

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL - UFRGS

**Avaliação da Influência de Polimorfismos dos Genes do Receptor α_{2A} -
Adrenérgico e da Subunidade β_3 da Proteína G nas Dependências de Álcool
e Nicotina e Transtornos Associados**

Alexandre Pôrto Prestes

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Genética e Biologia
Molecular da UFRGS como requisito
parcial para a obtenção do grau de
Mestre

Orientador: Prof. Dr. Claiton H. D. Bau

Porto Alegre

Março de 2006

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

As pesquisas foram realizadas no Laboratório de DNA do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e subvencionadas pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

O aluno recebeu bolsa de estudos concedida pelo CNPq.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à ajuda prestimosa do meu orientador, Claiton, pela paciência, altruísmo e dedicação com que sempre me auxiliou.

Agradeço aos colegas da sala 107, pois apesar de ser um “estranho no ninho”, me acolheram tão bem e de braços abertos.

Agradeço às minhas colegas do grupo de pesquisa, pela ajuda inestimável para o aprendizado das técnicas de laboratório.

Agradeço aos colegas de mestrado, pela solidariedade e acolhida.

Agradeço a todos os demais professores do departamento, que sempre foram muito amáveis e gentis.

Agradeço ao pessoal da secretaria, o Elmo, a Elen e a Lúcia, pela disponibilidade e eficiência.

Agradeço à minha esposa, Karítima, pelo seu carinho, companheirismo e apoio em todas as circunstâncias.

Agradeço ao meu filho, Thomas, conosco desde julho de 2005, que com sua tranqüilidade, alegria e esperteza tem sido grande motivo de alegria para nós.

Agradeço a meus pais, irmãs e cunhado, que sempre torceram por mim e sempre me ajudaram no limite de suas possibilidades.

Agradeço aos meus sogros, pelos cuidados excepcionais que têm tido para com a nossa prole.

Agradeço ao apoio dos amigos, que não foram poucos.

Agradeço a Deus, pela vida afortunada que tem me proporcionado.

SUMÁRIO

RESUMO	05
ABSTRACT	06
1 INTRODUÇÃO	07
1.1 Considerações Iniciais	07
1.1.1 Álcool	07
1.1.2 Nicotina	07
1.2 Definições	08
1.3 Epidemiologia	10
1.3.1 Álcool	10
1.3.2 Nicotina	11
1.4 Neurobiologia da Dependência - Recompensa Cerebral	13
1.5 Estudos Genéticos	14
1.5.1 Estudos em Famílias	14
1.5.2 Estudos em Gêmeos	14
1.5.3 Estudos de Adoção	15
1.6 Estudos Moleculares	16
1.7 Receptor α_{2A} -Adrenérgico	20
1.8 Subunidade β_3 da Proteínas G	24
2 OBJETIVOS	28
3 PRELIMINARY EVIDENCE THAT THE ADRA2A C-1291G POLYMORPHISM INFLUENCES NICOTINE DEPENDENCE	29
4 THE GNB3 C825T POLYMORPHISM AND DEPRESSION AMONG SUBJECTS WITH ALCOHOL DEPENDENCE	46
5 DISCUSSÃO	62
REFERÊNCIAS	69
ANEXOS	82

RESUMO

Transtornos por uso de álcool e nicotina apresentam alta prevalência e estão entre os principais problemas de saúde pública. Na presente dissertação foram estudadas possíveis associações envolvendo os polimorfismos C-1291G do gene do receptor α_{2A} -adrenérgico (ADRA2A) e C825T do gene da subunidade β_3 da proteína G (GNB3) em amostras de indivíduos com (i) dependências de álcool e nicotina, ($N_{ADRA2A}= 110$; $N_{GNB3}= 109$), dependência específica de nicotina ($N_{ADRA2A}= 121$; $N_{GNB3}= 117$) e (iii) controles ($N_{ADRA2A}= 114$; $N_{GNB3}= 108$). Na amostra de indivíduos com dependência de álcool também foram investigadas possíveis associações destes polimorfismos com outros transtornos mentais comórbidos. O DNA dos indivíduos foi amplificado através de reação em cadeia de polimerase, e os produtos clivados com enzimas de restrição específicas. A genotipagem foi realizada por eletroforese em géis de agarose ou poliacrilamida. Foi verificada uma associação entre o alelo G do polimorfismo C-1291G do gene ADRA2A com a dependência de nicotina ($\chi^2= 7,18$; $p= 0,007$). Não foram detectadas diferenças nas freqüências alélicas e genotípicas quanto ao polimorfismo C825T do gene GNB3 nos indivíduos com ou sem dependência. No entanto, os indivíduos com dependência de álcool e transtorno depressivo maior associado apresentaram maior freqüência do genótipo heterozigoto ($\chi^2= 12,34$; $p= 0,002$). Ambos os resultados positivos são consistentes com evidências obtidas em estudos prévios.

ABSTRACT

Alcohol and nicotine use disorders have high prevalence and are among the most important health problems in the world. In the present study we studied possible associations between the C-1291G polymorphism of the α_{2A} -adrenergic receptor gene (ADRA2A) and C825T polymorphism of the G-protein β_3 subunit gene (GNB3) in samples of individuals with (i) alcohol and nicotine dependencies ($N_{ADRA2A}= 110$; $N_{GNB3}= 109$), (ii) nicotine dependence only ($N_{ADRA2A}= 121$; $N_{GNB3}= 117$) and (iii) non-dependent controls ($N_{ADRA2A}= 114$; $N_{GNB3}= 108$). In the sample of individuals with alcohol dependence, we also investigated possible associations of these polymorphisms with other comorbid mental disorders. The subjects' DNA was amplified by the polymerase chain reaction. Products were digested with the specific restriction enzymes and genotyped by electrophoresis in polyacrylamide or agarose gels. The results showed an association between the G allele of the ADRA2A C-1291G polymorphism and nicotine dependence ($\chi^2= 7.18$; $p= 0.007$). No differences were found in allele and genotype frequencies of the GNB3 C825T polymorphism between subjects with or without dependencies. However, individuals with alcohol dependence and comorbid major depressive disorder presented a higher frequency of the heterozygous genotype ($\chi^2= 12.34$; $p= 0.002$). Both positive results are consistent with evidences obtained in previous studies.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Iniciais

1.1.1 Álcool

O etanol, álcool etílico, ou simplesmente álcool para os propósitos do presente trabalho, é uma substância psicoativa que faz parte da civilização desde a antigüidade (Hoffman, 2001). Na mitologia grega as figuras de Dionísio, Icário e o Rei Anfictião representam exemplos da visão da cultura helênica sobre o vinho (Bulfinch, 2001).

O álcool apresenta uma grande aceitação social e mesmo religiosa. Nos dias de hoje, é prática de muitas famílias a iniciação de crianças no consumo de bebidas alcoólicas (Best e cols., 2001). O amplo uso e os prejuízos físicos, psiquiátricos e sociais decorrentes dos transtornos relacionados ao etanol é um dos principais problemas de saúde pública das sociedades modernas (Meloni e Laranjeira, 2004). No entanto, embora amplamente utilizado na cultura ocidental, a maioria das pessoas não desenvolve transtornos relacionados ao álcool (Grant e cols., 2004a).

1.1.2 Nicotina

A Nicotina, alcalóide derivado das folhas de tabaco pertencentes à família *Nicotiana tabacum*, é uma substância psicoativa com grande potencial de dependência (Jain e Mukherjee, 2003).

O tabaco é originário das Américas e conhecido há cerca de oito mil anos pela maioria das culturas que habitavam o continente no período pré-colombiano. Foi introduzido na Europa após os Grandes Descobrimentos luso-espanhóis, utilizado para fins medicinais e recreacionais durante os séculos XVIII e XIX e popularizado mundialmente durante o século XX (Moyer, 2005). Por mais que se soubesse dos malefícios causados pelo cigarro, através de relatos de casos e da propaganda antitabagista movida pelos proibicionistas desde o final do século XIX, a ciência pouco se interessou pelo tabagismo na primeira metade do século XX. Os primeiros estudos epidemiológicos acerca do tabagismo só apareceram a partir de 1950, e as propriedades de dependência e os prejuízos físicos ocasionados foram estabelecidos definitivamente apenas a partir da segunda metade do século XX (Henningfield e cols., 2004).

O tabaco é considerado a segunda maior causa de mortes no mundo. Trata-se também da maior causa prevenível de morte (Murray, 2006).

1.2 Definições

Os transtornos relacionados ao álcool e à nicotina estão descritos nas duas principais classificações de transtornos mentais em uso atualmente: a Classificação Internacional de Doenças – 10ª. Edição (CID-10), da Organização Mundial de Saúde (World Health Organization, 1992), e o “Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition” (DSM-IV), da Associação Americana de Psiquiatria (American Psychiatric Association, 1994). Estas classificações foram desenvolvidas para melhorar a comunicação para fins

clínicos, de pesquisa e estatísticos. Os elaboradores das duas classificações trabalharam em estreita colaboração e os termos e códigos foram considerados completamente compatíveis. No ano de 2000 foi feita uma revisão no texto do DSM-IV, chamada de DSM-IV-TR (Text Revision) (American Psychiatric Association, 2000), mas os critérios diagnósticos permaneceram os mesmos.

Segundo o DSM-IV-TR, os transtornos relacionados a substâncias são divididos em dois grupos: transtornos por uso e transtornos induzidos por substância. Quanto ao etanol, os transtornos por uso de álcool são a dependência e o abuso. Os transtornos induzidos pelo álcool incluem quadros de intoxicação, abstinência, delirium, demência persistente, transtorno amnésico persistente, transtorno psicótico, transtorno do humor, transtorno de ansiedade, disfunção sexual e transtorno do sono. No caso da nicotina, a dependência é o transtorno por uso de substância e a abstinência é o transtorno induzido pela mesma.

A característica principal da dependência de uma substância segundo o DSM-IV-TR consiste na presença de um agrupamento de sintomas cognitivos, comportamentais e fisiológicos indicando que um indivíduo continua utilizando uma substância, apesar de problemas significativos relacionados a ela. Existe um padrão de auto-administração repetida que geralmente resulta em tolerância, abstinência e comportamento compulsivo de consumo da substância (Anexo 1).

A síndrome de dependência de uma substância psicoativa, segundo a CID-10, caracteriza-se por um conjunto de fenômenos fisiológicos, comportamentais e cognitivos, no qual o uso de uma substância ou uma classe de substâncias alcança uma prioridade muito maior para um determinado indivíduo que outros comportamentos que antes tinham maior valor. Uma característica descritiva

central da síndrome de dependência é o desejo (freqüentemente forte, algumas vezes irresistível) de consumir drogas psicoativas (as quais podem ou não ter sido medicamente prescritas), álcool ou tabaco. Pode haver evidência de que o retorno ao uso da substância após um período de abstinência leve a um reaparecimento mais rápido de outros aspectos da síndrome do que o que ocorre com indivíduos não dependentes (Anexo 2).

O presente trabalho se concentrou nas condições de dependência de álcool e nicotina, segundo os critérios do DSM-IV-TR.

1.3 Epidemiologia

1.3.1 Álcool

O número de norte-americanos adultos que apresentam abuso ou dependência de álcool cresceu de 13,8 milhões (7,41%) em 1991-1992 para 17,6 milhões (8,46%) em 2001-2002, de acordo com os resultados do “National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions” (NESARC) 2001-2002. Os novos dados revelam que a taxa de abuso de álcool aumentou de 3,03% para 4,65% através da década, enquanto que a taxa de dependência de álcool caiu de 4,38% para 3,81% (Grant e cols., 2004a).

O abuso e a dependência de álcool são mais comuns em indivíduos do sexo masculino, com a razão de homens para mulheres chegando a 5:1 (American Psychiatric Association, 2000).

Padrões de uso de álcool e prevalência de problemas relacionados ao álcool variam entre os grupos étnicos. Além dos fatores genéticos, outros

elementos que podem contribuir para as diferenças étnicas são as tradições sociais ou culturais (Galvan e Caetano., 2003). Tais diferenças caracterizam a quantidade, frequência e padrão de consumo alcoólico nos diversos países do mundo (Bloomfield e cols., 2003).

Quanto à prevalência de dependência de álcool no Brasil, em 2001 foi realizado um estudo domiciliar com uma amostra de 8589 indivíduos maiores de 12 anos, procedentes de 107 cidades brasileiras com mais de 200 mil habitantes (Carlini e cols., 2002). A prevalência de indivíduos portadores de dependência de álcool foi de 11,2% para a população geral, ocorrendo a maior taxa (15,5%) na faixa de 18 a 24 anos. Nesta pesquisa também foi evidenciada diferença entre os sexos, sendo que o percentual de dependência foi de 17,1% para o sexo masculino e 5,7% para o feminino. A prevalência de dependentes foi mais alta nas regiões Norte e Nordeste, com porcentagens acima dos 16% na população geral. Na região Sul a porcentagem de indivíduos com dependência foi de 9,5%. Um fato preocupante nesta pesquisa foi a observação de que, no Brasil, 48,3% dos adolescentes entre 12 e 17 anos já haviam utilizado bebidas alcoólicas e 5,2% apresentavam dependência de álcool, sendo que na região Sul a porcentagem de dependentes foi de 4,5%.

1.3.2 Nicotina

A prevalência do hábito de fumar está diminuindo nos países desenvolvidos, mas aumentando naqueles em desenvolvimento. A prevalência mais alta de uso de nicotina ocorre entre indivíduos mais velhos, ao contrário de

outras substâncias psicoativas. A prevalência do hábito de fumar é levemente maior nos homens do que nas mulheres (American Psychiatric Association, 2000).

Nos Estados Unidos, em 2001, uma pesquisa com 4414 indivíduos entre 15 e 54 anos de idade demonstrou uma prevalência para toda a vida para dependência de nicotina de 24% (Breslau e cols., 2001). Outra pesquisa com 43.093 indivíduos demonstrou uma prevalência ponto de 12,8% (intervalo de confiança a 95% de 12,0 a 13,6%) para dependência de nicotina na população geral desse país (Grant e cols., 2004b).

Segundo dados do I Levantamento Domiciliar sobre o Uso de Drogas no Brasil – 2001 (Carlini e cols., 2002) estima-se que 41,1%, da população brasileira (46,2% dos homens e 36,3% das mulheres), com idade entre 12 e 65 anos, já usaram tabaco ao menos uma vez na vida. A prevalência encontrada de indivíduos com dependência de nicotina nas 107 cidades do Brasil com mais de 200 mil habitantes foi de 10,1% para homens e 7,9% para mulheres.

Outros dados sobre o uso de tabaco foram obtidos pelo Inquérito Domiciliar sobre Comportamentos de Risco e Morbidade Referida de Doenças e Agravos Não Transmissíveis, do Instituto Nacional do Câncer (INCA), vinculado ao Ministério da Saúde, nos anos de 2002 e 2003 (Ministério da Saúde, 2003). A pesquisa revelou que as cidades brasileiras mais industrializadas foram as que apresentaram maiores taxas de uso de tabaco. A prevalência de fumantes regulares na população de 15 anos ou mais variou de 12,9% em Aracaju a 25,2% em Porto Alegre. A pesquisa estimou também que a proporção de homens que fumam regularmente é superior à das mulheres. A faixa etária de maior consumo regular de cigarros é a de pessoas com idade superior a 24 anos. Indivíduos com

menor escolaridade (ensino fundamental incompleto) também foram os que apresentaram consumo regular mais elevado.

1.4 Neurobiologia da Dependência - Recompensa Cerebral

O sistema de recompensa cerebral está presente desde os mamíferos mais primitivos. Ele tem participação fundamental na busca de estímulos causadores de prazer, tais como alimentos, sexo e relaxamento. Por meio do reforço positivo da recompensa, obtida durante essas experiências, o organismo é impelido a buscá-las repetidas vezes, criando-se uma memória específica para isso. O sistema de recompensa, desse modo, é um importante mecanismo de autopreservação (Esch e Stefano, 2004).

O sistema límbico, área tegmental ventral e o *nucleus accumbens* são as regiões cerebrais relacionadas com o mecanismo de recompensa, sendo a dopamina o principal neurotransmissor desse mecanismo (Vetulani, 2001). No entanto, outros sistemas neurotransmissores podem contribuir sobre os mecanismos de recompensa, possivelmente por interferência sobre a neurotransmissão dopaminérgica (Stahl, 2000). O trato mesolímbico-mesocortical é a via dopaminérgica relacionada à recompensa (Kiyatkin, 1995).

Diferentemente de um estímulo prazeroso natural, que leva posteriormente à saciedade, o uso de substâncias psicoativas tende a produzir uma busca adicional do estímulo. Assim, a dependência de substâncias em indivíduos predispostos pode ser considerada uma doença do sistema de recompensa cerebral (Vetulani, 2001).

1.5 Estudos Genéticos

1.5.1 Estudos em Famílias

Os estudos em famílias vêm demonstrando a agregação familiar nas dependências de álcool e nicotina, encontrando aumento de três a quatro vezes na prevalência em parentes de primeiro grau de dependentes quando comparado a indivíduos da população geral (Bierut e cols., 1998; Tyndale, 2003). Além disso, outras condições psiquiátricas que apresentam comorbidade com as dependências de álcool e nicotina (Kessler, 1995; Dani e Harris, 2005), como transtorno de humor, transtornos de ansiedade e personalidade anti-social, também apresentam recorrência familiar (Edwards e Lader, 1994).

1.5.2 Estudos em Gêmeos

As taxas de concordância de transtornos por uso de álcool são maiores em gêmeos monozigóticos do que em gêmeos dizigóticos (O'Brien, 2001). Por exemplo, Hrubec e Omenn (1981) avaliaram 7962 pares de gêmeos do sexo masculino, verificando uma concordância para o alcoolismo em gêmeos monozigóticos de 26,3% e em gêmeos dizigóticos de 11,9%. Koskenvuo e cols. (1984) obtiveram resultados semelhantes, com concordância de alcoolismo de 23,1% em gêmeos monozigóticos e de 10,8% em gêmeos dizigóticos. As estimativas de herdabilidade no conjunto de estudos variam de 40 a 60% (Messas e Vallada, 2004). Estudos em gêmeos e de adoções têm indicado consistentemente uma contribuição genética substancial para o início e

continuação do hábito de fumar, com estimativa de herdabilidade variando de 46% a 84% (Carmelli e cols., 1992; Batra e cols., 2003). Uma revisão de 14 estudos de gêmeos estimou que os fatores genéticos contribuem com 56% da variância para o início e uso regular do tabaco (Sullivan e Kendler, 1999). Um estudo encontrou evidências para uma vulnerabilidade comum para dependências de álcool e nicotina no sexo masculino (True e cols., 1999).

Os estudos em gêmeos para dependência de outras substâncias também apresentaram resultados positivos, com estimativas de herdabilidade variando de 30% para sedativos em mulheres (Van den Bree e cols., 1998) a 79% para abuso de cocaína em mulheres (Kendler e Prescott, 1998).

1.5.3 Estudos de Adoção

Vários estudos de adoção demonstraram que as dependências de álcool e de nicotina apresentam uma influência genética importante (Li, 2003). Goodwin e cols. (1973) foram um dos primeiros grupos a utilizar esta abordagem, tendo demonstrado que crianças separadas de seus pais biológicos, quando adultas, apresentavam um risco maior de alcoolismo do que um grupo controle de adotados cujos pais biológicos não eram dependentes de álcool. O estudo de adoção de Bohman (1978) avaliou o abuso de álcool em uma amostra de 2324 adotados, nascidos em Estocolmo entre 1930 e 1949, que foram colocados em lares adotivos antes da idade de 3 anos. Os adotados do sexo masculino com pais e mães biológicos diagnosticados como portadores de abuso de álcool tinham maior probabilidade de ser considerados como apresentando o mesmo problema. Posteriormente Cloninger e cols. (1981) reexaminaram e ampliaram os

dados de Bohman (1978), concluindo pela existência de dois tipos de alcoolismo: um de início tardio, usualmente leve, que apareceria tanto em homens quanto em mulheres e predominantemente influenciado pelo meio, e outro de início precoce, limitado ao sexo masculino, com alta herdabilidade e que tenderia a ser de intensidade moderada a grave.

Quanto à nicotina, os estudos de gêmeos e de adoção demonstraram alta predisposição genética tanto para o início quanto para a persistência do hábito de fumar (Sullivan e Kendler, 1999).

Em 1995 Cadoret e cols. demonstraram que o abuso ou a dependência de substância podem ser transmitidos por duas vias genéticas diferentes: uma via direta, proveniente de pais biológicos com diagnóstico de transtornos por uso de substância, e outra indireta, em que indivíduos com pais biológicos com diagnóstico de transtorno de personalidade anti-social têm maior probabilidade de também apresentarem agressividade, transtorno de conduta e personalidade anti-social, condições estas que predispõem para abuso e dependência de substâncias.

1.6 Estudos Moleculares

Com base nos estudos genéticos clássicos, que encontraram evidências da contribuição genética nos transtornos por uso de álcool, têm sido realizados estudos moleculares em genes candidatos para a predisposição a esses transtornos. O sistema dopaminérgico tem merecido destaque nos estudos moleculares devido ao sistema de recompensa cerebral (Kiyatkin, 1995; Vetulani,

2001). Alguns estudos têm encontrado associação de determinados polimorfismos em receptores dopaminérgicos com transtornos por uso de substâncias.

Blum e cols. (1990) encontraram uma associação entre o alelo TaqIA1 do gene do receptor dopaminérgico D₂ (DRD2) e o alcoolismo, fazendo com que a associação entre alelos desse gene e dependência de substâncias passasse a ser muito estudada. Foram realizados trabalhos semelhantes sobre a dependência de álcool em outros centros, mas os resultados iniciais não foram replicados (Bolos e cols., 1990; Gelernter e cols., 1991). Em uma meta-análise compreendendo 15 estudos americanos e europeus, num total de 1015 indivíduos portadores de alcoolismo e 898 controles, Noble (1998a) encontrou uma prevalência três vezes maior do alelo A1 desse gene em indivíduos com dependência grave de álcool, em relação a controles, ao passo que nenhuma diferença foi observada entre os controles e indivíduos com dependência leve de álcool. Igualmente, encontraram associação entre uma outra variante, o alelo B1, e dependência de álcool. Noble e cols. (1991), analisando sujeitos com diagnóstico de abuso de álcool ou outras substâncias, encontraram evidência de metabolismo regional cerebral de glicose reduzido em portadores do alelo A1 desse receptor em áreas envolvidas no sistema de recompensa cerebral, como o *nucleus accumbens*, ou reguladoras de função frontal, como o córtex pré-frontal. Em outro artigo, Noble e cols. (1994) relataram associação do alelo A1 com o hábito de fumar. No entanto, outros dois artigos não observaram associação entre este polimorfismo e dependência de nicotina (Singleton e cols., 1998; Bierut e

cols., 2000), sugerindo que esta associação não seja tão forte como referida pelos trabalhos iniciais.

Bau e cols. (2000), estudando a mesma amostra de homens brasileiros de ascendência caucasóide a ser utilizada no presente trabalho, também identificaram uma maior prevalência do alelo TaqIA1 do gene DRD2 em indivíduos com dependência de álcool quando comparados com controles. Além disso, esse estudo também identificou uma interação entre presença de alelo A1 com o estresse e evitação de dano influenciando na intensidade dos sintomas de dependência fisiológica ao álcool. Posteriormente, o mesmo grupo (Freire e cols., 2006) analisou separadamente as dependências de álcool e nicotina combinadas, dependência de nicotina isolada e um grupo de controles normais. Eles verificaram que a associação observada previamente (Bau e cols., 2000) envolvendo o alelo TaqIA1 poderia ser explicada pela dependência de nicotina, associada ou não ao alcoolismo.

Quanto ao gene do receptor dopaminérgico D₄ (DRD4), a maioria dos estudos, incluindo Parsian e cols. (1997) e Luciano e cols. (2004) não encontraram associação entre polimorfismos neste gene e alcoolismo. Um estudo com a presente amostra de indivíduos brasileiros também não demonstrou associação entre alelos de um VNTR no éxon 3 do gene DRD4 e susceptibilidade ao alcoolismo (Roman e cols., 1999). Por outro lado, Kottler e cols. (1997) verificaram uma associação entre os alelos longos do VNTR e dependência de opióides, enquanto que Shields e cols. (1998) encontraram que, considerando apenas os indivíduos afro-americanos, aqueles com pelo menos um alelo longo apresentavam menor idade de início e maior predisposição para o hábito de

fumar. Bau e cols (2001) realizaram um estudo envolvendo o mesmo VNTR e um outro polimorfismo de VNTR na região 3' do gene da proteína transportadora da dopamina (DAT1). Os autores encontraram uma interação entre genótipos contendo o alelo de 7 repetições do DRD4 e homozigotos 10/10 para o DAT1 com procura de novidades na predição do consumo de álcool em indivíduos com dependência.

Também foram realizadas investigações de polimorfismos com os outros subtipos de receptores dopaminérgicos. Thome e cols. (1999) encontraram uma associação entre um polimorfismo do receptor dopaminérgico D₃ (DRD3) em pacientes com dependência de álcool em relação a controles, enquanto Parsian e cols. (1997) não encontraram nenhuma associação. Vanyukov e cols. (1998) avaliaram o gene do receptor dopaminérgico D₅ (DRD5) para uma possível associação entre um polimorfismo do gene e abuso de substâncias, mediado pelo traço de personalidade de busca de novidade. Eles obtiveram um achado positivo para o sexo feminino, sugerindo diferentes vias de vulnerabilidade entre os sexos.

Outros genes relacionados com o transporte e metabolismo da dopamina, como os genes do transportador de dopamina (DAT1), tirosina hidroxilase (TH), dopamina β-hidroxilase (DBH), catecol-O-metiltransferase (COMT), monoaminoxidase A (MAOA) e monoaminoxidase B (MAOB) também têm sido estudados para transtornos por uso de álcool e nicotina, com resultados controversos (Batra e cols., 2003; Freire e cols., 2005; Contini e cols., no prelo).

Além dos genes relacionados à dopamina, também têm sido investigados genes de outros sistemas neurotransmissores quanto à associação com transtornos por uso de substâncias. Noble e cols. (1998b) encontraram uma

menor prevalência do alelo GABRB3-G1 do gene da subunidade β_3 do receptor gabaérgico (GABRB3) em dependentes graves do álcool, quando comparados a controles sem o fenótipo. Em outro trabalho, Schuckit e cols. (1999) investigaram a interação de diferentes sistemas na gênese de um traço de vulnerabilidade à dependência de álcool chamado nível de resposta. Eles encontraram associações com baixo nível de resposta e maior prevalência de dependência de álcool envolvendo o genótipo LL em um polimorfismo na região promotora do gene do transportador de serotonina (5-HTT) e o polimorfismo Pro/Ser do gene do receptor gabaérgico α_6 (GABRA6).

1.7 Receptor α_{2A} -Adrenérgico

Os receptores de noradrenalina e adrenalina são referidos simplesmente como adrenérgicos. De maneira geral, os receptores adrenérgicos são divididos em receptores α_1 , α_2 e β -adrenérgicos, cada um apresentando 3 subtipos, diferenciados por suas propriedades farmacológicas e sua distribuição (Sadock e Sadock, 2003). Os receptores α_2 adrenérgicos são subdivididos em α_{2A} , α_{2B} e α_{2C} , com base nos padrões de ligação do neurotransmissor e nas propriedades fisiológicas. Todos os subtipos dos receptores α_2 -adrenérgicos afetam os mesmos sistemas efetores, isto é, inibição da adenilciclase, ativação dos canais de K^+ operados pelos receptores e inibição dos canais de Ca^{++} sensíveis à voltagem (Hoffman, 2001).

Os receptores adrenérgicos, assim como os dopaminérgicos, pertencem a uma família de receptores chamados receptores 7TM, assim chamados por

apresentarem uma estrutura de sete hélices transmembrana (Lefkowitz, 2000). Os receptores 7TM fazem parte da via de transmissão de sinal de várias funções biológicas e apresentam como característica adicional a acoplagem de proteínas G (Berg e cols., 2002).

O sistema adrenérgico participa da neuromodulação e regulação endócrina. Entre outras funções, é fundamental para a resposta comportamental de luta ou fuga em situações de estresse. Ao nível central, a maior parte da noradrenalina é produzida por neurônios cujos corpos celulares estão localizados no locus ceruleus. As projeções noradrenérgicas vão principalmente para estruturas do sistema límbico, córtex frontal e hipotálamo (Wong-Riley, 2000). Além disso, a noradrenalina é o principal neurotransmissor do sistema nervoso simpático.

Os receptores α_2 -adrenérgicos desempenham importante papel na regulação da atividade do sistema nervoso simpático (Altman e cols., 1999). A ativação dos receptores α_2 na região pontobulbar do SNC inibe a atividade do sistema nervoso simpático e provoca queda da pressão arterial (Hoffman, 2001).

Em indivíduos que apresentam uso prolongado de álcool, a síndrome de abstinência é esperada, com intensidades variáveis, toda vez que a alcoolemia cai. O quadro inclui hiperatividade autonômica, tremores, insônia, ansiedade, agitação psicomotora e, em casos graves, convulsões (Soibelman e cols., 2004). Os sintomas e a intensidade da abstinência são determinados pela quantidade e duração do consumo de álcool (Fleming e cols., 2001). No entanto, diferenças genéticas para tolerância e abstinência têm sido identificadas em camundongos (Crabbe e cols., 1999). As mudanças fisiológicas que levam à síndrome de

abstinência são resultado de várias adaptações no sistema nervoso central. Por exemplo, o aumento da função dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) glutamatérgicos e a diminuição da influência inibitória dos receptores gabaérgicos pela ingestão crônica de álcool contribuem para a hiperexcitabilidade e neurotoxicidade do sistema nervoso central durante a abstinência alcoólica (Tabakoff e Hoffman, 1996; Chandler e cols., 1998). Por outro lado, alterações na liberação de catecolaminas levam a um estado hiperadrenérgico, provocando uma série de sintomas autonômicos. O uso prolongado de álcool provoca uma redução no número de receptores pré-sinápticos α_2 -adrenérgicos, gerando como consequência uma resposta hiperadrenérgica em caso de abstinência (Erwin e cols., 1998). A clonidina, um agonista α_2 -adrenérgico, tem sido utilizada como terapia coadjuvante para diminuir os sintomas autonômicos da abstinência de álcool (Kosten e O'Connor, 2003). Considerando a influência do álcool sobre o receptor α_2 -adrenérgico e a contribuição deste no sistema simpático, podemos supor que polimorfismos neste receptor também possam influir em pelo menos alguns sintomas de abstinência de álcool. Isso poderia ser importante para uma previsão de cuidados clínicos para indivíduos com abstinência.

Além disso, devido à freqüente comorbidade entre transtornos por uso de álcool e transtornos depressivos, é possível que uma vulnerabilidade genética comum possa estar presente. Quanto ao humor, existem muitas evidências sobre a contribuição do sistema noradrenérgico. A forte correlação demonstrada entre a regulação para baixo dos receptores β -adrenérgicos e a resposta clínica aos antidepressivos é provavelmente o dado mais convincente indicando uma função direta do sistema noradrenérgico na depressão (Sadock e Sadock, 2003). A

eficácia clínica de medicamentos antidepressivos com efeitos noradrenérgicos, como os tricíclicos, também reforça a função da noradrenalina na fisiopatologia da depressão (Schatzberg e cols., 1997). Além disso, sabe-se que o anti-hipertensivo reserpina, que acarreta depleção de monoaminas, induz sintomas depressivos importantes em 10 a 20 % dos pacientes. Outra evidência que reforça a hipótese da contribuição do sistema noradrenérgico na depressão é a de que em pelo menos um subgrupo de pacientes deprimidos é possível encontrar diminuição dos níveis urinários de 3-metoxi-4-hidroxi-fenilglicol (MHPG) - um metabólito da noradrenalina, que parece refletir a taxa de renovação da noradrenalina cerebral (Graeff e Brandão, 1993). Outra evidência é de que certos polimorfismos do gene que codifica a enzima tirosina hidroxilase, fator limitante na síntese de noradrenalina e dopamina, têm sido implicados com uma maior vulnerabilidade para transtornos do humor (Persson e cols., 1997; Serretti e cols., 1998).

O gene do receptor α_{2A} -adrenérgico (ADRA2A) mostrou-se associado a escores mais elevados de desatenção em crianças com transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (Roman e cols., 2003; 2006). Considerando que esse transtorno apresenta também comorbidade com transtornos por uso de álcool e nicotina, sendo um de seus fatores predisponentes (Comings e cols., 1996; Biederman e cols., 2006a), é possível que o gene ADRA2A esteja envolvido na predisposição para a dependência destas substâncias.

Além da relação do ADRA2A com outras condições psiquiátricas comórbidas, existem trabalhos demonstrando associação entre este receptor e consumo de etanol. Hu e cols. (1993) demonstraram que o álcool interfere na regulação de expressão gênica do receptor α_{2A} -adrenérgico. Em outro trabalho,

os dados sugerem uma relação entre polimorfismos do gene desse receptor e dependência de álcool (Feng e cols., 1998). Diferenças entre polimorfismos do gene ADRA2A também foram implicadas com escores de memória, irritabilidade e impulsividade (Comings e cols., 2000).

O gene ADRA2A codifica o receptor α_{2A} -adrenérgico e está localizado no cromossomo 10q23-25 (Garenc e cols., 2002). A referência da seqüência no NCBI é AF281308. Na presente dissertação foi estudado um polimorfismo de sítio de restrição *MspI* na região promotora, devido a uma transversão C para G na posição -1291 (Lario e cols., 1997). A presença do sítio de restrição *MspI* na posição -1291 determina o alelo G. A ausência desse sítio corresponde ao alelo C.

Com base nestas evidências da literatura, um dos focos da presente dissertação foi a avaliação deste polimorfismo na região promotora do gene ADRA2A em indivíduos com diagnóstico de dependência de álcool e nicotina.

1.8 Subunidade β_3 da Proteína G

Proteínas G são uma família de proteínas de estruturas similares que se encontram ligadas ao trifosfato de guanosina (GTP) ou ao difosfato de guanosina (GDP). Estas proteínas interagem com receptores 7TM mencionados anteriormente, incluindo os receptores adrenérgicos e dopaminérgicos (Sadock e Sadock, 2003). As proteínas G são heterotrímeros constituídas de subunidades chamadas α , β e γ . A subunidade α é que se liga ao nucleotídeo, sendo GDP no estado não ativado e GTP no estado ativado. A ligação do neurotransmissor ao

receptor 7TM leva à substituição de GDP por GTP na subunidade α , fazendo com que ela se dissocie do dímero β - γ . A dissociação do heterotrímero da proteína G em subunidade α +GTP e dímero β - γ transmite a informação de que o receptor está ligado ao seu ligante. Assim, as proteínas G são os intermediários na transmissão de sinais procedentes dos receptores 7TM (Berg e cols., 2002).

As subunidades da proteína G são codificadas, em células de mamíferos, por famílias de genes relacionados. As subunidades α são codificadas por 16 genes, as subunidades β por 5 genes e as subunidades γ por 12 genes (Downes e Gautam, 1999).

Tem sido considerada a possibilidade de que vias anormais de transdução de sinais intracelulares possam estar implicadas na patogênese dos transtornos psiquiátricos. As proteínas G são elementos essenciais na regulação da transmissão dos sinais dos receptores de neurotransmissores para as proteínas efetoras intracelulares. Existe uma hipótese de que pelo menos alguns casos de depressão poderiam ocorrer devido a uma deficiência pseudomonoaminérgica, ou seja, uma deficiência da transdução do sinal do neurotransmissor monoaminérgico até o núcleo do neurônio pós-sináptico, na presença de quantidades normais de neurotransmissor e receptores (Stahl, 2000). A deficiência nos eventos moleculares subseqüentes, a partir da ocupação dos receptores pelo neurotransmissor, poderia levar a uma resposta celular deficiente.

A deficiência no funcionamento de sinalização intracelular tem sido descrita em determinadas doenças endócrinas como o hipoparatiroidismo (deficiência do hormônio paratirodiano), pseudohipoparatiroidismo (receptores paratirodianos deficientes, mas níveis do hormônio paratirodiano normais) e

pseudopseudohipoparatiroidismo (deficiência da transdução de sinal levando ao estado clínico de hipoparatiroidismo, apesar dos níveis normais do hormônio e dos receptores) (Vilar e cols., 2001). Quanto à patologia endócrina, o pseudohipoparatiroidismo tipo I tem sido considerado um exemplo bem caracterizado de uma doença devido a uma mutação de um gene de subunidade de proteína G, no caso GNAS1, responsável pela codificação de uma subunidade α (Carter e cols., 1987).

A dopamina é o principal neurotransmissor do sistema de recompensa cerebral (Kiyatkin, 1995; Vetulani, 2001). Os 5 receptores dopaminérgicos atualmente conhecidos são receptores 7TM, utilizando-se da acoplagem de proteínas G para a transdução do sinal pós-sináptico (Berg e cols, 2002). Portanto, é possível que variações na ação da proteína G tenham influência no sistema de recompensa cerebral.

A subunidade β_3 da proteína G é um polipeptídeo de 340 aminoácidos, sendo codificada pelo GNB3, mapeado no cromossomo 12p13 no genoma humano (Downes e Gautam, 1999). O gene GNB3 já foi totalmente caracterizado, tendo 7,5 kb e sendo composto por 11 éxons e 10 íntrons (Roskopf e cols., 2000). Sua descrição encontra-se no NCBI com o número de acesso AY631872.

É provável que muitas mutações em subunidades da proteína G sejam letais, devido à função central destas proteínas na fisiologia dos mamíferos. Por outro lado, têm sido encontrados polimorfismos em populações humanas. Uma variação interessante devido ao seu significado funcional foi descrita por Siffert e cols. (1995), que identificaram uma mutação de ponto de citosina para timina na posição 825 do cDNA, correspondente ao éxon 9 do gene que codifica a

subunidade β_3 (GNB3). O alelo T deste polimorfismo está associado ao *splicing* alternativo G β_3 s, o qual, embora tenha uma deleção de 41 aminoácidos, é funcionalmente ativo e relacionado ao aumento da transdução de sinal pela proteína G (Siffert e cols., 1998). Diferentes estudos têm demonstrado que o alelo T desse gene encontra-se associado à hipertensão essencial (Beige e cols., 1999; Dong e cols., 1999). Existem também alguns estudos que sugerem relação entre este polimorfismo e obesidade (Siffert e cols., 1999). Um trabalho apresentou evidência de associação entre o alelo T do gene GNB3 e depressão sazonal (Willeit e cols., 2003), enquanto outro demonstrou uma associação entre este alelo com transtornos do humor e como indicador de resposta ao tratamento antidepressivo (Zill e cols., 2000). No entanto, outros dois estudos não encontraram associação entre este polimorfismo e transtornos do humor (Lin e cols., 2001; Kunugi e cols., 2002). As frequências alélicas do polimorfismo C825T do gene GNB3, em amostra da população geral da cidade Porto Alegre correspondem a 0,67 para o alelo C e 0,33 para o alelo T (Mattevi e cols., 2006).

Com base neste conjunto de dados, o polimorfismo C825T do gene GNB3 também foi estudado na presente dissertação.

2 OBJETIVOS

Como mencionado na introdução, as dependências de substâncias têm etiologia multifatorial e se desenvolvem a partir de uma predisposição genética envolvendo a participação de muitos genes, sob influência do ambiente. O estudo de variações genéticas com efeito plausível sobre as dependências, e com efeito funcional já estabelecido (como o polimorfismo C825T do gene GNB3) ou já implicadas em outros transtornos psiquiátricos (como o C-1291G do gene ADRA2A) apresenta uma probabilidade razoável de associação, justificando esse tipo de estudo. Para tornar a abordagem ainda mais consistente, investigamos também outros transtornos psiquiátricos associados, como a depressão maior, previamente sugerida como associada ao polimorfismo C825T do gene GNB3.

Assim, os objetivos do presente trabalho são:

- Comparar as frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos C825T do gene GNB3 e o polimorfismo C-1291G do gene ADRA2A em indivíduos com dependência combinada de álcool e nicotina, dependência exclusiva de nicotina e controles brasileiros não dependentes;
- Avaliar a possível associação entre os polimorfismos estudados e o transtorno depressivo maior e outras comorbidades em pacientes com dependência de álcool.

3 PRELIMINARY EVIDENCE THAT THE ADRA2A C-1291G POLYMORPHISM INFLUENCES NICOTINE DEPENDENCE

Manuscrito em preparação para ser submetido à revista American Journal of
Medical Genetics

**Preliminary Evidence that the ADRA2A C-1291G Polymorphism Influences
Nicotine Dependence**

**Alexandre P. Prestes, Francine Z. C. Marques, Mara H. Hutz, Tatiana Roman,
Claiton H. D. Bau**

Department of Genetics, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre,
RS, Brazil; Department of Morphological Sciences, Federal School of Medical
Sciences, Porto Alegre, RS, Brazil

Running title: ADRA2A C-1291G Polymorphism and Nicotine Dependence

Correspondence to Claiton H. D. Bau, Departamento de Genética, Instituto de
Biociências, UFRGS, Caixa Postal 15053, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil.
Tel: (55) 51 3316 6718 Fax: (55) 51 3316 7311
E-mail: claiton.bau@ufrgs.br

Funding sources: CNPq, FAPERGS, PRONEX

Abstract

The aim of the present study is to test for possible associations between the C-1291G polymorphism in the alpha2A-adrenergic receptor gene (ADRA2A) with alcohol and nicotine dependencies. The genotype and allele frequencies were compared in three groups of European-derived Brazilians: individuals with combined alcohol and nicotine dependencies (N=110), with nicotine dependence only (N=121) and controls (N=114). The frequency of the G allele was higher in the group with both dependencies, intermediate among subjects with nicotine dependence only, and lower among controls ($\chi^2= 8.00$; $p= 0.02$). The χ^2 partitioning did not reveal significant differences between the groups with alcohol and nicotine dependencies and nicotine dependence only ($\chi^2= 0.82$; $p= 0.36$). However, combining these groups, the difference to the non-smoking controls is higher than the one observed in the whole-groups analysis ($\chi^2= 7.18$; $p= 0.007$). The results suggest a role for the ADRA2A C-1291G polymorphism, notably the G allele, in nicotine dependence. The influence of the ADRA2A gene in nicotine and other substance dependencies should be more extensively assessed in future studies.

Key-words: adrenergic, norepinephrine, tobacco, addiction

INTRODUCTION

Nicotine, the main addictive substance in tobacco, has a very high potential to cause dependence, comparable to heroin and cocaine (Straub et al., 1999). Furthermore, tobacco use carries considerable health risks, specially related to cancer and cardiovascular diseases (Centers for Disease Control and Prevention, 2002).

Data from family, adoption and twin studies have consistently shown a substantial genetic component in the smoking habit, with heritability estimates varying from 46% to 84% (Batra et al., 2003). Interestingly, the heritability of nicotine and alcohol dependencies are partly shared (True et al., 1999)

The brain reward system is strongly related to dependencies, and dopamine is its main neurotransmitter (Marsden, 2006; Picciotto and Corrigall, 2002). The mesolimbic dopaminergic projection from the ventral tegmental area is a part of the brain reward system related to the nicotine-induced positive reinforcement (Johnson et al., 2005). Moreover, the ventral tegmental area also receives noradrenergic projections from the locus coeruleus (Vetulani, 2001). It is noteworthy that nicotine increases norepinephrine release in several regions of the SNC (Picciotto and Corrigall, 2002), including the locus coeruleus (Stein et al., 1998; Fu et al. 1998a,b). Therefore, the nicotine-induced norepinephrine release could also influence the brain reward system.

Medications with predominantly noradrenergic activity have been used in nicotine dependence treatment (Foulds et al., 2004; George and O'Malley, 2004). The selective norepinephrine reuptake inhibitor reboxetine attenuates nicotine self-administration in animal models (Rauhut et al., 2002). Bupropion, a first line

nicotine treatment medication (Hughes et al., 2005), is proposed to act through multiple systems, including the adrenergic inhibition in the locus coeruleus (Cryan et al., 2003). Nortriptyline, a predominantly noradrenergic antidepressant drug, has also been effective in the treatment of nicotine dependence (Foulds et al., 2004; Hughes et al., 2005).

There are also evidences that the alpha2-adrenergic self-receptors are remarkably down-regulated in smokers (Klimek et al., 2001). Indeed, the alpha2-adrenergic receptor agonists clonidine and guanfacine are effective in reducing nicotine abstinence symptoms (Gourlay et al., 2004). This receptor is codified by the alpha2A-adrenergic receptor gene (ADRA2A), a small, intronless gene mapped to 10q24-26. The ADRA2A gene has a promoter region single nucleotide polymorphism (SNP), namely C-1291G (rs 1800544), that has been associated with higher inattention scores in children with attention-deficit/hyperactivity disorder (Roman et al., 2003, 2006) and increased scores of irritability and impulsivity (Comings et al., 2000), conditions with substantial comorbidity with substance dependencies (Kollins et al., 2005). An additional suggestion for the possible contribution of this gene in smoking is the presence of a linkage signal for nicotine dependence in a region of chromosome 10, close to the ADRA2A locus (Straub et al., 1999; Uhl et al., 2001; Uhl, 2004). The aim of the present study is to test for possible associations between the C-1291G polymorphism in the ADRA2A gene with alcohol and nicotine dependencies.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

This study compared the genotype and allele frequencies in three groups of European-derived Brazilians: individuals with combined alcohol and nicotine dependencies (N=110), with nicotine dependence only (N=121) and controls (N=114). All these samples were ascertained in Porto Alegre, the capital of Brazil's southernmost state, Rio Grande do Sul. Differently from Brazil as a whole, the population of Rio Grande do Sul is composed mainly of people from European ancestry (82%). For this reason, the possibility of bias due to population stratification is smaller (Dornelles et al., 1999). All the individuals evaluated were males.

The sample with both dependencies was assessed in a specialized alcoholism treatment ward. The diagnosis of alcohol dependence followed DSM-IV criteria (American Psychiatric Association, 2000), and interviews were performed with the Semi-Structured Assessment for the Genetics in Alcoholism (SSAGA) (Bucholz et al., 1994). In this sample, 28 individuals presented other substance abuse (mostly Cannabis, followed by cocaine), 20 had antisocial personality and 44 had major depressive disorder. Other psychiatric disorders were either not assessed or were too infrequent.

A group of 232 individuals (121 non-alcoholic smokers and 114 non-smoking controls) was assessed in a blood bank. This sample was designed to be non-screened, representative of the gene frequencies of individuals from European descent in Porto Alegre. These individuals are replacement donors, that is, they are people that replaced the blood used by a hospitalized family member

or friend. For this reason, a behavior-related bias is not likely. The criterion for smoking in the alcoholic and non-alcoholic samples was daily use for at least one month. Daily smoking is strongly related to nicotine dependence, since it usually starts when dependence is already established (Mayhew et al., 2000, Wellman et al., 2004). For this reason, we consider that these individuals fulfilled DSM-IV criteria for nicotine dependence.

Written informed consent was obtained from every subject. The study protocol was approved by the institutional ethical committees.

Laboratory Methods

High molecular weight genomic DNA was isolated from total blood lymphocytes following the salting-out method described by Lahiri and Nurnberger (1991). The region of ADRA2A gene including the C-1291G polymorphism was amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) with primers and protocols described by Lario et al. (1997) and Roman et al. (2003). The 522 bp fragments originated in PCR reactions were digested with the *MspI* restriction endonuclease, since the transversion C→G creates a *MspI* restriction site. After this procedure, four constant fragments (5, 62, 116 and 165 bp) were obtained. The 'C' allele was defined by a polymorphic band of 174 bp, characterized by the absence of *MspI* site at -1291 position. The presence of a guanine in this location creates a *MspI* restriction site, breaking the 174 bp fragment in bands of 121 and 53 bp and defining the 'G' allele. The fragments resultant from endonuclease digestion were subjected to electrophoresis in 10% polyacrylamide gels, stained with ethidium bromide and visualized under UV light.

Statistical Analyses

The analyses of Hardy-Weinberg equilibrium and comparisons among individuals with combined alcohol and nicotine dependencies, nicotine dependence only and controls were performed using the chi-square test. The comparison between alcohol dependent patients with or without comorbid disorders was also performed with the chi-square test.

RESULTS

The three samples were in Hardy-Weinberg equilibrium for the C-1291G polymorphism. Allele and genotype frequencies for all three samples are presented in Table I. The frequency of the G allele was higher in the group with both dependencies, intermediate among subjects with nicotine dependence only, and lower among controls ($\chi^2= 8.00$; $p= 0.02$). The χ^2 partitioning did not reveal significant differences between the group with alcohol and nicotine dependencies and the group with nicotine dependence only ($\chi^2= 0.82$; $p= 0.36$). However, combining these groups, the difference to the non-smoking controls is more significant than the one observed in the whole-groups analysis ($\chi^2= 7.18$; $p= 0.007$).

There was no significant association between the C-1291G polymorphism and comorbid disorders (other substance abuse, antisocial personality and major depressive disorder) in the sample of patients with alcohol and nicotine dependencies.

DISCUSSION

The results of the present study suggested an involvement of the alpha2A-adrenergic receptor gene in nicotine dependence in a Brazilian sample. The frequency of the G allele of the C-1291G polymorphism was significantly higher among individuals with alcohol and nicotine dependences and individuals with nicotine dependence only, compared to controls.

Although there are no previous investigations in the literature with ADRA2A gene and nicotine dependence, evidences from some molecular studies give support to our findings. Two genome scan studies revealed that there are some consecutive markers at chromosome 10 very close to ADRA2A that yield small but positive results of linkage to a dichotomous outcome of nicotine dependence (Straub et al., 1999; Uhl et al., 2001; Uhl, 2004; Sullivan et al., 2004). Thus, our results represent the first association study to confirm the linkage signal in chromosome 10 (10q24-26) with nicotine dependence.

At least two neurobiological mechanisms could explain the association presented in this study between a noradrenergic receptor gene and nicotine dependence. The first would be a contribution of the noradrenergic system in the nicotine dependence, through the brain reward system. The ventral tegmental area, which is related to the brain reward system, receives noradrenergic projections from the locus coeruleus (Vetulani, 2001), while nicotine increases norepinephrine release in the locus coeruleus (Stein et al., 1998; Fu et al., 1998a,b). The second possibility is that, in addition to reward, a possible reason for smoking initiation might be the improvement of cognitive and mood states. Nicotine improves vigilance and concentration (Jain and Mukherjee, 2003) and

mediate 'calming' effects (Fu et al., 1998a). Nicotine increases attention in individuals with attention-deficit/hyperactivity disorder, a condition highly associated with substance dependencies (Kollins et al., 2005). Interestingly, the G allele was also associated with significantly higher inattention scores in probands with attention-deficit/hyperactivity disorder (Roman et al., 2003, 2006; Park et al., 2004).

The functional effect of the C-1291G polymorphism of the ADRA2A gene has been suggested in physiological studies, since carriers of the genotypes differ in the distribution of body fat, glucose and insulin levels and cortisol response to dexamethasone test (Rosmond et al., 2002). This transversion has also been speculated to change the density of alpha2A-adrenergic receptors in the membrane of noradrenergic neurons (Garenc et al., 2002). However, the association observed in our study might be due to the effect of another polymorphism in linkage disequilibrium with the C-1291G. Belfer et al. (2005) showed that there is a single haplotype block that captures the signal of any functional polymorphism in ADRA2A gene. This haplotype includes the polymorphism investigated here (C-1291G), but eight other SNPs are also comprised, thus making difficult to this point to determine which variant *per se* is contributing to the functionality of ADRA2A locus. Nevertheless, the C-1291G polymorphism seems to represent most of the haplotype variation in ADRA2A (Park et al., 2004; Belfer et al., 2005). Genotyping other polymorphisms would generate additional potentially relevant haplotypes, but their frequencies would be too small for the analysis with the present sample size.

The results observed in the present work suggest an association between the ADRA2A C-1291G polymorphism, notably the G allele, in nicotine dependence. The influence of the ADRA2A gene in nicotine and other substance dependencies should be more extensively assessed in future haplotype-based studies with higher sample sizes.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Hospital Espírita de Porto Alegre for allowing the data collection to occur. The sample collection of patients with alcohol dependence was obtained with the help of Alessandra Spode, Alexandra C. Ponso, Carlos E.D. Garcia, Evenise P. Elias and Fabiana T. Costa. Verônica Contini and Maria Paula Quiroga helped in the laboratory procedures. This research was supported by CNPq, FAPERGS and PRONEX.

REFERENCES

- American Psychiatric Association. 2000. Diagnostic and statistical manual of mental disorders, fourth edition, text revision. American Psychiatric Association, Washington D.C., 880 pp.
- Batra V, Patkar AA, Berrettini WH, Weinstein SP, Leone FT. 2003. The genetic determinants of smoking. *Chest* 123: 1730-1739.
- Belfer I, Buzas B, Hipp H, Phillips G, Taubman J, Lorincz I, Evans C, Lipsky RH, Enoch MA, Max MB, Goldman D. 2005. Haplotype-based analysis of alpha 2A, 2B, and 2C adrenergic receptor genes captures information on common functional loci at each gene. *J Hum Genet* 50:12-20.
- Bucholz KK, Cadoret R, Cloninger CR, Dinwiddie SH, Hesselbrock VM, Numberger JI, Reich T, Schmidt I, Schuckit MA. 1994. A new, semistructured psychiatric interview for use in genetic linkage studies: a report of the reliability of SSAGA. *J Stud Alcohol* 55: 149-158.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2002. Annual smoking-attributable mortality, years of potential life lost, and economic costs – United States, 1995-1999. *Morbidity and Mortality Weekly Report*; 51: 300-303
- Comings DE, Johnson JP, Gonzalez NS, Huss M, Saucier G, McGue M, MacMurray J. 2000. Association between the adrenergic alpha 2A receptor gene (ADRA2A) and measures of irritability, hostility, impulsivity and memory in normal subjects. *Psychiatr Genet* 10: 39-42.
- Cryan JF, Gasparini F, van Heeke G, Markou A. 2003. Non-nicotinic neuropharmacological strategies for nicotine dependence: beyond bupropion. *Drug Discov Today* 8: 1025-1034.

- Dornelles CL, Callegari-Jacques SM, Robinson WM, Weimer TA, Franco MHL, Hickmann AC, Geiger C, Salzano FM. 1999. Genetics, surnames, grandparents nationalities, and ethnic admixture in southern Brazil - Do the patterns of variation coincide? *Genet Mol Biol* 22:151-161.
- Foulds J, Burke M, Steinber M, Williams JM, Ziedonis DM. 2004. Advances in pharmacotherapy for tobacco dependence. *Expert Opin Emerg Drugs* 9: 39-53.
- Fu Y, Matta SG, James TJ, Sharp BM. 1998a. Nicotine-induced norepinephrine release in the rat amygdala and hippocampus is mediated through brainstem nicotinic cholinergic receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 284: 1188-1196.
- Fu Y, Matta SG, Valentine JD, Sharp BM. 1998b. Desensitization and resensitization of norepinephrine release in the rat hippocampus with repeated nicotine administration. *Neurosci Lett* 241: 147-150.
- Garenc C, Pérusse L, Chagnon YC, Gagnon TRJ, Borecki IB, Leon AS, Skinner JS, Wilmore JH, Rao DC, Bouchard C. 2002. The alpha2-adrenergic receptor gene and body fat content and distribution: the HERITAGE family study. *Mol Med* 8: 88-94.
- George TP, O'Malley SS. 2004. Current pharmacological treatments for nicotine dependence. *Trends Pharmacol. Sci.* 25: 42-48.
- Gourlay SG, Stead LF, Benowitz NL. 2004. Clonidine for smoking cessation. *Cochrane Database Syst Rev* 3: CD000058.
- Hughes JR, Stead LF, Lancaster T. 2005. Nortriptyline for smoking cessation: a review. *Nicotine Tob Res* 7:491-499.
- Jain R, Mukherjee K. 2003. Biological basis of nicotine addiction. *Indian J Pharmacol* 35: 281-289.

- Johnson BA, Ait-Daoud N, Akhtar FZ, Javors MA. 2005. Use of Oral Topiramate to promote smoking abstinence among alcohol-dependent smokers. *Arch Intern Med* 165: 1600-1605.
- Klimek V, Zhu MY, Dilley G, Konick L, Overholser JC, Meltzer HY, May WL, Stockmeier CA, Ordway GA. 2001. Effects of long-term cigarette smoking on the human locus coeruleus. *Arch Gen Psychiatry* 58: 821-827.
- Kollins SH, McClernon JF, Fuemmeler BF. 2005. Association between smoking and attention-deficit/hyperactivity disorder symptoms in a population-based sample of young adults. *Arch Gen Psychiatry*, 62:1142-1114.
- Lahiri DK and Nurnberger JI Jr.. 1991. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res.* 19: 5444.
- Lario S, Callls J, Cases A, Oriola J, Torra A, Rivera F. 1997. MspI identifies a biallelic polymorphism in the promoter region of the alpha 2A-adrenergic receptor gene. *Clin Genet* 51: 129-130.
- Marsden CA. 2006. Dopamine: the rewarding years. *Br J Pharmacol* 147: S136-S144.
- Mayhew KP, Flay BR, Mott JA. 2000. Stages in the development of adolescent smoking. *Drug Alcohol Depend* 59: 61-81.
- Park L, Nigg JT, Waldman ID, Nummy KA, Huang-Pollock C, Rappley M, Friderici KH. 2004. Association and linkage of alpha-2A-adrenergic receptor gene polymorphisms with childhood ADHD. *Mol Psychiatry* 10: 572–580.

- Picciotto MR, Corrigan WA. 2002. Neuronal systems underlying behaviors related to nicotine addiction: neural circuits and molecular genetics. *J Neurosci* 22: 3338-3341.
- Rauhut AS, Mullins SN, Dwoskin LP, Bardo MT. 2002. Reboxetine: attenuation of intravenous nicotine self-administration in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 303: 664-672.
- Roman T, Schmitz M, Polanczyk GV, Eizirik M, Rohde LA, Hutz M. 2003. Is the alpha-2A adrenergic receptor gene (ADRA2A) associated with attention-deficit/hyperactivity disorder? *Am J Med Genet* 120B: 116-120.
- Roman T, Polanczyk GV, Zeni C, Genro JP, Rohde LA, Hutz M. 2006. Further evidence of the involvement of alpha-2A-adrenergic receptor gene (ADRA2A) in inattentive dimensional scores of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry*. 11: 8-10.
- Rosmond R, Bouchard C, Bjorntorp P. 2002. A C-1291G polymorphism in the alpha2A-adrenergic receptor gene (ADRA2A) promoter is associated with cortisol escape from dexamethasone and elevated glucose levels. *J Intern Med* 251: 252-257.
- Stein EA, Pankiewicz J, Harsch HH, Cho JK, Fuller SA, Hoffmann RG, Hawkins M, Rao SM, Bandettini PA, Bloom AS. 1998. Nicotine-induced limbic cortical activation in the human brain: a functional MRI study. *Am J Psychiatry* 155: 1009-1015.
- Straub RE, Sullivan PF, Ma Y, Myakishev MV, Harris-Kerr C, Wormley B, Kadambi B, Sadek H, Silverman MA, Webb BT, Neale MC, Bulik CM, Joyce PR, Kendler KS. 1999. Susceptibility genes for nicotine dependence: a genome scan and

- followup in an independent sample suggest that regions on chromosomes 2, 4, 10, 16, 17 and 18 merit further study. *Mol Psychiatry* 4: 129-144.
- Sullivan PF, Neale BM, Van Den Oord E, Miles MF, Neale MC, Bulik CM, Joyce PR, Straub RE, Kendler KS. 2004. Candidate genes for nicotine dependence via linkage, epistasis, and bioinformatics. *Am J Med Genet* 126B: 23-36.
- True WR, Xian H, Scherrer JF, Madden PAF, Bucholz KK, Heath AC, Eisen SA, Lyons MJ, Goldberg J, Tsuang M. 1999. Common genetic vulnerability for nicotine and alcohol dependence in men. *Arch Gen Psychiatry* 56: 655-661.
- Uhl GR. 2004. Molecular genetics of substance abuse vulnerability: remarkable recent convergence of genome scan results. *Ann N Y Acad Sci* 1025:1-13.
- Uhl GR, Liu QR, Walther D, Hess J, Naiman D. 2001. Polysubstance abuse–vulnerability genes: genome scans for association, using 1,004 subjects and 1,494 single-nucleotide polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 69:1290–1300.
- Vetulani J. 2001. Drug addiction. Part II. Neurobiology of addiction. *Pol J Pharmacol.* 53: 303-317.
- Wellman RJ, DiFranza JR, Savageau JA, Dussault GF. 2004. Short term patterns of early smoking acquisition. *Tob Control* 13: 251-257.

Table I: Allele and genotype frequencies of the C-1291G polymorphism in individuals with dependence combined of alcohol and nicotine, nicotine dependence and controls

	Alcohol and nicotine dependence (AND)		Nicotine dependence (ND)		Controls (C)	
	n	%	n	%	n	%
	Alleles					
C	131	59.6	154	63.7	164	71.9
G	89	40.4	88	36.3	64	28.1
Total	220	100	242	100	228	100
Genotypes						
CC	38	34.5	47	38.8	59	51.8
CG	55	50.0	60	49.6	46	40.3
GG	17	15.5	14	11.6	9	7.9
Total	110	100	121	100	114	100

Chi-squares for comparisons:

Alleles:

AND x ND x C: $\chi^2= 8.00$; p= 0.02

AND + ND x C: $\chi^2= 7.18$; p= 0.007

Genotypes:

AND x ND x C: $\chi^2= 8.56$; p= 0.07

AND + ND x C: $\chi^2= 7.56$; p= 0.02

4 THE GNB3 C825T POLYMORPHISM AND DEPRESSION AMONG SUBJECTS WITH ALCOHOL DEPENDENCE

Manuscrito em preparação para ser submetido à revista Journal of Neural
Transmission

**The GNB3 C825T Polymorphism and Depression among Subjects with
Alcohol Dependence**

Alexandre P. Prestes, Francine Z. C. Marques, Mara H. Hutz, Claiton H. D.

Bau

Genetics Department, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS,
Brazil.

Running title: **GNB3 C825T Polymorphism and Depression**

Correspondence to Claiton H. D. Bau, Departamento de Genética, Instituto de
Biociências, UFRGS, Caixa Postal 15053, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil.
Tel: (55) 51 3316 6718 Fax: (55) 51 3316 7311
E-mail: claiton.bau@ufrgs.br

Funding sources: CNPq, FAPERGS, PRONEX

Summary

The T allele of the C825T polymorphism in the G-protein β_3 subunit gene (GNB3) is functionally active and related to the increase of signal transduction by the G-protein. Various studies suggest that this allele is involved in arterial hypertension and some of the results also indicate a connection to obesity and major depressive disorder. G-proteins are intermediary paths in signal transduction from dopaminergic, cannabinoid and opioid receptors, involved in the development of dependencies. We studied the C825T polymorphism in individuals with (i) alcohol and nicotine dependence (n = 109), (ii) nicotine dependence only (n = 117) and (iii) non-dependent controls (n = 108). We also tested for possible associations with psychiatric comorbidities among alcohol-dependent individuals. No differences were detected for allele and genotype frequencies in individuals with or without dependencies. Alcohol-dependent individuals with the heterozygous genotype presented more frequently major depressive disorder ($\chi^2 = 12.34$; $p = 0.002$). The preliminary, positive association with depression is consistent with previous findings on the GNB3 gene. The lack of association with the homozygous genotype may be related to an underrepresentation of more severe depressive disorder in this sample of alcohol dependence. In this case, the specificity of the association with the heterozygous genotype would be explained by a particular subtype of major depressive disorder associated with alcohol dependence.

Key-words: GNB3, C825T, alcohol, nicotine, dependence

Introduction

G-proteins are a family of proteins which are bound to guanosine triphosphate (GTP) or to guanosine diphosphate (GDP). They are intermediate paths for the transmission of signals from the receptors of 7 transmembrane domains (7TM) including the biogenic amine receptors (Berg et al., 2002; Sadock and Sadock, 2003).

The brain reward system is one of the main mechanisms implicated in substance dependence (Koob, 2003). Several neurotransmitter receptors, as the dopaminergic (Kiyatkin, 1995; Marsden, 2006), cannabinoid (Yamamoto and Takada, 2000) and opioid (Zastawny et al., 1994) operate in the brain reward system. These receptors use G-protein coupling for transduction of the postsynaptic signal (Berg et al., 2002). Therefore, G-protein related function can be regarded as part of the brain reward system. It is possible that a malfunction in the cascade of biochemical postsynaptic events could interfere in the operation of this mechanism.

Abnormal paths of intracellular signal transduction have been implicated in the pathogenesis of psychiatric conditions, especially mood disorders (Stahl, 2000; Zill et al, 2000). One hypothesis suggests that at least some cases of depression may occur due to a pseudomonoaminergic deficiency, that is, a deficiency in the transduction of the monoaminergic neurotransmitter signal to the nucleus of the postsynaptic neuron, notwithstanding the presence of normal numbers of neurotransmitters and receptors (Stahl, 2000).

The human G-protein β_3 subunit gene (GNB3) is mapped in the chromosome 12p13 (Downes and Gautam, 1999). The β_3 subunit is a polypeptide

of 340 amino acids (Levine et al., 1990). The GNB3 gene spans 7.5 kb and is composed of 11 exons and 10 introns (Roskopf et al., 2000). The C825T polymorphism, located in exon 9 of the gene, corresponds to a cytosine-to-thymine transition in position 825 of cDNA (Siffert et al., 1995). The T allele of this polymorphism is associated to the G β 3-s alternative splicing, and despite a deletion of 41 amino acids, is functionally active and increases the transduction of the signal by the G-protein (Siffert et al., 1998).

Associations were observed between the GNB3 C825T polymorphism and major depressive disorder, its severity and response to treatment (Lee et al., 2004); seasonal alterations of mood (Lee et al., 2005); seasonal depression (Willeit et al., 2003) and depressed mood (Exton et al., 2003). Other studies, however, did not find an association between the polymorphism and mood variations (Lin et al., 2001; Kunugi et al., 2002).

The importance of this polymorphism is also suggested by studies related to non-psychiatric disorders. The 825T allele was reported as associated to essential hypertension (Beige et al., 1999; Dong et al., 1999, Siffert, 2005) and obesity (Siffert et al., 1999; Snyder et al., 2004).

This study tested for a possible association between the GNB3 C825T polymorphism in individuals with alcohol and nicotine dependencies as compared to non-dependent controls. In addition, we looked for possible associations between this polymorphism and the presence of other substance abuse, antisocial personality and major depressive disorder in individuals with alcohol dependence.

Material and methods

Subjects

The alcohol dependent sample (N= 123; 109 nicotine dependents plus 14 non smokers) was investigated in an alcoholism treatment ward. This sample was also investigated for the presence of other psychiatric disorders (28 individuals presented other substance abuse (mostly Cannabis, followed by cocaine), 20 had antisocial personality and 44 had major depressive disorder). Other psychiatric disorders were either not assessed or were too infrequent. All the diagnoses followed the DSM-IV criteria (American Psychiatric Association, 2000). The diagnostic interview for alcohol dependence and lifetime comorbidities was performed with the Semi-Structured Assessment for the Genetics in Alcoholism (Bucholz et al., 1994).

A sample of 225 European-derived men (117 non-alcoholic nicotine dependents and 108 non-dependent controls) was assessed in a blood bank. This sample was designed to be non-screened, representative of the gene frequencies of individuals of European descent in Porto Alegre. These subjects are replacement donors, that is, they are people that replaced the blood used by a hospitalized family member or friend. For this reason, a behavior-related bias is not likely.

The criterion for smoking among blood donors was daily use for at least one month. Daily smoking is strongly related to nicotine dependence, since it usually starts when dependence is already established (Mayhew et al. 2000, Wellman et al. 2004). For this reason, we consider that these individuals fulfilled DSM-IV criteria for nicotine dependence.

Written informed consent was obtained from every subject. The study protocol was approved by the institutional ethical committees.

Laboratory Methods

The high molecular weight genomic DNA was isolated from total blood lymphocytes following the salting-out method described by Lahiri and Nurnberger (1991). The Polymerase Chain Reaction (PCR) was employed to amplify a DNA genomic region of 267 bp in the GNB3 gene. The protocol used was described by Schunkert et al. (1998) and adapted by Mattevi et al. (2006). The C825T polymorphism was shown in the PCR products by digestion with the *Bsa*JI restriction enzyme. The restriction fragments were separated by electrophoresis in 2.5% agarose gels stained with ethidium bromide and visualized under ultraviolet light. The C allele presents the restriction site resulting in two fragments of 115 bp and 153 bp. The T allele does not present the restriction site and resulted in a non-digested fragment of 267 bp.

Statistical Analyses

The analyses of Hardy-Weinberg equilibrium and comparisons among individuals with combined alcohol and nicotine dependencies, nicotine dependence only and controls, as well as among patients with and without comorbidities, were performed using the chi-square test.

Results

The samples were in Hardy-Weinberg equilibrium. There were no differences in the genotype ($\chi^2 = 2.104$; $p = 0.717$) or allele ($\chi^2 = 0.420$; $p = 0.811$) frequencies among individuals with alcohol and nicotine dependencies, nicotine dependence only and controls (table 1).

The heterozygous genotype of the GNB3 C825T polymorphism was more frequent among alcohol dependent individuals with comorbid major depressive disorder ($\chi^2 = 12.34$; $p = 0.002$). There were no differences in the allele frequencies of this polymorphism between individuals with or without depression ($\chi^2 = 0.004$; $p = 0.95$) (table 2). The GNB3 polymorphism was not associated with illegal drug abuse or antisocial personality disorder.

Discussion

The lack of association between the C825T polymorphism with substance dependence suggests that these conditions are not influenced by the T allele-related increase in the signal transduction of the G-Protein. However, a higher prevalence of the heterozygous genotype was observed among alcohol dependent patients with major depressive disorder.

The observed association of the GNB3 C825T polymorphism with major depressive disorder is consistent with previous works which suggested a specific association of the heterozygous genotype with seasonal variation of mood (Lee et al., 2005) and seasonal depression (Willeit et al., 2003). These findings, taken together with other studies suggesting an influence of the C825T polymorphism in

major depressive disorder (Exton et al. 2003; Lee et al., 2004), support the hypothesis of the involvement of G-proteins in mood regulation (Stahl, 2000).

On the other hand, the association was not observed for the allele frequencies. It is possible that this is due to a peculiarity of the heterozygote genotype as was found in the studies by Willeit et al. (2003) and Lee et al. (2005). The lack of association with the homozygous genotype may be related to an underrepresentation of more severe depressive disorder in this sample of alcohol dependence. In this case, the specificity of the association with the heterozygous genotype would be explained by a particular subtype of major depressive disorder associated with alcohol dependence. A similar hypothesis could explain the previous findings with seasonal variation of mood (Willeit et al., 2003; Lee et al., 2005). This hypothesis should be tested in independent samples of patients with major depressive disorder with or without substance dependence.

A potential weakness present in case-control association studies regards to the issue of population stratification. However, population stratification is not likely to be a confounder in this study, because the samples were carefully limited to Brazilians of European descent. The gene frequencies in the control sample were similar to those reported in a sample of healthy European descendents from Porto Alegre (Mattevi et al., 2006). Studies with a larger sample size could show a positive association with substance dependence. Nevertheless, the similarity of allele and genotype frequencies in our comparison groups suggests that if there is an effect of the polymorphism, it should be extremely small. Another limitation is the small number of patients with major depressive disorder. We cannot rule out

the possibility that the intriguing, specific association observed with the heterozygous genotype might be a false-positive result.

While our results suggest that the C825T polymorphism of GNB3 is unlikely to be involved in substance dependence, they also underscore previous studies indicating this locus as a candidate for major depressive disorder.

Acknowledgements

We thank the Hospital Espírita de Porto Alegre for allowing the data collection to occur. The sample collection of patients with alcohol dependence was obtained with the help of Alessandra Spode, Alexandra C. Ponso, Carlos E.D. Garcia, Evenise P. Elias and Fabiana T. Costa. Verônica Contini and Maria Paula Quiroga helped in the laboratory procedures. This research was supported by CNPq, FAPERGS and PRONEX.

References

- American Psychiatric Association (2000) Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition, Text Revision. American Psychiatric Association, Washington D.C., 880 pp
- Beige J, Hohenbleicher H, Distler A, Sharma AM (1999) G-Protein b3 subunit C825T variant and ambulatory blood pressure in essential hypertension. *Hypertension* 33: 1049-1051
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2002) Biochemistry. Fifth edition. W.H. Freeman and Company, New York and Basingstoke, 1059 pp
- Bucholz KK, Cadoret R, Cloninger CR, Dinwiddie SH, Hesselbrock VM, Numberger JI, Reich T, Schmidt I, Schuckit MA (1994) A new, semistructured psychiatric interview for use in genetic linkage studies: a report of the reliability of SSAGA. *J Stud Alcohol* 55: 149-158
- Dong Y, Zhu H, Sagnella GA, Carter ND, Cook DG, Cappuccio FP (1999) Association between the C825T polymorphism of the G protein b3-subunit gene and hypertension in blacks. *Hypertension* 34: 1193-1196
- Downes GB, Gautam N (1999) The G protein subunit gene families. *Genomics* 62: 544-552
- Exton MS, Artz M, Siffert W, Schedlowski M (2003) G protein beta3 subunit 825T allele is associated with depression in young, healthy subjects. *Neuroreport* 14: 531-533
- Kiyatkin EA (1995) Functional significance of mesolimbic dopamine. *Neurosci Biobehav Rev* 19: 573-598

- Koob GF (2003) Neuroadaptive mechanisms of addiction: studies on the extended amygdale. *Eur Neuropsychopharmacol* 13: 442-52
- Kunugi H, Kato T, Fukuda R, Tatsumi M, Sakai T, Nando S (2002) Association study of C825T polymorphism of the G-protein β_3 subunit gene with schizophrenia and mood disorders. *J Neural Transm* 109: 213-218
- Lahiri DK, Nurnberger JI Jr. (1991) A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 19: 5444
- Lee HJ, Cha JH, Ham BJ, Han CS, Kim YK, Lee SH, Ryu SH, Kang RH, Choi MJ, Lee MS (2004) Association between a G-protein beta 3 subunit gene polymorphism and the symptomatology and treatment responses of major depressive disorders. *Pharmacogenomics J* 4: 29-33
- Lee HJ, Sung SM, Han CS, Kim YK, Kim SH, Lee MS, Joe SH, Jung IK and Kim L (2005) G-Protein β_3 Subunit C825T Polymorphism Tends to Be Associated with Seasonal Variation in Young Male College Students. *Neuropsychobiology* 52: 135-139
- Levine MA, Smallwood PM, Moen PT Jr, Helman LJ, Ahn TG (1990) Molecular cloning of beta 3 subunit, a third form of the G protein beta-subunit polypeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 2329-2333
- Lin CN, Tsai SJ, Hong CJ (2001) Association analysis of a functional G Protein beta3 subunit gene polymorphism (C825T) in mood disorders. *Neuropsychobiology* 44: 118-121
- Marsden CA (2006) Dopamine: the rewarding years. *Br J Pharmacol* 147: S136-S144

- Mattevi VS, Zembruzski V, Hutz MH (2006) Impact of variation in ADRB2, ADRB3, and GNB3 genes in body mass index and waist circumference in a Brazilian population. *Am J Hum Biol* 18: 182-186
- Mayhew KP, Flay BR, Mott JA (2000) Stages in the development of adolescent smoking. *Drug Alcohol Depend* 59: 61-81
- Roskopf D, Busch S, Manthey I, Siffert W (2000) G protein beta 3 gene: structure, promoter, and additional polymorphisms. *Hypertension* 36: 33-41
- Sadock BJ, Sadock VA (2003) Kaplan & Sadock's Synopsis of Psychiatry: Behavioral Sciences, Clinical Psychiatry. 9^a. ed.. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 1460 pp
- Schunkert H, Hense HW, Döring A, Riegger GA, Siffert W (1998) Association between a polymorphism in the G protein beta3 subunit gene and lower renin and elevated diastolic blood pressure levels. *Hypertension* 32: 510-513
- Siffert W (2005) G protein polymorphisms in hypertension, atherosclerosis, and diabetes. *Annu Rev Med* 56: 17-28
- Siffert W, Roskopf D, Moritz A, Wieland T, Kaldenberg-Stasch S, Kettler N, Hartung K, Beckmann S, Jakobs KH (1995) Enhanced G protein activation in immortalized lymphoblasts from patients with essential hypertension. *J Clin Invest* 96: 759-766
- Siffert W, Roskopf D, Siffert G, Busch S, Moritz A, Erbel R, Sharma AM, Ritz E, Wichmann HE, Jakobs KH, Horsthemke B (1998) Association of a human G-protein beta3 subunit variant with hypertension. *Nat Genet* 18: 45-48
- Siffert W, Forster P, Jöchel K, Mvere DA, Brinkmann B, Naber C, Crookes R, Heyns AP, Epplen JT, Fridey J, Freedman BI, Müller N, Stolke D, Sharma AM,

- Motaery K, Grosse-Wilde H, Buerbaum B, Ehrlich T, Ahmad HR, Horsthemke B, Toit ED, Tiilikainen A, Ge J, Wang Y, Yang D, Hüsing J, Rosskopf D (1999) Worldwide ethnic distribution of the G protein beta3 subunit 825T allele and its association with obesity in Caucasian, Chinese, and black African individuals. *J Am Soc Nephrol* 10: 1921–1930
- Snyder EE, Walts B, Pérusse L, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Rankinen T, Bouchard C (2004) The human obesity gene map: the 2003 update. *Obes Res* 12: 369-439
- Stahl SM (2000) *Essential Psychopharmacology – Neuroscientific Basis and Pratical Applications*. Second Edition. Cambridge University Press, Cambridge, 617 pp
- Wellman RJ, DiFranza JR, Savageau JA, Dussault GF (2004) Short term patterns of early smoking acquisition. *Tob Control* 13: 251-257
- Willeit M, Praschak-Rieder N, Zill P, Neumeister A, Ackenheil M, Kasper S, Bondy B (2003) C825T polymorphism in the G protein beta3-subunit gene is associated with seasonal affective disorder. *Biol Psychiatry* 54: 682-686
- Yamamoto T, Takada K (2000) Role of cannabinoid receptor in the brain as it relates to drug reward. *Jpn J Pharmacol* 84: 229-236
- Zastawny RL, George SR, Nguyen T, Cheng R, Tsatsos J, Briones-Urbina R, O'Dowd BF (1994) Cloning, characterization and distribution of a mu-opioid receptor in rat brain. *J Neurochem* 62: 2099-2105
- Zill P, Baghai TC, Zwanzger P, Schule C, Minov C, Riedel M, Neumeier K, Rupprecht R, Bondy B (2000) Evidence for an association between a G-Protein beta3-gene variant with depression an response to antidepressant treatment. *Neuroreport* 11: 1893-1897

Table 1: Genotype and allele frequencies of the C825T polymorphism among subjects with alcohol and nicotine dependence, nicotine dependence only and non-dependent controls

	alcohol and nicotine dependence (n = 109)	nicotine dependence only (n = 117)	Controls (n = 108)
Genotypes			
CC	40 (36.7 %)	46 (39.3 %)	48 (44.4 %)
CT	57 (52.3 %)	57 (48.7 %)	46 (42.6 %)
TT	12 (11.0 %)	14 (12.0 %)	14 (13.0 %)
Alleles			
C	137 (62.8 %)	149 (63.7 %)	142 (65.7 %)
T	81 (37.2 %)	85 (36.3 %)	74 (34.3 %)

Genotypes:

CC x CT x TT: $\chi^2 = 2.10$; gl= 4; p= 0.72

CC x CT + TT: $\chi^2 = 1.40$; gl= 2; p= 0.50

Alleles:

C x T: $\chi^2 = 0.42$; gl = 2 ; p = 0.81

Table 2: Genotype and allele frequencies of the C825T polymorphism and major depressive disorder in subjects with alcohol dependence

	Major Depressive Disorder	
	No (n = 79)	Yes (n = 44)
Genotypes		
CC	33 (41,8 %)	11 (25,0 %)
CT	33 (41,8 %)	32 (72,7 %)
TT	13 (16,4 %)	1 (2,3 %)
Alleles		
C	99 (62,7 %)	54 (61,4 %)
T	59 (37,3 %)	34 (38,6 %)

Genotypes:

CC x CT x TT: $\chi^2= 12.34$; gl= 2 ; p= 0.002

CC x CT + TT: $\chi^2= 2.77$; gl= 1 ; p= 0.096

Alleles:

C x T: $\chi^2= 0.004$; gl= 1 ; p= 0.95

5 DISCUSSÃO

Os artigos que compõem a presente dissertação contam com uma discussão mais específica para os achados envolvendo cada um dos genes estudados. Nesse momento, será realizada uma discussão mais ampla, integrando os achados referentes aos dois genes. É preciso ter em mente que a mesma amostra de pacientes com dependência de álcool já foi estudada quanto a vários polimorfismos em outros genes, parte deles com resultados positivos para associações com as dependências ou fenótipos relacionados. Os polimorfismos estudados incluem os localizados nos genes DRD2, DRD4, DAT1, DBH, 5-HTT e MAOA (Bau e cols., 1999, 2000, 2001; Freire e cols., 2005, 2006; Contini e cols., no prelo; Marques e cols., no prelo). De maneira geral, os resultados positivos obtidos nos artigos mencionados são coerentes com a literatura prévia na área, dando suporte para um significado biológico compatível entre a presente amostra e aquelas obtidas em outras partes do mundo.

O presente trabalho apresenta dois achados principais. O primeiro se refere à associação entre o alelo G do polimorfismo C-1291G do gene ADRA2A com a dependência de nicotina. O segundo, com evidências menos seguras, sugere uma associação entre o genótipo heterozigoto para o polimorfismo C825T do gene GNB3 com o transtorno depressivo maior entre pacientes com dependência de álcool. Vale destacar que em ambos os casos as associações observadas estavam incluídas nas hipóteses estabelecidas *a priori*, tanto do ponto de vista dos fenótipos envolvidos como também dos alelos dos polimorfismos

implicados. Tratam-se, assim, de resultados que merecem ser considerados à luz da literatura pré-existente e futura nos tópicos abordados.

Por outro lado, algumas das hipóteses estabelecidas antes do trabalho, e descritas no capítulo introdutório da dissertação, não puderam ser confirmadas. São elas a falta de associação entre o polimorfismo C-1291G do gene ADRA2A com transtorno depressivo maior e sintomas de abstinência de álcool, e a inexistência de associação entre o GNB3 e as dependências. Tendo em conta a grande similaridade das freqüências alélicas e genótípicas entre os grupos comparados, é pouco provável que o aumento do tamanho amostral pudesse modificar os resultados obtidos.

O achado mais consistente do presente trabalho (associação entre o polimorfismo C-1291G do gene ADRA2A com a dependência de nicotina) era também o mais plausível tendo em conta a literatura disponível. Esse polimorfismo já havia sido implicado no TDAH, condição que predispõe às dependências de substâncias (Biederman e cols., 2006a). O vínculo entre o sistema noradrenérgico e o tabagismo também é sugerido pelo fato de que a nortriptilina (medicamento com atividade predominantemente noradrenérgica) é eficaz no tratamento do tabagismo (Foulds e cols., 2004). Além disso, os agonistas α_2 -adrenérgicos clonidina and guanfacina são eficazes na redução dos sintomas de abstinência da nicotina nicotine (Gourlay e cols., 2004).

A ocorrência conjunta de alcoolismo e tabagismo é muito freqüente. Estima-se que 80% dos alcoolistas fumem regularmente (Daepfen e cols., 2000). Além disso, alcoolistas dependentes de nicotina apresentam maior gravidade da dependência de álcool do que alcoolistas não fumantes (Daepfen e cols., 2000).

O hábito de fumar mostrou-se um fator de risco para a progressão dos sintomas de alcoolismo (True e cols., 1999), o que pode ocorrer pela diminuição dos efeitos do etanol (Madden e cols., 1995), enquanto a dependência de álcool revelou-se associada com uma síndrome de abstinência de nicotina mais acentuada (Madden e cols., 1997).

Com os dados obtidos no estudo de associação envolvendo o gene ADRA2A, não é possível afirmar se o alelo G também estaria associado à dependência de álcool em pacientes sem dependência de nicotina. O teste dessa hipótese dependeria de uma amostra de dependentes de álcool não tabagistas, não disponível em nosso laboratório. Há dados que sugerem que a dependência de nicotina seja um fator de risco para a dependência de álcool (Biederman e cols., 2006b). É interessante destacar que a mesma dúvida persiste quanto a outra associação observada pelo nosso grupo (Bau e cols., 2000; Freire e cols., 2006) entre o alelo TaqIA1 do gene DRD2 e as dependências de álcool e nicotina. Infelizmente, como já foi mencionado, é difícil a obtenção de um grande tamanho amostral de pacientes com dependência de álcool porém não tabagistas.

Alguns estudos com gêmeos já haviam sugerido que fatores genéticos influenciam não apenas as suscetibilidades ao abuso do álcool e do tabaco separadamente, mas também à dependência das duas substâncias ao mesmo tempo (Swan e cols., 1997; True e cols., 1999; Hopfer e cols., 2001). O conjunto de resultados sobre a progressão das dependências estimula a realização de mais estudos visando à caracterização de um perfil genético e fenotípico dos indivíduos com tabagismo sob alto risco de desenvolvimento de dependência de álcool e/ou outras drogas.

Ao contrário da nossa hipótese prévia, o gene GNB3 não se mostrou associado com as dependências estudadas. Vale ressaltar, no entanto, que a maior parte das hipóteses plausíveis não se confirmam nos estudos genéticos de associação. Isso porque a enorme complexidade tanto do genoma humano como também da fisiologia e bioquímica cerebrais tornam possível a existência de muitos mecanismos fisiopatológicos alternativos, possivelmente mais importantes do que aquele da hipótese sugerida. Também não é possível descartar, em princípio, que a falta de associação se deva à insuficiência do tamanho amostral. No entanto, o fato de que as frequências alélicas e genóticas foram muito semelhantes nos grupos estudados sugere que dificilmente o aumento do n pudesse tornar as associações positivas.

Por outro lado, a associação entre o genótipo heterozigoto para o polimorfismo C825T do gene GNB3 e o transtorno depressivo maior é compatível com publicações prévias (Willeit e cols., 2003; Lee e cols., 2004). No entanto, o fato de que a associação ocorre exclusivamente para os heterozigotos demanda cautela na interpretação. Não é possível descartar a possibilidade de que a homozigose para o alelo T esteja associada a uma forma mais grave de depressão não representada na presente amostra de pacientes com dependência de álcool. Essa hipótese deve ser estudada em amostras envolvendo pacientes com transtorno depressivo maior associado ou não a dependências de substâncias.

Os estudos de associação entre casos e controles têm como um de seus principais desafios o correto pareamento quanto à composição étnica da amostra. Isso é necessário para evitar o risco de viés de confusão devido à eventual

estratificação populacional, a qual pode gerar resultados tanto falso-positivos quanto falso-negativos (Colhoun e cols., 2003). No nosso estudo, tal problema foi minimizado pelo pareamento cuidadoso entre controles e pacientes quanto à etnia. Ainda que não tenhamos estudado marcadores genéticos para confirmar essa similaridade, estudos na mesma população não puderam demonstrar uma estratificação populacional significativa em Porto Alegre (Zembrzuski e cols., no prelo). Apesar dessa limitação, os estudos de associação também apresentam vantagens quando comparados a outros métodos. O poder estatístico é substancialmente maior do que os métodos de ligação e associação baseados em famílias (Cardon e Bell, 2001). Além disso, no caso dos transtornos psiquiátricos em adultos, especialmente as dependências de substâncias, é relativamente difícil obter-se a colaboração e participação de familiares em projetos de pesquisa.

Os transtornos por uso de substâncias apresentam etiologia multifatorial. Como ocorre na maioria dos transtornos mentais, a contribuição genética se dá pela participação de vários genes com pequeno efeito, produzindo diferentes graus de vulnerabilidade ao transtorno (Strachan e Read, 2004). Uma perspectiva existente é o estudo das interações entre diferentes genes. Por exemplo, variações na proteína G poderiam potencializar o efeito de polimorfismos em genes de receptores dopaminérgicos, inclusive aqueles já estudados pelo nosso grupo de pesquisa. Evidentemente, essas abordagens demandam, em primeiro lugar, que os polimorfismos incluídos nos modelos de interação tenham evidências sólidas de funcionalidade e influência no transtorno, consenso que ainda não foi alcançado. Além disso, é necessário um tamanho amostral

substancialmente maior do que no caso das associações pesquisadas individualmente.

Embora existam evidências a favor de uma contribuição genética para os transtornos por uso de álcool e nicotina, fatores ambientais também devem ser considerados. Pretendemos avaliar em estudos subseqüentes possíveis associações ou interações envolvendo os genes aqui descritos e as características relacionadas com o ambiente disponíveis no banco de dados.

Estudos de farmacogenômica poderão ser úteis para a identificação de alelos indicativos de uma melhor resposta a determinados tratamentos. Por exemplo, existem evidências de que o alelo T do polimorfismo C825T do GNB3 esteja relacionado com melhor resposta ao tratamento de pacientes com depressão (Lee e cols., 2004) e predição de sucesso na redução de peso com uso de sibutramina em pacientes com obesidade (Hauner e cols., 2003). Muito tempo e esforço ainda terá de ser dispensado para abordar o efeito de tantos polimorfismos genéticos na resposta terapêutica às dependências. Vale destacar que, de maneira geral, o conhecimento existente sobre a heterogeneidade clínica não tem favorecido uma abordagem terapêutica muito mais específica e eficaz para cada paciente (Cutler e Fishbain, 2005). Essa complexidade faz com que a expectativa gerada pelos estudos genéticos seja ainda maior. Espera-se também que, no futuro, os transtornos mentais possam ser melhor classificados, tendo em conta dados derivados de estudos moleculares e de farmacogenômica (Greenber, 2001). O volume crescente de informações provenientes das investigações sobre a heterogeneidade clínica e genética tem aberto novas hipóteses de investigação,

as quais muito provavelmente resultarão em uma medicina mais efetiva e personalizada.

REFERÊNCIAS

- Altman JD, Trendelenburg AU, MacMillan L, Bernstein D, Limbird L Starke K, Kobilka BK, Hein L (1999) Abnormal regulation of the sympathetic nervous system in α_2A -adrenergic receptor knockout mice. *Mol Pharmacol* 56: 154–161.
- American Psychiatric Association (1994) *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition*. American Psychiatric Association, Washington D.C., 886 pp.
- American Psychiatric Association (2000) *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition, Text Revision*. American Psychiatric Association, Washington D.C., 880 pp.
- Batra V, Patkar AA, Berrettini WH, Weinstein SP, Leone FT (2003) The genetic determinants of smoking. *Chest* 123: 1730-1739.
- Bau CHD, Almeida S, Costa FT, Garcia CED, Elias EP, Ponso AC, Spode A, Hutz MH (2001) DRD4 and DAT1 as modifying genes in alcoholism: interaction with novelty seeking on level of alcohol consumption. *Mol Psychiatry* 6: 7-8.
- Bau CHD, Almeida S, Hutz MH (2000) The taqI A1 allele of the dopamine D2 receptor gene and alcoholism in Brazil: association and interaction with stress and harm avoidance on severity prediction. *Am J Med Genet* 96: 302-306.
- Bau CHD, Roman T, Almeida S, Hutz MH (1999) Dopamine D4 receptor gene and personality dimensions in Brazilian male alcoholics. *Psychiatr Genet* 9: 139-143.
- Beige J, Hohenbleicher H, Distler A, Sharma AM (1999) G-protein β_3 subunit C825T variant and ambulatory blood pressure in essential hypertension. *Hypertension* 33: 1049-1051.
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2002) *Biochemistry*. Fifth edition. W.H. Freeman and Company, New York and Basingstoke, 1059 pp.

- Best D, Rawaf S, Rowley J, Floyd K, Manning V, Strang J (2001) Ethnic and gender differences in drinking and smoking among London adolescents. *Ethn Health* 6: 51-57.
- Biederman J, Monuteaux MC, Mick E, Spencer T, Wilens TE, Silva JM, Snyder LE, Faraone SV (2006a) Young adult outcome of attention deficit hyperactivity disorder: a controlled 10-year follow-up study. *Psychol Med* 36: 167-179.
- Biederman J, Monuteaux MC, Mick E, Wilens TE, Fontanella JA, Poetzi KM, Kirk T, Masse J, Faraone SV (2006b) Is cigarette smoking a gateway to alcohol and illicit drug use disorders? A study of youths with and without Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *Biol Psychiatry* 59: 258-264.
- Bierut LJ, Dinwiddie SH, Begleiter H, Crowe RR, Hesselbrock V, Nurnberger JI, Porjesz B, Schuckit MA, Reich T (1998) Familial transmission of substance dependence: alcohol, marijuana, cocaine, and habitual smoking: a report from the Collaborative Study on the Genetics of Alcoholism. *Arch Gen Psychiatry* 55: 982-988.
- Bierut LJ, Rice JP, Edenberg HJ, Goate A, Foroud T, Cloninger CR, Begleiter H, Conneally PM, Crowe RR, Hesselbrock V, Li TK, Nurnberger JI Jr, Porjesz B, Schuckit MA, Reich T (2000) Family-based study of the association of the dopamine D2 receptor gene (DRD2) with habitual smoking. *Am J Med Genet* 90: 299–302.
- Bloomfield K, Stockwell T, Gmel G, Rehn N (2003) International comparisons of alcohol consumption. *Alcohol Res Health* 27: 95-109.
- Blum K, Noble E, Sharidan P, Montgomery A, Ritchie T, Cohon J (1990) Allelic association of human dopamine D2 receptor gene and alcoholism. *JAMA* 263: 2055-2060.
- Bohman M (1978) Some genetic aspects of alcoholism and criminality. *Arch Gen Psychiatry* 35: 269-276.
- Bolos AM, Dean M, Lueas-Derse S, Ramsburg M, Brown GL, Goldman D (1990) Population and pedigree studies reveal a lack of association between the dopamine D2 receptor and alcoholism. *JAMA* 264: 3156-3160.

- Breslau N, Johnson EO, Hiripi E, Kessler R (2001) Nicotine dependence in the United States: prevalence, trends, and smoking persistence. *Arch Gen Psychiatry*. 58: 810-816.
- Bulfinch T (2001) *O Livro de Ouro da Mitologia - História de Deuses e Heróis*. Ediouro. 15ª edição. Rio de Janeiro. 418 pp.
- Cadoret R, Yates W, Troughton E, Woodworth G, Stewart M (1995) Adoption study demonstrating two genetic pathways to drug abuse. *Arch Gen Psychiatry* 52: 42-52.
- Cardon LR, Bell JI (2001) Association study designs for complex diseases. *Nat Rev Genet* 2: 91-99.
- Carlini EA, Galduróz JCF, Noto AR, Nappo SA (2002) I levantamento domiciliar sobre o uso de drogas no Brasil. Estudo envolvendo as 107 maiores cidades do país - 2001. Secretaria Nacional Antidrogas (SENAD) e Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID). Cromosste Gráficz e Editora, São Paulo.
- Carmelli D, Swan GE, Robinette D, Fabsitz R (1992) Genetic influence on smoking--a study of male twins. *New Eng J Med* 327: 829-833.
- Carter A, Bardin C, Collins R, Simons C, Bray P, Spiegel A (1987) Reduced expression of multiple forms of the α subunit of the stimulatory GTP-binding protein in pseudohypoparathyroidism type Ia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 7266-7269.
- Chandler LJ, Harris RA, Crews FT (1998) Ethanol tolerance and synaptic plasticity. *Trends Pharmacol Sci* 19: 491-495.
- Cloninger CR, Bohman M, Sigvardsson S (1981) Inheritance of alcohol abuse: cross fostering analysis of adopted men. *Arch Gen Psychiatry* 38: 861-868.
- Colhoun HM, McKeigue PM, Davey Smith G (2003) Problems of reporting genetic associations with complex outcomes. *Lancet* 361: 865-872.

- Comings D, Wu S, Dietz G, Muhleman D (1996) Polygenic inheritance of Tourette syndrome, stuttering, attention deficit hyperactivity, conduct, and oppositional defiant disorder. *Am J Med Genet* 67: 264-288.
- Comings DE, Johnson JP, Gonzalez NS, Huss M, Saucier G, McGue M, MacMurray J (2000) Association between the adrenergic alpha 2A receptor gene (ADRA2A) and measures of irritability, hostility, impulsivity and memory in normal subjects. *Psychiatr Genet* 10: 39-42.
- Contini V, Marques FZC, Garcia CED, Hutz MH, Bau CHD (no prelo) The MAOA-uVNTR Polymorphism in a Brazilian sample: further support for the association with impulsive behaviors and alcohol dependence. *Am J Med Genet*.
- Crabbe JC, Phillips TJ, Buck KJ, Cunningham CL, Belknap JK (1999) Identifying genes for alcohol and drug sensitivity: recent progress and future directions. *Trends Neurosci* 22: 173-179.
- Cutler RB, Fishbain DA (2005) Are alcoholism treatments effective? The Project MATCH data. *BMC Public Health* 14: 5-75.
- Daepfen JB, Smith TL, Danko GP, Gordon L, Landi NA, Nurnberger JI Jr, Bucholz KK, Raimo E, Schuckit MA (2000) Clinical correlates of cigarette smoking and nicotine dependence in alcohol-dependent men and women. The Collaborative Study Group on the Genetics of Alcoholism. *Alcohol Alcohol* 35: 171-175.
- Dani JA, Harris RA (2005) Nicotine addiction and comorbidity with alcohol abuse and mental illness. *Nat Neurosci* 8: 1465-1470.
- Dong Y, Zhu H, Sagnella GA, Carter ND, Cook DG, Cappuccio FP (1999) Association between the C825T polymorphism of the G protein b3-subunit gene and hypertension in blacks. *Hypertension* 34: 1193-1196.
- Downes GB, Gautam N (1999) The G protein subunit gene families. *Genomics* 62: 544-552.
- Edwards G, Lader M (1994) *A Natureza da Dependência de Drogas*. Artes Médicas, Porto Alegre, 285 pp.

- Erwin WE, Williams DB, Speir WA (1998) Delirium tremens. *South Med J* 91: 425-431.
- Esch T, Stefano GB (2004) The neurobiology of pleasure, reward processes, addiction and their health implications. *Neuro Endocrinol Lett.* 25: 235-251.
- Feng J, Sobell JL, Heston LL, Goldman D, Cook E Jr, Kranzler HR, Gelernter J, Sommer SS (1998) Variants in the alpha2A AR adrenergic receptor gene in psychiatric patients. *Am J Med Genet* 81: 405-410.
- Fleming M, Mihic SJ, Harris RA (2001) Ethanol. In: Hardman JG, Limbird ,Gilman AG (eds) *Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics.* 10nd ed. McGraw-Hill, New York, 2148 pp.
- Freire MT, Hutz MH, Bau CH (2005) The DBH -1021 C/T polymorphism is not associated with alcoholism but possibly with patients' exposure to life events. *J Neural Transm* 112: 1269-1274.
- Freire MT, Marques FZ, Hutz MH, Bau CH (2006) Polymorphisms in the DBH and DRD2 gene regions and smoking behavior. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* [Epub ahead of print]
- Galvan FH, Caetano R (2003) Alcohol use and related problems among ethnic minorities in the United States. *Alcohol Res Health* 27: 87-94.
- Garenc C, Pérusse L, Chagnon YC, Gagnon TRJ, Borecki IB, Leon AS, Skinner JS, Wilmore JH, Rao DC, Bouchard C (2002) The alpha2-adrenergic receptor gene and body fat content and distribution: the HERITAGE family study. *Mol Med* 8: 88–94.
- Gelernter J, O'Malley S, Risch N, Kranzler H, Krystal J, Merikangas K, Kennedy J , Kidd K (1991) No associatian between na allele at the D2 dopamine receptor gene (DRD2) and alcoholism. *JAMA* 266: 1801-1807.
- Goodwin DW, Schulsinger F, Hermansen L, Guze SB, Winokur G (1973) Alcohol problems in adoptees raised apart from alcoholic biological parents. *Arch Gen Psychiatry* 28: 238-243.

- Gourlay SG, Stead LF, Benowitz NL (2004) Clonidine for smoking cessation. *Cochrane Database Syst Rev* 3: CD000058
- Graeff FG, Brandão ML (1993) *Neurobiologia das Doenças Mentais*. Lemos, São Paulo, 184 pp.
- Grant BF, Dawson DA, Stinson FS, Chou SP, Dufour MC, Pickering RP (2004a) The 12-month prevalence and trends in DSM-IV alcohol abuse and dependence: United States, 1991-1992 and 2001-2002. *Drug Alcohol Depend* 74: 223-234.
- Grant BF, Hasin DS, Chou SP, Stinson FS, Dawson DA (2004b) Nicotine dependence and psychiatric disorders in the United States: results from the national epidemiologic survey on alcohol and related conditions. *Arch Gen Psychiatry*. 61: 1107-1115.
- Greenberg SA (2001) DNA microarray gene expression analysis technology and its application to neurological disorders. *Neurology* 57: 755-761.
- Hauner H, Meier M, Jöckel KH, Frey UH, Siffert W (2003) Prediction of successful weight reduction under sibutramine therapy through genotyping of the G-protein β_3 subunit gene (GNB3) C825T polymorphism. *Pharmacogenetics*, 13: 453–459.
- Henningfield J, Seffrin J, Zatonski W (2004) *Tobacco: Science, Policy and Public Health*. Oxford University Press, 830 pp.
- Hoffman BB (2001) Catecholamines, sympathomimetic drugs, and adrenergic receptor antagonists. In: Hardman JG, Limbird, Gilman AG (eds) *Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics*. 10nd ed. McGraw-Hill, New York, 2148 pp.
- Hopfer CJ, Stallings MC, Hewitt JK (2001) Common genetic and environmental vulnerability for alcohol and tobacco use in a volunteer sample of older female twins. *J Stud Alcohol* 62: 717-723.
- Hrubec Z, Omenn GS (1981) Evidence of genetic predisposition to alcoholic cirrhosis and psychosis: twin concordances for alcoholism and its biological and points by zygosity among male veterans. *Alcohol Clin Exp Res* 5: 207-215.

- Hu G, Querimit LA, Downing LA, Charness ME (1993) Ethanol differentially increases alpha 2-adrenergic and muscarinic acetylcholine receptor gene expression in NG108-15 cells. *J Biol Chem* 268: 23441-23447.
- Hughes JR, Stead LF, Lancaster T (2005) Nortriptyline for smoking cessation: a review. *Nicotine Tob Res* 7: 491-499.
- Jain R, Mukherjee K (2003) Biological Basis of Nicotine Addiction. *Indian Journal of Pharmacology* 35: 281-289.
- Kendler I, Prescott C (1998) Cocaine use, abuse and dependence in a population based sample of female twins. *Br J Psychiatry* 113: 345-50.
- Kessler R (1995) Epidemiology of psychiatric comorbidity. In: Tsuang M, Tohen M, Zahner G (eds) *Textbook in Psychiatric Epidemiology*. Wiley-Liss, New York, 736 pp.
- Kiyatkin EA (1995) Functional significance of mesolimbic dopamine. *Neurosci Biobehav Rev* 19: 573-598.
- Koskenvuo M, Langinvainio H, Kaprio J, Lonnqvist J, Tienari P (1984) Psychiatric hospitalisation in twins. *Acta Genet Med Gemellol* 33: 321-332.
- Kosten TR, O'Connor PG (2003) Management of drug and alcohol withdrawal. *N Engl J Med* 348: 1786-1795.
- Kottler M, Cohen H, Segman R, Gritsenko I, Nemanov L, Lerer B, Kramer I, Zer-Zion M, Kletz I, Ebstein R (1997) Excess dopamine D4 receptor (DRD4) exon III seven repeat allele in opioid-dependent subjects. *Mol Psychiatry* 2: 251-254.
- Kunugi H, Kato T, Fukuda R, Tatsumi M, Sakai T, Nanko S (2002) Association study of C825T polymorphism of the G-protein β_3 subunit gene with schizophrenia and mood disorders. *J Neural Transm* 109: 213-218.
- Lahiri DK and Nurnberger JI Jr.. 1991. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res.* 19: 5444.

- Lario S, Callls J, Cases A, Oriola J, Torra A, Rivera F (1997) MspI identifies a biallelic polymorphism in the promoter region of the alpha 2A-adrenergic receptor gene. *Clin Genet* 51: 129-130.
- Lee HJ, Cha JH, Ham BJ, Han CS, Kim YK, Lee SH, Ryu SH, Kang RH, Choi MJ, Lee MS (2004) Association between a G-protein beta3 subunit gene polymorphism and the symptomatology and treatment responses of major depressive disorders. *Pharmacogenomics J* 4: 29-33.
- Lefkowitz RJ (2000) The superfamily of heptahelical receptors. *Nat Cell Biol* 2: E133-E136.
- Li MD (2003) The genetics of smoking related behavior: a brief review. *Am J Med Sci*. 326: 168-173.
- Lin CN, Tsai SJ, Hong CJ (2001) Association analysis of a functional G Protein beta3 subunit gene polymorphism (C825T) in mood disorders. *Neuropsychobiology* 44: 118-121.
- Luciano M, Zhu G, Kirk KM, Whitfield JB, Butler R, Heath AC, Madden PA, Martin NG (2004) Effects of dopamine receptor D4 variation on alcohol and tobacco use and on novelty seeking: multivariate linkage and association analysis. *Am J Med Genet* 124: 113–123.
- Madden PA, Bucholz KK, Dinwiddie SH, Slutske WS, Bierut LJ, Statham DJ, Dunne MP, Martin NG, Heath AC (1997) Nicotine withdrawal in women. *Addiction* 57: 69-78.
- Madden PA, Heath AC, Starmer GA, Whitfield JB, Martin NG (1995) Alcohol sensitivity and smoking history in men and women. *Alcohol Clin Exp Res* 19: 1111-1120.
- Marques FZC, Garcia CED, Hutz MH, Bau CHD (no prelo) The influence of the serotonin transporter gene on comorbid disorders among alcoholics. *Psychiatr Genet*.

- Mattevi VS, Zembruzski V, Hutz MH (2006) Impact of variation in ADRB2, ADRB3, and GNB3 genes in body mass index and waist circumference in a Brazilian population. *Am J Hum Biol* 18: 182-186.
- Meloni JN, Laranjeira R (2004) The social and health burden of alcohol abuse. *Rev Bras Psiquiatr* 26: S7-S10.
- Messas GP, Vallada Filho HP (2004) The role of genetics in alcohol dependence. *Rev Bras Psiquiatr* 26: S54-S58.
- Ministério da Saúde (2003) Inquérito Domiciliar sobre Comportamentos de Risco e Morbidade Referida de Doenças e Agravos não Transmissíveis. Brasil, 15 capitais e Distrito Federal 2002-2003. Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro, 30 pp.
- Moyer DB (2005) *The Tobacco Book: A Reference Guide of Facts, Figures, and Quotations About Tobacco*. Sunstone Press. Santa Fe, 494 pp.
- Murray S (2006) A smouldering epidemic. *CMAJ*. 174: 309-310.
- Noble E (1998a) The D2 dopamine receptor gene: a review of association studies in alcoholism and phenotypes. *Alcohol* 16: 33-45.
- Noble E, Gottschalk L, Fallon J, Ritchie T, Wu J (1991) D2 dopamine receptor polymorphism and brain regional glucose metabolism. *Am J Med Genet* 74: 162-166.
- Noble E, Zhang X, Ritche T, Lawford B, Grosser S, Young R, Sparkes R (1998b) D2 dopamine receptor and GABA(A) receptor beta3 subunit genes and alcoholism. *Psychiatr Res* 81: 133-147.
- Noble EP, St Jeor ST, Ritchie T, Syndulko K, St Jeor SC, Fitch RJ, Brunner RL, Sparkes RS (1994) D2 dopamine receptor gene and cigarette smoking: a reward gene? *Med Hypotheses* 42: 257-260.
- O'Brien CP (2001) Drug addiction and drug abuse. In: Hardman JG, Limbird, Gilman AG (eds) *Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics*. 10nd ed. McGraw-Hill, New York, 2148 pp.

- Parsian A, Chakraverty S, Fisher L, Cloninger C (1997) No association between polymorphisms in the human dopamine D3 and D4 receptors genes and alcoholism. *Am J Med Genet* 74: 281-285.
- Persson ML, Wasserman D, Geijer T, Jonsson EG, Terenius L (1997) Tyrosine hydroxylase allelic distribution in suicide attempters. *Psychiatry Res* 72: 73-80.
- Roman T, Bau CHD, Almeida S, Hutz MH (1999) Lack of association of the Dopamine D4 receptor gene with alcoholism in a Brazilian population. *Addict Biol* 4: 203-207.
- Roman T, Polanczyk GV, Zeni C, Genro JP, Rohde LA, Hutz M (2006) Further evidence of the involvement of alpha-2A-adrenergic receptor gene (ADRA2A) in inattentive dimensional scores of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry*. 11: 8-10.
- Roman T, Schmitz M, Polanczyk GV, Eizirik M, Rohde LA, Hutz M (2003) Is the α -2A adrenergic receptor gene (ADRA2A) associated with attention-deficit/hyperactivity disorder? *Am J Med Genet* 120B: 116-120.
- Roskopf D, Busch S, Manthey S, Siffert W (2000) G protein β 3 gene: structure, promoter, and additional polymorphisms. *Hypertension* 36: 33-41.
- Sadock BJ, Sadock VA (2003) Kaplan & Sadock's Synopsis of Psychiatry: Behavioral Sciences, Clinical Psychiatry. 9^a. ed.. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 1460 pp.
- Schatzberg AF, Cole JO, DeBattista C (1997) Manual of Clinical Psychopharmacology. 3. ed.. American Psychiatric Press, Washington DC, 477 pp.
- Schuckit M, Mazzanti C, Smith T, Ahmed U, Radel M, Iwata N, Goldman D (1999) Selective genotyping for the role of 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C}, and GABA α 6 receptors and the serotonin transporter in the level of response to alcohol: a pilot study. *Biol Psychiatry* 45: 647-651.

- Schunkert H, Hense HW, Döring A, Riegger GA, Siffert W (1998) Association between a polymorphism in the G protein beta3 subunit gene and lower renin and elevated diastolic blood pressure levels. *Hypertension* 32: 510-513
- Serretti A, Macciardi F, Verga M, Cusin C, Pedrini S, Smeraldi E (1998) Tyrosine hydroxylase gene associated with depressive symptomatology in mood disorder. *Am J Med Genet* 81: 127-130.
- Shields PG, Lerman C, Audrain J, Bowman ED, Main D, Boyd NR, Caporaso NE (1998) Dopamine D4 receptors and the risk of cigarette smoking in African-Americans and Caucasians. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 7: 453-458.
- Siffert W, Forster P, Jöchel K, Mvere DA, Brinkmann B, Naber C, Crookes R, Heyns AP, Epplen JT, Fridey J, Freedman BI, Müller N, Stolke D, Sharma AM, Motaery K, Grosse-Wilde H, Buerbaum B, Ehrlich T, Ahmad HR, Horsthemke B, Toit ED, Tiilikainen A, Ge J, Wang Y, Yang D, Hüsing J, Roszkopf D (1999) Worldwide Ethnic Distribution of the G Protein β 3 Subunit 825T Allele and Its Association with Obesity in Caucasian, Chinese, and Black African Individuals. *J Am Soc Nephrol* 10: 1921–1930.
- Siffert W, Roszkopf D, Siffert G, Busch S, Moritz A, Erbel R, Sharma AM, Ritz E, Wichmann HE, Jakobs KH, Horsthemke B (1998) Association of a human G-protein beta3 subunit variant with hypertension. *Nat Genet* 18: 45-48.
- Singleton AB, Thomson JH, Morris CM, Court JA, Lloyd S, Cholerton S (1998) Lack of association between the dopamine D2 receptor gene allele DRD2*A1 and cigarette smoking in a United Kingdom population. *Pharmacogenetics* 8: 125-128.
- Soibelman M, Luz Junior E, Von Diemen L (2004) Problemas relacionados ao consumo de álcool. In: Duncan BB, Schmidt MI and Giugliani ERJ *Medicina Ambulatorial: Conduas de Atenção Primária Baseadas em Evidências*. 3rd ed. Artmed, Porto Alegre, pp 539-550.

- Stahl SM (2000) *Essential Psychopharmacology – Neuroscientific Basis and Practical Applications*. Second Edition. Cambridge University Press, Cambridge, 617 pp.
- Strachan T, Read AP (2004) *Human Molecular Genetics – Third Edition*. Garland Science, New York, 576 pp.
- Sullivan PF, Kendler KS (1999) The genetic epidemiology of smoking. *Nicotine Tob Res* 1: S51-S57.
- Swan GE, Carmelli D, Cardon LR (1997) Heavy consumption of cigarettes, alcohol and coffee in male twins. *J Stud Alcohol* 58: 182-190.
- Tabakoff B, Hoffman PL (1996) Alcohol addiction: an enigma among us. *Neuron* 16: 909-912.
- Thome J, Weijers H, Wiesbeck G, Sian J, Nara K, Boning J, Riederer P (1999) Dopamine D3 receptor gene polymorphism and alcohol dependence: relation to personality rating. *Psychiatr Genet* 9: 17-21.
- True WR, Xian H, Scherrer JF, Madden PAF, Bucholz KK, Heath AC, Eisen SA, Lyons MJ, Goldberg J, Tsuang M (1999) Common genetic vulnerability for nicotine and alcohol dependence in men. *Arch Gen Psychiatry* 56: 655-661.
- Tyndale RF (2003) Genetics of alcohol and tobacco use in humans. *Ann Med* 35: 94-121.
- Van den Bree MB, Johnson EO, Neale MC, Pickens RW (1998) Genetic and environmental influences on drug use and abuse/dependence in male and female twins. *Drug Alcohol Depend* 52: 231-241.
- Vanyukov M, Moss H, Gioio A, Hughes H, Kaplan B, Tarter R (1998) An association between a microsatellite polymorphism at the DRD5 gene and the liability to substance abuse: pilot study. *Behav Genet* 28: 15-82.
- Vetulani J. (2001) Drug addiction. Part II. Neurobiology of addiction. *Pol J Pharmacol* 53: 303-317.
- Vilar L, Castelar E, Moura E, Leal E, Machado AC, Teixeira L e Campos R (2001) *Endocrinologia Clínica*. 2ª. edição. Medsi, Rio de Janeiro, 939 pp.

- Willeit M, Praschak-Rieder N, Zill P, Neumeister A, Ackenheil M, Kasper S, Bondy B (2003) C825T polymorphism in the G protein beta3-subunit gene is associated with seasonal affective disorder. *Biol Psychiatry* 54: 682-686.
- Wong-Riley MTT (2000) *Neuroscience Secrets*. Hanley & Belfus, Philadelphia, 508 pp.
- World Health Organization (1992) *The ICD-10 Classification of Mental and Behavioural Disorders: Clinical Descriptions and Diagnostic Guidelines*. World Health Organization, Geneva, 351 pp.
- Zembrzuski VM, Callegari-Jacques SM, Hutz MH (no prelo) Application of an African Ancestry Index as a Genomic Control approach in a Brazilian population. *Annals of Human Genetics*.
- Zill P, Baghai TC, Zwanzger P, Schule C, Minov C, Riedel M, Neumeier K, Rupprecht R, Bondy B (2000) Evidence for an association between a G-Protein beta3-gene variant with depression and response to antidepressant treatment. *Neuroreport* 11: 1893-1897.

ANEXO I: CRITÉRIOS DO DSM-IV-TR PARA DEPENDÊNCIA

Critérios para Dependência de Substância segundo o DSM-IV-TR

Um padrão maladaptativo de uso de substância, levando a comprometimento ou sofrimento clinicamente significativo, manifestado por três (ou mais) dos seguintes critérios, ocorrendo em qualquer momento no mesmo período de 12 meses:

(1) tolerância, definida por qualquer um dos seguintes aspectos:

(a) necessidade de quantidades progressivamente maiores da substância, para obter a intoxicação ou o efeito desejado

(b) acentuada redução do efeito com o uso continuado da mesma quantidade da substância,

(2) abstinência, manifestada por qualquer dos seguintes aspectos:

(a) síndrome de abstinência característica da substância (consultar os Critérios A e B dos conjuntos de critérios para Abstinência das substâncias específicas)

(b) a mesma substância (ou uma substância estreitamente relacionada) é consumida para aliviar ou evitar sintomas de abstinência

(3) A substância é freqüentemente consumida em maiores quantidades ou por um período mais longo do que o pretendido

(4) existe um desejo persistente ou esforços mal-sucedidos no sentido de reduzir ou controlar o uso da substância

(5) muito tempo é gasto em atividades necessárias para a obtenção da substância (por exemplo, consultas a vários médicos ou longas viagens de automóvel), na utilização da substância (por exemplo, fumar em grupo) ou na recuperação de seus efeitos

(6) importantes atividades sociais, ocupacionais ou recreativas são abandonadas ou reduzidas em virtude do uso da substância

(7) o uso da substância continua, apesar da consciência de ter um problema físico ou psicológico persistente ou recorrente que tende a ser causado ou exacerbado pela substância (por exemplo, uso atual de cocaína, embora o indivíduo a reconheça como indutora da sua depressão, ou consumo continuado de bebidas alcoólicas, embora o indivíduo reconheça que uma úlcera piorou devido ao consumo do álcool)

Especificar se:

Com Dependência Fisiológica: evidências de tolerância ou abstinência (isto é, presença de item 1 ou 2)

Sem Dependência Fisiológica: não existem evidências de tolerância ou abstinência (isto é, nem item 1 nem item 2 estão presentes)

Especificadores de curso:

Remissão Completa Inicial

Remissão Parcial Inicial

Remissão Completa Mantida

Remissão Parcial Mantida

Em Terapia com Agonista

Em Ambiente Protegido

ANEXO 2: CRITÉRIOS DA CID-10 PARA DEPENDÊNCIA

Diretrizes diagnósticas para Síndrome de Dependência segundo a CID-10

Um diagnóstico definitivo de dependência deve usualmente ser feito somente se três ou mais dos seguintes requisitos tenham sido experienciados ou exibidos em algum momento durante o ano anterior:

- (a)** um forte desejo ou senso de compulsão para consumir a substância;
- (b)** dificuldades em controlar o comportamento de consumir a substância em termos de seu início, término ou níveis de consumo;
- (c)** um estado de abstinência fisiológico (ver F1x.3e F1x.4) quando o uso da substância cessou ou foi reduzido, como evidenciado por: a síndrome de abstinência característica para a substância ou o uso da mesma substância (ou de uma intimamente relacionada) com a intenção de aliviar ou evitar sintomas de abstinência;
- (d)** evidência de tolerância, de tal forma que doses crescentes da substância psicoativa são requeridas para alcançar efeitos originalmente produzidos por doses mais baixas (exemplos claros disto são encontrados em indivíduos dependentes de álcool e opiáceos, que podem tomar doses diárias suficientes para incapacitar ou matar usuários não tolerantes);
- (e)** abandono progressivo de prazeres ou interesses alternativos em favor do uso da substância psicoativa, aumento da quantidade de tempo necessária para obter ou tomar a substância ou para se recuperar de seus efeitos;
- (f)** persistência no uso da substância, a despeito de evidência clara de conseqüências manifestamente nocivas, tais como dano ao fígado por consumo excessivo de bebidas alcoólicas, estados de humor depressivos conseqüentes a períodos de consumo excessivo da substância ou comprometimento do funcionamento cognitivo relacionado à droga; deve-se fazer esforços para determinar se o usuário estava realmente (ou se poderia esperar que estivesse) consciente da natureza e extensão do dano.

ANEXO 3: MÉTODOS LABORATORIAIS: ADRA2A

O DNA genômico de alto peso molecular foi isolado de linfócitos de sangue total por procedimento de extração descrito por Lahiri e Nurnberger (1991).

A região que apresenta o polimorfismo C-1291G, localizada no promotor do gene ADRA2A, foi amplificada por reação de polimerase em cadeia (PCR) utilizando os primers e protocolos descritos por Lario e cols. (1997) e Roman e cols., (2003). O primer senso, na posição -1417 *upstream* do início da transcrição, é 5' TCA CAC CGG AGG TTA CTT CCC TCG 3' e o primer antisenso, na posição -913, é 5' TCC GAC GAC AGC GCG AGT T 3'.

A reação de PCR foi realizada em um volume total de 50 µl, contendo 50 ng de DNA, 30 pmol de cada primer, 250 µM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 2,5 U de *Taq* DNA polimerase e 1x tampão de *Taq*. As condições de PCR consistiram de uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 4 min, seguida de 35 ciclos que incluíram uma etapa de 30 seg de desnaturação a 94°C, uma etapa de reanelamento a 60°C e uma etapa de 1 min de extensão a 72°C. Uma etapa de extensão final a 72°C por 5 min foi incluída. A PCR originou fragmentos amplificados de 522 pb. Estes fragmentos foram digeridos com a enzima de restrição *MspI* por 3 horas a 37°C, usando 12 µl do produto da PCR, 10 U da endonuclease de restrição e tampão *MspI* 1x, gerando cinco fragmentos, de 5, 62, 116, 165 e 174 bp. O fragmento de 174 pb pode ser também clivado em fragmentos de 121 e 53 pb, dependendo da presença de guanina na posição -1291, correspondendo ao alelo G. A presença de citosina e a conseqüente ausência do sítio de restrição *MspI* corresponde ao alelo C (Garenc e cols., 2002). Os 5 ou 6 fragmentos resultantes foram separados por eletroforese em géis de poliacrilamida a 10%. Os géis foram corados com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta.

ANEXO 4: MÉTODOS LABORATORIAIS: GNB3

Foi utilizada a reação de polimerase em cadeia (PCR) para amplificar uma região de DNA genômico de 267 pb, do nucleotídeo 5348 ao nucleotídeo 5615 do gene GNB3. A posição do nucleotídeo 5500 da seqüência genômica corresponde à posição 825 do cDNA desse gene (Roskopf e cols., 2000). Foram utilizados os seguintes primers: 5' TGA CCC ACT TGC CAC CCG TGC 3' (primer senso) e 5' GCA GCA GCC AGG GCT GGC 3' (primer antisenso), segundo protocolo descrito por Schunkert e cols. (1998) e adaptado por Mattevi e cols. (2006). Para a PCR, foram utilizados 80 ng de DNA genômico e 0,5 U de *Taq* polimerase em 35 ciclos de amplificação. Depois de período inicial de desnaturação a 94°C, cada ciclo incluiu desnaturação a 94°C por 1 minuto, reanelamento a 61°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto. Foi utilizada uma etapa de extensão final de 7 minutos. O polimorfismo C825T foi evidenciado nos produtos da PCR pela digestão com a enzima de restrição *Bsa*JI, separados por eletroforese em gel de agarose a 2,5%. Os géis foram corados com brometo de etídio e visualizados sob luz UV. O alelo C apresenta o sítio de restrição, resultando em 2 fragmentos de 115 e 152 pb. O alelo T não apresenta o sítio de restrição, resultando em um fragmento não digerido com 267 bp.

ANEXO 5: TERMO DE CONSENTIMENTO - PROBANDOS

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

Termo de consentimento _____ Nome/Nº: _____

Assinando este documento, eu terei concordado em participar de uma pesquisa médica intitulada Estudo Colaborativo sobre Fatores Genéticos no Alcoolismo (ECGA). O estudo tem a supervisão dos Drs. Claiton H.D. Bau e Mara H. Hutz, do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A minha assinatura também autoriza os membros do ECGA a entrar em contato com meus parentes biológicos para determinar se eles também desejam participar. Qualquer parente que eu não queira que seja contactado não será procurado pela equipe do ECGA.

1. Objetivo da pesquisa: O objetivo principal do estudo é compreender como o alcoolismo pode ser transmitido de geração em geração ou de pais para filhos.

Todas as informações obtidas permanecerão confidenciais e não serão reveladas a ninguém de nenhuma maneira que possa identificar a mim ou minha família, exceto em situações em que riscos potenciais possam resultar a outros ou a mim mesmo. Eu compreendo que as informações que eu fornecer serão utilizadas somente para objetivos estatísticos e os resultados da pesquisa não incluirão nenhuma informação que possa ser usada para identificar a mim ou minha família. Todos os formulários receberão um número de identificação e serão usados somente por membros da equipe de pesquisa. Eu também compreendo que o conteúdo das entrevistas ou resultados de qualquer outro teste não serão revelados a nenhum dos meus parentes.

2. Procedimentos envolvidos e duração da minha participação:

Entrevista: Eu serei entrevistado por um membro do ECGA que fará perguntas sobre a minha história passada e presente, incluindo uso de álcool e drogas, traços de personalidade, humor, pensamentos, relações familiares, bem como informações sobre a história passada e presente do uso de álcool e drogas dos meus parentes. O tempo total de entrevista é de aproximadamente 5 a 7 horas.

Testes laboratoriais: Será solicitado que eu me submeta a uma coleta de 10 ml de sangue. A amostra servirá para testes bioquímicos e análises genéticas. Parte do material será congelado e utilizado no futuro, em estudos sobre a genética do alcoolismo.

3. Os riscos que sofrerei: Os testes utilizados no estudo não envolvem riscos maiores, físicos ou psicológicos. No entanto, se eu considerar algumas das perguntas como sendo desagradáveis, eu poderei recusar-me a respondê-las. A coleta de sangue pode gerar um pequeno desconforto, ou ferimento ou sangramento mínimo. Se eu considerar a entrevista muito longa ou estressante, eu poderei interromper e marcar outra ocasião. Para qualquer informação adicional, eu posso telefonar para o Departamento de Genética da UFRGS, telefone 051-316-6731.

4. Possíveis benefícios: Os resultados deste estudo poderão ajudar a mim e a outros membros da minha família a decidir sobre o uso do álcool. O estudo também pode ajudar a encontrar fatores que possam determinar os indivíduos que apresentem uma vulnerabilidade ao desenvolvimento da dependência de álcool. Os maiores benefícios serão para a sociedade como um todo. Se todos os objetivos forem atingidos, muito se saberá sobre a prevenção e tratamento de um dos maiores problemas mundiais de saúde.

5. Consentimento para liberação de informações familiares: Eu dou permissão aos membros do Estudo Colaborativo em Genética do Alcoolismo para informar para outros membros da família:

* meu nome e data de nascimento

* nomes, datas de nascimento e de óbito de outros membros da família

Fui informado de que estas informações serão liberadas de tal maneira que os dados familiares possam ser combinados com os de outros membros da família. Isto ajudará a desenvolver a árvore genealógica mais correta. No entanto, se há alguma razão pela qual eu prefira não dar estas informações (por exemplo, eu poderia ter um (a) filho (a) ou esposa (o) anterior a respeito de quem ninguém sabe), a equipe do ECGA me assegura de que estas informações não serão mostradas a ninguém.

Eu, _____, fui informado dos objetivos especificados acima e da justificativa desta pesquisa, de forma clara e detalhada. Recebi informações específicas sobre cada procedimento no qual estarei envolvido, dos desconfortos ou riscos previstos, tanto quanto dos benefícios esperados. Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento. Além disso, sei que novas informações, obtidas durante o estudo, me serão fornecidas e que terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa, face a estas informações.

O pesquisador _____ certificou-me de que as informações por mim fornecidas terão caráter confidencial.

Fui informado que caso existam danos à minha saúde, causados diretamente pela pesquisa, terei direito a tratamento médico e indenização conforme estabelece a lei. Também sei que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

ASSINATURA DO PACIENTE _____

ASSINATURA DO INVESTIGADOR _____

ASSINATURA DO ORIENTADOR _____

ANEXO 6: TERMO DE CONSENTIMENTO - CONTROLES

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

Termo de consentimento nº

Assinando este documento, eu concordo em que uma pequena amostra do sangue doado por mim seja utilizado pelo Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para formar um banco de material biológico representativo da população de Porto Alegre, a ser utilizado em um projeto denominado “Heterogeneidade Genética e Fenotípica no Alcoolismo”.

O material genético (DNA) será extraído do sangue, para serem realizados estudos comparando alcoolistas e não alcoolistas quanto a variações em genes possivelmente importantes para o alcoolismo.

Os resultados serão divulgados em nível científico, mas o meu nome não será divulgado para ninguém. Todas as informações serão identificadas apenas por um número.

Eu, fui informado do objetivo especificado acima, e da sua justificativa. Fui informado também de que a minha participação não implica nenhum risco adicional à doação de sangue.

Doador de sangue

Pesquisador

Data:

ANEXO 7: APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA - HCPA

GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

RESOLUÇÃO

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela CONEP como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA, em reunião conjunta, realizada em 30/dez/93, analisaram o projeto:

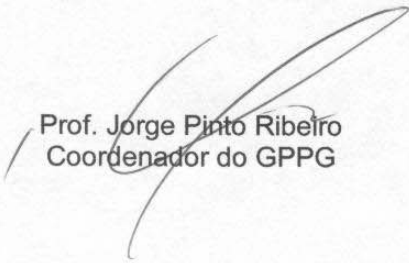
Número: 136/93

Título: " HETEROGENEIDADE GENÉTICA E FENOTÍPICA NO ALCOOLISMO ".

Autores: Claiton H. D. Bau e Roberto Giugliani.

- Este projeto foi aprovado estando adequado ética e metodologicamente, de acordo com as normas de Pesquisa em Saúde (Portaria 01/88 do Congresso Nacional de Saúde).

Porto Alegre, 10 de janeiro de 1994.


Prof. Jorge Pinto Ribeiro
Coordenador do GPPG

ANEXO 8: APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA DA UFRGS

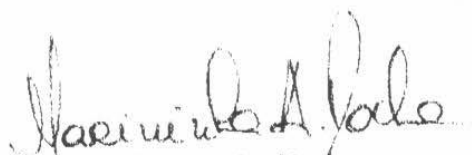


PRÓ-REITORIA DE PESQUISA PROPPQ

DECLARAÇÃO

A Pró-Reitoria de Pesquisa ratifica o parecer positivo do Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul relativo ao projeto intitulado "Heterogeneidade Genética e Fenotípica no Alcoolismo" sob responsabilidade do Professor Claiton H. D. Bau. O trabalho, cadastrado sob o número 99009, respondeu às questões solicitadas na diligência e o projeto apresenta condições de aprovação.

Porto Alegre, 27 de setembro de 2000


Marinha Aranha Rocha
Vice-Pró-Reitora de Pesquisa