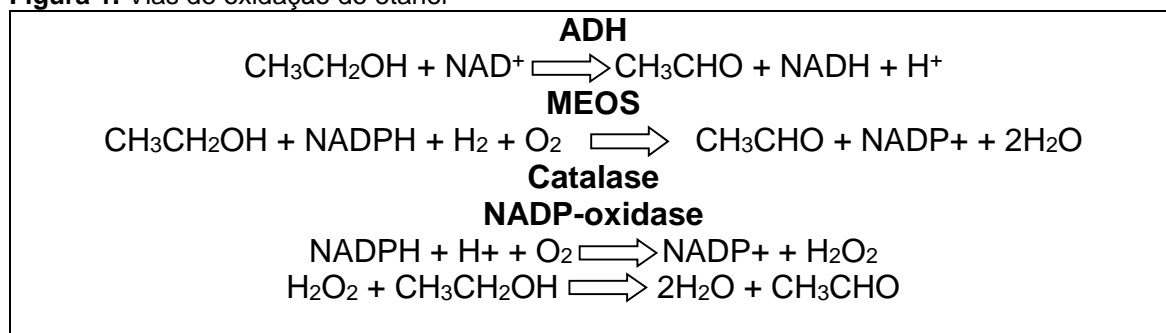
O processo mais frequente ocorre no citosol da célula, ao qual, utiliza a via álcool desidrogenase. Esta via envolve a enzima ADH e tem como cofator a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD), que é reduzido à forma NADH, pois há transferência de um H^+ do álcool para esta molécula. Produz-se assim, uma molécula de acetaldeído, que em concentrações elevadas no sangue, causa transtornos no organismo do indivíduo, como náuseas e vômitos. Esta rota é ativada quando o consumo de etanol acontece de forma moderada (MESSAS; VALLADA FILHO, 2004; CUNNINGHAM; VAN HORN, 2003; JÚNIOR et al., 1998). A atividade de ADH pode achar-se bloqueada em indivíduos com SDA, porém, as vias do sistema microsomal de oxidação do etanol (MEOS) e da catálise, conhecidas como vias de recurso, são sinalizadas a participarem da metabolização do álcool (KACHANI et al., 2008; MELLO et al., 2001).

Em 1966 foi fornecido pela primeira vez indícios da possível influência do etanol com o retículo endoplasmático liso hepático, após a indução da proliferação do tecido do fígado com a administração do etanol (LIEBER, 1999; ISERI; LANE; LIEBER, 1966). Tal experimento supôs que o etanol poderia também ser

metabolizado por uma outra via, nos microsossomas. Sendo este comprovada pela caracterização de um sistema microsossomal de oxidação do etanol (TESCHKE et al., 1972) que envolve as enzimas do citocromo P450, com participação fundamental do citocromo P4502E1 (CYP2E1) (KITSON & WEINER, 1996; LASKER et al., 1987). Ohnishi e Lieber (1977) demonstraram que o consumo crônico do etanol promove a indução de uma única enzima P450, esta enzima permite que elétrons se liguem ao oxigênio e no ciclo do NADH. Como resultado há formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), como radical hidroxila, podendo gerar peroxidação lipídica na membrana, dando origem final a produtos tóxicos como o melondialdeído (JÚNIOR et al., 1998; SONG; CEDERBAUM, 1996).

Sob influência da catalase, nos peroxissomos, ocorre a oxidação do NADPH pela ação da NADPH-oxidase, que resulta na formação de H₂O₂ (água oxigenada), gerando a oxidação do etanol via catalase (JÚNIOR, et al., 1998). Esta não metaboliza uma grande quantidade de álcool do corpo, visto que degrada menos de 2,0% do etanol ingerido (EDENBERG, 2007). Porém, quanto maior o consumo, maior a atividade de NADPH-oxidase, promovendo maior produção de H₂O₂, o que eleva a participação desta via na conversão do álcool (JÚNIOR et al., 1998). A Figura 1 exemplifica a oxidação do etanol por meio das três vias citadas anteriormente.

Figura 1. Vias de oxidação do etanol



Fonte: Adaptado de Júnior, et al. (1998)

Numa segunda fase o acetaldeído, proveniente da metabolização do etanol, é oxidado em acetato (CH₃COO⁻) por ação da enzima aldeído desidrogenase (ALDH) (KITSON & WEINER, 1996). A aldeído desidrogenase possui as variantes ALDH1 e ALDH2, ambas reguladas geneticamente, onde a ALDH2 é biologicamente inativa, em pessoas homozigotas para este gene, fato

este que ocorre em 10% da população asiática, apresentam efeitos colaterais mais intensos. Esta sensibilidade defende o indivíduo contra a dependência do álcool (MESSAS; VALLADA FILHO, 2004). Uma das características desta enzima é sua alta atividade mitocondrial (JÚNIOR et al., 1998). Em alguns tecidos, mas sobretudo no fígado o acetato é então quebrado em dióxido de carbono e água (*NATIONAL INSTITUTE ON ALCOHOL ABUSE AND ALCOHOLISM*, 1997).

2.3. NEUROANATOMIA DO SISTEMA DOPAMINÉRGICO E RECEPTOR D4 DA DOPAMINA

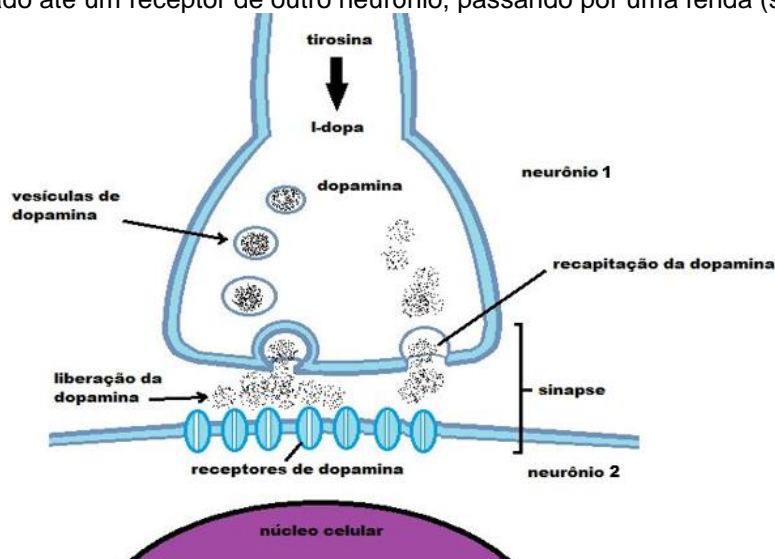
O sistema nervoso humano é um elaborado sistema de comunicação, sendo o cérebro o centro de controle. Este por sua vez, processa informações sensoriais advindas de todo o organismo, orienta os movimentos musculares e a locomoção, bem como atua regulando múltiplas funções corporais, é responsável pela formação dos pensamentos e sentimentos, modula percepção e humor, e principalmente controla todo o comportamento. Ele está organizado em lobos, que são os encarregados por desempenhar funções especializadas, tais como, em processos cognitivos, sensoriais e coordenação motora. Estes lóbulos são constituídos de unidades muito mais elaboradas, os circuitos, que compreende conexões diretas entre as bilhões de células especializadas, que por ventura, as várias substâncias de abuso podem acabar afetando (*CENTER FOR SUBSTANCE ABUSE TREATMENT*, 1999).

O sinal químico é conduzido por moléculas mensageiras, neurotransmissores, que se ligam aos receptores na superfície externa do neurônio alvo (CHARNESS, 1990). Dependendo de qual receptor é ativado, os neurotransmissores podem atuar de diferentes maneiras. Aumentando a responsividade de um neurônio receptor a um sinal entrante ocorre um efeito excitatório, quando há redução da capacidade de resposta verifica-se um efeito inibitório. A responsividade dos neurônios individuais pode influenciar não só a funcionalidade dos circuitos cerebrais, assim como, do cérebro como um todo (como ele se integra, interpreta e responde à informação). Diante disso, afetando a

função do corpo e o comportamento do Indivíduo (HILLER-STURMHFEL, et al. 1995; NATIONAL INSTITUTE ON ALCOHOL ABUSE AND ALCOHOLISM, 1994;).

A dopamina consiste em um neurotransmissor catecolamínico precursor da noradrenalina e adrenalina. Sintetizado a partir da tirosina, tornou-se um alvo para terapia de determinados distúrbios do neuroeixo, como esquizofrenia, doença de Parkinson e Transtorno do Déficit de Atenção com Hiperatividade (TDAH). Essa família de neurotransmissores é responsável por modular a atividade da neurotransmissão de ponto a ponto, influenciando processos como: atenção, humor e emoção (JONES; PILOWSKY, 2002). São transportadas por vesículas secretoras para seu armazenamento e posterior liberação. Para o seu transporte nas vesículas sinápticas é preciso duas bombas moleculares que controlam o deslocamento de acordo com o gradiente de concentração. As vesículas tendem a fundir-se com a membrana plasmática quando há estimulação da célula nervosa, resultando na liberação da dopamina na fenda sináptica (Figura 2). Na fenda esse agonista pode se ligar a auto-receptores pré-sinápticos ou a receptores pós-sinápticos (STANDAERT; GALANTER, 2009).

Figura 2. Transmissão da dopamina. O neurotransmissor mantém-se armazenado em vesículas no neurônio, transportado até um receptor de outro neurônio, passando por uma fenda (sinapse).



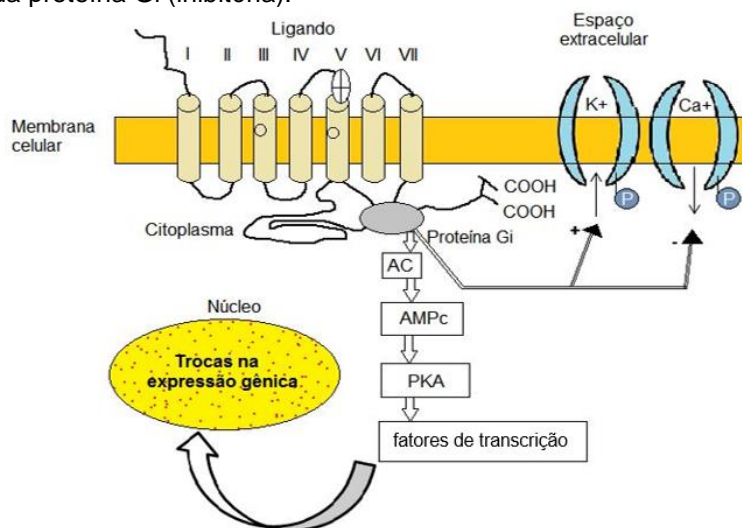
Fonte: Autor

Os receptores de dopamina pertencem a família de proteínas receptoras acopladas à proteína G. Baseado no efeito na formação de AMP cíclico (cAMP), houve a classificação das propriedades dos receptores de dopamina (STANDAERT; GALANTER, 2009). O aumento de cAMP fundamenta-se na

ativação dos receptores de classe D1, a qual compreende os receptores D1 e D5, enquanto a inibição da sua produção é devido a ativação dos receptores da classe D2, onde contém os receptores D2, D3 e D4 (STOOF; KEBABIAN 1981; KEBABIAN; CALNE 1979), além de ativar a abertura de canais de potássio e bloquear os de cálcio (CERESÉR; VIANNA, 2004). Esses cinco tipos de proteínas receptores, são cada um codificado por genes independentes (STANDAERT; GALANTER, 2009).

O receptor D4 está organizado em sete domínios transmembrana (Figura 3) e trata-se de um dos mais importantes receptores do sistema dopaminérgico, por causa da sua grande afinidade pela dopamina e clozapina (antipsicótico atípico). Tal receptor acopla-se a proteína G inibitória quando ativado, impedindo a enzima adenilil ciclase de converter a ATP em cAMP, determinando a continuidade da resposta intracelular. No sistema dopaminérgico esse receptor está posicionado nos neurônios pós-sinápticos (VAN TOL et al., 1991) e pré-sinápticos (SVINGOS; PERIASAMY; PICKEL, 2000), estando expresso principalmente no córtex frontal, medula oblonga e mesencéfalo (MOTA et al, 2013; STANDAERT; GALANTER, 2009).

Figura 3. Receptor D4 da dopamina. Os domínios transmembrana I à VII do receptor D4 da dopamina estão representados pelos cilindricos. A elipse cinza entre os domínios V e VII são os sítios de ligação da proteína Gi (inibitória).

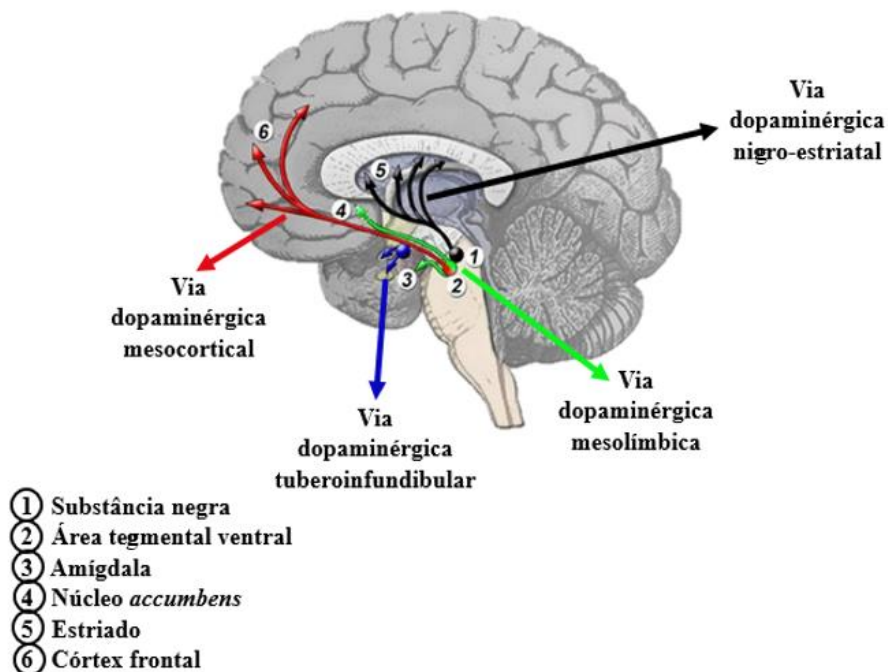


Fonte: Adaptado de Aguirre-Samudio e Nicolini (2005).

Na maior parte do sistema nervoso central (SNC) há presença do sistema dopaminérgico (Figura 4). Este sistema dispõe da via substância negra *pars*

compacta (SNc), onde seus axônios são projetados para o estriado e a via área tegmentar ventral (ATV) que direciona os axônios para o feixe frontocerebral mediano, ramificando para a região do córtex pré-frontal (via mesolímbica) e para a região do estriado ventral (via mesocortical dopaminérgicas) (KUHAR et al., 1999).

Figura 4. Vias dopaminérgicas. As vias dopaminérgicas se projetam desde da parte superior do tronco encefálico, a área tegmentar ventral e substância negra, ao núcleo *accumbens*, a amígdala, estriado dorsal e o córtex pré-frontal.



Fonte: <https://museudinamicointerdisciplinar.wordpress.com/2014/09/21/neuroanatomia-do-sistema-de-recompensa-cerebral-e-dependencia-quimica/>. Figura adaptada.

O sistema de recompensa límbico também chamado de sistema de recompensa de dopamina ou sistema de recompensa do cérebro é o circuito cerebral considerado fundamental para o sistema de reforço neurológico. Estende-se entre a ATV e o núcleo *accumbens*. Toda substância de abuso, tais como, o álcool, cocaína, metanfetamina, heroína, maconha e nicotina possuem algum efeito sobre tal sistema. Essas substâncias podem afetar o núcleo *accumbens*, que por sua vez, estimula o aumento da liberação do neurotransmissor dopamina (WISE, 1982, ROBBINS et al., 1989, DI CHIARA, 1995).

Mudanças comportamentais, como o aumento do humor e dos movimentos corporais, podem ocorrer quando há elevação dos níveis de dopamina livre no cérebro. Em excesso, a dopamina pode ocasionar alterações no comportamento,

como: nervosismo, irritabilidade, agressividade e paranoia, alucinações semelhantes à esquizofrenia. Por outro lado, níveis reduzidos de dopamina em determinadas áreas cerebrais, resulta em sintomas equivalentes ao da doença de Parkinson, como tremores e paralisia (DI CHIARA, 1995).

O núcleo *accumbens* é ativado por atividades naturais como por exemplo, comer, beber e comportamento sexual, que por sua vez, induz uma considerável comunicação entre os neurônios desta estrutura. Esta comunicação interna leva à liberação de dopamina. Uma vez liberada, acaba produzindo sentimentos imediatos, mas momentâneos, de prazer e alegria que são proporcionais ao nível de dopamina disponível. À proporção que os níveis de diminuem, conseqüentemente os sentimentos de prazer também são reduzidos. Havendo novo estímulo ativador do núcleo *accumbens*, novamente ocorre a liberação de dopamina, e mais sentimentos de prazer e euforia são produzidos. A liberação desse neurotransmissor e seus efeitos no núcleo *accumbens*, reforçam positivamente tais atividades em seres humanos e animais, motivando a buscar de situações que repitam tais sensações (*CENTER FOR SUBSTANCE ABUSE TREATMENT*, 1999).

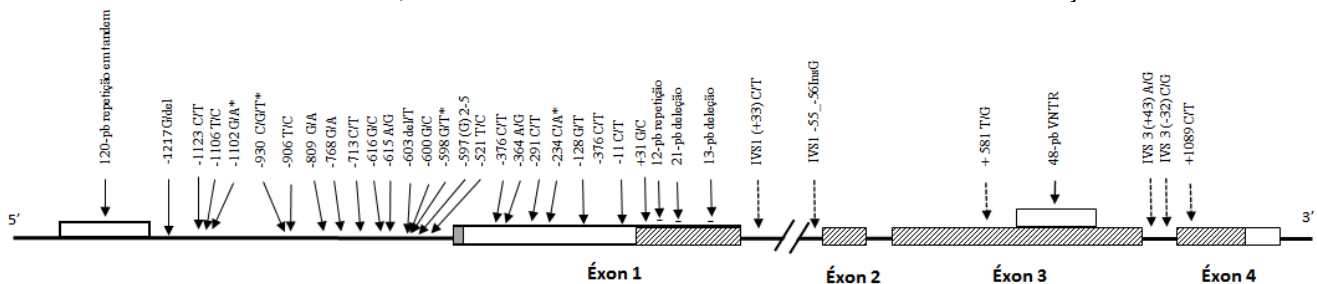
Estudos farmacológicos e genéticos demonstram um papel fundamental do sistema dopaminérgico com abuso de drogas (LUSHER; CHANDLER; BALL, 2001), bem como, a dependência do álcool, com grande intensificação em torno do gene *DRD4* (PRASAD; AMBEKAR; VASWANI, 2013; D'SOUZA et al., 2003; HUTCHISON et al., 2002; GEORGE et al., 1993).

2.4. GENE *DRD4*

Um importante foco de pesquisas nas áreas da neurologia, psicologia, psiquiatria e farmacologia é o gene *DRD4* que codifica o receptor de dopamina D4. Constituído por quatro éxons, com aproximadamente 4 kb, este gene situado no cromossomo 11 (11p.15.5) é considerado um dos genes humanos com maior número de polimorfismos, como mostrado na Figura 5 (LI et al., 2006; PETRONIS et al., 1993; GELERNTER et al., 1992). Esse gene é responsável por codificar uma

proteína com sete domínios transmembrana encontrados nas células pós-sinápticas da via dopaminérgica (LOWE et al., 2004).

Figura 5. Representação do gene *DRD4* e seus inúmeros polimorfismos. As regiões codificadoras estão mostradas em linhas, em branco não codificadoras e em cinza sítios de iniciação.



Fonte: Adaptado de Mitsuyasu, et al. (2007)

O gene *DRD4* se expressa em diversas regiões do cérebro, inclusive no córtex pré-frontal, região do cérebro responsável sobretudo por funções cognitivas e pela atenção (WANG et al, 2004; OAK; OLDENHOF; VAN TOL, 2000). De acordo com experimento realizado na década de 90, camundongos com ausência de receptor D4, retirado por recombinação homóloga em células tronco embrionária, apresentaram atividade reduzida de locomoção espontânea, comparados aos que possuíam a proteína, além de demonstrarem ser supersensíveis a estímulos locomotores induzido por drogas como cocaína, metanfetamina e etanol (RUBINSTEIN, 1997).

Simpson (2010) analisou o papel de alguns polimorfismos do gene *DRD4*, inclusive a duplicação 120 pb, quantificando e comparando o nível de expressão do mRNA do gene *DRD4* equivalente a cada genótipo. Apesar da associação não ter fornecido resultados com significância estatística para os polimorfismos investigados, gerou uma particularidade que deve ser citada. Uma expressão média reduzida de mRNA de *DRD4* foi verificada para homozigotos da duplicação 120 pb em comparação com os heterozigotos. Como será explanado adiante, variações neste gene promove alterações quantitativas na produção de cAMP (ASGHARI, 1995).

2.5. POLIMORFISMO DUPLICAÇÃO DE 120 pb DO GENE *DRD4*

Apesar do grande número de polimorfismos existentes no gene *DRD4*, apenas alguns são estudados. Situado a 1,2 - 1,4 kb da região promotora do gene, na extremidade 5', a duplicação de 120 pb é um dos poucos que frequentemente são pesquisados (SEAMAN et al., 1999).

A provável influência que os polimorfismos do *DRD4* promovem em variações normais de comportamento (EBSTEIN et al., 1996), distúrbios mentais (GRICE et al., 1996; MANKI et al., 1996) e abuso de substâncias (MURAMATSU et al., 1996), tem resultado em uma atenção maior para as variações deste gene. Ainda, trabalhos sugerem que podem exercer um papel na taxa de transcrição do gene, visto que muitos sítios de ligação de consenso da transcrição posicionam-se no interior desta duplicação (SEAMAN et al., 2004) e existem indícios de uma maior afinidade de ligação do fator de transcrição 1 (Sp1) com o alelo longo (RONAI et al., 2004).

Para discernir o alelo selvagem do derivado, Seaman (1999) realizou um estudo com 623 indivíduos de 11 populações diferentes, de cinco continentes, além de quatro espécies de primatas (chimpanzé, bonobo, gorila e orangotango). Os resultados revelaram que os primatas não apresentavam a duplicação 120 pb, demonstrando que 549 pb origina o alelo mutante. Enquanto as 11 populações apresentaram os dois alelos, tanto o ancestral (429 pb) como o derivado. A letra "S" que significa "Short" representa o alelo selvagem, enquanto "L" de "Long" nos direciona para o alelo 240 pb (com a duplicação).

A Tabela 1 traz as diferentes populações com suas respectivas frequências genotípica e alélicas para o polimorfismo de duplicação de 120 pb. Na tabela é observado as frequências das populações, destacando os caucasianos, pois é o grupo étnico que prevalece na composição étnica do brasileira (IBGE, 2011).

Tabela 1. Distribuição da frequência genotípica e alélicas do polimorfismo 120 pb do gene *DRD4*.

Origem da população		Frequência Genotípica (%)				Frequência Alélica (%)		
		N	S/S	S/L	L/L	2N	S	L
Caucasianos	Húngaros (SZANTAI et al, 2005)	598	3,0	28,3	68,7	1196	17,1	82,9
Africanos	Africano (SEAMAN et al., 1999)	68	35,5	48,2	16,3	136	59,6	40,4
Americanos	Maias (SEAMAN et al., 1999)	53	23,1	49,9	26,9	106	48,1	51,9
Asiáticos	Chineses (XING et al., 2003)	206	13,6	47,6	38,8	412	37,4	62,6
Sul-americanos	Brasileiros (MARQUES et al., 2006)	538	4,7	32,2	63,1	1076	21,0	79,0
Sul-americanos	Brasileiros (MULLER et al., 2012)	371	60,8	38,2	1,00	742	79,9	20,1

Fonte: autor.

2.6. ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DO GENE *DRD4* COM O ALCOOLISMO

Estudos com variações fisiológicas, pessoas adotadas e gêmeos, vêm demonstrado a influência genética com o alcoolismo. Porém, esses estudos não podem identificar os genes que predisõem a dependência e os mecanismos patológicos. Já a identificação de múltiplos genes ocasionadores de patologias mendelianas ocorrem nos estudos de ligação. No entanto, os resultados não são replicáveis nos grupos independentes para *loci* ligados a dependência do álcool. Acredita-se que o grande número de genes relacionados a essa doença e a vasta heterogeneidade, sejam os motivos para essa problemática (COMINGS, 1998). Por isso, são mais promissores os estudos de associação, baseados no modelo de genes candidatos (VOGEL; MOTULSKY, 1997). Além disso, esses estudos usam técnicas que possibilitam detectar variações na sequência que modificam a expressão ou estrutura da proteína (MANKI et al., 1996; CRADOCK; MCGUFFIN, 1993).

Como o alcoolismo é multifatorial faz se necessário a ênfase em genes que demonstram uma maior influência na susceptibilidade, pois, com a quantidade de genes participantes, os efeitos da maioria deles são mínimos (VOGEL; MOTULSKY, 1997). Têm sido pesquisados inúmeros genes candidatos, contudo, há divergência entre os resultados (GRZYWACZ et al., 2012; GOLDMAN, 1995). Em meio aos sistemas neurofisiológicos supostamente relacionados a fisiopatologia da doença, encontram-se os envolvidos com o efeito depressor (onde a mediação ocorre sobretudo pela atuação sobre os receptores GABA), de recompensa e prazer. A ativação do sistema dopaminérgico está fortemente associada a estas duas últimas sensações (McKINNEY et al. 2000).

Relatos na literatura mostram que o sistema nervoso dopaminérgico central sofre ação do álcool, este por sua vez, acaba por estimular os sistemas de recompensa cerebral (KONO et al., 1997; KOOB; BLOOM, 1988). Desde os anos de 1970, já foram realizadas várias pesquisas sobre o papel desempenhado da dopamina no sistema de recompensa cerebral (MA; ZHU, 2014; CHARLET; BECK; HEINZ, 2011; TUPALA; TIIHONEN, 2004).

A dopamina desempenha um papel chave no reforço e motivação para ações repetitivas ao qual foi rotulada como “molécula mestre do vício” (DI CHIARA, 1997, WISE, 1982), pois cada vez mais, aumentam a quantidade de evidências científicas que apontam que o sistema de recompensa límbico e os níveis de dopamina livre forneçam uma ligação comum entre o abuso e a dependência de todas as substâncias. De acordo com essas informações, considera-se a possível alteração na estrutura ou na expressão de genes da neurotransmissão dopaminérgica na susceptibilidade ao alcoolismo (KONO et al., 1997).

Entre os polimorfismos dos genes do sistema dopaminérgicos, os do *DRD4*, estão associados com a eficiência da transmissão do impulso nervoso nas vias de dopamina do SNC, via esta, responsável pela inervação das áreas de processamento do sistema cerebral de recompensa como núcleo *accumbens*, o corpo estriado e o córtex pré-frontal (KITAYAMA et al., 2014).

De acordo com o exposto anteriormente, polimorfismos são alterações que ocorrem na sequência de um gene. Porém, essas mudanças podem acontecer em um único nucleotídeo, os chamados polimorfismo de nucleotídeo único (SNP), ou uma variabilidade no comprimento de uma sequência repetida de DNA, os VNTRs (número variável de repetição em tandem). O polimorfismo pode intercorrer na região codificadora ou no local do gene que não codifica uma proteína, mas que tem plena influência na taxa de transcrição, ou seja, na região promotora do gene (LINHARES et al., 2010). É o caso da duplicação 120 pb do gene *DRD4*, que apesar de sua funcionalidade ainda não ser bem elucidada, há relatos de diferença na taxa de transcrição entre as variantes, uma vez que, em sua sequência sucede ligação de diversos fatores de transcrição tornando-o de grande significância para a expressão da proteína (McCRACKEN, 2000; SEEMAN; MADRAS, 1998).

A outra possibilidade de ocorrência de um polimorfismo é na própria região de transcrição de um gene, essa região interfere na constituição da proteína, pois

possivelmente resulta na troca de aminoácidos. Estas alterações podem estar relacionadas a mudanças na conformação, composição e na atividade da proteína formadora (LINHARES et al., 2010). Diferenças funcionais que foram validadas por Asghari ainda em 1995, quando em seu trabalho, ele concluiu que a eficácia da dopamina para inibir a formação de cAMP foi reduzida pela metade na variante D4.7 do polimorfismo VNTR 48 pb do gene *DRD4* em relação aos alelos de 2 e 4 repetições. Como receptores da família D2 são encarregados pela inibição de adenilato ciclase, com isso, não havendo a formação de cAMP, o fato do D4.7 possuir menor funcionalidade, conseqüentemente ocorrendo maiores concentrações de cAMP em regiões límbicas. Acúmulo de cAMP nestas regiões, preferencialmente no núcleo *accumbens*, permite o aumento da motivação por recompensas dopaminérgicas (RAY et al., 2008; CHOI et al., 2006; KNAPP et al., 2001). Apesar dos processos moleculares sobre esse efeito ainda não serem totalmente claros, podemos considerar essa redução com o risco da DA, visto que, portadores desse alelo pode ser funcionalmente menos sensíveis. Assim, o consumo exagerado de álcool pode estar associado ao excesso de cAMP nas regiões de recompensa cerebral (RAY et al, 2008).

Fatores como a quantidade de receptores de dopamina no local que ocorre a transmissão sináptica (sinapse), concentração sintetizada e liberada de dopamina, além do tempo que a dopamina permanece no espaço sináptico, interferem na neurotransmissão dopaminérgica (SPEED, 2010). D' Souza (2004) observou uma diminuição na taxa de transcrição para o alelo L em comparação ao alelo selvagem. Dentro deste contexto, supõe-se que uma possível associação do polimorfismo do 120 pb (deleção/inserção) com risco do desenvolvimento da dependência do álcool possa estar relacionada a uma redução da transcrição ou da expressão do receptor *DRD4*, uma vez que, a diminuição da funcionalidade da proteína permite o acúmulo de cAMP, espera-se que ocorra processo semelhante com a redução de mRNA, pois menos receptores iram ser formados, resultando em acúmulo nas regiões de recompensa cerebral. No entanto, tem sido bastante controverso os resultados dos estudos que tentam associar os genes codificadores dos receptores da família D2 com o alcoolismo (PARSIAN et al. 1997).

De acordo com o levantamento bibliográfico realizado, são escassos os estudos que realizaram a associação deste polimorfismo com o alcoolismo na

população mundial e principalmente na população brasileira, diferentemente daqueles com o TDAH, ao qual se encontra diversas pesquisas. Diante do panorama discutido acima que revela o potencial do gene *DRD4* na suscetibilidade às dependências, parece importante ressaltar que não apenas os estudos deste gene com o TDAH são relevantes para o processo de entendimento do mesmo e suas variáveis, mas também nesse novo contexto (associação do polimorfismo 120 pb com a DA) é crucial analisar o papel deste polimorfismo com o abuso do álcool, visto que essa desordem afeta grande parte da população global, nacional e regional. Cabe justamente a esta pesquisa a função de demonstrar as variações que ocorrem em diferentes populações, além de divulgar a importância deste tipo de estudo na população do nordeste brasileiro, uma vez que, o mesmo é inédito nesta população tão acometida por essa enfermidade.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar se o polimorfismo de duplicação 120 pb na região promotora do gene *DRD4* está associada com a susceptibilidade ou dependência do álcool em uma população masculina no Nordeste do Brasil.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a prevalência do polimorfismo de duplicação 120 pb no gene *DRD4* em uma população de alcoolistas e de controles no município de Parnaíba (PI).
- Comparar as frequências genotípicas e alélicas obtidas do polimorfismo de 120 pb do gene do receptor D4 de dopamina com as observadas em outros estudos populacionais.
- Analisar se as frequências alélicas e genotípicas são diferentes entre os indivíduos dependentes do álcool e dos controles, objetivando a identificação de variações na predisposição da dependência alcóolica.
- Investigar se a frequência do polimorfismo de 120 pb da região promotora do gene *DRD4* está associada ao hábito tabagista, histórico familiar e idade de início do álcool em uma população masculina do nordeste brasileiro.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. SELEÇÃO DOS SUJEITOS DA PESQUISA

Como o trabalho trata-se de um estudo caso-controle, foram selecionados 143 alcoolistas e 146 controles, ambos os grupos constituídos por indivíduos do sexo masculino e idade superior ou igual a 18 anos. Para fazer parte dos controles era necessário que os sujeitos fossem categorizados como não alcoolistas ou nunca tivesse bebido. O recrutamento de todos os participantes da pesquisa ocorreu no município de Parnaíba-PI, no período de 2011 a 2013. A análise diagnóstica dos voluntários ocorreu através de prontuários médicos, entrevista e preenchimento de um questionário (APÊNDICE II), conforme a 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).

Todos os pacientes da pesquisa encontravam-se sobre tratamento no Centro de Apoio Psicossocial de Álcool e Drogas (CAPS-AD), obedecendo os critérios de diagnóstico para dependência do álcool (303,90) ou abuso do álcool (305,00) estabelecidos pelo DSM-IV ou CID-10. Todos assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE I) e autorizaram a coleta de sangue para a genotipagem.

4.1.1. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Os critérios de inclusão dos sujeitos da pesquisa foram:

- Indivíduos sem relação de parentesco com nenhum dos sujeitos da pesquisa ou pesquisados;
- Sujeitos habilitados cognitivamente para compreender os objetivos proposto pelo estudo, das etapas experimental e das questões envolvidas na entrevista;
- Com descendência paterna e materna do nordeste do Brasil.

4.1.2. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), hepatite B e C e Doenças Sexualmente Transmissíveis (DSTs).
- Câncer não correlacionado com o consumo de bebidas alcoólicas.
- Dependentes de outras drogas químicas com exceção do álcool e da nicotina.

4.2. CÁLCULO DO GRAU DE DEPENDÊNCIA

A partir das informações contidas no questionário pode se estimar o grau de dependência de cada paciente, além de confirmar a ausência de dependência do álcool nos indivíduos controles. Esta estimativa se realiza através da multiplicação do volume consumido com a concentração alcoólica existente em cada bebida como observado na Tabela 2 (VOGEL, 2007). Desta forma, se obtém a quantidade absoluta de álcool em mL que deve ser convertida em gramas, pela multiplicação da densidade do álcool (0,8). Assim, constatamos o volume de álcool presente em cada dose de uma bebida como descrito na Tabela 3 (Núcleo Einstein de Álcool e Drogas do Hospital Israelita Albert Einstein – NEAD). O consumo de álcool é estabelecido pelo total de doses ingeridas, uma vez que cada dose equivale em média a 14 g.

Tabela 2. Concentração de álcool de acordo com o tipo de bebida

Bebida	Concentração de álcool em porcentagem
Cerveja	5%
Vinho	12%
Uisque/ Conhaque/ Pinga	40%

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

Tabela 3. Unidade 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
Cerveja	350mL	5%	17,5mL	14g	1
Vinho tinto	150mL	12%	18mL	14,4g	1
Destilada	40mL	40%	16mL	12,8g	1

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: 0234.0.045.000-10) de acordo com as diretrizes estabelecidas na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (ANEXO I). O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi assinado por todos os voluntários desta pesquisa pós-informados.

4.3. GENOTIPAGEM

4.3.1. EXTRAÇÃO DE DNA

Fez-se o uso de seringas individuais e descartáveis para a coleta de 4mL de sangue periférico dos voluntários e armazenados em tubos contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). O DNA genômico foi isolado a partir de linfócitos utilizando o kit de extração de DNA genômico Wizard™ (Promega Inc., Madison, WI, EUA) de acordo com instruções do fabricante (ANEXO II).

Por meio de corrida eletroforética em gel de agarose a 0,8%, corado com GelRed™ e visualizado a luz ultravioleta em transluminador modelo L-PIX-HE (LOCCUS® Biotecnologia, Brasil) foi possível verificar a qualidade do DNA extraído. A quantificação ocorreu com auxílio de espectrofotômetro, modelo BioSpec-nano (*Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão*) com comprimento de onda de 260 a 280 nm. Posteriormente, as amostras foram refrigeradas a uma temperatura de -20°C no Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Piauí-UFPI, Campus de Parnaíba e depositado no banco de DNA do projeto “Estudo Citogenético e Molecular em uma População de Alcoolistas do Estado do Piauí”, sob a responsabilidade da Prof^a Dr^a Renata Canalle.

4.3.2. PCR

A análise das variantes polimórficas do gene *DRD4* da duplicação 120 pb foi realizada tendo como base o protocolo para técnica de reação em cadeia da

polimerase (do inglês, *Polymerase Chain Reaction* - PCR) de acordo com Seaman et al., 1999. O protocolo da PCR foi realizado nas seguintes condições:

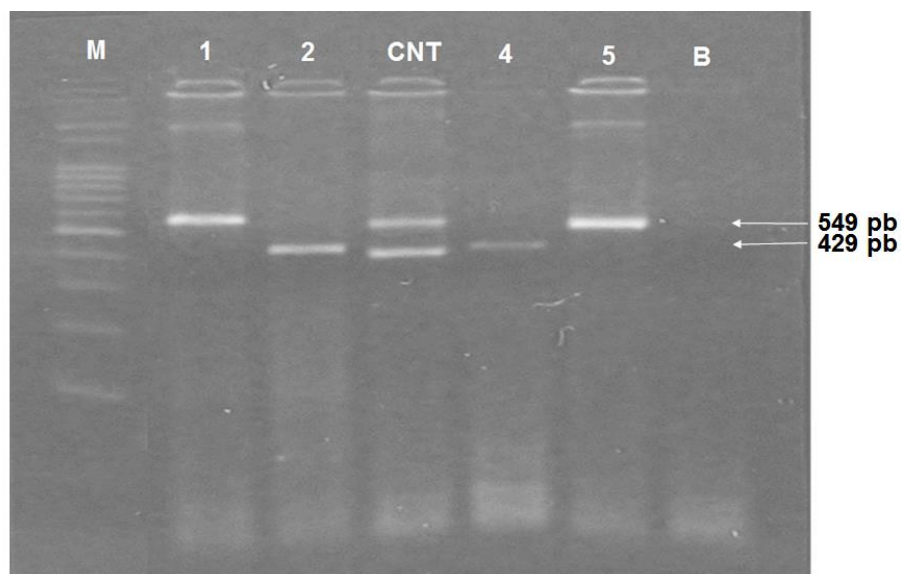
Tabela 4. Volume e concentração dos reagentes empregados na PCR após a padronização

Reagente	Volume e concentração
H ₂ O	12,2 µL
Tampão 10X	2,5µL (20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8,4)
dNTPs	5,0 µL (2 mM)
Primer forward	1,0 µl (0,4 µM)
Primer reverse	1,0 µl (0,4 µM)
DMSO	1,0 µl (5%)
MgCl ₂	1,0 µL (1,25 mM)
Taq DNA polimerase	0,3 µL (1,5 U)
DNA genômico	1,0 µL(100 ng)
Total	25 µL

Todo o manuseio das PCRs foi efetuado dentro de uma cabine de segurança biológica de fluxo unidirecional horizontal. Foram utilizados dois controles de reação, o controle negativo (branco), para assegurar a ausência de contaminação por DNA exógeno durante a reação, para isso, há adição de todos os reagentes da amplificação exceto o DNA genômico, e o controle positivo que identifica problemas nos reagentes e prováveis erros no experimento, além de funcionar como controle interno, pois consisti em uma amostra previamente otimizada para a reação.

Para a amplificação do polimorfismo 120 pb da região promotora do gene *DRD4* foram empregados os primers direto *DRD4-1*: 5' GTTGTCTGTCTTTTCTCATTGTTTCCATTG 3' e o primer reverso *DRD4-2*: 5' GAAGGAGCAGGCACCGTGAGC 3'. O par de primers fornece um fragmento de amplificação constante de 429 pb, correspondente ao genótipo homozigoto para o alelo selvagem (S/S), enquanto o surgimento do segmento longo de 549 pb determina o genótipo homozigoto mutante (L/L). A presença de ambos os fragmentos define o genótipo heterozigoto (S/L), onde todos os genótipos podem ser visualizados na Figura 6.

Figura 6. Representação dos genótipos. PCR em gel de agarose 2,5% para genotipagem do polimorfismo 120 pb. Na imagem pode-se observar em M= marcador de peso molecular (100 pb), 1 e 5 amostras homozigotas mutante (banda 549 pb), 2 e 4 homozigotas selvagem (banda 429 pb), CNT= controle interno da reação (heterozigoto) e B= o controle branco.



Fonte: Autor.

O programa para o ciclo de co-amplificação utilizado foi: 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 62°C por 30 segundos e 72°C por 60 segundos, seguidos de 10 minutos a 72°C. As reações de PCR foram conduzidas no termociclador Thermal Cyclers Amplitherm® (Madison, WI, USA).

Os produtos da PCR juntamente com o Ladder (marcador de peso molecular), com tamanho de 100 pb, foram analisados por eletroforese em gel de agarose com concentração de 2,5%. Para a eletroforese foi utilizado tampão TBE 1X (100ml de TBE 10X; 900ml de água destilada) para preparação do gel e corrida eletroforética, 5 µL do produto de PCR, corado com 2 µL de BLUE (azul de bromofenol + chileno-cianol + glicerol + água) e 3 µL da solução de GelRed™ 0,2% (1 µl de GelRed™ 10.000x + 500 µl de água) e em seguida submetidos a eletroforese a uma voltagem de 120 V por 40 minutos. Após a corrida do gel a região gênica amplificada foi visualizada sob efeito da luz UV por fotodocumentação no transluminador *Loccus* Biotecnologia e observado os padrões de bandas para a determinação do genótipo.

4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Por simples contagem dos grupos alcoolista e controle foi obtido as frequências alélicas e genotípicas. Utilizamos os testes de qui-quadrado (χ^2), exato de *Fisher* e *Odds Ratio* (OR) com intervalo de confiança (IC) de 95% e significância de $p < 0,05$ como uma estimativa de risco relativo e grau de associação para a análise da distribuição das frequências alélicas e genotípicas em associação com DA. As características demográficas da amostra foram calculadas pelo teste “t” independente. A avaliação estatística dos dados foi realizada no software BioEstat 5.3 (AYRES et al., 2007).

As distribuições genotípicas observadas e esperadas foram comparadas através do teste do qui-quadrado, com o intuito de avaliar o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

5. RESULTADOS

Para esta avaliação, foram considerados 143 pacientes com uso abusivo de álcool, em tratamento no CAPS-AD e 146 controles, que não bebem ou com consumo leve a moderado do mesmo (de acordo os critérios do DSM-IV). Todos os indivíduos da pesquisa são do sexo masculino, critério estabelecido para que a amostra estivesse com maior homogeneidade. A distribuição dos genótipos na população controle foi consistente com o equilíbrio de Hardy-Weinberg, com $p=0,093$. Enquanto, a distribuição genotípica dos pacientes não se distribuiu segundo o referido equilíbrio ($p=0,0022$).

De acordo com os dados da distribuição genotípica e alélica do polimorfismo ilustrada na Tabela 5, podemos observar que não houve diferença estatisticamente significativa na frequência dos genótipos do polimorfismo 120 pb no gene *DRD4* entre os grupos estudados, com o genótipo homocigoto selvagem (S/S) em menor proporção, tanto nos alcoolistas (10,49%) como nos controles (7,53%). O genótipo heterocigoto (S/L) apresentou-se em uma proporção intermediária, com 27,27% entre os pacientes e 30,14% nos controles. Todavia, o genótipo homocigoto mutante (L/L) apareceu em maior frequência genotípica, aproximadamente 62,00% entre alcoolistas e controles. Não houve diferença estatisticamente significativa na frequência dos alelos S e L ($p=0,73$). Entretanto, observa-se uma prevalência do alelo L entre os alcoolistas (75,87%) e controles (77,40%).

Tabela 5. Frequência genotípica e alélica dos alcoolistas e controles do polimorfismo de duplicação 120 pb no gene *DRD4*.

Genótipos/Alelos	Alcoolistas Número (%) n= 143	Controles Número (%) n= 146	p*	OR (95% IC)	p
<i>DRD4</i> 120pb					
S/S	15 (10,49)	11 (7,53)	referência	1 (referência)	
S/L	39 (27,27)	44 (30,14)	0,37	0,65 (0,26 -1,58)	0,46
L/L	89 (62,24)	91 (62,33)	0,53	0,71 (0,31- 1,64)	0,56
Alelos					
S	69 (24,13)	66 (22, 60)	referência	1 (referência)	
L	217 (75,87)	226 (77,40)	0,69	0,91 (0,62-1,35)	0,73

p*= teste de probabilidade exato de Fisher; S corresponde ao alelo selvagem (120 pb) e L o alelo mutante (240 pb); OR= *Odds Ratio*; IC= intervalo de confiança; Significância estatística ($p<0,05$).

As características demográficas e clínicas dos participantes em relação a idade, escolaridade, idade de 1º uso, doses por dia, hábito tabagista e histórico familiar estão descritas na Tabela 6.

Os indivíduos do grupo controle apresentaram idade mais avançada em comparação ao grupo alcoolista. A média de escolaridade também foi superior no grupo controle, ambas com diferença significativa ($p < 0,05$). Não houve significância estatística em relação a idade de início do consumo de álcool ($p = 0,77$). Foram significativamente maiores as doses de álcool consumida/dia entre os alcoolistas ($p < 0,05$), esse resultado já era esperado, visto que, os controles não bebem ou o fazem esporadicamente. Levando em consideração as variáveis, o uso do tabaco e o histórico familiar do consumo de álcool entre os grupos, foi verificado uma prevalência significativamente maior entre os alcoolistas, com $p < 0,05$, para ambas características.

Tabela 6. Características demográficas da amostra.

Variável	Alcoolistas Média ± D.P.	Controles Média ± D.P.	IC 95%	p	t
Idade (anos)	40,41(14,38)	54,58 (21,00)	18,35– 9,97	<0,05	6,65
Escolaridade (anos)	6,23(4,48)	12,27(4,59)	8,18– 3,88	<0,05	5,74
Idade 1º uso	14,43(3,68)	14,77(3,23)	2,85 – 2,18	0,77	0,30
Doses por dia**	34,57 (25,58)	2,11 (0,77)	11,86 – 57,27	<0,05	3,01
	Número (%)	Número (%)	Correção de Yates	p*	
Fumantes	81 (56,64)	43 (29,45)	20,70	<0,0001	
Não fumantes	62 (43,35)	103 (70,54)			
Histórico familiar	106 (74,12)	11 (7,53)			
Sem histórico familiar	37(25,87)	135 (92,46)	130,20	<0,0001	

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 ($p < 0.05$).

Diversos fatores estão correlacionados com a síndrome de dependência do álcool, dentre eles o histórico familiar. Diante disso, foi realizada a análise da associação genotípica do grupo dos alcoolistas que mencionaram a ingestão

abusiva de álcool por familiares em comparação aos indivíduos que comunicaram que não possuem familiares dependentes do mesmo. A maior frequência genotípica foi encontrada nos indivíduos homocigotos mutantes com histórico familiar de dependência alcóolica (63,20%) em relação aos que não apresentam parentes alcoolistas (55,89%), a diferença foi estatisticamente insignificante ($p=0,09$). Os dados obtidos do genótipo heterocigoto com histórico familiar (29,24%) e sem histórico na família (23,52%), não foram estatisticamente significantes, com $p=0,11$, conforme descrito na Tabela 7.

Tabela 5. Comparação da frequência do polimorfismo entre os dependentes do álcool com relação ao histórico familiar.

Genótipos	Com Histórico familiar Número (%) n= 106	Sem histórico familiar Número (%) n= 34	OR (IC) 95%	p
120 pb				
S/S	8 (7,54)	7 (20,59)	1 (referência)	
S/L	31 (29,24)	8 (23,52)	3,39 (0.94 – 12.16)	0.11
L/L	67 (63,20)	19 (55,89)	3,08 (0.86 - 8.19)	0.09

S= alelo selvagem; L= alelo mutante; OR= *Odds Ratio*; IC = intervalo de confiança; Significância estatística ($p<0,05$).

Os dados contidos na Tabela 8 evidenciam que não houve significância estatística quando analisada a distribuição genotípica em relação à idade de início da ingestão de álcool pelos alcoolistas, podendo a primeira dose de álcool ter sido consumida até os 13 anos ou igual e superior aos 14 anos de idade. O genótipo L/L se apresentou com maior frequência em ambos os grupos, com 58,62% entre os de idade de início inferior a 14 anos e 62,70% naqueles que iniciaram o consumo a partir dos 14 anos de idade ($p=0,10$). Apesar disso, os dados tenderam a significância para o genótipo S/L em comparação a idade de início do primeiro uso do álcool, com $p=0,08$.

Tabela 6. Frequência dos genótipos e idade do primeiro uso dos alcoolistas para o polimorfismo 120 pb.

Genótipos	Início de uso < 14 anos Numero (%) n= 58	Início de uso > 14 anos Numero (%) n= 81	OR (IC) 95%	P
120 pb				
S/S	10 (17,24)	5 (6,17)	1 (referência)	
S/L	14 (24,14)	25 (30,86)	0,28 (0.94- 12.16)	0.08
L/L	34 (58,62)	51 (62,70)	0,33 (0.99 – 9.60)	0.10

S = alelo selvagem; L = alelo mutante; OR= *Odds Ratio*; IC = intervalo de confiança; Significância estatística ($p<0,05$).

Observando a frequência dos genótipos dos indivíduos alcoolistas e controles relativa ao hábito tabagista (Tabela 9), as diferenças foram estatisticamente insignificantes para o genótipo homocigoto mutante entre os alcoolistas e controles fumantes, com frequência aproximada de 60,00% para os grupos ($p=0,96$). A frequência dos indivíduos heterocigotos alcoolistas (28,39%) e controles (30,23%) fumantes foi sem significância estatística ($p=0,99$). Ao analisar os pacientes e os controles não tabagistas o genótipo L/L não apresentou diferença estatística na distribuição dos genótipos, 64,51% entre os alcoolistas não fumantes e 63,10% para os controles sem este hábito ($p=0,79$). Também não houve significância estatística para o genótipo S/L, visto que a frequência dos alcoolistas não fumantes (25,80%) foi semelhante ao dos controles não fumantes (30,10%), com $p=0,63$.

Tabela 7. Comparação da frequência genotípica entre alcoolistas e controles em relação ao hábito tabagista.

Genótipos	Alcoolistas fumantes Número (%) n= 81	Controles fumantes Número (%) n= 43	OR (95%IC)	P
120 pb				
S/S	9 (11,11)	4 (9,30)	1 (referência)	
S/L	23(28,39)	13 (30,23)	0,78 (0,20 – 3,06)	0,99
L/L	49(60,50)	26 (60,46)	0,83 (0,23 – 2,98)	0,96
Genótipos	Alcoolistas não fumantes Número (%) n= 62	Controles não fumantes Número (%) n= 103	OR (95%IC)	P
120 pb				
S/S	6 (9,67)	7 (6,80)	1 (referência)	
S/L	16 (25,80)	31(30,10)	0,60 (0,17 – 2,09)	0,63
L/L	40 (64,51)	65 (63,10)	0,71 (0,22 – 2,29)	0,79

S = alelo selvagem; L = alelo mutante; OR= *Odds Ratio*; IC = intervalo de confiança; Significância estatística ($p<0,05$).

6. DISCUSSÃO

O presente estudo propôs-se a comparar as distribuições genotípicas e alélicas da população em estudo com outras populações, a análise da duplicação de 120 pb e a dependência ao álcool e coletar informações sobre as características demográficas e clínicas dos voluntários desta pesquisa.

Na comparação das frequências dos genótipos, observamos que no nosso estudo, as frequências genotípicas (S/S= 9,0%, S/L= 29,0% e L/L= 62,0%) são similares às encontradas em outras etnias. Na população global a distribuição do polimorfismo de duplicação 120 pb do gene *DRD4* é muito ampla, variando de acordo com a população e o estudo. Os resultados obtidos foram semelhantes a outras investigações, como na população de caucasianos (Húngaros): 3,0% com genótipo S/S, 28,3% S/L e 68,7% L/L (SZANTAI et al., 2005). Em contrapartida, as frequências encontradas divergiram de estudo africano, americano e asiático. Na população africana, o genótipo L/L se apresenta com menor frequência (16,3%), seguidos do S/S (35,5%) e S/L (48,2%) (SEAMAN et al., 1999). No mesmo trabalho, Seaman e colaboradores avaliaram a população Maia, perfazendo uma frequência de 23,1% (S/S), 26,9% (L/L) e 49,9% (S/L). Enquanto a frequência do genótipo S/S (13,6%) na população chinesa se assemelhou com a população do presente estudo, as distribuições dos outros genótipos não foram equivalentes, tendo como frequência genotípicas de 38,8% para L/L e de 47,6% para S/L (XING et al., 2003).

Com relação aos estudos brasileiros, até o momento foram realizados poucos trabalhos para o polimorfismo de 120 pb no gene *DRD4*. No ano de 2006 no Rio Grande do Sul, Marques e colaboradores avaliaram a relação deste polimorfismo com TDAH. Foram genotipados 538 indivíduos casos/controles (todos brasileiros descendentes de europeus) e encontrou-se uma frequência de 4,7% (S/S), 32,2% (S/L) e 63,1% (L/L). As frequências obtidas aproximaram das observadas neste estudo e compatíveis aos caucasianos. Um segundo trabalho realizado no sudeste do país, no Rio de Janeiro, que investigou também o TDAH, foram genotipados 371 indivíduos e encontrada uma frequência de 60,8%, 38,2% e 1,0% para os genótipos S/S, S/L, L/L, respectivamente (MULLER et al., 2012). Esses resultados foram mais próximos daquele encontrado na população africana e destoantes das observadas em nosso estudo.

A diversidade étnica e racial no Brasil decorre do processo de escravidão e colonização, apresentando graus variados dependendo da região e seus ancestrais. Na região sudeste houve um aumento da contribuição de africanos, particularmente no Rio de Janeiro a população autodeclarada preta é superior à média nacional (IBGE, 2007). Enquanto na região sul do Brasil percebemos maior contribuição da população europeia no processo de colonização (MATTEVI et.al., 2007). A permanência dessas populações nas regiões citadas contribuiu para a formação da etnia da população atual, o que pode justificar a distribuição genotípica encontrada nos trabalhos de Marques (2006) e Muller (2012).

As frequências alélicas para o polimorfismo 120 pb têm sido descritas para populações de diferentes etnias. Nossas frequências alélicas (S=23,0% e L=77,0%) se aproximam dos resultados encontrados no trabalho brasileiro de Marques (2006), citado anteriormente na comparação genotípica, com frequência alélica de 21,0% para o alelo S e 79,0% para o alelo L, não havendo associação positiva entre o polimorfismo 120 pb e o transtorno de déficit de atenção e hiperatividade. Também houve similaridade na distribuição dos alelos nos trabalhos internacionais: Szantai (2005) com 17,1% (S) e 82,9% (L); Mill (2001) 22,0% (S) e 78,0% (L) e Todd (2001) 20,0% (S) e 80,0% (L), todos analisaram diferentes populações caucasianas (húngaros, ingleses e norte-americanos, respectivamente). Apenas Szantai não relacionou com o TDAH, pois o mesmo investigava a validação de métodos de genotipagem. Nos trabalhos de Mill (2001) e Todd (2001) não foram encontradas significância estatística que pudessem associar o polimorfismo com o transtorno.

Seaman e colaboradores (1999) realizaram estudos com diferentes populações avaliando as frequências alélica e genotípica do polimorfismo do gene *DRD4*. Nas populações africana (S=59,6% e L=40,4%) e Maia (S=48,1% e L=51,9%) estas frequências foram divergentes das encontradas no presente trabalho. Podemos notar que, enquanto nestas populações as frequências dos alelos S e L são equivalentes, as do corrente estudo tem uma predominância do alelo mutante. Além disso, na população africana há uma prevalência do alelo selvagem, oposto ao resultado encontrado neste trabalho. As discrepâncias alélicas observadas entre estas populações em comparação as obtidas nesta pesquisa não se restringem apenas aos estudos estrangeiros, mas também a um estudo no sudeste brasileiro.

Muller e colaboradores (2012), verificaram a frequência de 79,9% para o alelo S e de 20,1% para o alelo L na população do Rio de Janeiro. Esta distribuição chegou mais próxima da encontrada no estudo africano (SEAMAN et al., 1999), visto que ambas tiveram uma maior prevalência do alelo selvagem, mas bem diferente do identificado no atual trabalho. Sendo essa frequência alélica de S muito superior às frequências observadas em diversos estudos que avaliaram diferentes etnias no Brasil e no mundo.

Em relação a análise do polimorfismo estudado e a DA, foi notório que a maioria dos estudos publicados que envolvem o gene *DRD4* faz relação com o VNTR 48 pb (MOTA, et al., 2013; RAY, et al., 2008; PARSIAN, et al., 1997; MURAMATSU, et al., 1996), apenas uma pequena parcela estuda a duplicação de 120 pb. Dentro desses poucos estudos, a maior parte associa esse polimorfismo a outras desordens (LI, et al., 2004; ROGERS et al., 2004; XING, et al., 2003), principalmente a TDAH (MARQUES, et al., 2016; TODD, et al., 2001; EL-FADDAGH, et al., 2004; KUSTANOVICH, et al., 2004; MILL, et al., 2001; MCCRACKEN et al., 2000), poucos trabalhos avaliaram a influência da duplicação com o alcoolismo (PRASAD; AMBEKAR; VASWANI, 2013), além disso, estudos demonstram que a presença do TDAH é apontada como fator de risco para o desenvolvimento do alcoolismo (OHLMEIR, et al., 2008). Sabendo que a população brasileira supera a média mundial no consumo de álcool (WHO, 2014) e que entender os mecanismos fisiopatológicos possivelmente trará benefícios para o diagnóstico e tratamento dessa enfermidade, avaliamos a associação do polimorfismo 120 pb do gene *DRD4* com a dependência do álcool.

Alguns trabalhos sugerem que o polimorfismo de 120 pb da região promotora do gene *DRD4* pode modificar a suscetibilidade do indivíduo ao TDAH (KUSTANOVICH, et al., 2004; MCCRACKEN et al., 2000) e ao alcoolismo (PRASAD; AMBEKAR; VASWANI, 2013), pois pressupõe-se ter influência nos níveis de transcrição, estando o alelo L associado a uma diminuição da densidade de receptores nas áreas de recompensa cerebral, principalmente no núcleo *accumbens*, provocando acúmulo de cAMP nas regiões de recompensa do cérebro, deixando este sistema bastante sensível a situações que causam sensação de prazer. Além do mais, o álcool tornar-se fortemente agregado a sensação prazerosa e essa memória pode ser evocada com facilidade, causando

um desejo forte e incontrolável em busca da substância (TAPERT, et al., 2004). No entanto, nossos resultados não indicam que o alelo 240 pb esteja associado a uma maior suscetibilidade ao alcoolismo. Da mesma forma que a maioria dos estudos que tentaram associar este polimorfismo com TDAH (FRANK et al., 2004; KIRLEY et al., 2004; BARR et al., 2001c; TODD et al., 2001b).

Mill e colaboradores (2001) realizaram um trabalho na população inglesa que avaliou a associação dos polimorfismos de duplicação 120 pb, os SNPs -616 C/G e -512 C/T (ambos na região promotora), a repetição poli-G (intron 1) e o VNTR de 48 pb do éxon III, todos do gene *DRD4*. Os resultados sugeriram que o envolvimento dos alelos L (duplicação 120 pb), C (-616 C/G) e C (-512 C/T) da região promotora pode conferir suscetibilidade com TDAH, contudo, quando a avaliação destes polimorfismos foi realizada individualmente não se observou nenhuma associação com o transtorno. Como o nosso estudo analisou apenas o polimorfismo 120 pb de maneira isolada, não foi constatada associação com a SDA. Desta forma, possivelmente uma investigação conjunta com outros polimorfismos da região promotora desse gene poderia fornecer uma associação positiva para o alcoolismo.

Em 2004 Arcos-Burgos também pesquisando o TDAH, procurava encontrar uma possível ligação entre a desordem e os polimorfismos do gene do *DRD4* (repetição de 120 pb e VNTR 48 pb). Seu estudo revelou uma associação positiva entre a combinação dos alelos L e 7R com a predisposição ao TDAH em uma população derivada da Colômbia. Deste modo, uma avaliação da interação desses dois polimorfismos poderia proporcionar uma possível predisposição ao alcoolismo, visto que, ambos influenciam na taxa de acúmulo de cAMP no núcleo accumbens.

Resultados semelhantes aos encontrados por Arcos-Burgos (2004b) sobre a associação do VNTR 48 pb com a predisposição ao TDAH, foram equivalentes aos obtidos em diferentes populações, tais como irlandesa, americana, alemã, brasileira e canadense (BELLGROVE, et al., 2005c; LANGLEY, et al., 2004; SEEGER, et al., 2004; ROMAN, et al., 2001; MUGLIA, et al., 2000; LOHOSTE, et al., 1996). Todos associaram a variante de 7 repetições com o transtorno, uma vez que em comparação aos alelos 2R e 4R, esse alelo tem uma capacidade de dobramento cerca de 2-3 vezes inferior para o acoplamento da dopamina e Adenil ciclase, ou seja, produziria uma proteína com resposta a dopamina diminuída

(ASGHARI, et al., 1995; VAN TOL, et al., 1992). Simpson e colaboradores (2010) pesquisando a expressão de mRNA dos polimorfismos VNTR 48 pb e da duplicação 120 pb em tecido do córtex cerebral coletados *post-mortem*, verificaram uma expressão diminuída de mRNA em indivíduos que possuíam pelo menos uma variante de 7R em comparação aos indivíduos com a ausência deste alelo. Da mesma forma que o genótipo L/L em comparação ao heterozigoto do polimorfismo 120 pb. Apesar de ambas as expressões não terem sido estatisticamente significantes, esses resultados corroboram com os achados na literatura (D' Souza et. al., 2004) pois mais uma vez mostram que a taxa de mRNA é afetada pela presença do alelo L do polimorfismo de 120 pb e do alelo D4.7 do VNTR 48 pb.

Evidências mostram que o VNTR 48 pb podem modular o comportamento compulsivo de busca ao álcool nos indivíduos que sofrem com abuso desta substância (CERQUEIRA, et al., 2008), pois trabalhos demonstram que portadores dos alelos longos (> 7 repetições) aumenta significativamente o desejo e consumo de álcool, comparados aos indivíduos homozigotos para os alelos curtos, menor que 7R (MACKILLOP et al. 2007; McGEARY, et al., 2006; HUTCHISON, et al., 2002). Como nos embasamentos propostos pela literatura, o alelo mutante do polimorfismo 120 pb pode resultar em praticamente o mesmo efeito no processo de recompensa cerebral, indivíduos com esse polimorfismo pode ter uma tendência maior na procura pelo álcool.

Tanto quanto sabemos, o trabalho de Prasad (2013) na população indiana foi o único que associou o polimorfismo de 120 pb no gene *DRD4* a DA, além disso, os resultados mostraram uma associação positiva a essa desordem. A frequência do alelo S entre os alcoolistas foi 28,0% e nos controles 45,0%, enquanto o alelo mutante apresentou frequência entre os casos de 72,0% e nos não alcoolistas de 55,0%, havendo uma diferença estatisticamente significante, sugerindo que o alelo de 240 pb confere aproximadamente duas vezes maior risco ao desenvolvimento do alcoolismo em comparação ao grupo controle. Porém, essa população não obedeceu ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, precisando ser interpretado com cautela esses resultados.

Diferente dos resultados propostos por Prasad e colaboradores (2013), no presente trabalho as frequências alélicas entre alcoolistas e controles não divergiram estatisticamente, tendo sido a frequência do alelo S 24,1% e 22,6%

entre os alcoolistas e controles, nesta ordem. Em relação ao alelo L a frequência foi 75,8% entre os dependentes do álcool e 77,4% entre os controles ($p=0,73$). De fato, no presente trabalho, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre as frequências alélicas dos casos e dos controles analisados, não demonstrando uma associação entre o polimorfismo 120 pb do gene que codifica o receptor D4 e a suscetibilidade ao desenvolvimento da dependência do álcool.

Entendemos que as conclusões aqui obtidas apontam para existência de diferenças nos resultados, possivelmente, fatores como: 1) metodologia utilizada na pesquisa: pois alguns dos estudos que evidenciaram associação desse polimorfismo com outras desordens foi realizado pelo método de teste de desequilíbrio de transmissão (KUSTANOVICH et al., 2004; MCCRACKEN et al., 2000); 2) pelas variações nas frequências alélicas: ligado diretamente as diferentes etnias, por exemplo, na população brasileira a alta miscigenação pode ter influência nas diversas distribuições alélicas encontradas dentro da própria população (MULLER et al., 2012; MARQUES et al., 2006) e 3) tamanho da amostra: quanto maior o número amostral mais representativo será a população.

Tratando-se da análise das características demográficas, os dados mostram que a idade média do grupo controle foi de aproximadamente 54 anos, enquanto dos alcoolistas, 40 anos, com a diferença das idades estatisticamente significativamente ($p<0,05$). Estes dados são condizentes com os publicados pelo Estudo Epidemiológico Nacional Sobre Álcool e Condições Relacionadas (*National Epidemiologic Survey of Alcohol and Related Conditions – NESARC, 2002*), mostrando que à medida que a idade avança, a frequência de ingestão de álcool diminui em 50% em relação ao consumo do ano anterior entre indivíduos de 45-64 anos em comparação com aqueles entre 18-29 anos. A maior prevalência entre os jovens pode ser ainda explicada por meio do grande apelo das propagandas sobre o uso de tal substância e pelo fato do consumo sociável do álcool ser aceita e estimulada em diversos países do mundo, implicando no aumento das chances desse grupo a tornar-se dependente do álcool (MALTA et al., 2014).

Com relação ao grau de escolaridade, a amostra estudada apresentou diferença significativa entre o nível de escolaridade nos dois grupos, revelando que os alcoolistas possuem menor nível de escolaridade em comparação aos controles. Esses dados são compatíveis aos demonstrados na literatura, pois os maiores

índices de dependência alcoólica pertencem às classes sociais com baixo grau de instrução e que pode ser um elemento importante no envolvimento de pessoas com o uso nocivo do álcool (ABREU et al., 2012; DA COSTA et al., 2004; PRIMO; STEIN, 2004;). Os padrões culturais onde estão inseridos esses indivíduos e outras características socioeconômicas podem influenciar a prática do uso abusivo do mesmo (BARROS et al., 2007).

Embora o uso excessivo do álcool prejudique o funcionamento do cérebro, cada indivíduo apresenta níveis diferentes de comprometimento cerebral. A diversidade dos fatores modeladores, são em certos casos os responsáveis por essas variações nos efeitos do consumo abusivo desta substância. Alguns dos fatores modeladores são: sexo, padrões de consumo, existência de outros transtornos psiquiátricos, duração da abstinência, além da influência genética (avaliada pelo o histórico familiar), uso simultâneo de outras drogas e idade de início do desenvolvimento da dependência (TAPERT, et al., 2004). Desta forma, nesta investigação avaliamos o histórico familiar, para demonstrar a importância da genética, o consumo de outra droga (no caso o cigarro) e idade do primeiro uso, em vez de analisar a idade de início da dependência do álcool.

Teorias acerca da dependência mostram que quanto mais precocemente se faz o uso do álcool, maiores são as chances de tornar-se dependente. Estudos sugerem que só a partir dos 21 anos o cérebro humano completa o seu desenvolvimento total, e que antes disso, está sujeito a alterações bioquímicas permanentes decorrentes da exposição precoce ao álcool, influenciando negativamente no desenvolvimento intelectual do indivíduo e principalmente tornando-o mais susceptível a desenvolver a DA (TAPERT, et al., 2004). Entretanto, nossos dados não condizem com esses relatos, uma vez que a idade que os indivíduos fizeram a ingestão de sua primeira dose não divergiu significativamente entre os controles e os que fazem uso abusivo do álcool ($p > 0,05$). Sugere-se que um estudo com maior número amostral proporcionasse associação equivalente com os encontrados na literatura.

De acordo com a análise genotípica e a idade de primeiro uso, não houve diferença significativa entre os genótipos e a idade de primeiro uso do álcool entre os dependentes, apesar do genótipo homozigoto mutante (L/L) ter se mostrado com maior frequência entre os indivíduos acima de 14 anos, sugerindo que não há

influência do polimorfismo 120 pb no gene *DRD4* com início do hábito alcoolista. Em parte, esse resultado pode ser comparado com o trabalho de Demir e colaboradores (2002), que utilizando técnica de imagem para medir o fluxo sanguíneo nas regiões cerebrais, buscavam examinar os efeitos da idade de início da DA. Foram agrupados os alcoolistas em dois grupos, de início precoce (<20 anos) e início tardio (>20 anos), assim como os participantes controles. Descobriram que houve prejuízo funcional neuropsicológico e diminuição do fluxo sanguíneo nas regiões frontais superiores esquerdas em ambos os grupos de alcoolistas comparado com os indivíduos controles. Os achados revelam que o início precoce do abuso de álcool não é mais danoso para o funcionamento cerebral do que o início tardio, uma vez que não houve diferença significativa entre as medidas de fluxo sanguíneo e o desempenho neuropsicológico entre os alcoolistas de início precoce e de início tardio. Independente do estudo não ter analisado fatores genéticos, é importante compreender os efeitos que podem ou não estar associado com a idade de início da dependência. Da mesma forma que Demir e colaboradores não encontraram uma relação entre os efeitos com a idade de início da dependência, nossa investigação não obteve uma associação do polimorfismo de 120 pb com a idade da primeira dose.

O consumo de álcool também está associado a outras dependências, como o tabagismo (CASTRO et al., 2008). Em nosso estudo, a associação entre alcoolistas e o hábito tabagista foi significativa (<0,0001). Segundo a *AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION* (ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE PSIQUIATRIA) (1996), cerca de 15 a 20% dos indivíduos que fumam apresentam predisposição a desenvolver a DA. O consumo de ambas as substâncias pode estar correlacionado porque normalmente consumidores de álcool fumam, e o uso do álcool e do tabaco são feitos concomitantemente (LEON et al., 2007; SHIFFMAN; BALABANIS, 1995).

Várias razões têm feito com que a combinação de álcool e cigarro seja estudada, entre elas: o fato de muitos dependentes alcóolicos vir a óbito por doenças relativas ao fumo; o hábito de fumar pode ser considerado um marcador para o abuso do álcool (HUGHES, 1995); o uso simultâneo dessas duas drogas está relacionado a um aumento expressivo nos índices de câncer orofaríngeos (BOBO, 1989) e a suspensão de uma delas pode significar a interrupção da outra (LEON et al., 2007). Desta forma, é possível inferir que esta relação pode ser

explicada por fatores genéticos, farmacológicos, culturais, entre outros (ROOM et al., 2004; NIAURA; SHIFFMAN, 1995; BIEN; BURGE, 1990).

Todavia a análise da comparação das frequências genótípicas e o hábito tabagista não foi evidenciada significância estatística que associe os genótipos analisados ao uso do cigarro. Não foram encontradas na literatura pesquisas com o polimorfismo 120 pb do gene *DRD4* associado com o hábito tabagista. Aqueles que fazem tal associação com o gene *DRD4* utilizam o polimorfismo VNTR 48 pb mostrando associação positiva em homens, mas não em mulheres (LAUCHT et al., 2004) e em afrodescendentes, mas não em caucasianos (SHIELDS et al., 1998). Diante disso, os estudos são controversos com relação ao gene (e seus polimorfismos) e o hábito tabagista. Em suma, a distribuição dos genótipos S/S, S/L e L/L do polimorfismo 120 pb do gene *DRD4* não diferiu entre pacientes e controles, nem se encontrou qualquer associação entre o genótipo e os indicadores de gravidade da doença ou história de tabagismo.

Dados da literatura evidenciam que famílias com indivíduos que fazem uso excessivo do álcool, pode estar associado como um fator de risco para que as futuras gerações tenham tendências ao vício (EDWARDS, MARSHALL E COOK, 2005). Fato este corroborado com os dados do presente estudo, que se verificou uma grande prevalência de parentes biológicos com os dependentes do álcool. É possível observar que a dependência alcóolica tem um caráter familiar, visto que, familiares que fazem uso abusivo do álcool têm uma frequência significativamente maior ($<0,0001$) de dependência do que em parentes de não dependentes do álcool. Estudos mostram a relevância dos fatores hereditários na predisposição a tal transtorno. A complexa interação dos fatores genéticos, psicossociais e culturais são os causadores do desenvolvimento da compulsão pelo álcool (MESSAS; VALLADA FILHO, 2004).

No histórico familiar foi perguntado aos pacientes sobre sua família em relação as condições envolvendo o consumo do álcool. Nesta variante notou-se uma ausência de associação entre os genótipos do polimorfismo estudado e o histórico familiar, levando em consideração a análise apenas entre os alcoolistas. Porém, nossos resultados sugerem uma tendência, ainda que não estatisticamente significativa, de que o genótipo homozigoto mutante ($p=0,09$) seja mais representado no grupo de pacientes com história familiar.

Dentro deste contexto, sugere-se que novas pesquisas que visam o entendimento da fisiopatologia seja o quesito para avanço de efetivas estratégias de prevenção e tratamento da DA, especialmente em nossa população em que o uso abusivo do álcool vem crescendo consideravelmente. Talvez devido ao tamanho das amostras e a estratificação populacional ser tão diferente entre os grupos estudados os resultados tenham sido contraditórios, recomendamos uma análise com maior número amostral que as publicadas até o presente momento para a confirmação desses resultados e o esclarecimento do papel do gene *DRD4* no risco da DA e na determinação dos fatores que influenciam na sua gênese.

7. CONCLUSÃO

Nesta investigação observou-se a distribuição das frequências alélicas (S=23,0% e L=77,0%) e genóticas (S/S= 9,0%; S/L= 29,0% e L/L= 62,0%) semelhante das populações caucasianas: húngaros, ingleses, norte-americanos e brasileira. E diferentes das encontradas nas populações chinesa, maia e africana.

Após a interpretação dos resultados das frequências dos alelos e dos genótipos avaliados não foi verificada uma associação positiva entre o alcoolismo e o polimorfismo de 120 pb da região promotora do gene *DRD4*, pois não foi observada diferença significativa entre as frequências dos indivíduos com SDA e os controles. Logo, o presente estudo sugere que a suscetibilidade ou a proteção contra o alcoolismo não tem influência deste polimorfismo.

Nossos resultados demonstraram que o uso abusivo do álcool pode estar relacionado com o hábito tabagista e ao histórico familiar, em razão da observação de uma significância entre a DA e essas variantes. Mas, não estando ligado o desenvolvimento da DA com a idade do primeiro uso do álcool. Além disso, foi inexistente a prevalência significativa dos genótipos desse polimorfismo com estas características demográficas analisadas. No entanto, ainda que não significativa, houve uma tendência do genótipo L/L nos alcoolistas com história familiar.

Embora este estudo tenha limitações que dificultam deduções concludentes sobre o real significado desses achados, como por exemplo o número amostral, abrem-se novas possibilidades para o estudo da fisiopatologia da dependência do álcool. Estudos adicionais são necessários uma vez que esta investigação é pioneira nesta população do nordeste piauiense, sendo importante para o levantamento da frequência deste gene nesta população e a busca da possível relação com a DA.

8. REFERÊNCIAS

ABREU, Ângela Maria Mendes et al. Consumo nocivo de bebidas alcoólicas entre usuários de uma Unidade de Saúde da Família. **CEP**, v. 20211, p. 110, 2012.

AGUIRRE-SAMUDIO, A J.; NICOLINI, H. El gen receptor a dopamina D4 y su asociación con los trastornos mentales. **Revista de investigación clínica**, v. 57, n. 1, p. 65-75, 2005.

ARCOS-BURGOS, M. et al. Pedigree disequilibrium test (PDT) replicates association and linkage between *DRD4* and ADHD in multigenerational and extended pedigrees from a genetic isolate. **Molecular psychiatry**, v. 9, n. 3, p. 252-259, 2004.

ASGHARI, V. et al. Dopamine D4 receptor repeat: analysis of different native and mutant forms of the human and rat genes. **Mol Pharmacol**, v. 46, p. 364–373, 1994.

ASGHARI, V. et al. Modulation of intracellular cyclic AMP levels by different human dopamine D4 receptor variants. **Journal of neurochemistry**, v. 65, p. 1157-1165, 1995.

AYRES, M., AYRES JÚNIOR, M., AYRES, D.L. & SANTOS, A.A. 2007. BIOESTAT. Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas. **Ong Mamiraua**. Belém, PA.

BARR, C. L. et al. 5'-untranslated region of the dopamine D4 receptor gene and attention-deficit hyperactivity disorder. **Am J Med Genet**, v. 8, n. 105, p. 84-90, 2001.

BARR, C. L. et al. 5'-Untranslated region of the dopamine D4 receptor gene and attention-deficit hyperactivity disorder. **American journal of medical genetics**, v. 105, n. 1, p. 84-90, 2001c.

BARROS, Marcelle Aparecida de; PILLON, Sandra Cristina. Atitudes dos profissionais do Programa Saúde da Família diante do uso e abuso de drogas. **Esc Anna Nery**, v. 11, n. 4, p. 655-62, 2007.

BELLGROVE, M. A. et al. *DRD4* gene variants and sustained attention in attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): effects of associated alleles at the VNTR and-521 SNP. **American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics**, v. 136, n. 1, p. 81-86, 2005c.

BIEN, T. H. ;BURGE, R. Smoking and drinking: a review of the literature. **The International Journal of the Addictions**. 25,1429–1454, 1990.

BOBO, J. K. Nicotine dependence and alcoholism epidemiology and treatment. **Journal of Psychoactive Drugs** 21,323–329,1989.

BOHMAN, M. Some genetic aspects of alcoholism and criminality. **Archives of General Psychiatry**, v. 35, p. 269- 276, 1978.

BRADY, Scott et al. **Basic neurochemistry: principles of molecular, cellular, and medical neurobiology**. Academic Press, p. 243- 262, 2011.

BRITANNICA ACADEMIC. "**Alcohol**". Disponível em: <<http://global.britannica.com/science/alcohol>>. Acessado em: 08/11/2015.

CADORET, R.; GATH, A. Inheritance of alcoholism in adoptees. **The British Journal of Psychiatry**, v. 132, p. 252- 258, 1978.

CARLINI, E. A. et al. I Levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 107 maiores cidades do país. **São Paulo: Cebrid/Unifesp**, 2002.

CARLINI, E. A. et al. II Levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país: 2005 - **São Paulo: Cebrid/Unifesp**, 2006.

CASTELLANOS, F. X. et al. Lack of an association between a dopamine-4 receptor polymorphism and attention-deficit/hyperactivity disorder: genetic and brain morphometric analyses. **Molecular psychiatry**, v. 3, n. 5, p. 431-434, 1998.

CENTER FOR SUBSTANCE ABUSE TREATMENT. Chapter 2 How Stimulants Affect the Brain and Behavior. 1999.

CERESÉR, M.; VIANNA, R. Neurotransmissores. In: Kapzinski F, Quevedo J and Izquierdo. 1ª ed. **Bases biológicas dos transtornos psiquiátricos**, Editora Artmed, porto Alegre, pp 35-52. 2004.

CERQUEIRA, et al. Genes Que Modulam A Susceptibilidade À Dependência Ao Alcool. **Rev.Saúde**. 4(1): 50-56, 2008.

CHARNESS, M. E. Alcohol and the brain. **Alcohol Health & Research World**, v. 14, n. 2, p. 85-90, 1990.

CHOI, K. H.; WHISLER D.L.; GRAHAM, D. L.; SELF, D. W. Antisenseinduced reduction in nucleus accumbens cyclic AMP response element binding protein attenuates cocaine reinforcement. **Neurosci**, v. 137, p. 373–383, 2006

CLONINGER, C. R. Neurogenetic adaptative mechanisms in alcoholism. **Science**, v. 236, p. 410-416, 1987.

COMINGS; D. Why different rules are required for polygenic inheritance: Lessons from studies of the DRD2 gene. **Alcohol**, v. 16, n. 1, p. 61-70, 1998.

COROMINAS, R. M.; RONCERO A. C.; CASAS B. M. El Sistema dopaminérgico em las adicciones. **Investigación Y Ciencia**, n. 35, 2009.

COSTA, J. S. et al. Heavy alcohol consumption and associated factors: a population-based study. **Revista de saúde pública**, v. 38, n. 2, p. 284-291, 2004.

CRADDOCK, N.; MCGUFFIN, P. Approaches to the genetics of affective disorders. **Ann. Med**, v. 25, p. 317-322, 1993.

CUNNINGHAM, C. C.; VAN, C. G. H. Energy availability and alcohol-related liver pathology. **Alcohol Research and Health**, v. 27, p. 291-299, 2003.

D'SOUZA, M.S. et al. Chronic D1 agonist and ethanol coadministration facilitate ethanol-mediated behaviors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* v. 76, p. 335–342, 2003.

D'SOUZA, U. M. et al. Functional effects of a tandem duplication polymorphism in the 5' flanking region of the *DRD4* gene. **Biological psychiatry**, v. 56, n. 9, p. 691-697, 2004.

DE CASTRO, Márcia Regina Pizzo et al. A dependência da nicotina associada ao uso de álcool e outras substâncias psicoativas. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, v. 29, n. 2, p. 131-140, 2008.

DE LEON, Jose et al. Association between smoking and alcohol use in the general population: stable and unstable odds ratios across two years in two different countries. **Alcohol and Alcoholism**, v. 42, n. 3, p. 252-257, 2007.

DEMIR, B. et al. Regional cerebral blood flow and neuropsychological functioning in early and late onset alcoholism. **Psychiatry Research: Neuroimaging**, v. 115, n. 3, p. 115-125, 2002.

DI CHIARA, G. The role of dopamine in drug abuse viewed from the perspective of its role in motivation. **Drug and alcohol dependence**, v. 38, n. 2, p. 95-137, 1995.

DING, Y. C.; CHI, H. C.; GRADY, D. L. Evidence of positive selection acting at the human dopamine receptor D4 gene locus. **Proc Natl Acad Sci**, v. 99, p. 309-314, 2002.

EBSTEIN, R. P. et al. Dopamine D4 receptor (D4DR) exon III polymorphism associated with the human personality trait of novelty seeking. **Nature genetics**, v. 12, n. 1, p. 78-80, 1996.

EDENBERG, H. J. The genetics of alcohol metabolism: Role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase variants. **Alcohol Research & Health**, v. 30, p. 5-13, 2007.

EDWARDS, G.; MARSHALL, E.J.; COOK, C.C.H. **O Tratamento do alcoolismo: um guia para profissionais da saúde**. 4^a ed. Porto Alegre: Artmed. 2005.

EL-FADDAGH et al. Association of dopamine D4 receptor (*DRD4*) gene with attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) in a high-risk community sample: a longitudinal study from birth to 11 years of age. **J Neural Transm** 111:883-9, 2004.

ERJAVEC, G. N. et al. Association of gene polymorphisms encoding dopaminergic system components and platelet MAO-B activity with alcohol dependence and alcohol dependence-related phenotypes. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 54, p. 321-327, 2014.

FRANK Y, et al. Dopamine D4 receptor gene and attention deficit hyperactivity disorder. **Pediatr neurol.** 31:345-8, 2004.

GELERNTER, J. et al. The D4 dopamine receptor (*DRD4*) maps to distal 11p close to HRAS. **Genomics**, v. 13, p. 208-210, 1992.

GEORGE, S. R. et al. Polymorphisms of the D4 dopamine receptor alleles in chronic alcoholism. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 196, n. 1, p. 107-114, 1993.

GIGLIOTTI, A.; BESSAB, M. A. Síndrome de Dependência do Álcool: critérios diagnósticos Alcohol Dependence Syndrome: diagnostic criteria. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 26, p. 11-13, 2004.

GIGLIOTTI, M., et al. Principais mecanismos de atuação do álcool no desenvolvimento do câncer oral. **Clín.-Científ**, v. 7, p.107-112, 2008.

GILPIN, N. W.; KOOB, G. F. Neurobiology of alcohol dependence: focus on motivational mechanisms. **Alcohol research & health: the journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism**, v. 31, n. 3, p. 185, 2008.

GOEDDE, H. W.; HARADA, S.; AGARWAL, D. P. Racial differences in alcohol sensitivity: a new hypothesis. **Human Genetics**, v. 51, n. 3, p. 331-334, 1979.

GOLDMAN, D. Candidate genes in alcoholism. **Clin. Neurosci**, v. 3, p. 174–181, 1995.

GOODWIN, D. W. Alcohol problems in adoptees raised apart from alcoholic biological parents. **Archives of General Psychiatry**, v. 28, p. 238-243, 1973.

GRANT, K. A.; HOFFMAN, P. L.; TABAKOFF, B. Neurobiological and behavioral approaches to tolerance and dependence. In: **The nature of dependence**. Oxford University Press Oxford, p. 135-169, 1990.

GRICE, D. E. et al. Linkage disequilibrium between an allele at the dopamine D4 receptor locus and Tourette syndrome, by the transmission-disequilibrium test. **American journal of human genetics**, v. 59, n. 3, p. 644, 1996.

GRZYWACZ, A. et al. Family-based and case-control study of glutamate receptor GRIK3 Ser310Ala polymorphism in alcohol dependence. **Eur. Addict. Res.**, v. 19, p. 55–59, 2012.

GUILHERME, P. M.; HOMERO, P. V. F. The role of genetics in alcohol dependence. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 26, p. 54-58, 2004.

HATTORI, E. Variable number of tandem repeat polymorphisms of *DRD4*: re-evaluation of selection hypothesis and analysis of association with schizophrenia. **Eur J Hum Genet**, v.17, n. 6, p. 793-801, 2009.

HAWI, Z. et al. No association of the dopamine *DRD4* receptor (*DRD4*) gene polymorphism with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) in the Irish

population. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 96, n. 3, p. 268-272, 2000.

HECKMANN, W.; SILVEIRA, C. M. Dependência do álcool: aspectos clínicos e diagnósticos. **Álcool e suas consequências: uma abordagem multiconceitual**, p. 67-87, 2009.

HILLER-STURMHFEL, S. Signal transmission among nerve cells. *Alcohol Health and Research World*.19(2):128, 1995.

HOFFMANN, M. H. et al. Álcool e segurança - epidemiologia e efeitos. **Psicologia: ciência e profissão**, v.6, n. 1, 1996.

HUGHES, J. R. Clinical implications of the association between smoking and alcoholism. In **Alcohol and Tobacco: From Basic Science to Clinical Practice, NIH Publication 95-397**, Ferting, J. B., Allen, J. P. eds, pp. 171–181, 1995.

HURLEY, T. D.; EDENBERG, H. J.; LI, T. K. **Pharmacogenomics: The Search for Individualized Therapies**. The pharmacogenomics of alcoholism. In: Weinheim, Germany: Wiley-VCH, p. 417–441, 2002.

HUTCHINSON, K. E. et al. The *DRD4* VNTR polymorphism moderates craving after alcohol consumption. **Health Psychology**, v. 21, n. 2, p. 139, 2002.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Características Étnico-Raciais da População - um estudo das categorias de classificação de cor ou raça 2008**. Rio de Janeiro: IBGE, 2011.

IBGE-Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Estudos Sociodemográficos E Análises Espaciais Referentes Aos Municípios Com A Existência De Comunidades Remanescentes De Quilombos**. Rio de Janeiro: IBGE, 2007

ISERI, O. A.; GOTTLIEB, L. S.; LIEBER, C. S. The ultrastructure of fatty liver induced by prolonged ethanol ingestion. **The American journal of pathology**, v. 48, p. 535-555, 1966.

JONES, H.M; PILOWSKY, L.S. Dopamine and antipsychotic drug action revisited. **The Royal College of Psychiatrists**, v. 181, p. 271-175, 2002.

JOVANOVIC, V.; GUAN, H. C., VAN, T. H. Comparative pharmacological and functional analysis of the human dopamine D4.2 and D4.10 receptor variants. **Pharmacogenetics**, v. 9, p. 561-568, 1999.

JÚNIOR, A. A. J., et al. Peroxidação lipídica e etanol: Papel da Glutathione reduzida e da vitamina E. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 31, p. 434-449, 1998.

KACHANI, A. T. et al. O impacto do consumo alcoólico no ganho de peso. **Revista de Psiquiatria Clínic**, v. 35, p. 21-24, 2008.

KEBABIAN, J. W.; CALNE, D. B. "Multiple receptors for dopamine." **Nature**, v. 277, p. 93-99, 1979.

KENDLER, K. S. A twin-family study of alcoholism in women. **American Journal of Psychiatry**, v. 151, p. 707-715, 1994.

KIM, Y. S.; LEVENTHAL, B. L.; KIM, S. J. Family-based association study of DAT1 and *DRD4* polymorphism in Korean children with ADHD. **Neurosci Lett**, v. 390, p. 176–181, 2005.

KIRLEY, A. et al. Phenotype studies of the *DRD4* gene polymorphisms in ADHD: association with oppositional defiant disorder and positive family history. **American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics**, v. 131, n. 1, p. 38-42, 2004.

KITAYAMA, S. et al. The dopamine D4 receptor gene (*DRD4*) moderates cultural difference in independent versus interdependent social orientation. **Psychological Science**, v. 25, n. 6, p. 1169-1177, 2014.

KITSON, K. E.; WEINER, H. Ethanol and acetaldehyde metabolism: past, present and future. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 20, p.82A-92A, 1996.

KNAPP, C. M.; LEE, K.; FOYE, M.; CIRAULO, D. A.; KORNETSKY, C. Additive effects of intra accumbens infusion of the cAMP-specific phosphodiesterase inhibitor, rolipam, and cocaine on brain stimulation reward. **Life Sci**, v. 69, p.1673–1682, 2001.

KONO, Y. et al. Association between early-onset alcoholism and the dopamine D2 receptor gene. **American journal of medical genetics**, v. 74, n. 2, p. 179-182, 1997.

KOOB, G. F.; BLOOM, F. E. Cellular and molecular mechanisms of drug dependence. **Science**, v. 242, p. 715–723, 1988.

KUSTANOVICH, V. et al. Transmission disequilibrium testing of dopamine-related candidate gene polymorphisms in ADHD: confirmation of association of ADHD with *DRD4* and *DRD5*. **Molecular psychiatry**, v. 9, n. 7, p. 711-717, 2004.

LAHOSTE, G. J. et al. Dopamine D4 receptor gene polymorphism is associated with attention deficit hyperactivity disorder. **Molecular psychiatry**, v. 1, n. 2, p. 121-124, 1996.

LANGLEY, K. et al. Association of the dopamine D4 receptor gene 7-repeat allele with neuropsychological test performance of children with ADHD. **American Journal of Psychiatry**, v. 161, n. 1, p. 133-138, 2004.

LARANJEIRA, R. et al. Consenso sobre a Síndrome de Abstinência do Álcool (SAA) e o seu tratamento. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 22, n. 2, p. 62-71, 2000.

LASKER J. M. et al. Purification and characterization of human liver cytochrome P-450- ALC. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 148, p. 232-238, 1987.

LAUCHT M, et al. Maternal smoking during pregnancy: risk factor for ADHD in the offspring? **Z kinder jugendpsychiatr psychother** 32:177-85, 2004.

LEE, M. S.; RYU, S. H. No association between the dopamine D3 receptor gene and Korean alcohol dependence. **Psychiatr Genet**, v. 12, n. 3, p. 173–176, 2002.

LI, D. et al. Meta-analysis shows significant association between dopamine system genes and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). **Hum Mol Genetics**, v. 15, p. 84, 2006.

LIEBER, C. E.; ABITTAN, C. Pharmacology and metabolism of alcohol, including its metabolic effects and interactions with other drugs. **Clin Dermatol**, v. 17, p. 365-379, 1999.

LIEBER, C. S. Microsomal Ethanol-Oxidizing System (MEOS): The First 30 Years (1968-1998)—A Review. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 23, n. 6, p. 991-1007, 1999.

LINHARES, I. M.; GIRALDO, P. C.; BARACAT, E. C. Vaginal bacterial flora: up to date. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 3, p. 370-374, 2010.

LIVER PATHOLOGY. **Alcohol Res Health**, v. 27, p. 291-299, 2003.

LOWE, N. et al. Multiple marker analysis at the promoter region of the *DRD4* gene and ADHD: Evidence of linkage and association with the SNP_616. **AmJ Med Genet Part**, v. 131, p. 33-37, 2004.

LUSHER, J. M.; CHANDLER, C.; BALL, D. Dopamine D4 receptor gene (*DRD4*) is associated with Novelty Seeking (NS) and substance abuse: the saga continues. **Molecular psychiatry**, 2001.

MACKILLOP, J. et al. Effects of craving and *DRD4* VNTR genotype on the relative value of alcohol: an initial human laboratory study. **Behavioral and Brain Functions**, v. 3, n. 1, p. 11, 2007.

MAFFEI, F. Biomarkers to assess the genetic damage induced by alcohol abuse in human lymphocytes. **Mutation Research**. v. 514, p. 49-58, 2002.

MALTA, D. C. et al. Consumo de álcool entre adolescentes brasileiros segundo a Pesquisa Nacional de Saúde Escolar (PeNSE 2012). **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 17, n. supl 1, p. 203-214, 2014.

MANKI, H. et al. Dopamine D2, D3 and D4 receptor and transporter gene polymorphisms and mood disorders. **Journal of affective disorders**, v. 40, n. 1, p. 7-13, 1996.

MARQUES, F. Z. C. **Polimorfismos nos genes DAT1 e DRD4 e transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) em adultos**. 2006. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

MATTEVI, V. S.; ZEMBRZUSKI, V. M.; HUTZ, M. H. Effects of a PPARG gene variant on obesity characteristics in Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, n. 7, p. 927-932, 2007.

MCCRACKEN, J. T. et al. Evidence for linkage of a tandem duplication polymorphism upstream of the dopamine D4 receptor gene (*DRD4*) with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). **Molecular psychiatry**, v. 5, n. 5, p. 531-536, 2000.

MCGEARY, J. E. et al. Genetic moderators of naltrexone's effects on alcohol cue reactivity. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 30, n. 8, p. 1288-1296, 2006.

MCGUE, M: The behavioral genetics of alcoholism. **Current Directions in Psychological Science**, v. 8, p. 109–115, 1999.

MCKINNEY, E. F. et al. Association between polymorphisms in dopamine metabolic enzymes and tobacco consumption in smokers. **Pharmacogenetics**, v. 10, p. 483-491, 2000.

MELIS, M.; SPIGA, S.; AND DIANA, M. The dopamine hypothesis of drug addiction: Hypodopaminergic state. **International Review of Neurobiology**, v. 63, p. 101–154, 2005.

MELLO, M. L. M.; BARRIAS, J.; BREDA, J. Álcool e problemas ligados ao álcool em Portugal, Lisboa, **Direção Geral de Saúde**, 2001.

MESSAS; VALLADA FILHO. The role of genetics in alcohol dependence. **Rev Bras Psiquiatr**. 26(Supl I):54-58, 2004.

MILL, J. et al. Attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) and the dopamine D4 receptor gene: evidence of association but no linkage in a UK sample. **Molecular psychiatry**, v. 6, n. 4, p. 440, 2001.

MILLER, M. C.; MOHRENWEISER, H. W.; BELL, D. A. Genetic variability in susceptibility and response to toxicants. **Toxicology letters**, v. 120, n. 1, p. 269-280, 2001.

MOTA, N. R. et al. Association between *DRD2/DRD4* interaction and conduct disorder: a potential developmental pathway to alcohol dependence. **American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics**, v. 162, n. 6, p. 546-549, 2013.

MOTA, N. R. et al. *DRD2/DRD4* heteromerization may influence genetic susceptibility to alcohol dependence. **Mol Psychiatry**, v. 18, p. 401- 402, 2013.

MUGLIA, P. et al. Adult attention deficit hyperactivity disorder and the dopamine D4 receptor gene. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 96, n. 3, p. 273-277, 2000.

MULLER, D. Investigação do papel do gene *DRD4* na etiologia do Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade em uma amostra do Rio de Janeiro. 2012.

MURAMATSU, T. et al. Association between alcoholism and the dopamine D4 receptor gene. **Journal of medical genetics**, v. 33, n. 2, p. 113-115, 1996.

NATIONAL INSTITUTE ON ALCOHOL ABUSE AND ALCOHOLISM (NIAAA). Eighth Special Report to the U.S. Congress on Alcohol and Health From the Secretary of Health and Human Services, September 1993. NIH Pub. No. 94-3699. Bethesda, MD: **National Institutes of Health**, 1994.

NATIONAL INSTITUTE ON ALCOHOL ABUSE AND ALCOHOLISM. Alcohol Alert: Alcohol Metabolism. **National Institutes of Health**, v. 35, p. 371, 1997.

NIAURA, R.; SHIFFMAN, S. Psychosocial and biological mechanism. In **Alcohol and Tobacco: From Basic Science to Clinical Practice, NIH Publication 95-39**, Ferting, J. B., Allen, J. P. eds, pp. 159–168, 1995.

OAK, J. N. et al. The dopamine D 4 receptor: one decade of research. **European journal of pharmacology**, v. 405, n. 1, p. 303-327, 2000.

OHLMEIER, Martin D. et al. Comorbidity of alcohol and substance dependence with attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). **Alcohol and alcoholism**, v. 43, n. 3, p. 300-304, 2008.

OHNISHI, K.; LIEBER, C. S. Reconstitution of the microsomal ethanoloxidizing system: Qualitative and quantitative changes of cytochrome P-450 after chronic ethanol consumption. **J Biol Chem**, v. 252, p.7124-7131, 1977.

OKUYAMA, Y.; ISHIGURO, H.; TORU, M.; ARINAMI, T. A genetic polymorphism in the promoter region of *DRD4* associated with expression. and schizophrenia. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 258, p. 292–295, 1999.

PARSIAN, A. et al. No association between polymorphisms in the human dopamine D3 and D4 receptors genes and alcoholism. **American journal of medical genetics**, v. 74, n. 3, p. 281-285, 1997.

PETRONIS, A. et al. The D4 dopamine receptor gene maps on 11p proximal to HRAS. **Genomics**, v. 18, p.161-163, 1993.

PIERCE R. C; KUMARESAN V.: The mesolimbic dopamine system: the final common pathway for the reinforcing effect of drugs of abuse? **Neurosci Biobehav**, v. 30, n. 2, p. 215-238, 2006.

PRASAD, P.; AMBEKAR, A.; VASWANI, M. Case–control association analysis of Dopamine receptor polymorphisms in alcohol dependence: a pilot study in Indian males. **BMC research notes**, v. 6, n. 1, p. 418, 2013.

PRIMO, N. L. N. P.; STEIN, Airton Tetelbom. Prevalência do abuso e da dependência de álcool em Rio Grande (RS): um estudo transversal de base populacional. **Rev Psiquiatr Rio Gd Sul**, v. 26, n. 3, p. 280, 2004.

RATSMA, J. E.; VAN, D. S; GUNNING, W. B. Neurochemical markers of alcoholism vulnerability in humans. **Alcohol and Alcoholism**, v. 37, p. 522-533, 2002.

RAY, L. et al. The dopamine D4 receptor (*DRD4*) gene exon III polymorphism, problematic alcohol use, and novelty seeking: direct and mediated genetic effects. **Addict Biol**, 2008.

ROBBINS, T. W. et al. Limbic-striatal interactions in reward-related processes. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 13, n. 2, p. 155-162, 1989.

ROGERS, Geraldine et al. Association of a duplicated repeat polymorphism in the 5'-untranslated region of the *DRD4* gene with novelty seeking. **American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics**, v. 126, n. 1, p. 95-98, 2004.

ROMAN, T. et al. Attention-deficit hyperactivity disorder: A study of association with both the dopamine transporter gene and the dopamine D4 receptor gene. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 105, n. 5, p. 471-478, 2001.

RONAI Z, et al. Capillary electrophoresis study on DNA-protein complex formation in the polymorphic 50 upstream region of the dopamine D4 receptor (*DRD4*) gene. **Curr Med Chem**, v. 11, p. 1023–1029, 2004.

ROOM, R. (2004) Smoking and drinking as complementary behaviors. **Biomedicine and Pharmacotherapy** 58, 111–115.

RUBINSTEIN, M. et al. Mice lacking dopamine D4 receptors are supersensitive to ethanol, cocaine, and methamphetamine. **Cell**, v. 90, n. 6, p. 991-1001, 1997.

SCHUCKIT, M. A. **Abuso de álcool e drogas**. Artes Médicas, Porto Alegre, p. 356, 1991.

SEAMAN, M. I. Tandem duplication polymorphism upstream of the dopamine D4 receptor gene (*DRD4*). **Am J Med Genet**, v. 88, p. 705-709, 1999.

SEEGER, G. et al. Gene–environment interaction in hyperkinetic conduct disorder (HD+ CD) as indicated by season of birth variations in dopamine receptor (*DRD4*) gene polymorphism. **Neuroscience letters**, v. 366, n. 3, p. 282-286, 2004.

SEEMAN, P.; VAN, T. H. Dopamine receptor pharmacology. *Curr. Opin. Neurol. Neurosurg*, v. 6, p. 602–608, 1993.

SHIELDS, Peter G. et al. Dopamine D4 receptors and the risk of cigarette smoking in African-Americans and Caucasians. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 7, n. 6, p. 453-458, 1998.

SHIFFMAN, S.; BALABANIS, M. Association between alcohol and tobacco. In **Alcohol and Tobacco: From Basic Science to Clinical Practice**, NIH Publication 95-397, Ferting, J. B., Allen, J.P. eds, United States Department of Health and Human Services, Washington, DC. pp. 17–37, 1995.

SIMPSON, J. et al. The *DRD4* receptor Exon 3 VNTR and 5' SNP variants and mRNA expression in human post-mortem brain tissue. **American Journal of**

Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics, v. 153, n. 6, p. 1228-1233, 2010.

SMITH, K. M. et al. Association of the dopamine beta hydroxylase gene with attention deficit hyperactivity disorder: genetic analysis of the Milwaukee longitudinal study. **American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics**, v. 119, n. 1, p. 77-85, 2003.

SONG, B. J.; CEDERBAUM A. I. Ethanol-inducible cytochrome P450 (CYP4502E1): biochemistry. **Molecular biology and clinical relevance**, p.138-146,1996.

SPEED, N. K. **The Role of Insulin Signaling on Dopamine Transporter Trafficking**. 2010. Tese de Doutorado. Vanderbilt University. 2010.

STANDAERT, D.; GALANTER, J. M. Farmacologia da Neurotransmissão Dopaminérgica. **Princípios de Farmacologia: A Base Fisiopatologia da Farmacoterapia**, p. 166-185, 2009.

STOOF, J. C; KEBABIAN J. W. "Opposing roles for D-1 and D-2 dopamine receptors in efflux of cyclic AMP from rat neostriatum". **Nature**, v. 294, p. 366-369, 1981.

SVINGOS, A. L.; PERIASAMY, S.; PICKEL, V. M. Presynaptic dopamine D(4) receptor localization in the rat nucleus accumbens shell. **Synapse**, v. 36, p. 222–232, 2000.

SZANTAI, E. et al. Linkage analysis and molecular haplotyping of the dopamine D4 receptor gene promoter region. **Psychiatric genetics**, v. 15, n. 4, p. 259-270, 2005.

SZANTAI, E. et al. The polymorphic nature of the human dopamine D4 receptor gene: a comparative analysis of known variants and a novel 27 bp deletion in the promoter region. **BMC genetics**, v. 6, n. 1, p. 1, 2005.

TAPERT, S. E.; CALDWELL, L.; BURKE, C. Alcohol and the adolescent brain: human studies. **Alcohol Research & Health**, v. 28, n. 4, p. 205-213, 2004.

TESCHKE, R. et al. Microsomal ethanol-oxidizing system (MEOS): purification and properties of a rat liver system free of catalase and alcohol dehydrogenase. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 49, n. 5, p. 1187-1193, 1972.

TODD, R. et al. Lack of association of dopamine D4 receptor gene polymorphisms with ADHD subtypes in a population sample of twins. **American journal of medical genetics**, v. 105, n. 5, p. 432-438, 2001.

VAN TOL H. H. M., WU C. M., GUAN H. C., OHARA K., BUNZOW J. R., CIVELLI O., KENNEDY J., SEEMAN P., NIZNIK H. B., JOVANOVIC V. Multiple dopamine D4 receptor variants in the human population. **Nature** 358:149–152, 1992.

VAN, T. H. et al. Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. **Nature**, v. 350, p. 610-614,1991.

VOGEL, F.; MOTULSKY, A. G.; BROCK, D. Human genetics: problems and approaches. **Genetical Research**, v. 69, n. 1, p. 75, 1997.

WANG, E., et al. The genetic architecture of selection at the human dopamine receptor D4 (*DRD4*) gene locus. **American Journal of Human Genetics**, v. 74, p. 931-944, 2004.

WISE, R. A. Neuroleptics and operant behavior: the anhedonia hypothesis. **Behavioral and brain sciences**, v. 5, n. 01, p. 39-53, 1982.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **Global status report on alcohol**. Geneva: WHO, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **Global status report on alcohol and health-2014**. WHO, 2014.

XING, Qing-he et al. Association analysis of polymorphisms in the upstream region of the human dopamine D4 receptor gene in schizophrenia. **Schizophrenia research**, v. 65, n. 1, p. 9-14, 2003.

ZAKHARI, S. Overview: how is alcohol metabolized in the body. **Alcohol Res Health**, v. 29, p. 245-55, 2006.

APÊNDICE I - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ CAMPUS MINISTRO REIS VELLOSO

Av. São Sebastião, 2819. Reis Velloso, CEP: 64204-035 – Parnaíba-PI
Fone: (86) 3315 – 5510 / Fax: (86) 3315 – 5510

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto: *Estudo Citogenético e Molecular em Alcoolistas do Estado do Piauí*

Pesquisadores responsáveis: Profa. Dra. Renata Canalle e Prof. Dr. Fábio José Nascimento Motta
Instituição: Universidade Federal do Piauí – *Campus* Ministro Reis Velloso

Pesquisadores participantes: Profa. Dra. France Keiko Nascimento Yoshioka, Prof. Dr. Giovanni Rebouças Pinto

Telefones para contato (inclusive a cobrar): (86) 9939-7757 / 9921-9489 / 3323-5963

E-mail: recanalle@ufpi.edu.br; motta@ufpi.edu.br

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Você precisa decidir se quer participar ou não. Por favor, não se apresse em tomar a decisão. Leia cuidadosamente o que se segue e pergunte ao responsável pelo estudo qualquer dúvida que você tiver. Após ser **esclarecido(a)** sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizado(a) de forma alguma.

Uma vez que o álcool constitui um grave problema à saúde, estamos desenvolvendo um estudo para obter um maior conhecimento clínico e científico de fatores genéticos e ambientais relacionados com a dependência ao álcool e predisposição a doenças decorrentes do alcoolismo em uma população do Estado do Piauí, e verificar se o consumo de bebidas alcoólicas provoca algum dano ao material genético. Por meio desta pesquisa é possível conhecer melhor os mecanismos da dependência, das doenças decorrentes e os danos provocados no material genético e, portanto, oferecer novas possibilidades de prevenção, diagnóstico e tratamento. Para a realização deste estudo é necessário fazermos uma comparação entre pacientes etilistas e pessoas saudáveis que não consomem bebidas alcoólicas, as quais serão utilizadas como grupo controle. Este estudo é realizado utilizando amostras de sangue periférico de indivíduos alcoolistas admitidos para tratamento e acompanhamento em Instituições Municipais e Estaduais de assistência aos usuários de álcool e Hospitais da região de Teresina e Parnaíba, no estado do Piauí, assim como de indivíduos saudáveis voluntários não etilistas.

Para os exames genéticos precisamos de uma amostra de sangue periférico, que será obtido com uma seringa (como para um exame de sangue), sendo este (possível dor da picada da agulha) o único desconforto a que será submetido, não apresentando, portanto, nenhum risco a sua saúde. Todo o procedimento experimental será realizado no laboratório, utilizando somente o sangue. O uso deste material não implicará riscos adicionais para você, nem exigirá que se submeta a qualquer procedimento adicional, e não será utilizado para diagnóstico. Os resultados deste estudo serão úteis para avaliarmos quais condições relacionadas ao alcoolismo são encontradas na população do Estado do Piauí.

Este projeto prevê o armazenamento das amostras coletadas para estudos futuros, que possam mostrar a tendência da população do Estado do Piauí em manifestar doenças decorrentes do alcoolismo. A realização desse projeto não terá custos e nem riscos aos voluntários. Além disso, fica garantida a manutenção de sigilo, por parte dos pesquisadores, sobre a identificação dos voluntários que decidirem colaborar com esse projeto de pesquisa.

Todo o material colhido e usado nesta pesquisa será identificado no laboratório por código formado por números e letras e, portanto, sua privacidade e identidade serão preservadas. A eventual

inclusão dos resultados em publicação científica será feita de modo a manter o anonimato do paciente ou indivíduo controle.

Concordando em participar desta pesquisa e com o uso deste material, do modo descrito, você responderá ao questionário para coleta de informações e cadastro, como dados de identificação (número do prontuário, nome do paciente, diagnóstico principal), informações gerais (etnia, sexo, data de nascimento, idade, endereço, profissão), história de Tabagismo, história de Etilismo, história familiar.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas, bem como a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo sem que isso traga prejuízo ao seu acompanhamento e tratamento quando necessários.

Asseguramos o compromisso de proporcionar informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar a sua vontade de continuar participando, e que se existirem gastos adicionais estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Se você não concordar em permitir o uso deste material para pesquisa, sua decisão não influenciará, de nenhum modo, o seu tratamento e acompanhamento.

Você receberá uma cópia deste documento.

Consentimento da participação da pessoa como sujeito

Eu: _____, RG _____ / CPF _____ / n.º de prontuário _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo, como sujeito. Fui suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo intitulado "*Estudo Citogenético e Molecular em Alcoolistas do Estado do Piauí*". Eu discuti com o(a) Dr(a). Renata Canalle ou Fábio José Nascimento Motta sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu acompanhamento/ assistência/tratamento neste Serviço.

Local e data _____

Nome e Assinatura do sujeito ou responsável: _____

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar Testemunhas (não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome: _____

RG: _____ Assinatura: _____

Nome: _____

RG: _____ Assinatura: _____

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste sujeito de pesquisa ou representante legal para a participação neste estudo.

Parnaíba, ____ / ____ / _____

 Profa. Dra. Renata Canalle
 Pesquisadora responsável

 Prof. Dr. Fábio José Nascimento Motta
 Pesquisador responsável

Observações complementares

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato: Comitê de Ética em Pesquisa – UFPI - Campus Universitário Ministro Petrônio Portella - Bairro Ininga Centro de Convivência L09 e 10 - CEP: 64.049-550 - Teresina - PI
tel.: (86) 3215-5734 - email: cep.ufpi@ufpi.br web: www.ufpi.br/cep

APÊNDICE II - QUESTIONÁRIO APLICADO PARA COLETA DE DADOS

FORMULÁRIO DE CADRASTRO DE PACIENTES (CASOS E CONTROLES)

1- Dados de Identificação

Nº do prontuário no hospital _____ Unidade de Saúde _____

Nome do Paciente _____

Paciente () Internado () Ambulatorial () CAPS-AD () Controle

2- Informações Gerais

Data da entrevista / /

Coleta de sangue () Sim () Não

De início quero agradecer o(a) senhor(a) por participar deste estudo. Nós estamos conduzindo um estudo com finalidade de esclarecer se determinadas características e hábitos de homens e mulheres podem ter relação com algumas doenças decorrentes do alcoolismo e tabagismo. Eu farei várias perguntas cujas respostas serão registradas neste caderno. Devo dizer que tudo o que o (a) senhor (a) responder na entrevista será estritamente confidencial e as informações colhidas das inúmeras pessoas que irão participar do estudo serão usadas apenas em relatos científicos, sem nenhuma identificação pessoal. Os possíveis benefícios deste estudo dependem de que as respostas sejam as mais reais possíveis. Por favor, pergunte se não entender o significado de alguma questão. A qualquer momento o(a) senhor(a) pode se recusar a continuar ou a responder perguntas específicas. Além do questionário o estudo inclui a coleta de uma amostra de sangue. Se houver necessidade de entrar em contato com o(a) senhor(a), poderia fornecer seu endereço e telefone?

Endereço:

Bairro:

Cidade:

CEP:

Telefone:

Podemos começar? O (A) Sr(a) poderia assinar essa folha de consentimento?

QUESTIONÁRIO

1- Sexo:

- () Masculino
() Feminino
() Prefere não declarar

2- Data de nascimento:

3- Idade: _____

4- Peso: _____

5- Estatura: _____

6- Cor referida: _____

7- Qual a sua etnia?

- () branco
() mulato
() negro
() oriental
() indígena
() outra

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

9- Qual a cidade o(a) Sr(a) mora e há quanto tempo?

10- Qual a cidade/estado/país que seus pais nasceram?

11- Escolaridade:

- () não sabe ler e escrever
() 1_ grau incompleto
() 1_ grau completo
() 2_ grau incompleto
() 2_ grau completo
() Superior incompleto
() Superior completo

12- Qual a profissão do(a) Sr(a)? (aquela que exerceu/ou exerce por mais tempo):

13- Por quanto tempo exerceu/ou exerce esta profissão? (anos):

14- Faz uso de algum medicamento?

- () Não () Sim

Qual? _____

15 – Quais dessas doenças já foram diagnosticadas no(a) senhor(a)?

- () Doenças cardíacas ou vasculares
() Bronquite crônica
() Asma
() Enfisema pulmonar
() Osteoporose
() Doença no fígado
() Lesões dos tecidos da boca e dos lábios
() Doença no pâncreas
() Cirrose hepática
() Pancreatite
() Tem alguma alteração na sensibilidade dos pés
() Diabetes
() Hanseníase
() Gastrite
() Câncer.

Qual? _____
() Nenhuma

16 – Alguém na família sofre ou sofreu de alguma dessas doenças? (Tipo de familiar)

- () Doenças cardíacas ou vasculares
 () Bronquite crônica
 () Alguma alteração na sensibilidade dos pés
 () Diabetes
 () Hanseníase
 () Gastrite
 () Câncer.
 Qual? _____
 () Nenhuma

17 – Com que idade foi feito o diagnóstico de câncer?

18 – O familiar citado era/é alcoolista ou tabagista?

- () sim, alcoolista
 () sim, tabagista
 () sim, ambos
 () não

19- Que idade você tinha quando experimentou alguma bebida alcoólica pela primeira vez (anos)?

20- Qual a bebida alcoólica que você usa ou usou com mais frequência?

- () cerveja, chope
 () vinhos
 () cachaça, pinga
 () uísque, vodka, conhaque
 () outras

21 – Com qual frequência o(a) senhor(a) consome/consumia bebidas alcólicas?

- () Todos os dias
 () cinco a seis dias por semana
 () Três a quatro vezes por semana
 () Uma ou duas vezes por semana
 () De uma a três vezes ao mês
 () Algumas vezes ao ano
 () Consumiu uma vez há mais de 12 meses.
 () Nunca bebeu

22 – Quando o (A) senhor(a) costuma beber (ou beber)?

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

23 – Há alguém mais que ingere bebidas alcólicas em sua casa?

- () Asma
 () Enfisema pulmonar
 () Osteoporose
 () Mortalidade neonatal
 () Lesões dos tecidos da boca e dos lábios

- () Pai
 () Avó
 () Madrasta
 () Mãe
 () Avô
 () Irmão
 () Padrastro
 () Outro

() Não há

24 - Com qual idade começou a ingerir bebidas alcólicas regularmente?

- () Menos de 10 anos de idade
 () Entre 10 anos e 13 anos de idade
 () Entre 14 anos e 16 anos de idade
 () Entre 17 anos e 19 anos de idade
 () Com 20 anos de idade ou mais
 () Não bebi regularmente.

25 - Qual a quantidade de bebidas alcólicas você ingere/ingeria por dia (copo, garrafa, lata)?

26- No último ano quantas vezes você ficou alcoolizado (tomou um porre)?

- () não se aplica
 () todos os dias
 () 5-6 dias/semana
 () 3-4 dias/semana
 () 1-2 dias/semana
 () de 3-4 dias/mês
 () de 1-2 dias/mês
 () menos que 1 vez/mês

27- No último mês quantos dias você bebeu?

28 – Qual a idade que você parou de beber?

29- Quando começou a notar dependência alcóolica?

30 – Qual foi o seu tempo de consumo pesado de álcool?

31 – Quantas vezes tentou deixar de ingerir bebidas alcólicas?

- () Uma vez
 () Duas vezes

- () Síndrome do álcool em recém-nascidos de gestantes que bebem
 () Doença no fígado
 () Doença no pâncreas
 () Cirrose hepática
 () Pancreatite
 () Mais de duas vezes
 () Nunca tentei

32- Se você ingeria bebidas alcólicas e parou, há quanto tempo está sem beber?

- () Menos que 6 meses
 () Mais que 6 meses e menos que 1 ano
 () Mais de 1 ano

33 – Dos sintomas de abstinência abaixo citados, quais você sentiu no período em que esteve sem ingerir bebidas alcólicas?

- () Tremor nas mãos
 () Insônia
 () Ansiedade
 () Nervosismo/irritação
 () Dor de cabeça
 () Teve alucinações
 () Outros
 () Não teve sintomas de abstinência

34- Faz uso de outra droga?

- () cigarro
 () maconha
 () crack
 () cocaína
 () heroína
 () solventes

35 - O(a) Senhor (A) é fumante?

- () Não () Sim

36- Que idade você tinha quando fumou pela primeira vez (anos)?

37 - Com qual idade começou a fumar regularmente?

- () Menos de 10 anos de idade
 () Entre 10 anos e 13 anos de idade
 () Entre 14 anos e 16 anos de idade
 () Entre 17 anos e 19 anos de idade
 () Com 20 anos de idade ou mais
 () Não fumo regularmente.

38 - Com que frequência o (a) senhor(a) fuma?

- () Diariamente
 () Algumas vezes por semana
 () Só nos fins de semana

- Algumas vezes ao mês
- Algumas vezes ao ano
- Faz mais de um ano que não fumo

39- Qual a quantidade de cigarros você fuma por dia?

- Menos de uma carteira

- Uma carteira
- Duas carteiras ou mais

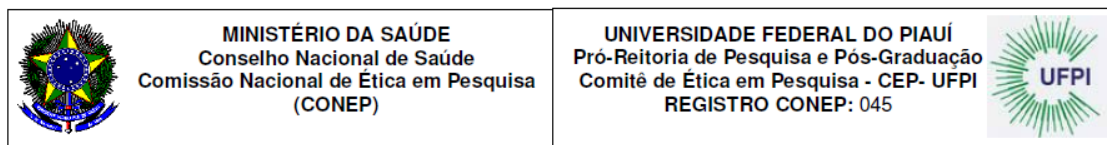
40- Após acordar quanto tempo você demora para fumar o primeiro cigarro do dia?

41 –Se você fumava e parou, há

quanto tempo está sem fumar?

- Menos que 6 meses
- Mais que 6 meses e menos que 1 ano
- Mais de 1 ano

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



CARTA DE APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa – UFPI, reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – (CONEP/MS) analisou o protocolo de pesquisa:

Título: Estudo Citogenético e Molecular em Alcoolistas do estado do Piauí
CAAE (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética): 0234.0.045.000-10
Pesquisador Responsável: Renata Canalle

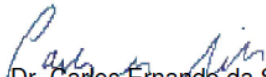
Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes estabelecidas na Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente a este Comitê. O pesquisador deve apresentar ao CEP:

Agosto/2011	Relatório parcial
Agosto/2012	Relatório final

Os membros do CEP-UFPI não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.

DATA DA APROVAÇÃO: 10/09/2010

Teresina, 14 de Setembro de 2010.


 Prof. Dr. Carlos Ernando da Silva
 Comitê de Ética em Pesquisa – UFPI
 COORDENADOR

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
- ponteiros P1000 (azul)
- etanol 70%
- descartes para ponteiros (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 μ l).
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.