



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

FRANCISCO CARLOS DA SILVA JUNIOR

**ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS A-1438G E T102C NO GENE
5HT2A E A DEPENDÊNCIA ALCOÓLICA EM UMA POPULAÇÃO MASCULINA
DO NORDESTE BRASILEIRO**

**PARNAÍBA – PI
JUNHO – 2018**

FRANCISCO CARLOS DA SILVA JUNIOR

**ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS A-1438G E T102C NO GENE
5HT2A E A DEPENDÊNCIA ALCOÓLICA EM UMA POPULAÇÃO MASCULINA
DO NORDESTE BRASILEIRO**

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

Área de concentração: Medicina Investigativa e Marcadores Epidemiológicos

Linha de Pesquisa: Genética Humana e Médica

Orientadora: Prof^a Dr^a Renata Canalle

PARNAÍBA – PI
JUNHO – 2018

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

S586e Silva Júnior, Francisco Carlos da.

Estudo da associação dos polimorfismos A-1438G e T102C no gene 5HT2A e a dependência alcoólica em uma população masculina do nordeste brasileiro [manuscrito] / Francisco Carlos da Silva Júnior. – 2018.

82 f. : il. color.

Impresso por computador (printout).

Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) – Universidade Federal do Piauí, 2018.

Orientação: Profa Dra Renata Canalle.

FRANCISCO CARLOS DA SILVA JUNIOR

ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS A-1438G E T102C NO GENE
5HT2A E A DEPENDÊNCIA ALCOÓLICA EM UMA POPULAÇÃO MASCULINA
DO NORDESTE BRASILEIRO

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

APROVADA EM 27/06/2018

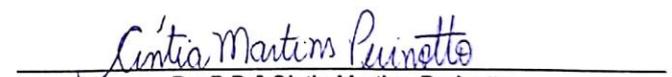
BANCA EXAMINADORA:



Prof.^a Dr.^a Renata Canalle
Universidade Federal do Piauí – Campus Ministro Reis Velloso
PRESIDENTE



Prof. Dr. Fábio José Nascimento Motta
Universidade Federal do Piauí – Campus Ministro Reis Velloso
MEMBRO EXTERNO



Prof.^a Dr.^a Cintia Martins Perinotto
Universidade Federal do Piauí – Campus Ministro Reis Velloso
MEMBRO EXTERNO

PARNAÍBA – PI
JUNHO – 2018

EPÍGRAFE

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus.

Muito, nos aproxima”

Louis Pasteur

DEDICATÓRIA

***“Dê a cada um o que lhe é devido,
Dê honra a quem te honra”***

Romanos 13.7

*Dedico esse trabalho, a quem me abraçou, me acolheu
e fez tornar possíveis todos os meus sonhos.*

A autora da frase: Pensa que é fácil? É apenas o COMEÇO!

À Professora Renata Canalle

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, pelo amor e misericórdia, pela força e ânimo. Agradeço por ter me permitido chegar até aqui, e por em todas as orações realizadas não deixou faltar nada, seja material ou espiritual. Porque dEle, por Ele e para Ele são todas as coisas.

A minha orientadora Prof^a **Renata Canalle**, por em tempos de aflição passados por mim (que eu não acreditava que chegaria até aqui), me proporcionou a esperança e a fé de dias melhores. Pela oportunidade de ter sido seu estudante de IC e de mestrado, e ter usufruído de todas as experiências desde a bancada do laboratório até a docência dentro da sala de aula. Ter realizado todo esse trabalho me fez sentir completo e com sensação de dever cumprido como um estudante de mestrado que saiu com tudo que tinha para realizar. Sou imensamente grato pela relação que tivemos, não apenas orientando-orientadora, mas de bons amigos. Certamente, o sentimento construído nesses quase 5 anos, vai se PERPETUAR. Mais que uma cientista, mais que uma professora, uma grande amiga. Esse trabalho não é meu, é da senhora! Obrigado por tudo!

Ao professor **Fábio Motta** pelos ensinamentos e por todo apoio e conhecimento investido em mim. Pela confiança e pelas valorosas contribuições e incentivo ao conhecimento científico.

A **banca examinadora** pelas contribuições pertinentes e relevantes para este trabalho.

A minha família, em especial **meus pais** (Cícera: Avó e Francisco: Pai); que me deram o apoio emocional e financeiro em todas as situações. Que não mediram esforços ao tirarem da “própria boca” para saciar minha fome quando não tinha nada dentro da minha casa para comer. Dedico esse trabalho a meu avô (**José Carlos – in memoriam**), que mesmo com os problemas de memória, mesmo em sua idade avançada dizia: Cadê o Carlinhos? Já mandou o sustento dele? Como ele está? Sempre estará em minha memória e em meu coração!

A **Adna e Marcos, Phelippe e Olívia** (Sousa-PB) que desde 2012, do momento que coloquei o pé em Parnaíba, me deram todo o apoio e sustento. E com tanto compromisso, confiaram em mim e honrei. Agradeço imensamente pela amizade e por todos os: É hoje Adna!

A **igreja Batista em Parnaíba**, que quando tive fome, me deram de comer, quando tive sede, me deram de beber, quando estive sem roupa, me deram o que vestir, quando estava doente foram me visitar. Por terem exercido o que tem na marca da igreja: “Uma comunidade de amor, onde você é alguém especial”. A todas as mães e pais, irmãos e irmãs que abriram as portas de suas casas e me oferecem abrigo, conforto e amor de estar em família.

A **Luzia Emília, Hudson e Vó**, pela harmonia de viver em família e a disponibilidade de seu lar em abrigar e me dar a paz e o amor de viver em família nesses anos em que estive em Parnaíba.

A **pensão da Zilmar**, e em especial a própria, que durante o tempo que estive na pensão, me garantiu segurança, conforto e alegria de todos os momentos compartilhados. Meu muito obrigado! Agradeço a **Joci, Samona, Ramona, Jéssica, Nívia, Marcia** e todos os outros, que foram importantes e essenciais na chegada até aqui.

A minha amiga do coração e companheira de Laboratório, **Loiziana Melo e sua família**. Por terem acreditado no meu potencial e se disponibilizarem em todos os episódios de angústia e aflição e oportunidades.

A **Ana Rachel e Baldomero**, pelos conselhos, pela amizade e pelas contribuições ao meu trabalho durante a qualificação até o hora da defesa. Foi muito bom ter a Rachel mesmo que por pouco tempo desenvolvendo seu pós-doc, e fico feliz por ter ajudado na caminhada.

Ao **Laboratório de Genética e Biologia Molecular**, em especial a **Andréia, Carol, Vanessa e Klayane**, por terem deixado minha rotina de laboratório mais divertida e menos cansativa. Pelo companheirismo e pela humildade de todo mundo “estar no mesmo nível”. Aos **professores Giovanni e Keiko** por disponibilizarem das amostras para completar o número amostral e pelas valorosas contribuições científicas.

Ao **Hygor**, pela disponibilidade e confiança. Agradeço pelo apoio técnico e pelas retiradas de dúvidas nos momentos de tensão de PCR. Pela super ajuda com os *primers* e com demais materiais. Muito obrigado!

As ICs **Emilia, Luzia, Hanna e Valentina**. Não sabe o orgulho que tenho de vocês! Foi com vocês no Laboratório que confirmei mais ainda que não me vejo

fazendo outra coisa se não for ensinando e pesquisando. “Vocês me matam do coração, mas quero apenas padecer de ORGULHO”.

Aos amigos da minha turma do mestrado, em especial **Julianna, Silveny, Emanuella, Layla e Mariana**, por toda amizade e companheirismo sempre!

A Dona **Júlia Campos** por sua hospitalidade e gentileza durante os últimos meses de mestrado aqui na UFPI.

A **Amélia e doutor Manoel**, pela confiança e ajuda nesses anos na UFPI e o apoio, mesmo em momentos que não me conheciam por completo.

As minhas amigas de Aparecida-PB, **Augusta, Mariana, Amália e Yanne** e famílias, por nunca se esquecerem de mim e também pelos ótimos apelidos concedidos quando eu não dava o “ar da graça”. Sou tão feliz e fui tão privilegiado pela amizade de vocês!

A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** (CAPES) pela concessão da bolsa.

A todos os **participantes dessa pesquisa** que voluntariamente se disponibilizaram a ajudar na contribuição científica.

A todos os **servidores e técnicos da UFPI**, pela compreensão no excesso de horas trabalhadas.

A todos os demais que de maneira direta e indireta contribuíram para o desenvolvimento e realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADO!

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 17 |
| 2. REFERENCIAL TEÓRICO | 19 |
| 2.1 ALCOOLISMO | 19 |
| 2.1.1 O álcool e seus efeitos | 19 |
| 2.1.2 Epidemiologia do alcoolismo no Mundo | 21 |
| 2.1.3 Epidemiologia do alcoolismo no Brasil | 22 |
| 2.1.4 Epidemiologia do alcoolismo no Nordeste | 24 |
| 2.1.5 Alcoolismo e Genética | 25 |
| 2.2 CIRCUITO SEROTONINÉRGICO | 26 |
| 2.3 O GENE <i>5HT2A</i> | 29 |
| 2.3.1 Polimorfismos A-1438G e T102C | 29 |
| 2.3.2 Desequilíbrio de ligação (DL) | 31 |
| 3. OBJETIVOS | 33 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL | 33 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 33 |
| 4. METODOLOGIA | 34 |
| 4.1 NÚMERO AMOSTRAL E SELEÇÃO DOS SUJEITOS..... | 34 |
| 4.2 EXTRAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E ARMAZENAMENTO DO DNA | 36 |
| 4.3 DESENHO DOS <i>PRIMERS</i> | 37 |
| 4.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)..... | 37 |
| 4.5 GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS NO GENE <i>5HT2A</i> | 39 |
| 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA | 43 |
| 5. RESULTADOS | 44 |
| 5.1 POLIMORFISMO A-1438G NO GENE <i>5HT2A</i> E ASSOCIAÇÃO COM HÁBITO ALCOOLISTA | 45 |
| 5.2 POLIMORFISMO T102C NO GENE <i>5HT2A</i> E ASSOCIAÇÃO COM O HÁBITO ALCOOLISTA | 47 |
| 5.3 ANÁLISE DO DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO..... | 50 |
| 6. DISCUSSÃO | 51 |
| 6.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS..... | 51 |
| 6.2 POLIMORFISMO A-1438G | 52 |
| 6.3 POLIMORFISMO T102C | 55 |
| 6.4 DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO | 58 |
| 7. CONCLUSÃO | 61 |
| 8. REFERÊNCIAS | 62 |
| APÊNDICE I - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO | 73 |
| APÊNDICE II - QUESTIONÁRIO APLICADO PARA COLETA DE DADOS | 76 |
| ANEXO I - CARTA DE APROVAÇÃO DESTE TRABALHO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ | 79 |
| ANEXO II – PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE SANGUE TOTAL | 81 |

RESUMO

O alcoolismo representa uma das causas mais prevalentes de morbidade e mortalidade e o consumo nocivo do álcool acarreta cerca de 3,3 milhões de mortes a cada ano, representando de todas as mortes no mundo, 5,9%. Polimorfismos genéticos na via serotoninérgica, tais como os polimorfismos A-1438G e T102C do gene do receptor da serotonina da família 2 subtipo A (*5HT2A*) foram correlacionados com o início e a manutenção do hábito alcoolista. O presente estudo teve como objetivo estimar a prevalência e investigar possíveis associações entre estes polimorfismos e o uso abusivo do álcool em uma população masculina do Nordeste Brasileiro. Para compor o estudo foram selecionados 113 indivíduos alcoolistas e 114 controles, todos do sexo masculino e idade superior ou igual a 18 anos, no período de 2011 a 2013, e em seguida analisados pela técnica de PCR-RFLP. A distribuição das frequências genotípicas e alélicas e a associação dos polimorfismos ao comportamento alcoolista foram avaliadas usando o teste do Qui-quadrado (χ^2), teste Exato de Fisher e *Odds Ratio* (OR) com intervalo de confiança de 95%, bem como foi analisado o Equilíbrio de Hardy-Weinberg em ambos os grupos caso e controle. A análise dos dados foi desenvolvida utilizando o programa estatístico BioStat 5.0 com significância estatística estabelecida em $p < 0,05$. A análise do desequilíbrio de ligação foi desempenhada no Haploview 4.2. Para as características demográficas da população, houve a observação de diferenças significativas entre os grupos estudados para as variáveis: escolaridade, média de consumo de doses por dia, histórico familiar e hábito tabagista ($p < 0,05$). Os resultados da distribuição alélica entre os grupos para os polimorfismos A-1438G e T102C revelaram uma frequência do alelo G de 63,7% em casos e 64,92% no grupo controle, enquanto que para o alelo C a frequência no grupo alcoolista foi de 62,3% e no grupo controle 66%. A distribuição dos genótipos para os ambos os SNPs demonstrou frequência do genótipo GG nos alcoolistas de 41,6% e nos controles de 39,47%, no entanto, o genótipo CC mostrou uma frequência em casos e controles de 40,72% e 41,23%, respectivamente. As frequências dos alelos e dos genótipos de ambos os polimorfismos estudados não diferiram significativamente entre alcoolistas e controles, sugerindo ausência de associação com a dependência alcoólica na população analisada. A análise do desequilíbrio de ligação dos SNPs A-1438G e T102C no gene *5HT2A* demonstrou que estes estão em forte desequilíbrio ($D' = 0,86$, $r^2 = 0,73$), e que o haplótipo GC considerado de suscetibilidade, demonstrou frequência de 59,5% no grupo alcoolista e 60,1% no grupo controle, não diferindo estatisticamente ($p = 0,99$). Os dados apontam para a falta de contribuição dos polimorfismos A-1438G e T102C no gene *5HT2A* com a dependência alcoólica na população investigada, no entanto, estudos adicionais são necessários para a confirmação dos resultados obtidos e o esclarecimento do papel dos polimorfismos com a suscetibilidade para o alcoolismo e fatores que são responsáveis pelo início e manutenção do hábito.

Palavras-Chave: Alcoolismo; via serotoninérgica; polimorfismos; suscetibilidade.

ABSTRACT

Alcoholism is one of the most prevalent causes of morbidity, mortality and harmful alcohol consumption accounts for about 3.3 million deaths each year, representing 5.9% of all deaths worldwide. Genetic polymorphisms in the serotonergic pathway, such as the A-1438G and T102C polymorphisms of the receptor serotonin 2A (*5HT2A*) were correlated with the onset and maintenance of alcoholic habit. The present study is aimed to estimate the prevalence and to investigate possible associations between these polymorphisms and abusive alcohol use in a male population in Northeast Brazil. 113 alcoholic individuals and 114 controls were recruited, all male and 18 years old were selected from 2011 to 2013, and then analyzed by PCR-RFLP technique. The distribution of genotypic and allelic frequencies and the association of polymorphisms with alcoholic behavior were evaluated using the Chi-square test (χ^2), Fisher's exact test and *Odds Ratio* (OR) with 95% confidence interval, as well as it was analyzed the Hardy-Weinberg equilibrium in both case and control groups. Data analysis was performed using the statistical software BioStat 5.0 with statistical significance established at $p < 0.05$. Linkage disequilibrium analysis was performed in Haploview 4.2. For the demographic characteristics of the population, significant differences were observed among the studied groups for the variables: schooling, average of drinks per day, family history and smoking habits ($p < 0.05$). The results of the allelic distribution between the groups for the A-1438G and T102C polymorphisms revealed a G allele frequency of 63.7% in cases and 64.92% in the control group, whereas for the C allele the frequency in the alcoholic group was of 62.3% and in the control group was 66%. The distribution of the genotypes for both SNPs showed frequency of the GG genotype in alcoholics of 41.6% and controls of 39.47%, however, the CC genotype showed a frequency in cases and controls of 40.72% and 41.23%, respectively. The frequencies of the alleles and genotypes of both polymorphisms studied did not differ significantly between alcoholics and controls, suggesting no association with alcohol dependence in the studied population. Analysis of the Linkage disequilibrium of the A-1438G and T102C SNPs in the *5HT2A* gene demonstrated that they are in heavy disequilibrium ($D = 0.86$, $r^2 = 0.73$), and that the GC haplotype considered susceptible, showed frequency of 59.5% in the alcoholic group and 60.1% in the control group and did not differ statistically ($p = 0.99$). The data showed to the lack of contribution of the A-1438G and T102C polymorphisms in the *5HT2A* gene with the alcohol dependence in our population, however, additional studies are necessary to confirm the results obtained and clarify the role of the polymorphisms with the susceptibility to alcoholism and factors that are responsible for the onset and maintenance of the habit.

Keywords: Alcoholism; serotonergic pathway; polymorphisms; susceptibility.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Distribuição das mortes atribuídas ao álcool..... | 22 |
| Figura 2: Regulação sináptica da neurotransmissão da serotonina | 27 |
| Figura 3: Visualização dos produtos de digestão do polimorfismo A-1438G do gene <i>5HT2A</i> | 41 |
| Figura 4: Visualização dos produtos de digestão do polimorfismo T102C do gene <i>5HT2A</i> | 42 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Porcentagem de álcool de acordo com o tipo de bebida | 35 |
| Tabela 2: Quantidade de álcool contida em cada dose de bebida | 35 |
| Tabela 3: Sequências de primers para ampliações das regiões de interesse do gene <i>5HT2A</i> | 37 |
| Tabela 4: Volume e concentração dos reagentes empregados na PCR após a padronização | 38 |
| Tabela 5: Programa de amplificação do polimorfismo em A-1438G do gene <i>5HT2A</i> | 38 |
| Tabela 6: Programa de amplificação do polimorfismo em T102C do gene <i>5HT2A</i> .. | 39 |
| Tabela 7: Genotipagem e perfis de bandas das variantes polimórficas | 40 |
| Tabela 8: Características clínicas e demográficas das amostras | 44 |
| Tabela 9: Distribuição genotípica e alélica dos alcoolistas e controles para o polimorfismo A-1438G no gene <i>5HT2A</i> | 45 |
| Tabela 10: Análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg para o polimorfismo A-1438G no gene <i>5HT2A</i> | 46 |
| Tabela 11: Comparação da frequência do polimorfismo A-1438G no gene <i>5HT2A</i> entre alcoolistas em relação ao histórico familiar | 46 |
| Tabela 12: Comparação da frequência do polimorfismo A-1438G no gene <i>5HT2A</i> entre alcoolistas e controles em relação ao hábito tabagista | 47 |
| Tabela 13: Distribuição genotípica e alélica dos alcoolistas e controles para o polimorfismo T102C no gene <i>5HT2A</i> | 48 |
| Tabela 14: Análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg para o polimorfismo T102C no gene <i>5HT2A</i> | 48 |
| Tabela 15: Comparação da frequência do polimorfismo T102C no gene <i>5HT2A</i> entre alcoolistas em relação ao histórico familiar | 49 |
| Tabela 16: Comparação da frequência do polimorfismo T102C no gene <i>5HT2A</i> entre alcoolistas e controles em relação ao hábito tabagista | 50 |
| Tabela 17: Frequências haplotípicas para os SNPs A-1438G e T102C do gene <i>5HT2A</i> nos grupos alcoolista e controle | 50 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT – Serotonina

ATV – Área Tegumentar Ventral

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

CAPS-AD - Centro de Atenção Psicossocial Álcool e Drogas

CID-10 – Classificação Internacional de doenças

dbSNP – Banco de dados de SNP

DL – Desequilíbrio de ligação

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DSM-IV – American Psychiatric Association

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

IC – Intervalo de Confiança

ISTs – Infecções Sexualmente Transmissíveis

INSS – Instituto Nacional de Seguro Social

MAO – Monoamina Oxidase

NCBI – Centro Nacional de Informações Biotecnológicas

NE – Região Nordeste

NEAD – Núcleo Einstein de Álcool e Drogas do Hospital Israelita Albert Einstein

OBID – Observatório Brasileiro de Informações sobre Drogas

OMS – Organização Mundial da Saúde

OR – *Odds Ratio*

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

RFLP – Polimorfismo no Comprimento do Fragmento de Restrição

SNC – Sistema Nervoso Central

SNP – do inglês, *Single Nucleotide Polymorphism*; Polimorfismo de Nucleotídeo Único

SR – Sistema de Recompensa Cerebral

SRA – Síndrome da Recompensa Cerebral

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TPH – Triptofano Hidroxilase

UV – Luz Ultravioleta

WHO – World Health Organization

1. INTRODUÇÃO

Sendo de fácil acesso, baixo custo e apresentando caráter licito, o álcool é aceito pela sociedade atual de forma diferente quando comparado com outras drogas (OLIVEIRA e LUCHES, 2010). Essa substância psicoativa, dependendo da forma que é usada, pode levar a dependência, e subsequente a isso, desenvolver um quadro clínico conhecido como alcoolismo. Quando ingerido de maneira exagerada, alcança rapidamente a circulação, podendo atingir órgãos vitais do corpo, vindo posteriormente causar problemas neurológicos, gástricos, musculares, hepáticos, pancreáticos e, por conseguinte, uma predisposição para o desenvolvimento de cânceres (WHO – World Health Organization, 2014; MENEZES *et al.*, 2015; INCA, 2015).

Globalmente, o consumo de álcool resulta em aproximadamente 3,3 milhões de mortes a cada ano. De todas as mortes no mundo, 5,9% delas são atribuídas ao consumo alcoólico, essa porcentagem é maior do que as mortes advindas da AIDS (2,8%), violência (0,9%) ou tuberculose (1,7%). No Brasil, o uso nocivo do álcool aumentou 31,1% em 2012, sendo 50% da população geral considerada alcoolista, dentre os quais 17% abusam da substância e são dependentes. Nesse mesmo período, a Região Nordeste (NE) aumentou o consumo alcoólico em 67%, sendo a região que mais cresceu nesse quesito considerado abusivo (13,8%), e esse aumento está ligado a indivíduos com baixo grau de escolaridade (LARANJEIRAS *et al.*, 2012; WHO, 2014).

Quando ingerido, o álcool causa efeitos no organismo que variam de acordo com a rapidez e a frequência, porém essa situação se torna distinta em diferentes populações por estar intrínseca a fatores genéticos (DOTTO-BAU, 2002). O alcoolismo enquadra-se como um distúrbio multifatorial, ou seja, existe influência ambiental e genética que corrobora para a manifestação desse fenótipo. Estudos com gêmeos demonstram que há intervenção de fatores genéticos de forma elevada para dependência ao álcool, principalmente para o sexo masculino, apresentando uma herdabilidade entre 40% e 60%. Com isso, é válido destacar que fatores genéticos e ambientais demonstram relevante contribuição para o início e manutenção do hábito alcoolista (MESSAS; FILHO, 2004; HAES *et al.*, 2010).

O etanol aumenta a ação dos neurônios na Área Tegumentar Ventral (ATV) e nos núcleos *acumbens*, relacionados com os efeitos da recompensa, favorecendo

a liberação de dopamina no sistema de recompensa cerebral (SR), além disso, é visto que os receptores do sistema serotoninérgico podem modular a atividade dopaminérgica (YOSHIMOTO *et al.*, 1991; ZALESKI *et al.*, 2004; CARROLL, *et al.*, 2006; IKEMOTO e BONCI, 2013).

Neurotransmissão mediada pela serotonina (5-hidroxitriptamina - 5-HT) demonstra papel importante em muitas funções fisiológicas, tais como atividade motora, modos de alimentação, sono, atividade reprodutiva, assim como estados cognitivos e emocionais. Uma baixa atividade central serotoninérgica tem sido correlacionada com o aumento do consumo de álcool e tem sido implicada como um possível fator de vulnerabilidade para a dependência alcoólica (SANDER *et al.*, 1997; LOVINGER *et al.*, 2013). Variações genéticas afetando a transmissão serotoninérgica representam potenciais candidatos para o entendimento do comportamento alcoólico (PREUSS *et al.*, 2001; TYNDALE, 2003).

O gene do receptor da serotonina *5HT2A* localizado na região cromossômica 13q14-q21 apresenta dois SNPs de considerável relevância por serem associados a diversas desordens e problemas relacionados com uso abusivo de substâncias. Os SNPs A-1438G e T102C demonstram efeito sobre a expressão do gene por diminuírem a afinidade dos fatores de transcrição iniciarem de forma eficiente a formação do RNAm (POLESSAKAYA & SOKOLOV, 2002; PARSONS *et al.*, 2004; MYERS *et al.*, 2007). Ainda, de acordo com estes trabalhos anteriormente citados, estes polimorfismos estão quase que completamente em desequilíbrio de ligação.

Partindo do pressuposto, pesquisas genéticas que promovam uma investigação do papel genético na suscetibilidade a dependência alcoólica e, conseqüentemente, identifiquem genótipos correlacionados a essa doença são de extrema relevância. Até o presente momento não há evidências na literatura de estudos destes polimorfismos em populações no nordeste do Brasil, o que torna esse estudo pioneiro. Assim sendo, este estudo poderá atuar na prevenção de doenças secundárias ao alcoolismo, como também direcionar para alguma estratégia terapêutica em uma população alcoólica do estado do Piauí, Brasil.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ALCOOLISMO

2.1.1 O álcool e seus efeitos

O alcoolismo é uma síndrome multifatorial que pode comprometer a vida do indivíduo em âmbito físico, mental e social. Os critérios de diagnóstico atuais são baseados na Classificação Internacional de Doenças (CID-10) da Organização Mundial da Saúde (OMS), e no Manual de Diagnóstico e Estatística de Distúrbios Mentais da Associação Norte-Americana de Psiquiatria (DSM-IV; American Psychiatric Association, 1994) (DOTTO-BAU, 2002).

Comumente usada pela população mundial, o álcool é uma substância que dependendo da forma que é usada pode levar a um estado de abuso, dependência, intoxicação e abstinência. O termo dependência refere-se a um padrão mal adaptativo do uso de alguma substância, que leva a prejuízos ou sofrimento clínico significativo, podendo evidenciar três ou mais características que incluem tolerância, abstinência ou abandono das atividades sociais, ocupacionais ou recreativas, justamente pelo uso da substância em um período de 12 meses (DSM-IV; American Psychiatric Association, 1994).

As bebidas alcoólicas foram usadas por populações desde antes de Cristo, como no Oriente Médio, até mesmo pela sociedade da Idade Média. A partir da idade média a produção do álcool foi intensificando-se ao ponto dos problemas relacionados ao uso da substância tornarem-se socialmente relevantes. No entanto, é importante destacar que com o advento da destilação, a disponibilidade do álcool teve um grande avanço, e concomitante a isso, o aumento do uso exagerado e abusivo tornou-se notável na sociedade atual (MARQUES, 2001; DOTTO-BAU, 2002).

Estudos históricos revelaram que no Brasil a prática de consumo de bebidas alcoólicas existia ainda antes da chegada dos portugueses. Os índios produziam uma espécie de bebida a partir da fermentação do milho e mandioca chamada *cauim*. Porém, com a chegada dos portugueses a produção e disponibilidade da cachaça através do cultivo da cana-de-açúcar levou a popularização dessa bebida com alto teor alcoólico (GALDURÓZ *et al.*, 2007; FERREIRA *et al.*, 2011).

O etanol quando consumido de forma descontrolada leva ao acometimento de vários sistemas do organismo. Tais efeitos podem comprometer órgãos do sistema digestório, nervoso, muscular, o que pode implicar em riscos ao desenvolvimento de desordens orgânicas e aparecimento de processos neoplásicos (HAES *et al.*, 2010; BONGAERTS *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2012; URASHIMA *et al.*, 2013; VOLKOW *et al.*, 2017).

Os efeitos do álcool predominam-se sobre os dois principais componentes do Sistema Nervoso, o Sistema Nervoso Central (SNC) e o Sistema Nervoso Periférico (SNP), podendo ter efeitos negativos em alguns processos fisiológicos, tais como sono, temperatura e coordenação (OSCAR-BERMAN *et al.*, 1997).

Com a ingestão de bebidas alcoólicas, existe o aparecimento dos efeitos estimulantes, bem como os efeitos depressores. Dentre os efeitos estimulantes, destacam-se a euforia, a desinibição e o desembaraço, já os efeitos depressores destacam-se a perda da coordenação motora, o descontrole e a intensa sonolência, contudo esses efeitos depressores podem ser ainda mais exacerbados quando a ingestão é constante e em grandes quantidades, podendo levar até mesmo a um estado de coma (HAES *et al.*, 2010; PRACZ *et al.*, 2010).

Os danos associados ao uso do álcool podem ser caracterizados em três mecanismos: a toxicidade física, a intoxicação e a dependência a substância. A possibilidade de dependência ao alcoolismo vai de acordo com a frequência e quantidade ingerida pelo indivíduo, em que elevações dos níveis na corrente sanguínea podem levar a mudanças de comportamento e refletir em danos como a intoxicação aguda, acidentes e violência (BLAINE e SINHA, 2017). Além disso, a prática de ingerir bebidas alcoólicas continuamente pode acarretar em problemas secundários de saúde como, cirrose hepática, pancreatite e outras doenças que tendem a se estender por outras partes do corpo (DUALIBI *et al.*, 2007; BECKER, 2017).

As consequências do consumo do álcool transcendem aos danos à saúde do consumidor. Os efeitos acabam atingindo familiares, amigos, colegas e demais pessoas do convívio social. Entre essas decorrências incluem-se o absenteísmo, diminuição da renda familiar, desemprego na família (para cuidar de algum parente com problemas advindos do consumo alcoólico), violência, aumento de gastos com saúde tanto da família como do Estado, impacto na saúde mental (depressão,

ansiedade, traumas, abusos) e ocorrências de lesões no trabalho ou em locais públicos (FERREIRA *et al.*, 2013; MONTEIRO, 2016).

2.1.2 Epidemiologia do alcoolismo no Mundo

Bebidas alcoólicas são uma das substâncias recreativas mais usadas na sociedade e contém um componente psicoativo – o etanol. É bem conhecido que o abuso do álcool está ligado a vários resultados negativos em termos sociais, econômicos e físicos (RYU *et al.*, 2016). Há um crescente impacto significativo do uso nocivo do álcool, não apenas em indivíduos consumidores, como também na saúde global (CREMONTE *et al.*, 2016).

O álcool começa a produzir mortes relativamente cedo na vida, mostrando uma maior tendência entre o início e meados da idade adulta. No que diz respeito aos padrões de consumo de álcool, a nível mundial, é ligeiramente mais prevalente entre os jovens de 15 – 19 anos (11,7%) em comparação com a população total com idade superior (7,5%) (DELKER *et al.*, 2016)

A proporção de mortes atribuídas ao álcool é significativamente maior em homens (7,6%), quando comparada em mulheres (4%), demonstrando que essa distinção entre os dois sexos é um indicador de diferença no hábito de beber bebidas alcoólicas entre ambos. Existem cerca de três vezes mais jovens do sexo masculino do que jovens do sexo feminino que fazem uso exagerado do álcool (LARANJEIRA *et al.*, 2007; WHO, 2014).

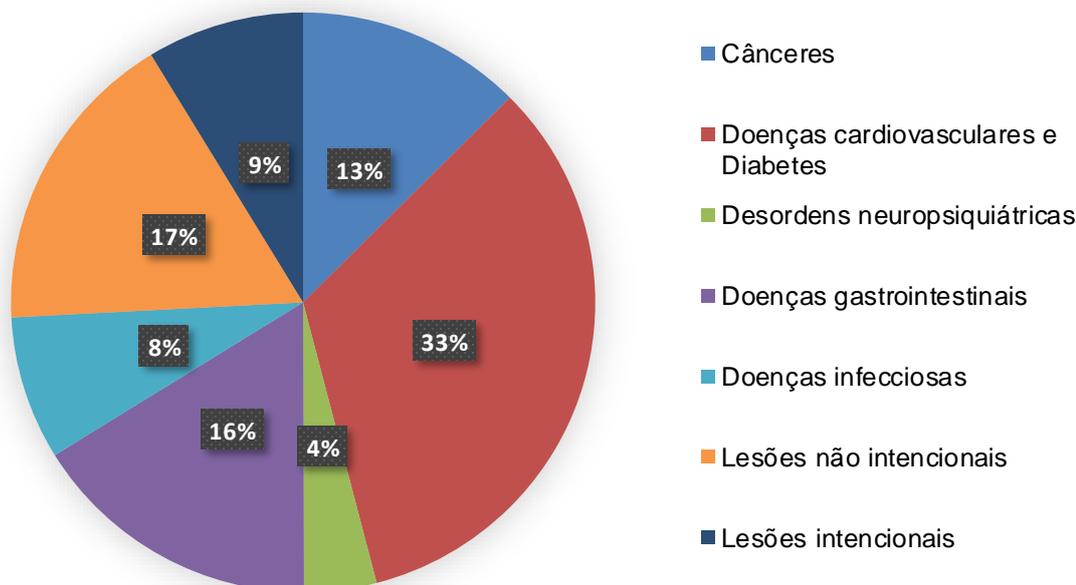
Dentre as doenças, injúrias e perturbações causadas pelo uso abusivo do álcool, o maior número de mortes é consequência da instalação de doenças cardiovasculares, seguidas de lesões (especialmente as lesões não intencionais), doenças gastrointestinais (cirrose hepática) e cânceres (WHO, 2014) (**Figura 1**).

O’Keefe e colaboradores (2007), demonstrou que o álcool pode ser considerado uma “espada de dois gumes”, pois dependendo da forma que é consumido pode conferir efeitos benéficos ou ser um fator de risco para doenças cardiovasculares. O uso abusivo do álcool pode comprometer o músculo cardíaco, explicando assim o aparecimento de efeitos deletérios no sistema cardiovascular (BORBA, 2015). Uma estimativa de 780.383 mortes cardiovasculares (441.893 e 338.490 mortes entre homens e mulheres, respectivamente) foi atribuída globalmente em 2012 ao consumo nocivo de álcool, contando uma porcentagem de

1,4% de todas as mortes e 26,6% de todas as mortes advindas do álcool (REHM *et al.*, 2016).

Figura 1: Distribuição das mortes atribuídas ao álcool

3,3 milhões de mortes a cada ano



Categorias por doenças causadas pelo uso do álcool. Adaptado de WHO, 2014.

O uso abusivo do álcool também é um fator de risco para o aparecimento de câncer oral, faringe, esôfago, colorretal, fígado, laringe, mama, pâncreas e próstata (BAGNARDI *et al.*, 2015). No ano de 2002, 3,6% de todos os casos de morte por câncer foram derivadas do consumo alcoólico. Em 2012, um total de mortes por câncer atribuídas ao álcool aumentou aproximadamente 770.000 em todo o mundo, (5,5% do número total de casos de câncer) -540.000 homens (7,2%) e 230.000 mulheres (3,5%) (PRAUD *et al.*, 2015).

2.1.3 Epidemiologia do alcoolismo no Brasil

O uso do álcool no Brasil vem apresentando-se bastante difuso. Acredita-se que o álcool seja responsável por 2,3 milhões de mortes a cada ano no Brasil (GARCIA *et al.*, 2015). A frequência do consumo na vida varia entre 51 e 71,5% nas diferentes regiões brasileiras (FILIZOLA *et al.*, 2008). Dados de 2012 que enfatizam a consequência da dependência ao álcool, em termos de mortalidade e morbidade,

demonstraram que no Brasil 28,8% dos homens e 5,8% das mulheres podem desenvolver cirrose hepática; além disso, acidentes relacionados com o uso abusivo do álcool perfazem 52,5% em homens e 11,3% nas mulheres, a cada 100.000 habitantes (WHO, 2014).

Vieira e colaboradores (2007) ao desenvolverem um estudo para analisar o perfil de estudantes brasileiros do estado de São Paulo a respeito do consumo de álcool, perceberam que a prevalência do álcool na vida desses jovens foi de 62,2%; 32,8% dos estudantes de 10 – 12 anos já fizeram uso do álcool, além disso, tomando como base todos os estudantes que experimentaram alguma bebida alcoólica, 99,1% foi antes dos 18 anos. Isso mostra que ainda em fase prematura da vida, pessoas estão tratando o uso do álcool como um estilo de vida.

O uso abusivo do álcool pela população brasileira surge como uma problemática para a saúde pública nos dias atuais. O Observatório Brasileiro de Informações sobre Drogas (OBID) aponta que 65% dos homens adultos e 48% das mulheres adultas bebem pelo menos uma vez a cada ano, levando um total de 52% de brasileiros acima de 18 anos. Entre os homens adultos, 28% bebem cerca de quatro vezes por semana e 11% bebem todos os dias da semana (MORETTI-PIRES *et al.*, 2011).

Há distinções no índice de beber diário (mais frequente) entre as diferentes faixas etárias (de jovens a idosos), entretanto, a abstinência é superior a 79% em indivíduos com 60 anos ou mais em relação aos jovens de 18-24 anos. Tal fato não é surpreendente, pois a população mais idosa tende a ter um caráter mais conservador; no entanto, sendo o Brasil um país que abrange um grande contingente populacional jovem, esse consumo nessa mesma população pode estar associado com maiores problemas relacionados ao álcool no país (LARANJEIRAS *et al.*, 2007).

O uso de drogas psicoativas também se destaca como uma causa de mortes em acidentes de trânsito. O Brasil, nos dias atuais, reconhece o comportamento de dirigir alcoolizado como um grave problema de saúde pública. As poucas estatísticas existentes demonstram um quadro preocupante para os programas de políticas públicas em saúde. Um estudo realizado entrevistando caminhoneiros na cidade de Passos, Minas Gerais, indicou que o álcool era utilizado em 91% deles e que adquiriam a bebida principalmente em postos de combustíveis na estrada. Tal estudo salientou a importância de campanhas preventivas e informativas voltadas

para essa categoria de profissionais, alertando sobre os riscos que a ingestão de álcool nas estradas pode ocasionar (CAMPOS *et al.*, 2008; ALMEIDA, 2014).

No triênio de 2010 a 2012 foram registradas no Brasil aproximadamente 20 mil mortes, nas quais o consumo alcoólico foi o responsável, o que equivale a 1.500 mortes a cada mês, ou 50 por dia. O sexo masculino concentrou mais de 90% das mortes, com taxas 10 vezes superiores às mulheres (GARCIA *et al.*, 2015).

2.1.4 Epidemiologia do alcoolismo no Nordeste

Binge Drinking é uma prática conhecida na literatura científica internacional e significa beber consumindo um volume excessivo de álcool em um curto espaço de tempo, e é considerado um tipo muito perigoso de consumo alcoólico e associado a uma série de problemas físicos, sociais e mentais (NAIMI *et al.*, 2009; MALTA *et al.*, 2014).

Segundo o Levantamento Nacional sobre os padrões de consumo do álcool na população brasileira (2012), a região Nordeste se destaca por apresentar consumidores de bebidas alcoólicas que bebem em ocasiões especiais, mas em grandes quantidades, com 13% de bebedores que consomem de 12 ou mais doses por dia de consumo.

Tratando-se de problemas advindos do uso excessivo do álcool no Nordeste, existe uma prevalência de 14% para problemas sociais, 16% relacionados à violência, 17% para problemas familiares e 41% para problemas físicos (LEVANTAMENTO NACIONAL DE CONSUMO ALCOÓLICO, 2007). Isso mostra que o alcoolismo desencadeia efeitos maléficos expressivos na população do nordeste do Brasil, e que é preciso maiores e melhores estudos para o entendimento dos mecanismos relacionados.

Em um estudo descritivo realizado entre os anos de 2010 e 2012, que teve o objetivo de analisar o número de óbitos advindos do uso alcoólico nas diferentes unidades da federação do Brasil, demonstrou que a mortalidade prevaleceu significativamente na Região Nordeste com 15.135 mortes para o sexo masculino e 1.895 mortes para o sexo feminino (GARCIA *et al.*, 2015).

Nos últimos anos, tem crescido o número de benefícios concedidos a pessoas acometidas dos problemas advindos do uso exacerbado do álcool. Dados do Ministério da Previdência Social, em Teresina (PI), revelaram que de janeiro de

2003 a abril de 2014, o Instituto Nacional de Seguro Social (INSS) concedeu 572 benefícios a segurados com doenças relacionadas ao alcoolismo. Cerca de 1 milhão de reais foi investido em vítimas asseguradas pelo órgão que apresentavam doenças associadas ao alcoolismo (Ministério da Previdência Social, 2014). Em Parnaíba, região norte do estado do Piauí, não existem levantamentos de dados epidemiológicos a respeito do alcoolismo.

2.1.5 Alcoolismo e Genética

É perceptível que o alcoolismo mostra ser um tema discutido em todo o mundo na literatura científica, sendo influenciado por fatores genéticos e ambientais, isso explica o caráter multifatorial que apresenta. Por isso, vários estudos de associação têm buscado entender a relação que existe em alguns genes que podem, possivelmente, estarem ligados a uma predisposição à dependência alcoólica (WRZOSEK *et al.*, 2012; JONAS *et al.*, 2014; VASCONCELOS *et al.*, 2015; WU *et al.*, 2016; FELTMANN *et al.*, 2018).

Estudos com gêmeos demonstraram a existência de uma concordância maior em monozigóticos quando comparados com dizigóticos; isto sugere um efeito genético, principalmente se tratando do alcoolismo de início precoce. Além disso, outros estudos tentando compreender a herdabilidade que existe no alcoolismo, revelaram que há aproximadamente 40-60% de herdabilidade tanto para homens quanto para mulheres (DOTTO-BAU *et al.*, 2002).

A herdabilidade do alcoolismo está intimamente relacionada com o tabagismo, podendo explicar a forte associação que há entre esses dois problemas, tomando como forte consideração as vias neurobiológicas e de metabolização que estes dois fenótipos compartilham (KOOPMANS *et al.*, 1998; HITSCHFELD *et al.*, 2015; WEINBERGER *et al.*, 2015).

Mesmo sendo desenvolvidos de maneira escassa, os estudos de adoção apresentam uma importância por distinguir ou separar as influências genéticas e ambientais, todavia, os que já foram feitos mostraram uma prevalência significativamente maior em filhos de pais biológicos para uma predisposição à dependência alcoólica, com diagnóstico semelhante no sexo masculino e feminino (MESSAS; FILHO, 2004).

Em resultados prévios, nosso grupo mostrou que o polimorfismo *SLC6A3 VNTR* (DAT) relacionado ao sistema de recompensa pela via dopaminérgica, foi significativamente associado com suscetibilidade para a dependência do álcool em uma população do Nordeste Brasileiro (VASCONCELOS *et al.*, 2015). Neste mesmo estudo, foi observado uma chance de 6,25 vezes maior em indivíduos portadores do genótipo A10/A10 a dependência do álcool em nossa amostra populacional, indicando que fatores genéticos são importantes determinantes no fenótipo alcoolista.

Com o avanço e o melhoramento das técnicas em Genética Molecular, vários achados epidemio-moleculares foram demonstrados, buscando entender a associação que existe entre alguns genes e a dependência alcoólica (HWU, CHEN, 2000; TYNDALE, 2003; PALMER *et al.*, 2012; WU *et al.*, 2016). O início e a manutenção do hábito alcoolista podem estar associados a genes que codificam receptores do sistema serotoninérgico, isso porque o álcool parece apresentar trajetos envolvidos no SR cerebral. O gene *5HT2A* mostra ser um dos mais ligados com a dependência alcoólica e com outros fenótipos neurológicos tais como autismo, esquizofrenia e depressão (WRZOSEK *et al.*, 2012; WATANABE *et al.*, 2014; GUIARD e Di GIOVANNI, 2015; NADJJA *et al.*, 2015; WU *et al.*, 2016; CHEAH *et al.*, 2017).

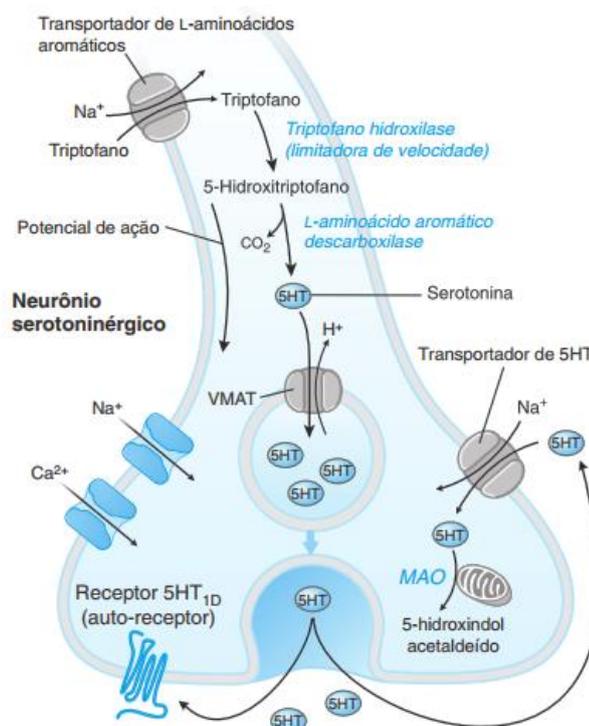
2.2 CIRCUITO SEROTONINÉRGICO

Dentre outros neurotransmissores de concepção do reforço positivo ao álcool, pode-se destacar a serotonina. A serotonina é sintetizada a partir do aminoácido Triptofano pela enzima triptofano hidroxilase (TPH), que converte o triptofano em 5-hidroxitriptofano. A seguir, a L-aminoácido aromático descarboxilase converte o 5-hidroxitriptofano em serotonina (5-HT). A neurotransmissão é iniciada por um potencial de ação no neurônio pré-sináptico, que acaba produzindo a fusão das vesículas pré-sinápticas com a membrana plasmática, através de um processo dependente de cálcio. A serotonina pode estimular tanto auto-receptores, proporcionando a inibição da sua retroalimentação, ou pode ser sequestrada por vesículas para ser degradada pela MAO (Monoamina Oxidase) mitocondrial (**Figura 2**) (KANDEL *et al.*, 2000; GOLAN *et al.*, 2012).

No núcleo de rafe, principalmente na parte dorsal da medula espinhal e no hipotálamo, pode ocorrer a liberação de serotonina de diversos neurônios. A serotonina atua como inibidora das vias de dor na medula, e está relacionada com padrões de comportamento, ansiedade, sono, humor, depressão e supressão de apetite (CROWELL, 2004).

Sabe-se que a serotonina exibe uma variedade de efeitos devido à presença de múltiplos subtipos de receptores presentes em neurônios, musculatura lisa, e possivelmente, nas células neuroendócrinas. Ela apresenta sete tipos ou famílias e vários subtipos de receptores que já foram identificados, denominados como 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆ e 5-HT₇ (NICHOLS *et al.*, 2008; OLIVEIRA, 2013).

Figura 2: Regulação sináptica da neurotransmissão da serotonina



Mecanismos de síntese, neurotransmissão e retroalimentação da serotonina. Adaptado de GOLAN, *et al.*, 2012.

A serotonina pode ligar-se ao seu receptor, ativando proteínas na célula chamadas proteínas G. A ativação dessas proteínas, em parte, pode afetar os canais de íons na membrana da célula e induzir a formação de moléculas de sinalização (p.ex.: segundos mensageiros), que podem afetar os canais iônicos ou viajar para o núcleo da célula e promover a alteração da expressão gênica (LOVINGER, 1997; PURVES *et al.*, 2004; BOSANERA *et al.*, 2006).

É relatado que o álcool induz a liberação dos principais neurotransmissores do SNC, tais como dopamina, noradrenalina, serotonina e outros compostos opióides. Tal substância promove a ativação neuronal na ATV e posterior liberação dopaminérgica e serotoninérgica nos núcleos *accumbens* – sendo esse processo primordial para os efeitos de recompensa cerebral (FELTMANN *et al.*, 2018).

O álcool interage com a transmissão sináptica serotoninérgica no cérebro por vários caminhos. Uma exposição aguda altera vários aspectos das funções da serotonina. Em humanos, os níveis de metabólitos de serotonina na urina e no sangue aumentam logo após uma simples ingestão de álcool, indicando aumento da liberação de serotonina no sistema nervoso (YOSHIMOTO *et al.*, 1991; LOVINGER, 1997).

Estudos experimentais em animais têm mostrado que a exposição aguda de álcool eleva os níveis de serotonina, sugerindo que mais serotonina é liberada dos axônios serotoninérgicos. Convergindo a esse fato, essa liberação aumentada foi observada em regiões do cérebro associada ao controle de consumo ou uso de numerosas substâncias, incluindo muitas drogas de abuso (YOSHIMOTO *et al.*, 1991; YOSHIMOTO *et al.*, 2012; SACHS *et al.*, 2014; WATANABE *et al.*, 2014).

O álcool pode interferir também com as funções dos receptores da serotonina. Aumento da atividade da serotonina no receptor 5-HT₂ causada pela exposição crônica de álcool pode contribuir para a Síndrome da Recompensa Alcoólica (SRA). Alcoolistas dependentes frequentemente experimentam elevação dos níveis de ansia depois de cessar o consumo. (PANOCKA *et al.*, 1993; REZVANI *et al.*, 2014).

A serotonina ao se ligar ao receptor pode estimular a atividade dopaminérgica nos neurônios na ATV, fazendo assim com que haja um aumento da atividade desses neurônios induzida pelo álcool e causando elevação da liberação de dopamina. Com isso, a ativação dependente de serotonina desses neurônios dopaminérgicos pode reforçar o comportamento de ingestão de álcool. Este cenário sugere que a serotonina, por meio da sua interação com o sistema dopaminérgico pode desempenhar papel central na produção dos efeitos de recompensa cerebral (BRODIE *et al.*, 1995; LOVINGER, 1997).

Mutações em genes associados ao Sistema Serotoninérgico expressam seu fenótipo em receptores que compõem esse circuito, influenciando nos mecanismos de recompensa cerebral, levando a supor que o indivíduo que abusa do álcool

busque cada vez mais a substância, a fim de adquirir um nível de prazer adequado (CRABBE *et al.*, 1996; RISINGER *et al.*, 1996; HEINS *et al.*, 2001; BOSANERA *et al.*, 2006; WATANABE *et al.*, 2014).

2.3 O GENE 5HT2A

2.3.1 Polimorfismos A-1438G e T102C

A serotonina caracteriza-se como um neurotransmissor sintetizado pelos neurônios, atuando na modulação de mecanismos fisiológicos da alimentação, como também nas variações de humor, constrição vascular cerebral, liberação de neurotransmissores e agregação plaquetária, além de estar relacionado a vários transtornos psiquiátricos e abuso de substâncias (POLINA *et al.*, 2009).

Os níveis de serotonina podem aumentar com o consumo de álcool, sugerindo que variações no sistema nervoso serotoninérgico podem influenciar alguns aspectos relacionados ao alcoolismo. Tais variações enquadram-se em âmbito genético, levando a crer que polimorfismos em genes envolvidos neste circuito podem ter importante papel no hábito alcoolista em indivíduos (YOSHIMOTO *et al.*, 2012).

Os receptores do tipo 2 são classificados em três subtipos: A, B e C. Localizado na região cromossômica 13q14-q21, o gene do receptor 5-HT2A apresenta três éxons e dois íntrons, estendido por mais de 63Kb (CHEN *et al.*, 1992). Um tipo de variação muito comum nesse gene é a troca de uma base nitrogenada em outra (SNPs – do inglês, *Single Nucleotide Polymorphisms*), onde cerca de 169 foram identificados e que podem ter efeito tanto sobre a atividade transcricional como na estrutura conformacional da proteína envolvida (WILSON, 2008).

A troca de uma base nucleotídica pode gerar a codificação de um aminoácido diferente, e neste caso, pode haver uma alteração estrutural do receptor. Entretanto, não é o que ocorre para o polimorfismo T102C, no qual as sequências TCT ou TCC codificam ambas o aminoácido serina, sendo por esse motivo classificado como um polimorfismo silencioso (PEROUTKA, 2000). Entretanto, os alelos T e C determinam uma expressão gênica diferente, como fora demonstrado por Poleskaya e Sokolov (2002). Tais autores, a partir da análise de tecido cerebral

(córtex temporal) pós-mortem de indivíduos heterozigotos (TC), determinaram a quantidade de moléculas de RNAm do receptor 5HT2A transcritas do alelo T e do alelo C, observando que a ocorrência do alelo C em comparação com o alelo T mostrou uma diminuição na expressão gênica, e como consequência, na quantidade de receptores. Dessa forma, apesar de ser um polimorfismo silencioso, o T102C é funcional, levando-nos a inferir que a diminuição da densidade dos receptores em indivíduos portadores do alelo C pode estar associada com surgimento de sensações desagradáveis em indivíduos que abusam do álcool, como raiva, ansiedade e uma necessidade de recorrer à substância que estimula a liberação de serotonina na tentativa de ganhar um alívio temporário dos sintomas.

Outra variação que se destaca é a transição A>G na posição -1438 do gene *5HT2A*, que corresponde a um polimorfismo funcional que afeta a atividade promotora. O alelo G está associado a uma significativa diminuição da expressão do gene em relação ao alelo A (PARSONS *et al.*, 2004; MYERS *et al.*, 2007), o que conduz a levantar o pressuposto que a diminuição transcricional e, subsequentemente de receptores no SR pode induzir os indivíduos a buscarem níveis anteriores de recompensa cerebral. Foi sugerida uma contribuição deste polimorfismo com o abuso do álcool em indivíduos, demonstrando forte ligação com a característica fenotípica (NAKAMURA *et al.*, 1999; HWU, CHEN, 2000; PREUSS *et al.*, 2001; JONAS *et al.*, 2014).

É importante considerar o papel das frequências alélicas nos diferentes estudos genéticos. Para o polimorfismo T102C, o alelo C apresenta uma frequência de 54% em caucasianos, e em africanos de 61%; enquanto que para a variante A-1438G, o alelo G apresenta frequência de 56% a 59% em caucasianos e africanos respectivamente (CAO *et al.*, 2014).

Em um estudo realizado no Sul do Brasil, Polina e colaboradores (2009) analisaram dois grupos (grupo caso – indivíduos alcoolistas fumantes, e grupo controle); verificando no grupo de alcoolistas fumantes uma maior prevalência do genótipo AA (26%) e menor frequência do genótipo GG (16%) quando comparado ao grupo controle (24% e 36%, respectivamente), resultando em diferença significativa nessa distribuição. Esses autores sugeriram uma provável contribuição do polimorfismo A-1438G com o uso abusivo do álcool.

Hwu e Chen (2000) investigaram o papel do polimorfismo T102C com o abuso do álcool associado a problemas de comportamento em uma população

masculina de Taiwan, e observaram as frequências dos alelos T e C entre homens que abusavam da substância com (T= 59,1% e C=40,9%) e sem (T=79,5% e C=20,5%) problemas de comportamento apresentando diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), o que levou os pesquisadores a supor uma possível contribuição desses alelos com o abuso do álcool.

Jakubczyk e colaboradores (2012) observaram uma influência significativa do genótipo CC para o polimorfismo T102C em alcoolistas em uma população masculina da Polônia. Estes confirmaram a hipótese de que fatores genéticos são importantes determinantes para o hábito alcoolista e que a via serotoninérgica mostra um papel relevante no estabelecimento desse comportamento.

Particularmente, os polimorfismos T102C e A-1438G no gene do receptor da serotonina *5HT2A* exercem um papel significativo não apenas no fenótipo alcoolista, como também em outros diferentes comportamentos e transtornos tais como tabagismo, esquizofrenia, depressão, comportamento suicida, obesidade e síndrome do pânico (ARIAS *et al.*, 2001; DO PRADO-LIMA *et al.*, 2004; CORREA *et al.*, 2007; YOON *et al.*, 2008; SORLÍ *et al.*, 2008; DU *et al.*, 2011).

2.3.2 Desequilíbrio de ligação (DL)

É de extrema importância definir que o desequilíbrio de ligação – DL (uma associação não aleatória de alelos em *loci* diferentes) é um indicador das forças genéticas de uma determinada população que estruturam um genoma. Por causa do crescimento explosivo de métodos para avaliar a variação genética em uma escala fina, cientistas estão explorando cada vez mais o desequilíbrio de ligação, a fim de compreender o passado, eventos evolutivos e demográficos, bem como mapear genes que estão associados a características quantitativas e doenças complexas (SLATKIN, 2008).

Quando uma mutação causadora de uma patologia ocorre em uma população, a mesma tem lugar em um determinado cromossomo e forma um conjunto haplotípico com *loci* adjacentes. Na geração seguinte a tendência é que esse alelo mutante ocorra no mesmo haplótipo original, excetuando-se os casos de recombinação. Chama-se desequilíbrio de ligação, a ocorrência na população de uma frequência maior de uma determinada combinação entre dois *loci* do que a esperada pelo produto de suas frequências individuais (FEITOSA; KRIEGER, 2002).

Ressaltando que o DL é dependente da taxa de recombinação e que quanto maior a taxa de recombinação, mais rápida será a aproximação do equilíbrio entre os dois *loci* (KRUGLYAK, 1999).

Muitos trabalhos anteriores realizados em diversas populações demonstram que os SNPs A-1438G e T102C estão em região cromossômica com completo desequilíbrio de ligação ($D' = 1,00$) (PREUSS *et al.*, 2000; YOON *et al.*, 2008; SAIZ *et al.*, 2009; JAKUBCZYK *et al.*, 2012; WRZOSEK *et al.*, 2012), sendo fator determinante em como os alelos desses *loci* são herdados ao passar das gerações, de acordo com a distância desses alelos no cromossomo e na quantidade de recombinações possíveis ao longo do tempo.

Considerando os dados expostos acima, o presente trabalho demonstrou extrema importância em vista do alcoolismo ser um problema atual prevalente na sociedade brasileira, e os polimorfismos A-1438G e T102C tem sido fortes candidatos na investigação de predisposição para a dependência alcoólica em populações nas quais foram estudados. Por achados prévios do nosso grupo de pesquisa (VASCONCELOS *et al.*, 2015), foi encontrada associação genética para genes envolvidos na recompensa cerebral com suscetibilidade a dependência do álcool aumentando ainda mais os questionamentos de que outros genes possam estar relacionados com a modulação do fenótipo alcoolista. Até o presente momento, não existem muitos estudos brasileiros e mais precisamente no Nordeste que correlacionem tais polimorfismos com o alcoolismo, principalmente para o polimorfismo T102C. Com isso, esse estudo teve o intuito de associar os polimorfismos citados no gene *5HT2A* à dependência do álcool, por meio de um estudo caso-controle em uma população masculina do Nordeste Brasileiro, procurando assim com os resultados obtidos, contribuir com a literatura científica, permitir a construção de abordagens terapêuticas no futuro, bem como promover um melhor planejamento de alocação de recursos no combate ao alcoolismo.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estimar a prevalência dos polimorfismos A-1438G e T102C do gene *5HT2A* e avaliar suas relações com a predisposição ou suscetibilidade para a dependência do álcool em uma população do Nordeste Brasileiro.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar um levantamento das frequências genótípicas e alélicas destas variantes polimórficas em uma população de alcoolistas e controles no município de Parnaíba-PI.
- Determinar se a frequência da variante alélica proposta, e de seu respectivo genótipo selvagem, são diferentes entre o grupo de alcoolistas e o grupo de controles, objetivando a identificação de variações na predisposição da dependência ao álcool.
- Investigar se as frequências dos polimorfismos no gene *5HT2A* estão associadas a características clínicas do alcoolismo, tais como histórico familiar e hábito tabagista.
- Verificar o desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos do gene *5HT2A* na população estudada.

4. METODOLOGIA

4.1 NÚMERO AMOSTRAL E SELEÇÃO DOS SUJEITOS

O presente trabalho é do tipo caso-controle, por isso fez-se necessário o recrutamento de 113 indivíduos alcoolistas e 114 indivíduos controles, ambos os grupos abrangendo participantes apenas do sexo masculino, e de ancestralidade predominantemente europeia (VASCONCELOS *et al.*, 2015). O recrutamento de todos os participantes da pesquisa ocorreu no período de 2011 a 2013. Vale ressaltar que foi realizado cálculo para obtenção de número amostral, revelando a necessidade de um número amostral de aproximadamente 250 indivíduos para cada grupo. O cálculo teve como base a utilização da seguinte fórmula $n = Z^2 \times [pq] / d^2$, onde **Z** é uma constante com valor de 1,96, **p** e **q** são as frequências do alelo maior e menor, respectivamente; e **d** o erro, considerando que seja igual a 5%. O número amostral não foi alcançado em vista das limitações relacionadas a financiamento da pesquisa e critérios de inclusão.

A avaliação diagnóstica de todos os indivíduos participantes foi realizada por meio de prontuários médicos e questionários com base na entrevista de âmbito clínico baseada na 4ª. edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos-DSM-IV Mentais (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th edition - DSM-IV) (American Psychiatric Association, 1994).

Para realização desse projeto, utilizaram-se amostras de sangue periférico coletadas de indivíduos alcoolistas admitidos para tratamento e acompanhamento em Instituições Municipais e Estaduais de assistência aos usuários que fazem uso crônico do álcool e Hospitais da região de Parnaíba, no estado do Piauí, Nordeste do Brasil. Tais indivíduos enquadram-se em pelo menos três dos atuais critérios de diagnóstico para dependência do álcool (303,90) ou o abuso do álcool (305,00) do DSM-IV ou CID-10 que são: um forte desejo de consumo, dificuldades em controlar a sua utilização, persistência em seu uso apesar das consequências nefastas, maior prioridade dada ao uso de álcool do que para outras atividades e obrigações, maior tolerância, e às vezes um estado de abstinência fisiológica. Para seleção dos indivíduos, fez-se necessária a utilização de critérios de inclusão e exclusão. Para o grupo de alcoolistas, os critérios de inclusão adotados foram: apresentar idade igual ou superior a 18 anos, consumo abusivo ou crônico do álcool; no entanto, para o

grupo controle os critérios de inclusão utilizados foram: idade igual ou superior a 18 anos e não fazer consumo exagerado ou pesado do álcool. Critérios de exclusão foram adotados para ambos os grupos: indivíduos que apresentassem doenças como Hepatite C, HIV, ISTs, esquizofrenia, desordens de humor, demência, câncer não relacionado com o consumo de bebidas alcoólicas, dependência de outras substâncias além da nicotina e álcool, parentesco entre os participantes e não consentimento para participação na pesquisa.

Os participantes foram informados sobre o objetivo da pesquisa, da confidencialidade dos dados da pesquisa e da identidade dos sujeitos e só mediante assinatura no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE (APÊNDICE I) responderam ao questionário (APÊNDICE II) para coleta das informações. Os dados adquiridos do grupo alcoolista por meio do questionário de estudo transversal serviram para apurar o grau de dependência de acordo com a frequência e a quantidade de álcool consumida, considerando os diferentes tipos de bebida (**Tabela 1**).

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

| Tipo de Bebida | Porcentagem de álcool |
|-------------------------|-----------------------|
| Cerveja | 5% |
| Vinho | 12% |
| Uísque/ Conhaque/ Pinga | 40% |

Fonte: Departamento de Psicobiologia da UNIFESP/EPM.

Na tentativa de obter as doses-equivalentes de uma determinada bebida, é preciso multiplicar a quantidade consumida por sua concentração alcoólica. Utilizando esse método, tem-se a quantidade absoluta de álcool da bebida conforme demonstrado na **Tabela 2** (Núcleo Einstein de Álcool e Drogas do Hospital Israelita Albert Einstein – NEAD).

Tabela 2: Quantidade de álcool contida em cada dose de bebida

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

(*) Quantidade de álcool em gramas é obtida a partir da multiplicação da quantidade de álcool contido na bebida pela densidade do álcool (d=0,8).

Seguindo à resolução nº196/96 do Conselho Nacional de Saúde, que aborda as normas para pesquisas envolvendo seres humanos, este projeto obteve aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Piauí (CAAE nº 0234.0.045 – 00 010) (ANEXO I).

4.2 EXTRAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E ARMAZENAMENTO DO DNA

As amostras de sangue periféricos coletadas em tubo a vácuo contendo EDTA foram processadas no Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Piauí – *Campus* Ministro Reis Veloso, localizado em Parnaíba (PI), onde se executou os procedimentos de extração e aliquotação. Foi realizada extração de DNA a partir de sangue total dos alcoolistas e controles, utilizando o *kit* de extração de DNA (*Wizard*® *Genomic* – Promega; Madison, Wisconsin, USA), conforme especificações do protocolo fornecido pelo fabricante (ANEXO II), com algumas modificações.

A pureza e concentração do DNA foram determinadas por eletroforese em gel de agarose a 0,8%, corado com Gel Red® (corante fluorescente para ácidos nucleicos estável e seguro ambientalmente que substitui o brometo de etídio), e em espectrofotômetro modelo Biospec-nano UV-Vis (Shimadzu®, Kyoto, Japão), por meio do comprimento de onda de 260 e 280 nm. Posteriormente a isto, as amostras de DNA de trabalho diluídas a 100 ng/μl em água estéril e, juntamente com o restante do sangue coletado, foram armazenadas em freezer (-20°C) no laboratório de Genética e Biologia Molecular do *Campus* de Parnaíba (PI), onde passaram a compor o banco de DNA do Projeto intitulado “*Estudo Citogenético e Molecular em uma População de Alcoolistas do Estado do Piauí*”, coordenado e supervisionado pela Prof^a. Dr^a. Renata Canalle.

4.3 DESENHO DOS PRIMERS

Os *primers* foram desenhados a partir das sequências genômicas das regiões polimórficas do gene *5HT2A*, obtidas no banco de dados de SNP (dbSNP) do NCBI – National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nih.gov/SNP>). As informações referentes ao SNP de interesse do gene *5HT2A* foram acessadas no dbSNP, a partir da entrada pelo seu número de acesso rs6313 (T102C) e rs6311 (A-1438G).

Para a escolha do melhor par de *primers* utilizou-se o programa *Primer3* (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). Gene Runner (Versão 3.05, Hasting Software, Inc.) foi utilizado para a construção e avaliação das melhores condições dos *primers*.

A **tabela 3** apresenta os *primers* utilizados e o tamanho do produto de amplificação de cada um. Os *primers* para A-1438G geram um produto de 202 pb, enquanto que os *primers* para T102C promove a formação de um produto de 355 pb.

Tabela 3: Sequências de primers para amplificações das regiões de interesse do gene *5HT2A*

| Gene/Polimorfismo | Primer | Sequência (5' – 3') | Tamanho | pb* |
|-----------------------|----------------|-----------------------|---------|-----|
| <i>5HT2A</i> /A-1438G | <i>Foward</i> | GTCAGTAATTCCTCTGGAC | 21 | 202 |
| | <i>Reverse</i> | GCTTTTGAGAGAACTGGAG | 20 | |
| <i>5HT2A</i> /T102C | <i>Foward</i> | GTACACCAGCCTCAGTGTTAC | 21 | 355 |
| | <i>Reverse</i> | CTGTCAGTAAAGCAGACCAG | 20 | |

*pb= pares de bases

4.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Para a análise dos polimorfismos A-1438G e T102C no gene *5HT2A* foi empregada a técnica de PCR, seguida por tratamento com endonucleases de restrição (*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphisms* – PCR-RFLP). Para as duas variantes, foi utilizado o mesmo protocolo nas seguintes condições:

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

| Reagente | Volume e Concentração |
|-------------------|--|
| H ₂ O | 13,45 µL |
| Tampão 10x | 2,5 µL (20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8,4) |
| MgCl ₂ | 0,75 µL (1,5 mM) |
| Primer (Forward) | 1,0 µL (0,4 µM) |
| Primer (Reverse) | 1,0 µL (0,4 µM) |
| dNTPs | 5,0 µL (0,2 mM) |
| Taq Polimerase | 0,3 µL (1,5 U) |
| DNA genômico | 1,0 µL (100 ng) |
| Total | 25 µL |

Os reagentes foram preparados (*mix* de PCR) em microtubos de 1,5 mL, e logo após, distribuídos em microtubos de 250 µL, identificados com os números das amostras a serem devidamente amplificadas. Todas as reações de PCR foram efetuadas dentro de uma cabine de segurança de fluxo unidirecional horizontal da marca VECO. Antes do início de cada reação na cabine, foi necessária a utilização da luz UV (ultravioleta) por 30 minutos para esterilizar o ambiente onde as reações foram executadas. É de grande importância utilizar controles negativos em atividades laboratoriais, a fim de detectar prováveis erros no experimento decorrentes do manuseio inadequado de algum material ou até mesmo problemas com reagentes. Sendo assim, nos tubos identificados com os números das amostras a serem amplificadas, foi adicionado o DNA genômico, exceto no controle negativo (também chamado de branco). Subsequente a identificação, os tubos foram inseridos na placa do termociclador *Applied Biosystems Veriti™ Thermal Cyclers®* (Califórnia, USA), o qual foi previamente programado com as devidas condições de temperatura e tempo para os polimorfismos do estudo (**Tabelas 5 e 6**).

Tabela 5: Programa de amplificação do polimorfismo em A-1438G do gene *5HT2A*

| Passos | Temperatura | Tempo | Ciclos |
|----------------------|-------------|--------|--------|
| Desnaturação inicial | 95°C | 10 min | 1x |
| Desnaturação | 95°C | 45 s | 35x |
| Anelamento | 55°C | 45 s | |
| Extensão | 72°C | 45 s | |
| Extensão Final | 72°C | 5 min | 1x |

Tabela 6: Programa de amplificação do polimorfismo em T102C do gene *5HT2A*

| Passos | Temperatura | Tempo | Ciclos |
|----------------------|--------------------|--------------|---------------|
| Desnaturação inicial | 95°C | 5 min | 1x |
| Desnaturação | 95°C | 45 s | 35x |
| Anelamento | 60°C | 45 s | |
| Extensão | 72°C | 45 s | |
| Extensão Final | 72°C | 5 min | 1x |

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% a 110V por 30 minutos, onde na corrida utilizou-se 5 µL do produto de PCR com 3 µL de corante BLUE (azul de bromofenol + xileno cianol + glicerol + água) e 2 µL de Gel Red® 0,2% (1 µL de Gel Red® 10.000x + 500 µL de água), a mesma quantidade para o branco. Para o marcador de peso molecular (50 pb e 100 pb; polimorfismos A-1438G e T102C, respectivamente) utilizou-se 2 µL do mesmo e 2 µL de Gel Red®. A visualização da banda por foto-documentação no Transluminador modelo L-IX-HE (LOCCUS® Biotecnologia – Cotia, São Paulo, Brasil) foi realizada sob luz UV, para confirmação tanto da amplificação como da ausência de contaminação no controle negativo.

4.5 GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS NO GENE *5HT2A*

Logo após a amplificação das regiões de interesse das variantes polimórficas A-1438G e T102C, a genotipagem do gene *5HT2A* foi realizada pela Técnica de RFLP. Para ambos os polimorfismos as condições de digestão foram as mesmas, tendo um volume total de 10 µL, sendo: 5 µL do produto da PCR, 0,2 µL (2U) da enzima de restrição *HpaII* (*New England BioLabs*, USA), 1,0 µL de tampão específico *NEBuffer1* e H₂O em quantidade suficiente para completar o volume final. Seguinte a esse processo, incubou-se os tubos a 37°C por um período de 16 horas em banho-maria a seco.

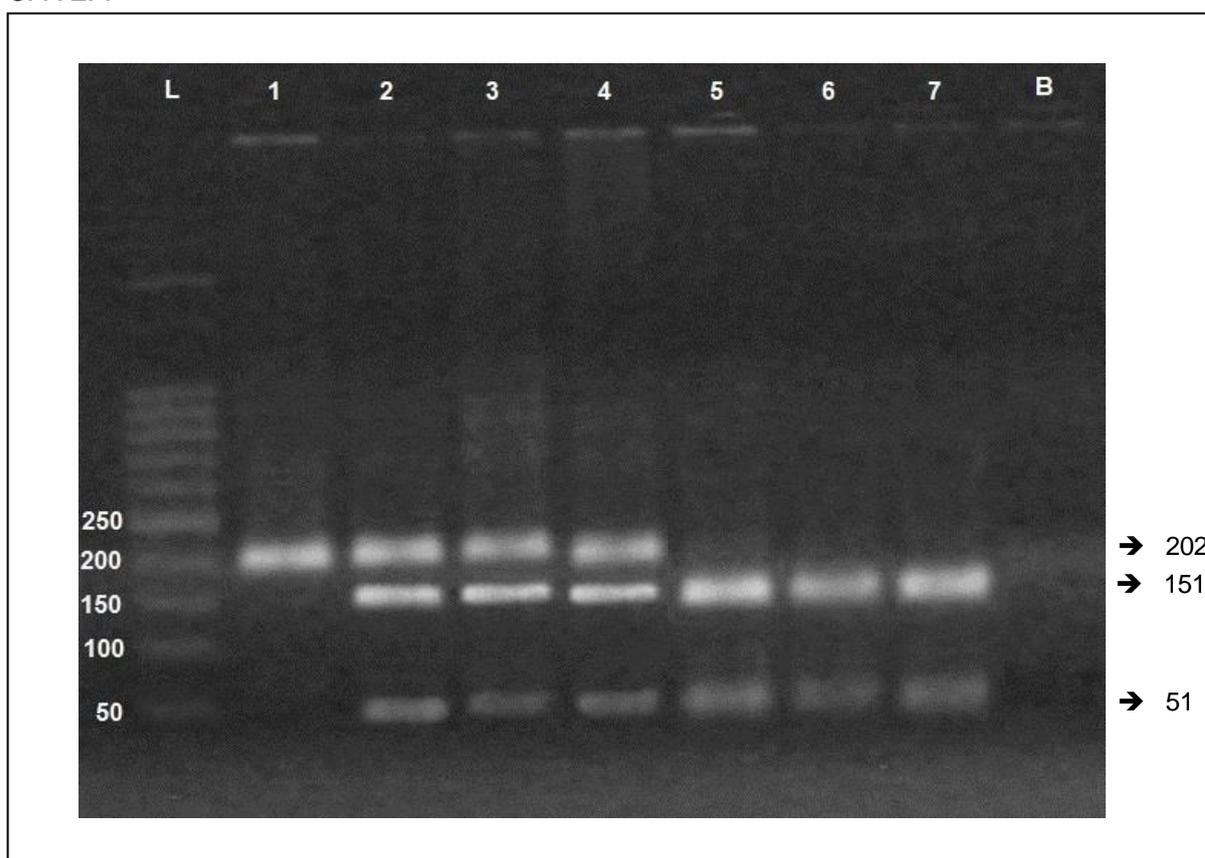
É relevante enfatizar que na presença dos polimorfismos A-1438G e T102C localizados no gene do receptor da serotonina 2A (*5HT2A*), a enzima *HpaII* reconhece o sítio de restrição (5'-C▼CGG-3') que, seguida a digestão enzimática, promove a observação do perfil de bandas correlacionados aos três genótipos (**Tabela 7**).

Tabela 7: Genotipagem e perfis de bandas das variantes polimórficas

| Gene/Polimorfismo | Genótipo | Perfis de bandas |
|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| <i>5HT2A</i> / A-1438G | AA (Selvagem) | 202 pb |
| | AG (Heterozigoto) | 202 pb, 151 pb e 51 pb |
| | GG (Homozigoto mutante) | 151 pb e 51 pb |
| <i>5HT2A</i> /T102C | TT (Selvagem) | 355 pb |
| | TC (Heterozigoto) | 355 pb, 212 pb e 143 pb |
| | CC (Homozigoto mutante) | 212 pb e 143 pb |

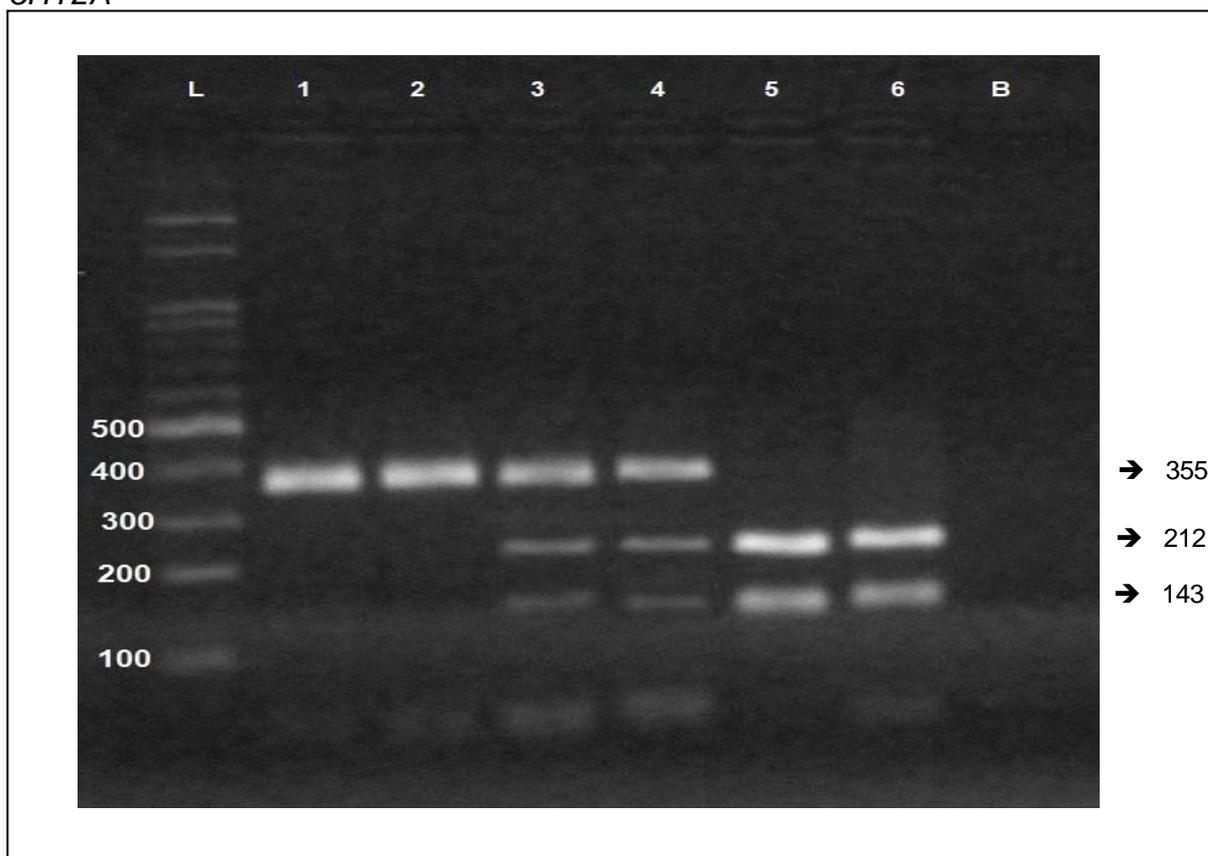
Após a digestão, os produtos da RFLP, o controle negativo e o marcador de peso molecular (50 pb e 100 pb; polimorfismos A-1438G e T102C, respectivamente), foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% em cuba horizontal preenchida com TBE 1x (Tris, Ácido Bórico, EDTA) e corado com Gel Red®, aplicando uma corrente elétrica de 110V por 40 minutos, para ambos os polimorfismos do estudo. Sucedendo a corrida, a visualização do gel ocorreu sob luz UV no Transluminador modelo L-IX-HE (LOCCUS® Biotecnologia – Cotia, São Paulo, Brasil) para identificação dos três genótipos possíveis, sendo armazenado no banco de dados (**Figuras 3 e 4**), onde foram anotados para análise estatística.

Figura 3: Visualização dos produtos de digestão do polimorfismo A-1438G do gene *5HT2A*



Genótipos do SNP A-1438G obtidos após tratamento com a enzima *HpaII* e posterior aplicação em gel de agarose (2%), corado com gel red® (cores modificadas), com auxílio de um transluminador com luz ultravioleta. Observa-se neste gel os três genótipos possíveis para o polimorfismo A-1438G do gene *5HT2A*. Em L (*Ladder*) está o marcador de peso molecular (50 pb). Em 1 está o indivíduo homocigoto selvagem (202 pb); Em 2, 3 e 4 indivíduos heterocigotos (202 pb, 151 pb e 51 pb); Em 5, 6 e 7 indivíduos homocigotos mutantes (151 pb e 51 pb). O B representa o controle negativo sem contaminação.

Figura 4: Visualização dos produtos de digestão do polimorfismo T102C do gene *5HT2A*



Genótipos do SNP T102C obtidos após tratamento com a enzima *HpaII* e posterior aplicação em gel de agarose (2%), corado com gel red® (cores modificadas), com auxílio de um transluminador com luz ultravioleta. Observa-se neste gel os três genótipos possíveis para o polimorfismo T102C do gene *5HT2A*. Em L (*Ladder*) está o marcador de peso molecular (100 pb). Em 1 e 2 indivíduos homocigotos selvagens (355 pb); Em 3 e 4 indivíduos heterocigotos (355pb, 212 pb e 143 pb); Em 5 e 6 indivíduos homocigotos mutantes (212 pb e 143 pb). O B representa o controle negativo sem contaminação.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As frequências alélicas e genotípicas foram obtidas para os grupos alcoolistas e controles por simples contagem. A distribuição das frequências alélicas e genotípicas em associação com a dependência alcoólica foi submetida ao teste do qui-quadrado (χ^2), exato de Fisher e *odds ratio* (OR) com intervalo de confiança (IC) de 95% e significância $p < 0,05$, como uma estimativa de chance ou risco relativo e grau de associação. A análise dos dados sucedeu-se pelo software BioEstat 5.3 (Instituto Mamirauá, Brasil). Teste *t* para amostras independentes foi usado para avaliar as diferenças dos dados demográficos pela utilização do programa IBM SPSS Statistics 20 (SPSS Inc, EUA).

Por fim, para testar o equilíbrio de Hardy-Weinberg, as distribuições genotípicas observadas e esperadas foram comparadas pelo teste do qui-quadrado. A análise do desequilíbrio de ligação foi executada no Haploview 4.2 (BARRET *et al.*, 2005).

5. RESULTADOS

Esse projeto teve seu campo amostral constituído por 227 indivíduos, sendo 113 alcoolistas em atendimento e seguimento clínico em um centro de Tratamento de Referência (CAPS-AD) e 114 controles que não apresentavam histórico de consumo alcoólico pesado ou moderado. Todos os participantes foram do sexo masculino com idade entre 18 e 91 anos, recrutados no município de Parnaíba, estado do Piauí, Brasil.

As características demográficas tais como: idade, anos de estudo (escolaridade), média de consumo do álcool, tabagismo e história familiar de alcoolismo foram analisadas nos grupos caso e controle (**Tabela 8**). A variável idade para ambos os grupos não diferiu significativamente; no entanto, é importante mencionar que para as demais características observadas houve uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). O grupo alcoolista demonstrou uma maior média de consumo de doses de bebida por dia (35,3) quando comparado com a população controle (0,07); porém o contrário pode ser notado para a variável escolaridade, na qual o grupo controle obteve uma maior média de anos (9,59) do que no grupo alcoolista (5,34). O histórico familiar positivo e a frequência de hábito tabagista mostraram-se mais prevalentes no grupo alcoolista do que no controle.

Tabela 8: Características clínicas e demográficas das amostras

| | Alcoolistas | Controles | (95% IC) | p^a |
|--|--------------------|------------------|-------------------|----------------------|
| | média ± DP | média ± DP | | |
| Idade (anos) | 44,64 ± 17,6 | 48,9 ± 22,8 | (1,05 – 9,61) | > 0,05 |
| Escolaridade (anos) | 5,34 ± 3,7 | 9,59 ± 4,9 | (2,62 – 5,87) | < 0,05 |
| Média de consumo de doses/dia [#] | 35,3 ± 19,9 | 0,07 ± 0,25 | (-38,97 – -31,52) | < 0,05 |
| | NA (%) | NA (%) | Correção de Yates | p ^b |
| Fumante | 66 (58,4) | 27 (23,6) | (26,87) | < 0,05 |
| Não fumante | 47 (41,6) | 87 (76,4) | | |
| História familiar de alcoolismo | 79 (69,9) | 41 (35,9) | (24,90) | < 0,05 |
| Sem história familiar de alcoolismo | 34 (30,1) | 73 (64,1) | | |

p^a = valor a partir do teste t independente; p^b = valor a partir do teste do qui-quadrado; DP = desvio padrão; IC = intervalo de confiança; NA = número absoluto . [#] A média de consumo de bebidas por dia está em doses, definido de acordo com o Instituto Nacional de Abuso do Álcool e Alcoolismo - (NIAAA) onde 1 dose é igual a 14g de álcool (<http://rethinkingdrinking.niaaa.nih.gov/WhatCountsDrink/WhatsAstandardDrink.asp>).

5.1 POLIMORFISMO A-1438G NO GENE 5HT2A E ASSOCIAÇÃO COM HÁBITO ALCOOLISTA

A análise dos dados apresentados na **tabela 9**, de acordo com a amostra total de alcoolistas (n= 113) e controles (n= 114) revelou que a frequência dos respectivos genótipos homocigoto selvagem (AA), heterocigoto (AG) e homocigoto para o alelo polimórfico (GG) foram 14,15%, 44,24% e 41,6% nos pacientes alcoolistas, respectivamente. As frequências para os controles foram 9,66%, 50,88% e 39,47%, respectivamente. As frequências alélicas para o alelo G foram semelhantes entre os grupos alcoolistas (63,7%) e controles (64,92%). Sobre esses resultados foram aplicados o teste exato de Fisher e cálculo da OR, aos quais não foi possível constatar diferença significativa para concluir que o SNP poderia estar associado com a característica fenotípica investigada nesse estudo. Para este polimorfismo, ambos os grupos estiveram em equilíbrio de Hardy-Weinberg (**Tabela 10**), pois não houve quaisquer desvios nas frequências genotípicas e gênicas ($p>0,05$).

Tabela 9: Distribuição genotípica e alélica dos alcoolistas e controles para o polimorfismo A-1438G no gene 5HT2A

| Genótipos/ Alelos | Alcoolistas N= 113 (%) | Controles N= 114 (%) | p* | OR (95% IC) | P |
|----------------------|---------------------------|-------------------------|------------|--------------------|------|
| 5HT2A A-1438G | | | | | |
| AA | 16 (14,15) | 11 (9,66) | Referência | 1 (Referência) | |
| AG | 50 (44,24) | 58 (50,88) | 0,28 | 0,59 (0,25 – 1,39) | 0,32 |
| GG | 47 (41,6) | 45 (39,47) | 0,51 | 0,72 (0,30 – 1,71) | 0,59 |
| AG+GG | 97 (85,8) | 103 (90,3) | 0,31 | 0,64 (0,28 – 1,46) | 0,39 |
| Alelos | | | | | |
| A | 82 (36,3) | 80 (35,08) | Referência | 1 (Referência) | |
| G | 144 (63,7) | 148 (64,92) | 0,84 | 0,94 (0,64 – 1,39) | 0,86 |

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

Tabela 10: Análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg para o polimorfismo A-1438G no gene *5HT2A*

| | χ^2 | p |
|-------------|----------|------|
| Alcoolistas | 0,20 | 0,64 |
| Controles | 1,29 | 0,25 |

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

A **tabela 11** apresenta as frequências dos genótipos nos alcoolistas com relato de histórico familiar positivo para abuso do álcool e alcoolistas sem relato de histórico. Uma maior predominância foi verificada para os genótipos GG e AG+GG nos alcoolistas com histórico familiar positivo (GG: 45,6%; AG+GG: 87,3%) quando comparado com alcoolistas sem histórico familiar (GG: 32,4%; AG+GG: 82,3%), no entanto, tendo em vista o histórico familiar ser um fator de risco para a dependência do álcool, foi realizada a análise de associação para a distribuição destas frequências, a qual não foi possível detectar significância estatística para suscetibilidade entre os grupos em relação ao hábito alcoolista.

Tabela 11: Comparação da frequência do polimorfismo A-1438G no gene *5HT2A* entre alcoolistas em relação ao histórico familiar

| Genótipos | Com histórico familiar | Sem histórico familiar | OR (95% IC) | p |
|----------------------|------------------------|------------------------|--------------------|------|
| | N = 79 (%) | N = 34 (%) | | |
| 5HT2A A-1438G | | | | |
| AA | 10 (12,6) | 6 (17,6) | 1 (Referência) | |
| AG | 33 (41,8) | 17 (50,0) | 1,16 (0,36 – 3,74) | 0,96 |
| GG | 36 (45,6) | 11 (32,4) | 1,96 (0,58 – 6,62) | 0,44 |
| AG + GG | 69 (87,3) | 28 (82,3) | 1,47 (0,49 – 4,45) | 0,68 |

A = alelo selvagem; G = alelo mutante; OR = odds ratio; IC = intervalo de confiança; Significância estatística (p < 0.05).

Avaliando o SNP A-1438G em relação ao hábito tabagista e tomando o genótipo AA como referência, resultados apresentados na **tabela 12**, observou-se que a frequência dos genótipos AG, GG e AG+GG no grupo de alcoolistas fumantes foram respectivamente 40,9%, 42,5% e 83,3%, enquanto que no grupo de controles fumantes as frequências para os respectivos genótipos foram 51,8%, 40,7%, 92,6%, todavia, quando foi aplicado o teste da OR não se verificou associação com

significância estatística para esta análise. Comparando apenas os indivíduos não fumantes para ambos os grupos foi percebido semelhança nas frequências dos genótipos considerados de suscetibilidade entre os alcoolistas não fumantes (48,9%, 40,5% e 89,4%, respectivamente) e controles não fumantes (50,6%, 39% e 89,7%, respectivamente), não apresentando significância estatística.

Tabela 12: Comparação da frequência do polimorfismo A-1438G no gene 5HT2A entre alcoolistas e controles em relação ao hábito tabagista

| Genótipos | Alcoolistas | Controles | OR (95% IC) | p |
|----------------------|------------------------|------------------------|--------------------|------|
| | fumantes N = 66 (%) | fumantes N = 27 (%) | | |
| 5HT2A A-1438G | | | | |
| AA | 11 (16,6) | 2 (7,5) | 1 (Referência) | |
| AG | 27 (40,9) | 14 (51,8) | 0,35 (0,06 – 1,80) | 0,34 |
| GG | 28 (42,5) | 11 (40,7) | 0,46 (0,08 – 2,43) | 0,57 |
| AG+GG | 55 (83,3) | 25 (92,6) | 0,40 (0,08 – 1,94) | 0,40 |
| Genótipos | Alcoolistas não | Controles não | OR (95% IC) | p |
| | fumantes N = 47 (%) | fumantes N = 87 (%) | | |
| 5HT2A A-1438G | | | | |
| AA | 5 (10,6) | 9 (10,4) | 1 (Referência) | |
| AG | 23 (48,9) | 44 (50,6) | 0,94 (0,28 – 3,13) | 0,83 |
| GG | 19 (40,5) | 34 (39,0) | 0,99 (0,29 – 3,43) | 0,76 |
| AG+GG | 42 (89,4) | 78 (89,7) | 0,96 (0,30 – 3,07) | 0,80 |

A= alelo selvagem; G= alelo mutante; OR= *odds ratio*; IC= intervalo de confiança; Significância estatística ($p < 0,05$).

5.2 POLIMORFISMO T102C NO GENE 5HT2A E ASSOCIAÇÃO COM O HÁBITO ALCOOLISTA

Ao investigar o polimorfismo T102C segundo exposto na **tabela 13**, as frequências dos genótipos TT, TC e CC no grupo de pacientes alcoolistas foram de 15,04%, 44,24% e 40,72%, respectivamente, enquanto, no grupo controle as frequências foram 9,66%, 49,12% e 41,23%, respectivamente, demonstrando um padrão semelhante sem diferença significativa nessa distribuição em ambos os grupos (TC: $p = 0,28$, CC: $p = 0,38$, TC+CC: $p = 0,23$). A frequência do alelo C em casos foi de 62,3% e em controles 66%, entretanto as diferenças não foram comprovadas significativas pela análise estatística ($p = 0,55$). Quando sobre esses

achados foi aplicado o teste da OR não foi possível encontrar resultado com significância estatística para inferir que estes genótipos possam influenciar na dependência do álcool em nossa amostra. O equilíbrio Hardy-Weinberg manteve-se para a variação investigada em ambos os grupos ($p > 0,05$) (**Tabela 14**).

Tabela 13: Distribuição genotípica e alélica dos alcoolistas e controles para o polimorfismo T102C no gene 5HT2A

| Genótipos/ Alelos | Alcoolistas N= 113 (%) | Controles N= 114 (%) | p* | OR (95% IC) | P |
|----------------------|---------------------------|-------------------------|------------|--------------------|------|
| 5HT2A T102C | | | | | |
| TT | 17 (15,04) | 11 (9,66) | Referência | 1 (Referência) | |
| TC | 50 (44,24) | 56 (49,12) | 0,28 | 0,57 (0,24 – 1,35) | 0,28 |
| CC | 46 (40,72) | 47 (41,23) | 0,38 | 0,63 (0,26 – 1,49) | 0,40 |
| TC+CC | 96 (84,9) | 103 (91,1) | 0,23 | 0,60 (0,26 – 1,35) | 0,30 |
| Alelos | | | | | |
| T | 84 (37,7) | 78 (34,0) | Referência | 1 (Referência) | |
| C | 142 (62,3) | 150 (66,0) | 0,55 | 0,87 (0,59 – 1,29) | 0,57 |

T= alelo selvagem; C= alelo mutante; OR= *odds ratio*; IC= intervalo de confiança; Significância estatística ($p < 0,05$).

Tabela 14: Análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg para o polimorfismo T102C no gene 5HT2A

| | χ^2 | p |
|-------------|----------|------|
| Alcoolistas | 0,31 | 0,57 |
| Controles | 0,94 | 0,32 |

χ^2 = qui-quadrado; p= significância estatística ($p < 0,05$)

Semelhantemente ao realizado com o SNP A-1438G, as variáveis demográficas como histórico familiar e hábito tabagista foram aplicadas com o polimorfismo T102C em relação à dependência do álcool. Ao analisar o histórico familiar (**Tabela 15**), foi observado uma maior prevalência dos genótipos CC e TC+CC nos alcoolistas com histórico familiar positivo (CC: 44,3% e TC+CC: 88,6%, respectivamente), quando comparado aos alcoolistas sem histórico de abuso do

álcool (32,4% e 76,5%), entretanto, sem diferença estatística levando em consideração a suscetibilidade para o uso abusivo da substância.

Tabela 15: Comparação da frequência do polimorfismo T102C no gene 5HT2A entre alcoolistas em relação ao histórico familiar

| Genótipos | Com histórico familiar | Sem histórico familiar | OR (95% IC) | p |
|--------------------|------------------------|------------------------|--------------------|------|
| | N = 79 (%) | N= 34 (%) | | |
| 5HT2A T102C | | | | |
| TT | 9 (11,4) | 8 (23,5) | 1 (Referência) | |
| TC | 35 (44,3) | 15 (44,1) | 2,07 (0,67 – 6,40) | 0,32 |
| CC | 35 (44,3) | 11 (32,4) | 2,82 (0,87 – 9,10) | 0,14 |
| TC + CC | 70 (88,6) | 26 (76,5) | 2,39 (0,83 – 6,86) | 0,17 |

T= alelo selvagem; C= alelo mutante; OR= *odds ratio*; IC= intervalo de confiança; Significância estatística (p<0.05).

Comparando os grupos de alcoolistas e controles com respeito ao hábito tabagista (**Tabela 16**), pode-se constatar diferenças nas frequências dos genótipos TC, CC e TC+CC quando analisados os grupos de alcoolistas fumantes (TC: 43,9%, CC: 45,5%, TC+CC: 89,3%) e controles fumantes (TC: 55,5%, CC: 37%, TC+CC: 92,6%), porém, tais diferenças não foram consideradas significativas nestes grupos. Aos grupos que não apresentaram hábito de fumar as diferenças nas frequências encontradas não foram consideradas pertinentes do ponto de vista estatístico para inferir qualquer associação com a dependência alcoólica.

Tabela 16: Comparação da frequência do polimorfismo T102C no gene 5HT2A entre alcoolistas e controles em relação ao hábito tabagista

| Genótipos | Alcoolistas | Controles | OR (95% IC) | p |
|--------------------|------------------------|------------------------|--------------------|------|
| | fumantes N = 66 (%) | fumantes N = 27 (%) | | |
| 5HT2A T102C | | | | |
| TT | 7 (10,6) | 2 (7,5) | 1 (Referência) | |
| TC | 29 (43,9) | 15 (55,5) | 0,55 (0,10 – 2,99) | 0,76 |
| CC | 30 (45,5) | 10 (37,0) | 0,85 (0,15 – 4,81) | 0,79 |
| TC+CC | 59 (89,3) | 25 (92,6) | 0,67 (0,13 – 3,47) | 0,93 |
| Genótipos | Alcoolistas não | Controles não | OR (95% IC) | p |
| | fumantes N = 47 (%) | fumantes N = 87 (%) | | |
| 5HT2A T102C | | | | |
| TT | 6 (12,8) | 9 (10,4) | 1 (Referência) | |
| TC | 23 (48,9) | 41 (47,1) | 0,84 (0,26 – 2,66) | 0,99 |
| CC | 18 (38,3) | 37 (42,5) | 0,72 (0,22 – 2,36) | 0,82 |
| TC+CC | 41 (87,2) | 78 (89,7) | 0,78 (0,26 – 2,36) | 0,89 |

T = alelo selvagem; C = alelo mutante; OR= *odds ratio*; IC = intervalo de confiança; Significância estatística ($p < 0.05$).

5.3 ANÁLISE DO DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO

A análise do desequilíbrio de ligação mostrou que os alelos para o SNPs A-1438G e T102C estão em forte desequilíbrio ($D' = 0,86$, $r^2 = 0,73$). Quatro haplótipos foram construídos para essas variações não apresentando diferença significativa entre o grupo alcoolista e controle. A frequência do haplótipo GC, na qual apresenta os dois alelos de maiores frequências e logo, são os alelos considerados de suscetibilidade, foi de 59,5% no grupo alcoolista e 60,1% no grupo controle, no entanto, sem significância estatística ($p = 0,99$, 1.000 permutações) (**Tabela 17**).

Tabela 17: Frequências haplotípicas para os SNPs A-1438G e T102C do gene 5HT2A nos grupos alcoolista e controle

| Haplótipos | Alcoolistas (%) | Controles (%) | p | p* |
|------------|-----------------|---------------|------|------|
| GC | 59,5 | 60,1 | 0,90 | 0,99 |
| AT | 33,6 | 33,5 | 0,97 | 0,99 |
| GT | 3,2 | 3,6 | 0,79 | 0,99 |
| AC | 3,6 | 2,8 | 0,59 | 0,94 |

*, Valor ajustado de p após 1.000 permutações

6. DISCUSSÃO

Com base nos dados levantados em nosso estudo, decidiu-se avaliar a associação dos polimorfismos A-1438G e T102C no gene *5HT2A* com as características envolvidas no uso abusivo do álcool. Para isso, foram determinadas as frequências de ambos os SNPs em uma amostra particular de 113 alcoolistas e 114 controles provenientes da região norte do estado do Piauí, com a finalidade de estabelecer uma correlação entre estes polimorfismos e a suscetibilidade a dependência alcoólica. Até o nosso conhecimento esta é a primeira investigação realizada em uma população do estado do Piauí para estes polimorfismos em associação com o fenótipo alcoolista, uma população que é altamente miscigenada e que pode ter frequências únicas de polimorfismos genéticos.

6.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS

Diferenças significativas foram observadas quando se analisou as variáveis demográficas tanto do grupo caso como controle, variáveis essas como escolaridade, média de consumo de álcool, histórico familiar, bem como hábito de fumar. Tais achados corroboram com os resultados anteriormente publicados por (VASCONCELOS *et al.*, 2015).

Foi observada uma associação significativa entre escolaridade e uso do álcool, constatando que na população do estudo existe um maior índice de indivíduos que bebem portando menor grau de instrução educacional do que nos indivíduos controles. Estudos prévios confirmaram uma correlação positiva entre nível baixo de escolaridade e uso abusivo de bebidas alcoólicas, levando a inferir que a diferença de consumo nos grupos com grau de instrução diferenciado pode ser resultado dos diferentes padrões socioculturais para o hábito alcoolista, fazendo levar a implementação de uma ideia de uso do álcool como evasão do estresse cotidiano ou para lazer momentâneo (FERREIRA *et al.*, 2011; WRZOSEK *Et al.*, 2012; MORIKAWA *et al.*, 2014; VASCONCELOS *et al.*, 2015).

Estudos com famílias foram importantes na observação de que há uma maior predominância para dependência em parentes de 1º grau, apresentando uma predisposição significativa de cinco a oito vezes maior em indivíduos que possuem histórico familiar positivo para abuso comparado com indivíduos sem histórico

familiar (MESSAS; FILHO, 2004). Nossos achados revelaram uma diferença estatisticamente significativa quando foi analisado o histórico familiar entre os grupos ($p < 0,05$), indicando uma probabilidade para transmissão herdável de fatores relacionados ao abuso do álcool no grupo alcoolista.

O alcoolismo é uma característica que apresenta herança compartilhada com o tabagismo, e muitos trabalhos comprovam forte associação entre esses dois fenótipos com atuação de genes relacionados à dependência e predisposição elevada para o aparecimento de cânceres, tais como câncer oral, cabeça e pescoço (MADDEN *et al.*, 2000; DOTTO-BAU, 2002; ANTUNES *et al.*, 2013; URASHIMA *et al.*, 2013; MADANI *et al.*, 2014). Observou-se em nossos resultados uma maior prevalência de fumantes em alcoolistas quando se levou em consideração o grupo controle, dado estatisticamente significativo ($p < 0,05$). Resultados semelhantes foram encontrados em outros trabalhos (POLINA *et al.*, 2009; VASCONCELOS *et al.*, 2015).

6.2 POLIMORFISMO A-1438G

O gene *5HT2A* apresenta uma transição de A>G na posição -1438 da região promotora que afeta a atividade transcricional do gene, diminuindo a quantidade de RNAm, indicando que a baixa disponibilidade de receptores pode ocasionar uma baixa atividade serotoninérgica no sistema de recompensa cerebral em indivíduos com dependência ao álcool propiciando o surgimento de sintomas desagradáveis de recorrência a substância (PARSONS *et al.*, 2004). Existem evidências de que esse polimorfismo pode estar associado com diferentes desordens psiquiátricas e abuso de substâncias como álcool e tabaco em todo o mundo (ONO *et al.*, 2001; LI *et al.*, 2006; FLOREZ *et al.*, 2008; SAIZ *et al.*, 2009; GONZÁLEZ CASTRO *et al.*, 2013; GHASEMI *et al.*, 2018; FERREIRA GOMES *et al.*, 2018).

Existe um número muito limitado de estudos com esse polimorfismo relacionado ao alcoolismo na população brasileira (POLINA *et al.*, 2009), e não há relatos de investigações epidemio-moleculares para essa variante associando a dependência do álcool em uma amostra populacional do nordeste brasileiro, fazendo dos resultados encontrados aqui consideráveis. No nosso trabalho, analisando a amostra estudada, foram encontradas as frequências dos genótipos AA, AG e GG de 14,15%, 44,24% e 41,6% em casos, respectivamente, e em controles de 9,66%,

50,88% e 39,47%, respectivamente. As frequências do alelo G foram 63,7% e 64,92% para casos e controles, respectivamente. Subsequentemente, não foram encontradas diferenças significativas nestas distribuições que possa levar a inferir que a variante polimórfica esteja intrinsecamente relacionada com o alcoolismo em nossa população (AG: $p= 0,28$, GG: $p= 0,51$; G: $p= 0,84$). Esses resultados são similares aos de Saiz e colaboradores (2009) utilizando uma população de alcoolistas espanhóis (162 alcoolistas e 420 controles), os quais não detectaram associação entre este SNP e a dependência do álcool ($p= 0,138$). Além disso, os autores observaram no grupo caso as frequências de 19,1%, 53,7% e 27,2%, correspondentes aos respectivos genótipos AA, AG e GG, e 21%, 48% e 31% no grupo controle, respectivamente, mostrando uma tendência semelhante com as observadas em nossa investigação.

As análises do SNP A-1438G quanto ao histórico familiar e hábito tabagista não evidenciaram diferenças significativas para os genótipos AG, GG e AG+GG, no entanto, esse é o primeiro estudo desta variante em relação às características clínicas supracitadas com o alcoolismo em nossa amostra, na busca pelo levantamento de frequências genóticas e possível associação, tornando nossos achados importantes. Estudos prévios destacaram a importância do histórico familiar e hábito de fumar com a dependência do álcool, mostrando que existe um compartilhamento de ambos com uma maior suscetibilidade a indivíduos que ou demonstram histórico familiar positivo para uso abusivo do álcool ou apresentam tabagismo (BERGGREN *et al.*, 2003; UNDERWOOD *et al.*, 2008; POLINA *et al.*, 2009; WRZOSEK *Et al.*, 2012).

As frequências de 14,15%, 44,24% e 41,6% encontradas em nosso estudo no grupo alcoolista referentes aos genótipos AA, AG e GG convergem às encontradas em outro trabalho desenvolvido por Florez e colaboradores (2008) em um estudo transversal com 90 indivíduos alcoolistas espanhóis. Os autores verificaram as frequências de 19,1%, 49,4% e 31,5% para os genótipos supracitados em ordem e ainda não encontraram diferença significativa nessa distribuição que levasse os pesquisadores a sugerirem possível influência do SNP com o alcoolismo ($p= 0,279$), reforçando os resultados alcançados em nosso trabalho.

Por mais que nossos achados evidenciem falta de associação do SNP com o fenótipo analisado, não se pode descartar a possibilidade do polimorfismo influenciar na predisposição ao abuso de substâncias, como o abuso do álcool. Uma

metanálise desenvolvida com estudos de associação de diferentes populações mundiais indicou associação positiva do polimorfismo A-1438G com alcoolismo (OR= 1,52, IC= 1,16 – 1,98, $p=0,0023$) em indivíduos de origem europeia (246 casos e 203 controles), inferindo que o SNP no gene *5HT2A* pode contribuir com suscetibilidade para distúrbios de abuso de substâncias, particularmente a dependência alcoólica (CAO *et al.*, 2014). Semelhantemente, estudo dirigido por Nakamura e colaboradores (1999), os quais exploraram uma possível associação direta entre o polimorfismo A-1438G e o alcoolismo em uma população Japonesa (225 alcoolistas e 361 controles), verificaram que o genótipo GG estava influenciando na predisposição a dependência do álcool (OR= 1,40, IC= 1,11 – 1,78, $p=0,025$). Com base nestes resultados, os autores levantaram a sugestão de que este SNP pode influenciar no alcoolismo e subseqüentemente, promover a manutenção do hábito.

O alcoolismo compartilha de uma forte interação genética com o tabagismo, com vias de metabolização e de respostas relacionadas ao sistema nervoso atuando na modulação dos efeitos associados à dependência (KOOPMANS *et al.*, 1998). Ramos Neto e colaboradores (2014) estudando o polimorfismo A-1438G com o hábito tabagista em uma população do nordeste brasileiro (135 fumantes e 135 controles) observaram que a frequência do genótipo GG foi 39,26% em casos e 37,77% em controles, por conseguinte, semelhante às frequências encontradas em nosso trabalho (41,6% casos, 39,47% controles), tais autores não confirmaram a evidência de que o SNP em questão pudesse estar relacionado com o hábito tabagista (OR= 1,09, IC= 0,54 – 2,18, $p=0,93$). Em contrapartida, Polina e colaboradores (2009) investigando uma população de alcoolistas e fumantes no Sul do Brasil (113 alcoolistas fumantes, 120 fumantes e 115 controles) observaram a frequência do genótipo GG para os três grupos de 25%, 24% e 36%, respectivamente, enquanto que a frequência do alelo G foi de 50%, 49% e 60%, respectivamente. Estes autores sugeriram uma forte indicação de que o sistema serotoninérgico esteja envolvido com a dependência ao tabaco e álcool logo após constatarem diferença significativa na distribuição do genótipo GG ($p= 0,01$) e alelo G ($p= 0,04$) pela comparação dos grupos estudados.

Dessa forma, os dados conflitantes podem ser explicados pela atuação de fatores como diferenças étnicas na distribuição destes genótipos ou de uma população etnicamente heterogênea, visto que se encontram grandes variações nas

frequências alélicas destes genótipos entre os diferentes grupos populacionais (NAKAMURA *et al.*, 1999; SORLÍ *et al.*, 2008; POLINA *et al.*, 2009; SUN *et al.*, 2016). Além disso, as variações podem ser resultadas de interação com outros genes, exposições ambientais diferenciadas, bem como questões socioeconômicas e sociodemográficas.

6.3 POLIMORFISMO T102C

O polimorfismo T102C é responsável pela diminuição da densidade de receptores 5HT2A, principalmente em áreas associadas com abuso de substâncias, conduzindo os indivíduos que abusam do álcool a procurar níveis anteriores de recompensa (POLESSKAYA; SOKOLOV, 2002). Ao nosso conhecimento, não existem dados na literatura que reportam frequências genótípicas para o SNP T102C em alcoolistas originados na população brasileira, bem como esta é a primeira investigação sobre a distribuição polimórfica deste SNP com a dependência alcoólica no nordeste brasileiro.

Neste estudo, observou-se que as frequências dos genótipos TT, TC e CC entre casos foram de 15,04%, 44,24% e 40,72%, respectivamente, enquanto que nos controles foram encontradas as frequências de 9,66%, 49,12% e 41,23% para os três genótipos correspondentes ao *locus* de estudo, respectivamente. Estas frequências mostraram um padrão equivalente entre o grupo alcoolista e controle. Dessa forma, nenhuma associação entre este polimorfismo e a suscetibilidade a dependência do álcool foi detectada. No entanto, Ramos Neto e colaboradores (2014) também realizaram o levantamento das frequências genótípicas para o SNP exposto relacionando com o hábito tabagista em uma população do nordeste brasileiro (135 fumantes e 135 controles) encontrando frequências similares as obtidas em nosso trabalho. Os autores evidenciaram as frequências no grupo de fumantes de 17,78%, 44,18% e 37,4% referente aos respectivos genótipos TT, TC e CC, e no grupo de indivíduos não fumantes observaram frequências de 20%, 45,93% e 34%, respectivamente.

O histórico familiar e o tabagismo foram características clínicas utilizadas para investigar a associação do polimorfismo T102C com o uso abusivo do álcool, sendo o primeiro estudo para a análise deste SNP com o alcoolismo em nossa amostra populacional. O levantamento das frequências em ambas as análises não

mostrou diferenças significativas na distribuição dos genótipos TC, CC e TC+CC entre os que apresentaram histórico positivo ao abuso do álcool e os que não tinham relato familiar, bem como entre alcoolistas e controles fumantes e não fumantes. Underwood e colaboradores (2008) por análise de autópsia de tecido cerebral de 25 alcoolistas (18 com histórico positivo e 7 sem histórico positivo), observaram que entre estes grupos existia uma diferença significativa da disponibilidade de receptores 5HT2A ($p < 0,05$), no entanto, quando os autores analisaram juntamente com o polimorfismo T102C não encontram associação significativa da variante polimórfica com o decréscimo de receptores entre os grupos investigados ($p > 0,05$), corroborando com os resultados obtidos em nosso trabalho. Em outro estudo, Berggren e colaboradores (2003) observaram que alcoolistas dependentes (37 homens) que usam nicotina de forma crônica demonstram uma neurotransmissão serotoninérgica reduzida quando comparados com alcoolistas não fumantes, indicando um compartilhamento de possíveis fatores genéticos ou ambientais para os dois fenótipos, conduzindo a inferir que a nossa análise entre alcoolistas e controles fumantes e não fumantes foi considerável mesmo com a presença contrastante do resultado do trabalho anteriormente citado.

Nós encontramos as frequências do alelo C em casos e controles de 62,3% e 66%, respectivamente, não sendo possível observar diferença significativa nessa distribuição, demonstrando que o alelo polimórfico não está associado com o desenvolvimento do abuso do álcool nesta população de estudo (OR= 0,87, IC= 0,59 – 1,29, $p=0,57$). Um estudo coordenado por Preuss e colaboradores (2000) também não evidenciou associação significativa do alelo C para o comportamento suicida entre uma população de 150 alcoolistas e 115 controles provenientes da Alemanha (OR= 1,09, IC= 0,65 – 1,63, $p=0,90$), fazendo os autores levantar um pressuposto de que o alelo C não seria um marcador genético confiável de desordens cerebrais em alcoolistas dependentes, no entanto, destacaram que o *lócus* permanece interessante de investigar em outras populações tendo em vista seu papel no sistema de recompensa cerebral. Neste mesmo trabalho, houve a observação das frequências do alelo C de 53,7% e 54% em casos e controles, respectivamente.

As frequências do alelo C levantadas em nosso trabalho corroboram com de outros realizados em populações caucasianas europeias. Cao e colaboradores (2014) em uma metanálise desenvolvida com estudos de população europeia caucasiana (326 casos e 155 controles) encontraram a frequência do alelo C em

casos de 63% e em controles 54%, indicando que a frequência da variante demonstra-se prevalente na população caucasiana e se aproxima da frequência encontrada no presente estudo (62,3% e 66% em casos e controles, respectivamente). Contrastante aos nossos resultados, a análise realizada por estes autores indicou evidência de associação para proteção do alelo C com a dependência do álcool (OR= 0,70, IC= 0,54 – 0,91, $p=0,0074$).

Como mencionado, em nossos achados não foi possível detectar associação significativa nas distribuições genóticas com o abuso do álcool em nossa população, entretanto, estudos prévios obtiveram resultados de associação diferentes (JAKUBCZYK *et al.*, 2012; WRZOSEK *et al.*, 2012). Jakubczyk e colaboradores (2012) em um estudo de associação utilizando uma população masculina na Polônia (209 alcoolistas) observaram que a frequência do genótipo CC foi de 38,3%, mostrando-se semelhante à frequência encontrada em nosso trabalho de 40,72%. Entretanto, os autores relataram forte associação de altos níveis de impulsividade e o genótipo CC em pacientes que abusavam do álcool ($p= 0,00126$), fazendo-os sugerir que fatores genéticos são importantes determinantes de impulsividade comportamental de recorrência a substância em indivíduos dependentes, e que o sistema serotoninérgico mostra influência no estabelecimento do seu nível.

Equitativamente, Wrzosek e colaboradores (2012) investigando a influência do SNP T102C em uma população da Polônia com a dependência do álcool (150 alcoolistas e 80 controles), levantaram a frequência do genótipo CC em casos de 37% e controles de 29%, assim como identificaram a frequência do alelo C em casos de 63% e controles de 52%. As frequências adquiridas por tais autores fortalecem os dados das frequências obtidas em nosso trabalho anteriormente demonstradas. Contudo, é importante destacar que esse estudo desenvolvido por Wrzosek e colaboradores (2012) encontrou diferenças significativas entre alcoolistas dependentes e controles na distribuição tanto do genótipo CC ($p= 0,036$) como do alelo C ($p= 0,025$), erguendo a hipótese pelos autores de que a mutação pode apresentar potencial função de propensão para o uso abusivo do álcool.

A serotonina é uma molécula que demonstra papel nas mudanças relacionadas ao comportamento humano e logo, qualifica-se como um marcador de propensão genética para diversas desordens psiquiátricas (ARIAS *et al.*, 2001). Alterações no sistema serotoninérgico têm sido implicadas na patogênese do

alcooolismo e do comportamento suicida, e este comportamento é mais reportado em indivíduos que usam o álcool abusivamente (CORREA *et al.*, 2007).

Du e colaboradores (2000) analisando o fenótipo de depressão e suicídio em uma população caucasiana canadense (120 pacientes e 131 controles) verificaram uma maior prevalência do genótipo CC no grupo caso (35%) do que no grupo controle (18%), mostrando distinção das frequências deste genótipo em nosso trabalho que foram de 40,72% em casos e 41,23% em controles. Outro ponto que demonstrou uma dessemelhança aos nossos achados é ao fato de terem identificado diferença significativa entre os grupos, indicando forte relação do genótipo CC com os fenótipos associados ($p=0,0016$).

Os resultados divergentes discutidos aqui não são ignoráveis podendo considerar que existe a possibilidade de ocorrer diferenças nas frequências genotípicas e alélicas para o SNP T102C em populações etnicamente distintas, ressaltando a importância de estudos que visam o conhecimento da distribuição da variante polimórfica colocada. Além disso, a interação de outros polimorfismos localizados em outras regiões cromossômicas associadas à manutenção do sistema de recompensa, bem como fatores não genéticos e questões relacionadas ao perfil econômico e social da população podem promover a observação dessas diferenças.

6.4 DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO

Com base no anteriormente citado, e em resultados prévios da literatura (PREUSS *et al.*, 2000; YOON *et al.*, 2008; SAIZ *et al.*, 2009; JAKUBCZYK *et al.*, 2012; WRZOSEK *et al.*, 2012; RAMOS NETO *et al.*, 2014) que demonstraram que os SNPs A-1438G e T102C estão quase que completamente em DL, nosso estudo semelhantemente avaliou em nossa amostra encontrando também um forte desequilíbrio de ligação entre os dois *loci* ($D' = 0,86$, $r^2 = 0,73$). Obtivemos a frequências do haplótipo composto pelos dois alelos polimórficos (GC) de 59,5% no grupo alcoolista e 60,1% no grupo controle, no entanto, sem diferença estatística na distribuição entre os grupos investigados ($p=0,99$). Observamos as frequências em casos de 3,2% e em controles de 3,6% para o haplótipo GT, e para o haplótipo AC as frequências em casos e controles foram de 3,6% e 2,8%, respectivamente, ambas as distribuições para estes haplótipos sem diferença estatisticamente significativa ($p=0,99$, $p=0,94$, respectivamente). Ramos Neto e colaboradores (2014)

com uma população de fumantes e controles proveniente do estado do Piauí detectaram um moderado desequilíbrio de ligação pela análise dos dois SNPs aqui expostos ($D' = 0,79$, $r^2 = 0,57$), todavia é importante ressaltar que os mesmos encontraram as frequências do haplótipo GC em casos de 56,3% e controles de 50,8%, sem constatação de diferença significativa entre os grupos ($p = 0,59$), corroborando com os resultados observados em nossa pesquisa. Vale salientar que as frequências do haplótipo GT em casos foram de 4,0% e em controles foi 10%, enquanto que as frequências do bloco haplotípico AC foi de 3,3% e 6,3% em casos e controles, respectivamente.

Saiz e colaboradores (2008) analisando uma população de espanhóis (99 pacientes e 420 controles) quanto ao fenótipo obsessivo compulsivo identificaram um completo desequilíbrio de ligação entre os SNPs A-1438G e T102C ($D' = 1,00$). Em contraste, os autores não realizaram a análise dos blocos haplotípicos com a doença investigada, o que torna os achados adquiridos em nosso trabalho um diferencial científico.

Em nosso estudo foi demonstrada a avaliação dos SNPs separadamente mesmo com o conhecimento do forte DL que possuem, entretanto, outros trabalhos mostram maneiras divergentes de análise das apresentadas em nossa pesquisa. Ono e colaboradores (2001) investigando o fenótipo suicida com uma amostra constituída por indivíduos de origem japonesa (151 casos e 163 controles) identificaram os genótipos do polimorfismo T102C em todas as amostras e certificaram que o SNP A-1438G estava quase que em completo desequilíbrio de ligação, com análise estatística apenas para o SNP T102C. De igual modo, Segman e colaboradores (2001) em uma amostra de israelitas esquizofrênicos (59 casos e 96 controles) tiveram a mesma conduta, identificando um forte desequilíbrio com o A-1438G, conduzindo os autores a analisarem molecularmente os dois polimorfismos com abordagem estatística somente para o T102C.

Praticamente, não existem dados na literatura que demonstrem a associação haplotípica dos polimorfismos A-1438G e T102C com o alcoolismo em uma população brasileira e, grande parte dos trabalhos realizados com estas variantes polimórficas são desenvolvidos separadamente e associadas com outros fenótipos de abuso e desordens psiquiátricas (DO PRADO-LIMA *et al.*, 2004; CORDEIRO *et al.*, 2009; POLINA *et al.*, 2009; CORREA *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2017; FERREIRA GOMES *et al.*, 2018). Portanto, a comparação de blocos

haplotípicos em nossa investigação culminou não apenas em convergir com dados já presentes na literatura confirmando o forte desequilíbrio de ligação em diferentes populações, como também favoreceu a associação destes blocos com o alcoolismo, que mesmo não evidenciando influência com o fenótipo, estimula outros estudos a serem realizados utilizando a mesma abordagem a fim de conseguir dados mais refinados na população do nordeste brasileiro e ou em outras populações de caráter miscigenado.

7. CONCLUSÃO

Nessa investigação foi possível estimar as frequências genotípicas e alélicas de ambos os polimorfismos A-1438G e T102C em uma população do nordeste brasileiro. As frequências dos alelos G e C em casos foram de 63,7% e 62,3%, respectivamente, em seguida, controles mostraram frequências de 64,92% e 66% para os respectivos alelos. Tais frequências demonstraram padrão semelhante das observadas em estudos com outras populações caucasianas, tais como europeia e brasileira.

Interpretando os resultados obtidos após a análise estatística das frequências genotípicas e alélicas, não encontramos associação com a dependência alcoólica e os polimorfismos investigados, pois não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os indivíduos dependentes e os controles para inferir suscetibilidade ou proteção ao alcoolismo em nossa amostra.

A análise das características demográficas revelou que o uso abusivo do álcool pode estar relacionado com o histórico familiar e hábito tabagista ($p < 0,05$). Porém, não se constatou associação significativa dessas variáveis com os genótipos AG, GG e AG+GG, bem como TC, CC e TC+CC. É importante destacar que as associações com as variáveis clínicas relacionadas ao alcoolismo para os SNPs estudados não foram abordadas na literatura, tornando esse trabalho inédito.

A falta de associação dos polimorfismos A-1438G e T102C não impossibilita os mesmos de estarem envolvidos com características relacionadas ao comportamento aditivo. Apesar das limitações impostas pelo número amostral e dos resultados controversos da literatura científica, este estudo é de grande utilidade para realização de outras pesquisas no que concerne ao papel genético do alcoolismo e também contribui para a compreensão dos aspectos associados ao perfil alcoolista piauiense, o que pode colaborar para abordagens específicas no combate ao problema do alcoolismo nesse estado.

8. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, N. D. Os Acidentes e mortes no Trânsito causados pelo consumo de álcool: Um problema de Saúde Pública. **Revista Direção Sanitária**. p. 108 – 125, 2014.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Manual de Diagnóstico e Estatística de Distúrbios Mentais DSM-IV. Ed. Manole; São Paulo, 1994.

ALVES-SILVA, J.; DA SILVA SANTOS, M.; GUIMARÃES, P.E.M.; FERREIRA, A.C.S.; BANDELT, H.; PENA, S.D.J.; PRADO, V.F. The Ancestry of Brazilian mtDNA Lineages. **American Journal Human Genetic**. v. 67, p. 444-461, 2000.

ANTUNES, J.L.F.; TOPORCOV, T.N.; BIAZEVIC, MG.H.; BOING, A.F.; SCULLY, C.; PETTI, S. Joint and Independent Effects of Alcohol Drinking and Tobacco Smoking on Oral Cancer: A Large Case-Control Study. **Plos One**. v. 8, n. 7, p. 1-7, 2013.

ARIAS, B.; GASTRÓ, C.; CATALÁN, R.; GUTIÉRREZ, B.; PINTOR, L.; FAÑANÁS, L. The 5-HT_{2A} receptor gene 102 T/C polymorphism is associated with suicidal behavior in depressed patients. **American Journal Medical Genetics**. v.105, p. 801-804, 2001.

BAGNARDI, V.; ROTA, M.; BOTTERI, E.; TRAMACERI, I.; ISLAMI, F.; FEDIRKO, V.; SCOTTI, L. Alcohol consumption and site-specific cancer risk: a comprehensive dose–response meta-analysis. **British Journal of Cancer**. p. 580 – 593, 2016.

BARRETT, J.C.; FRY, B.; MALLER, J.; DALY M.J. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. **Bioinformatics**. v. 21: 263–265, 2005

BECKER, H. C. Influence of stress associated with chronic alcohol exposure on Drinking. **Neuropharmacology**. v. 122, p. 115 – 126, 2017.

BERGGREN, U.; FAHLKE, C.; ERIKSSON, M.; BALDIN, J. Tobacco Use is Associated With Reduced Central Serotonergic Neurotransmission in Type 1 Alcohol-Dependent Individuals. **Alcoholism, Clinical and Experimental Research**. v. 27, n. 8, p. 593 – 599, 2003.

BONGAERTS, B.W.C.; DE GOEIJ, A.F.P.M.; WOUTERS, K.A.D.; ENGELAND, M.V.; GOTTSCHALK, R.W.H.; SCHOOTEN, F.J.V.; GOLDBOHM, R.A.; BRANDT, P.A.V.D.; WEIJENBERG, M.P. Alcohol Consumption, alcohol dehydrogenase 1C (*ADH1C*) genotype, and risk of colorectal cancer in the Netherlands Cohort Study on diet and cancer. **Alcohol**. v. 45, p. 217-225, 2011.

BLAINE, S. K.; SINHA, R. Alcohol, stress, and glucocorticoids: From risk to dependence and relapse in alcohol use disorders. **Neuropharmacology**. v. 122, p. 136 – 147, 2017.

BORBA, C. S.; LEMOS, I. G. S.; HAYASIDA, N. M. A. Alcohol Consumption in Demographic Subpopulations. **Revista Saúde e Desenvolvimento Humano**. v. 3, n. 1, p. 51 – 60, 2015.

BOSANERA, S. J.; CHU, H.; BRENNAN, T. J.; TECOTT, L. H. A Null Mutation of the Serotonin 6 Receptor Alters Acute Responses to Ethanol. **Neuropsychopharmacology**. v. 31, p. 1801 – 1813, 2006.

BRODIE, M. S.; TRIFUNOVIC, R. D.; SHEFNER, S. A. Serotonin Potentiates Ethanol-Induced Excitation of Ventral Tegmental Area Neurons in Brain Slices from Three Different Rat Strains. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 275, n. 3, 1995.

CAMPOS, V. R.; SALGADO, R.; ROCHA, M. C.; DUALIBI, S.; LARANJEIRA, R. Drinking-and-driving prevalence in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil. **Caderno de Saúde Pública**. v. 24, n. 4, p. 829-834, 2008.

CARROLL, M. R.; RODD, Z. A.; MURPHY, J. M.; SIMON, J. R. Chronic ethanol consumption increases dopamine uptake in the nucleus accumbens of high alcohol drinking rats. **Alcohol**. v. 40, n. 2, p. 103-109, 2006.

CARLINI, D. B.; CHEN, Y.; STEPHAN, W. The relationship between third-codon position nucleotide content, codon bias, mRNA secondary structure and gene expression in the drosophilid alcohol dehydrogenase genes *Adh* and *Adhr*. **Genetics**. v.159, n.2, p. 623-33. 2001.

CASTRO, D.S.; SANCHEZ, Z.M.; ZALESKI, M.; ALVES, H.N.P.; PINSKY, I.; CAETANO, R.; LARANJEIRA, R.R. Sociodemographic characteristics associated with binge drinking among Brazilians. **Drug and Alcohol Dependence**. v. 126, n. 1, p. 272-276, 2012

CAO, Y.; WILLET, W. C.; RIMM, E. B.; STAMPFER, M. J.; GIOVANNUCCI, E.L. Light to moderate intake of alcohol, drinking patterns, and risk of cancer: results from two prospective US cohort studies. **Biology Molecular Journal**. 2013.

CAO, J.; LIU, X.; HAN, S.; ZHANG, C. K.; LIU, Z.; LI, D. Association of the *HTR2A* gene with alcohol and heroin abuse. **Human Genetics**. v. 133, p. 357-365, 2014.

CORREA, H.; DE MARCO, L.; BOSON, W.; NICOLATO, R.; TEIXEIRA, A.L.; CAMPO, V.R.; ROMANO-SILVA, M.A. Association study of T102C 5-HT2A polymorphism in schizophrenic patients: diagnosis, psychopathology, and suicidal behavior. **Dialogues Clinical Neuroscience**. v. 9, p. 97-101, 2007.

CORDEIRO, Q.; SOUZA, B. R.; CORREA, H.; GUINDALINIC.; HUTZ, MARA HELENA; VALLADA, H.; ROMANO-SILVA, M. A. A review of psychiatric genetics research in the Brazilian population. **Revista Brasileira Psiquiátrica**. v. 31, n. 2, p. 154 – 162, 2009.

COLLIER, D. A.; ARRANZ, M. J.; LI, T.; MUPITA, D.; BROWN, N.; TREASURE, J. Association between 5-HT2A gene promoter polymorphism and Anorexia nervosa. **The Lancet**. v. 350, 1997.

CHEN, K.; YANG, W.; GRIMSBY, J.; SHIH, J. C. The human 5-HT₂ receptor is encoded by a multiple intron-exon gene. *Brain. Molecular Brain Research*. p. 20 – 26, 1992.

CHEAH, S.; LAWFORD, B. R.; YOUNG, R.; MORRIS, C. P.; VOISEY, J. mRNA Expression and DNA Methylation Analysis of Serotonin Receptor 2A (HTR2A) in the Human Schizophrenic Brain. *Genes*. v. 8, n. 14, p. 1 – 11, 2017.

CRABBE, J. C.; PHILLIPS, T. J.; FELLER, D. J.; HEN, R.; WENGER, C. D.; LESSOV, D. N.; SCHAFER, C. L. Elevated Alcohol Consumption in null mutant mice lacking 5HT_{1B} serotonin receptors. *Nature*. 1996.

CREMONTE, M.; BISCARRA, M. A.; CONDE, K.; CHARPITEL, C. J. Epidemiology of alcohol consumption and related problems in Latin American countries: Contributions of psychology. *International Journal of Psychology*. 2016.

CROWELL, M. D. Role of serotonin in the pathophysiology of the irritable bowel syndrome. *British Journal of Pharmacology*. v. 141, p. 1285 – 1293, 2004.

DAVID WILSON. **Associação de haplótipos de genes do Sistema Serotonérgico e impulsividade**. Tese de Doutorado. 2008.

DELKER, E.; BROWN, Q.; HASIN, D. S. Alcohol Consumption in Demographic Subpopulations. *Alcohol Research*. v. 38, n. 1, 2016.

DOTTO BAU, C. H. Estado atual e perspectivas de genética e epidemiologia do alcoolismo. *Ciência & Saúde Coletiva*. v.7, n.1, p. 183-90, 2002.

DO PRADO-LIMA, P.A.S.; CHATKIN, J.M.; TAUFER, M.; OLIVEIRA, G.; SILVEIRA, E.; NETO, C.A.; HAGGSTRAM, F.; BODANESE, L.C.; DA CRUZ, I.B.M. Polymorphism of 5HT_{2A} serotonin receptor gene is implicated in smoking addiction. *American Journal Medical Genetics*. 128B, p. 90-93, 2004.

DUALIBI, S.; LARANJEIRA, R. Políticas públicas relacionadas às bebidas alcólicas. *Revista de Saúde Pública*, v. 41, n. 5, p. 839 – 48, 2007.

DU, Y.; NIE, Y.; LI, Y.; WAN, Y.J. The association between the SLC6A3 VNTR 9-repeat allele and alcoholism – a meta-analysis. *Alcohol Clinical and Experimental Research*., v.35, n.9, p. 1625-1634, 2011.

DU, Y.; BAKISH, D.; LAPIERRE, Y. D.; RAVINDRAN, A. V.; HRDINAP. V. Association of Polymorphism of Serotonin 2A Receptor Gene With Suicidal Ideation in Major Depressive Disorder. *Neuropsychiatric Genetics*, v. 96, p. 56 – 60, 2000.

FEITOSA, M. F.; KRIEGER, H. Future of genetic epidemiology in complex traits. *Ciência e Saúde Coletiva*. v. 7, n. 1, p. 73 – 83, 2002.

FELTMANN, K.; BORROTO-ESCUELA, D. O.; RUEGG, J.; PINTON, L.; OLIVEIRA SÉRGIO, T.; NARVÁEZ, M.; BERISTAIN, A. J.; EKSTROM, T. J.; FUXE, K.; STEENSLAND, P. Effects of Long-Term Alcohol Drinking on the Dopamine D₂

Receptor: Gene Expression and Heteroreceptor Complexes in the Striatum in Rats. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 42, n. 2, p. 338 – 351, 2018.

FERREIRA GOMES, S. K.; FONSECA, T. V.; MELO FELLIPE, F. B.; ANDRADE, J. B. S.; FONTENELLE, L. F.; KOHLRAUSCH, F. B. Association analysis of SLC6A4 and HTR2A genes with obsessive-compulsive disorder: Influence of the STin2 polymorphism. **Comprehensive Psychiatry**. v. 82, p. 1 – 6, 2018.

FERREIRA, L. N.; JUNIOR, J. P. B.; SALES, Z. N.; CASSOTI, C. A.; JUNIOR, A. C. R. B. Prevalence and associated factors of alcohol abuse and alcohol addiction. **Ciência e Saúde Coletiva**. v. 18, n. 11, p. 3409 – 3418, 2013.

FERREIRA, L. N.; SALES, Z. N.; CASOTTI, C. A.; JÚNIOR, J. P. B.; JÚNIOR, A. C. R. B. Perfil do consumo de bebidas alcóolicas e fatores associados em um município do Nordeste do Brasil. **Caderno Saúde Pública**, v. 27, n. 8, p. 1473 – 1486, 2011.

FILIZOLA, P. R. B.; NASCIMENTO, A. E.; SOUGEY, E. B.; MEIRA-LIMA, I. V. Alcoolismo no Nordeste do Brasil – prevalência e perfil sociodemográfico dos afetados. **Journal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 57, n. 4, p. 227 – 232, 2008.

FILDALGO, S.; IVANOV, D. K.; WOOD, S. H. Serotonin: from top to bottom. **Biogerontology**. v. 14, p. 21- 45, 2013.

FLOREZ, G.; SAIZ, P.; GARCIA-PORTILHA, P.; ALVÁREZ, S.; NOGUEIRAS, L.; MORALES, B.; ALVAREZ, V.; COTO, E.; BOBES, J. Association Between the STin2 VNTR Polymorphism of the Serotonin Transporter Gene and Treatment Outcome in Alcohol-Dependent Patients. **Alcohol and Alcoholism**. v. 43, n. 5, p. 516 – 522, 2008.

GALDURÓZ, J.C.F.; CARLINI, E. A. Use of alcohol among the inhabitants of the 107 largest cities in Brazil – 2001. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 40, n. 3, p. 367 – 375, 2007.

GARCIA, L. P.; FREITAS, L. R. S. Heavy drinking in Brazil: results from the 2013 National Health Survey. **Epidemiologia Serviço e Saúde**. v. 24, n. 2, p. 227 – 237, 2015.

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

GONZÁLEZ CASTRO, T. B.; TOVILLA-ZÁRATE, C.; JUÁREZ-ROJOP, I.; GARCÍA, S. P.; VELÁSQUEZ-SANCHEZ, M. P.; GENIS, A.; NICOLINI, H.; NARVÁEZ, L. L. Association of the 5HTR2A gene with suicidal behavior: CASE-control study and updated meta-analysis. **BMC Psychiatry**. v. 13, n. 25, p. 1 – 10, 2013.

GUIARD, B. P.; Di GIOVANNI, G. Centralserotonin-2A(5-HT2A) receptor dysfunction in depression and epilepsy: themis singlink? **Frontiers in Pharmacology**. v. 6, n. 46, p. 1 – 17, 2015.

HAES, T. M.; CLÉ, D. V.; NUNES, T. F.; RORIZ-FILHO, J. S.; MORIGUTI, J. C. Álcool e Sistema Nervoso Central. **Revista de Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 43, n. 2, p. 153 – 63, 2010.

HEINZ, A.; MANN, K.; WEINBERGER, D. R.; GOLDMAN, D. Serotonergic Dysfunction, Negative Mood States, and Response to Alcohol. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**. v. 25, n. 4, p. 487 – 495, 2001.

HITSCHFELD, M. J.; SCHEEKLOTH, T. D.; EBBERT, J. O.; HALL-FLAVIN, D. K.; KARPYAK, V. M.; ABULSEOUD, O. A.; PATTEN, C. A.; GESKE, J. R.; FRYE, M. A. Female smokers have the highest alcohol craving in a residential alcoholism treatment cohort. **Drug and Alcohol Dependence**. v. 150, p. 179 – 182, 2015.

HWU, H.G.; CHEN, C.H. Association of 5HT2A receptor gene polymorphism and alcohol abuse with behavior problems. **American Journal Medical Genetics**. v. 96, n. 6, p.797-800, 2000.

IKEMOTO, S.; BONCI, A. Neurocircuitry of drug reward. **Neuropharmacology**, v. 76, p. 1 – 13, 2013.

JAKUBCZYK, A.; WRZOSEK, M.; LUKASZKIEWICZ, J.; MAZURIK, J. The CC genotype in HTR2A T102C polymorphism is associated with behavioral impulsivity in alcohol-dependent patients. **Journal of Psychiatric Research**. v. 46, p. 44 – 49, 2012.

JONAS, D. E.; AMICK, H. R.; FELTNER, C.; WINES, R.; SHANAHAN, E.; ROWE, C. J.; GARBUTT, J. C. Genetic polymorphisms and response to medications for alcohol use disorders: a systematic review and meta-analysis. **Pharmacogenetics**. p. 1687 – 1700, 2014.

KANDEL E. R.; SCHWARTZ J. H.; JESSELL T. M. **Principles of Neural Science**. 4th ed. McGraw-Hill, New York, 2000.

KOOPMANS, J. R.; VAN DORNEEN, L. J. P.; BOOMSMA, D. I. Association between Alcohol Use and Smoking in Adolescent and Young Adult Twins: A Bivariate Genetic Analysis. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**. v. 21, n. 3, p. 537 – 546, 1998.

KRUGLYAK, L. Prospects for whole-genome linkage disequilibrium mapping of common disease genes. **Nature**. v. 22, n. 2, 1999.

INCA Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2015: incidência do câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf>. Acesso em: 20 Junho. 2017.

LARANJEIRA, R.; MADRUGA, C.S.; PINSKY, I.; CAETANO, R.; RIBEIRO, M.; MITSUHIRO, S. **II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas - Consumo de Álcool no Brasil: Tendências entre 2006/2012**. 2012.

LI, D.; ZHAO, H.; GELERNTER, J. Further clarification of the contribution of the ADH1C gene to vulnerability of alcoholism and selected liver diseases. **Human Genetics**. v. 131, n. 8, p. 1361-1374, 2012.

LI, D.; DUAN, Y.; HE, L. Association study of serotonin 2A receptor (5-HT2A) gene with schizophrenia and suicidal behavior using systematic meta-analysis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 340, n. 3, p. 1006 – 1015, 2006.

LOPES, T.R.; SANTOS, S.; SANTOS, A.R.; RESQUE, R.L.; PINTO, G.R.; YOSHIOKA, F.K.N. Population data of the 46 insertion-deletion (INDEL) loci in population in Piauí State, Northeastern Brazil. **Forensic Science International: Genetics**, v. 9, n. 1, p. 1 – 7, 2013.

LOYOLA, L. F. R. **Associação entre o polimorfismo T102C do receptor 5HT2A e a resiliência em pacientes com depressão maior**. pag. 1 – 118. Tese de Doutorado, Universidade Católica de Pelotas, Pelotas, 2016.

LOVINGER, D. M.; ROBERTO, M. Synaptic Effects Induced by Alcohol. **Current Top Behaviour Neuroscience**. v. 13, p. 31 – 86. 2013.

MADANI, A.H.; DIKSHIT, M.; BHADURI, D.; AGHAMOLAEI, T.; MOOSAVY, S.H.; AZARPAYKAN, A. Interaction of Alcohol Use and Specific Types of Smoking on the Development of Oral Cancer. **International Journal High Risk Behaviour Addict**. v. 3, n. 1, p. 1 - 4, 2014.

MADDEN, P.A.F.; BUCHOLZ, K.K.; MARTIN, N.G.; HEATH, A.C. Smoking and the Genetic Contribution to Alcohol – Dependence Risk. **Alcohol Research and Health**. v. 24, n. 4, p. 209 - 214, 2000.

MALTA, D. C.; BERNA, R. T. I.; SILVA, M. M. A.; CLARO, R. M.; JUNIOR, J. B. S.; REIS, A. A. C. Consumption of alcoholic beverages, driving vehicles, a balance of dry law, Brazil 2007-2013. **Revista Saúde Pública**. v. 48, n. 4, p. 692 – 696, 2014.

MARQUES, A. C. P. R. O uso do álcool e a evolução do conceito de dependência de álcool e outras drogas e tratamento. **Revista IMESC**, n. 3, p. 73 – 86, 2001.

MENEZES, F.R.; BERGMANN, A.; AGUIAR, S.S.; THULER, L.C.S. Alcohol consumption and the risk of cancer in Brazil: a study involving 203,506 cancer patients. **Alcohol**. v. 49, n. 7, p. 747 – 751, 2015.

MESSAS, G. P.; FILHO, H. P. V. O papel da genética na dependência do álcool. **Revista Brasileira Psiquiátrica**, v. 26, Suplemento I, p. 54 – 58, 2004.

MONTEIRO, M. G. Public policies to prevent alcohol related harm. **Epidemiologia Serviço e Saúde**. v. 25, n. 1, p. 171 – 174, 2016.

MORETTI-PIRES, R. O.; CORRADI-WEBSTER, C. M.; FURTADO, E. F. Consumo de álcool e atenção primária no interior da Amazônia: sobre a formação de médicos

e enfermeiros para a assistência integral. **Revista Brasileira de Educação Médica**, v. 35, n. 2, p. 219 – 228, 2011.

MORIKAWA, Y. et al. The effect of age on the relationships between work-related factors and heavy drinking. **Journal of Occupational Health**, v. 56, n. 2, p. 141–149, 2014.

Ministério da Previdência Social, 2014. Disponível em <<http://www.brasil.gov.br/saude/2014/05/doencas-relacionadas-ao-alcoolismo-deixam-inss-em-alerta>> Acesso em 06 jun 2017.

Epidemiologia e Serviços de Saúde. **Revista do Sistema Único de Saúde**. v. 22, n. 2, p. 1 – 170, 2011.

MYERS, R. L.; AIREY, D. C.; HAL MANIER, D.; SHELTON, R. C.; SANDERS BUSH, E. Polymorphisms in the Regulatory Region of the Human Serotonin 5-HT_{2A} Receptor Gene (HTR2A) Influence Gene Expression. **Biology Psychiatry**. v. 61, n. 2, p. 167 – 173, 2007.

NAJJAR, F.; OWLEY, T.; MOSCONI, M. W.; JACOB, S.; HUR, K.; GUTER, S. J.; SWEENEY, J. A. *et al.* Pharmacogenetic Study of Serotonin Transporter and 5HT_{2A} Genotypes in Autism. **Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology**. v. 25, n. 6, p. 467 – 474, 2015.

NAIMI, T.S.; NELSON, D.E.; BREWER, R.D. Driving After Binge Drinking. **American Journal Prevent Medicine**. v. 37, n. 4, p. 314 – 320, 2009.

NAKAMURA, T.; MATSUSHITA, S.; NISHIGUCHI, N.; KIMURA, M.; YOSHINO, A.; HIGUSHI, S. Association of a polymorphism of the 5HT_{2A} receptor gene promoter region with alcohol dependence. **Molecular Psychiatry**. v. 4, p. 85 – 88, 1999.

NICHOLS, D. E.; NICHOLS, C. D. Serotonin Receptors. **Chemical Journal**. v. 108, p. 1614 – 1641, 2008.

O'KEFFE J. H.; BYBEE K. A.; LAVIE C. J. Alcohol and cardiovascular health: the razor-sharp double-edged sword. **Journal American College Cardiologist**, v. 50, n. 11, p. 1009 – 1014, 2007.

OLIVEIRA, G. F., LUCHES, L. B. O discurso sobre álcool na revista brasileira de enfermagem. **Revista Latino Americano Enfermagem**, v. 18, p. 623-33, 2010.

ONO, H.; SHIRAKAWA, O.; NISHIGUCHI, N.; NISHIMURA, A.; NUSHIDA, H.; UENO, Y.; MAEDA, K. Serotonin 2A receptor gene polymorphism is not associated with completed suicide. **Journal of Psychiatric Research**. v. 35, p. 173 – 176, 2001.

OSCAR-BERMAN, M.; SHAGRIN, B.; EVERT, D. L.; EPSTEIN, C. The neurological effects of alcohol. **Alcohol Health and Research World**, v. 21, n. 1, p. 65 – 75, 1997.

PANOCKA, I.; POMPEI, P.; MASSI, M. Suppression of Alcohol Preference in Rats

Induced by Risperidone, a Serotonin 5-HT₂ and Dopamine D₂ Receptor Antagonist. **Brain Research Bulletin**. v. 31, p. 595 – 599, 1993.

PARSONS, M. J.; D'SOUZA, U. M.; ARRANZ, M.; KERWIN, R. W.; MAKOFF, A. J. The –1438A/G Polymorphism in the 5-Hydroxytryptamine Type 2A Receptor Gene Affects Promoter Activity. **Biology Psychiatry**. v. 56, p. 406 – 410, 2004.

PALMER, R.H.C.; McGEARY, J.E.; FRANCAZIO, S.; RAPHAEL, B.J.; LANDER, A.D.; HEATH, A.C.; KNOPIK, V.S. The genetics of alcohol dependence: Advancing towards systems-based approaches. **Drug and Alcohol Dependence**. p. 179 – 191, 2012.

PEROUTKA, S. J. Serotonin Receptor Variants in Disease: New Therapeutics Opportunities. **Spectra Biomedical**. 2000.

POLINA, ER; CONTINI, V; HUTZ, MH; BAU, CHD. The serotonin 2A gene in alcohol dependence and tobacco smoking. **Drug and Alcohol depend.**, v.101, p.128-131, 2009.

POLESSKAYA O.O.; SOKOLOV, B.P. Differential expression of the “C” and “T” alleles of the 5-HT_{2A} receptor gene in the temporal cortex of normal individuals and schizophrenics. **Journal of Neuroscience Research**, v.67, n.6, p.812–822, 2002.

PURVES, D.; AUGUSTINE, G. J.; FITZPATRICK, D.; HALL, W. C.; LAMANTIA, A.; McNAMARA J. O., WILLIAMS, S. M. **Neuroscience**. 3. Ed. U.S.A. Sunderland (MA), 2004.

PRACZ, R.; SANTOS, C. S. M.; PINHEIRO, R. K. T.; CATELAN-MAINARDES, S. C. **As ações do álcool no Sistema Nervoso Central do dependente químico**. Anais eletrônico – CESUMAR, 2010.

PRAUD, D.; ROTA, M.; REHM, J.; SHIELD, K.; ZATONSKI, W.; HASHIBE, M.; La VECCHIA, C.; BOFFETA, F. Cancer incidence and mortality attributable to alcohol consumption. **International Journal of Cancer**. 2015.

PREUSS, U. W.; KOLLER, G.; BONDY, B.; BAHLMANN, M.; SOYKA, M. Impulsive Traits and 5-HT_{2A} Receptor Promoter Polymorphism in Alcohol Dependents: Possible Association but No Influence of Personality Disorders. **Neuropsychobiology**. v. 43, p. 186–191, 2001.

PREUSS, U. W.; KOLLER, G.; BAHLMANN, M.; SOYKA, M.; BONDY, B. No Association Between Suicidal Behavior and 5-HT_{2A}-T102C Polymorphism in Alcohol Dependents. **Neuropsychiatric Genetics**. v. 96, p. 877 – 878, 2000.

RAMOS NETO, E. S.; MÁGULAS, J. O.; SOUSA, J. J. S.; MOURA, A. C. M.; PINTO, G. R.; YOSHIOKA, F. K. N.; CANALLE, R.; MOTTA, F. J. N. Study of polymorphic variants of the serotonin 2A receptor gene (5-HT_{2A}) and its possible effects on smoking habits of a population from northeastern Brazil. **Genetics and Molecular Research**. v. 13, n. 4, p. 8268 – 8277, 2014.

REHM, J.; SHIELD, K. D.; ROERECKE, M.; GMEL, G. Modelling the impact of alcohol consumption on cardiovascular disease mortality for comparative risk assessments: an overview. **BMC Public Health**. p. 1 – 9, 2016.

REZVANI, A. H.; CAULEY, M. C.; LEVIN, E. D. Lorcaserin, a selective 5-HT_{2C} receptor agonist, decreases alcohol intake in female alcohol preferring rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. n. 125, p. 8 – 14, 2014.

RISINGER, F. O.; BORMANN, N. M.; OAKES, R. A. Reduced Sensitivity to Ethanol Reward, But Not Ethanol Aversion, in Mice Lacking 5HT_{1B} Receptors. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**. v. 20, n. 8, 1996.

RYU, Y.; BARCELÓ, D.; BARRON, L. P.; BIJSLMA, L.; CASTIGLIONI, L. Comparative measurement and quantitative risk assessment of alcohol consumption through wastewater-based epidemiology: An international study in 20 cities. **Science of the Total Environment**. p. 977 – 983, 2016.

SAIZ, P. A.; GARCIA-PORTILHA, M. P.; FLOREZ, G.; ARANGO, C.; CORCORAN, P.; MORALES, B.; BASCARAN, M-T.; ALVAREZ, C.; NARCISO, G. S.; CARRENO, E.; ALVAREZ, V.; COTO, E.; BOBES, J. Differential role of serotonergic polymorphisms in alcohol and heroin dependence. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**. v. 33, p. 669 – 700, 2009.

SANDER, T.; HARMS, H.; PODSCHUS, J.; FINCKH, U.; NICKEL, B.; ROLFS, A.; ROMMELSPACHER, H.; SCHMIDT, L. G. Allelic association of a dopamine transporter gene polymorphism in alcohol dependence with withdrawal seizures or delirium. **Biology Psychiatry**. v. 41, p. 299-304, 1997.

SACHS, B. D.; SALAHI, A. A.; CARON, M. G. Congenital brain serotonin deficiency leads to reduced ethanol sensitivity and increased ethanol consumption in mice. **Neuropharmacology**. v. 77, p. 177 – 184, 2014.

SEGMAN, R. H.; HERESCO-LEVY, U.; FINKEL, B.; GOLTSEY, T.; SHALEM, R.; SCHLAFMAN, M.; DOREVITCH, A.; YAKIR, A.; GREENBERG, D.; LERNER, A.; LERER, B. Association between the serotonin 2A receptor gene and tardive dyskinesia in chronic schizophrenia. **Molecular Psychiatry**. v. 6, 2001.

SILVA, T. O.; JUNG, I.; TROTT, A.; BICA, C. G.; CASARIN, J. N.; FORTUNA, P. C.; RIBEIRO, E. E.; De ASSIS, F. D.; FIGUEIRA, G. C.; BARBASIN, F.; MANICA-CATTANI, M. F.; BONADIMAN, B. S. R.; HOUENOU, L. J.; Do PRADO-LIMA, P. A.; Da CRUZ, I. B. M. Association between T102C 5-HT_{2A} receptor gene polymorphism and 5-year mortality risk among Brazilian Amazon riparian elderly population. **American Journal of human Biology**. 2017.

SORLÍ, J.V.; FRANCÉS, F.; GONZÁLEZ, J.I.; GUILLÉN, M.; PORTOLÉS, O.; SABATER, A.; COLTELL, O.; CORELLA, D. Impact of the -1438 G>A polymorphism in the serotonin 2A receptor gene on anthropometric profile and obesity risk: A case-control study in a Spanish Mediterranean population. **Appetite**, v. 50, p.260-265, 2008.

SLATKIN, M. Linkage disequilibrium — understanding the evolutionary past and mapping the medical future. **Nature Review Genetics**. v. 9, n. 6, p. 477 – 485, 2008.

SUN, L.; XU, P.; ZHOU, Y.; ZUO, S.; LIU, Y. Meta-analysis of polymorphism rs6311 and rs6313 in the 5-HT_{2A}R gene and schizophrenia. **Nordic Journal of Psychiatry**, 2016.

TYNDALE, R. F. Genetics of alcohol and tobacco use in humans. **Annals of Medicine**. v. 25, n. 2, p. 94 – 121, 2003.

URASHIMA, M.; HAMA, T.; SUDA, T.; SUZUKI, Y.; IKEGAMI, M.; SAKANASHI, C.; AKUTSU, T.; AMAGAYA, S.; HORIUCHI, K.; IMAI, Y.; MEZAWA, H.; NOYA, M.; NAKASHIMA, A.; MAFUNE, A.; KATO, T.; KOJIMA, H. Distinct Effects of Alcohol Consumption and Smoking on Genetic Alterations in Head and Neck Carcinoma. **Plos One**. v. 8, p. 1-9, 2013.

UNDERWOOD, M. D.; MANN, J. J.; HUANG, Y.; ARANGO, V. Family History of Alcoholism Is Associated with Lower 5-HT_{2A} Receptor Binding in the Prefrontal Cortex. **Alcoholism, Clinical and Experimental Research**. v. 32, n. 4, 2008.

VASCONCELOS, A. C. C. G.; NETO, E. S. R.; PINTO, G. R.; YOSHIOKA, F. K. N.; MOTTA, F. J. N.; VASCONCELOS, D. F. P.; CANALLE, R. Association Study of the VNTR (DAT) and Taq1A Polymorphisms with Alcohol Dependence in a Population from Northeastern Brazil. **Alcoholism, Clinical and Experimental Research**, v. 39, p. 205 - 211, 2015.

VIEIRA, D. L.; RIBEIRO, M.; ROMANO, M.; LARANJEIRA, R. R. Álcool e adolescentes: estudo para implementar políticas municipais. **Revista de Saúde Pública**, v. 41, n. 3, p.1 – 8, 2007.

VOLKOW, N. D.; WIERS, C. D.; SHOKRI-KOJORI, E.; TOMASI, D.; WANG, G.; BALER, R. Neurochemical and metabolic effects of acute and chronic alcohol in the human brain: Studies with positron emission tomography. **Neuropharmacology**, v. 122, p. 175 – 188, 2017.

WARREN, J. T. J.; PEACOCK, M. L.; RODRIGUEZ, L. C.; FINK, J. K. An MspI polymorphism in the human serotonin receptor gene (*5HTR*): Detection by DGGE and RFLP analysis. **Human Molecular Genetics**, 1993.

WATANABE, Y.; YOSHIMOTO, K.; TATEBE, H.; KITA, M.; NISHIKURA, K.; KIMURA, M.; TANAKA, M. Enhancement of alcohol drinking in mice depends on alterations in RNA editing of serotonin 2C receptors. **International Journal of Neuropsychopharmacology**. v. 17, p. 739 – 751, 2014.

WEINBERGER, A. H.; PLATT, J.; JIANG, B.; GOODWIN, R. D. Cigarette Smoking and Risk of Alcohol Use Relapse Among Adults in Recovery from Alcohol Use Disorders. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**. v. 39, n. 10, p. 1989 – 1996, 2015.

WHO (World Health Organization) Global status report on alcohol and health, 2014. Disponível em: http://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/en/. Acesso em 20 de Junho de 2017.

WRZOSEK, M.; JAKUBCZYK, A.; WRZOSEK, M.; MATSUMOTO, H.; ŁUKASZKIEWICZ, J.; BROWER, K. J.; WOJNAR, M. Serotonin 2A receptor gene (*HTR2A*) polymorphism in alcohol-dependent patients. **Pharmacological Reports**. p. 449 – 453, 2012.

WU, L. S.; LEE, C.; WENG, T.; WANG, K. W.; CHENG, A. T. Association Study of Gene Polymorphisms in GABA, Serotonin, Dopamine, and Alcohol Metabolism Pathways with Alcohol Dependence in Taiwanese Han Men. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**. v. 40, n. 2, 2016.

YOSHIMOTO, K.; McBRIDE, W. J.; LUMENG, L.; LI, T. K. Alcohol stimulates the release of dopamine and serotonin in the nucleus accumbens. **Alcohol**. v. 9, p. 17 – 22, 1991.

YOSHIMOTO, K.; WATANABE, Y.; TANAKA, M.; KIMURA, M. Serotonin 2C receptors in the nucleus accumbens are involved in enhanced alcohol-drinking behavior. **European Journal of Neuroscience**. v. 35, p. 1368 – 1380, 2012.

YOON, H.K.; YANG, J.C.; LEE, H.J.; KIM, Y.K. The association between serotonin-related gene polymorphism and panic disorder. **Journal Anxiety Disorder**. v. 22, p. 1529-1534, 2008.

ZALESKI, M.; MORATO, G. S.; SILVA, V. A.; LEMOS, T. Aspectos neurofarmacológicos do uso crônico e da síndrome da abstinência do álcool. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 26, p. 40 – 42, 2004.

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, assinie 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
() 1º grau incompleto
() 1º grau completo
() 2º grau incompleto
() 2º 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
() Enfiseuma 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
 () Asma
 () Enfisema pulmonar
 () Osteoporose
 () Mortalidade neonatal
 () Lesões dos tecidos da boca e dos lábios
 () Síndrome do álcool em recém-nascidos de gestantes que bebem
 () Doença no fígado
 () Doença no pâncreas
 () Cirrose hepática
 () Pancreatite
 () 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 beberia)?

- () 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?

- () Pai
 () Avó
 () Madrasta
 () Mãe
 () Avô
 () Imão
 () Padrasto
 () 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
 () 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**

| | | | |
|---|---|--|---|
|  | <p>MINISTÉRIO DA SAÚDE Conselho Nacional de Saúde Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)</p> | <p>UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação Comitê de Ética em Pesquisa - CEP- UFPI REGISTRO CONEP: 045</p> |  |
|---|---|--|---|

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**

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

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.
12. Centrifugar a 13.000 rpm por 1 minuto à temperatura ambiente.
13. Retirar o sobrenadante (pode inverter).
14. Lavar em etanol 70% (500 µl).
15. Centrifugar a 13.000 rpm por 1 minuto.

16. Retirar o sobrenadante, inverter o tubo em papel absorvente e deixar secar (10-15 minutos).
17. Adicionar a solução de re-hidratação de DNA e incubar a 65°C por uma hora ou em temperatura ambiente (ou 4°C) overnight.
18. Estocar à 2-8°C.