



2012



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Etiologia das Toxicodependências no Sexo Masculino: Pesquisa de Factores Genéticos

Etiologia das Toxicodependências no Sexo Masculino: Pesquisa de Factores Genéticos



Licinia I. L. Gomes

Licinia Isabel Lagoa Gomes

2012





DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Etiologia das Toxicodependências no Sexo Masculino: Pesquisa de Factores Genéticos

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Alda Ambrósio (Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra) e do Professor Doutor Rui Carvalho (Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra).

Licínia Isabel Lagoa Gomes

2012

Agradecimentos

À Doutora Alda Ambrósio, minha orientadora, pela segurança impar da orientação científica e técnica, pela sua total disponibilidade e apoio insubstituível e permanente ao meu trabalho, pelas palavras de experiência acurada e estímulo, bem como pela confiança que depositou em mim, permitindo que chegasse a bom porto e conclui-se a minha dissertação. Muito Obrigado pelo empenho, paciência, credibilidade e pela amizade.

À Unidade de Genética Clínica e Molecular da Delegação do Centro do Instituto Nacional de Medicina Legal, a instituição de acolhimento, por me possibilitarem a oportunidade de realizar este trabalho, e ao Director do mesmo, Professor Duarte Nuno Vieira.

Ao Centro Regional de Alcoologia do Centro Maria Lucília Mercês de Mello, principalmente à equipa médica que seleccionou os doentes para a realização deste estudo, assim como um agradecimento especial aos doentes voluntários que aceitaram participar neste projecto.

Ao Doutor Rui Carvalho, meu co-orientador.

Em especial à minha mãe e ao meu padrasto por TUDO, sem eles jamais teria conseguido. A eles dedico este trabalho.

À minha irmã, Diana Mora, pelas palavras doces confortantes e alegres que uma criança pode dar nos momentos menos bons, assim como o carinho e o amor que uma irmã pode proporcionar.

A toda a minha família, especialmente os meus avos maternos pelo incentivo, pelos conselhos sensatos e por de certa forma me terem ajudado a chegar aqui.

Ao António Mateus, pelo apoio incondicional, pelo incentivo, pela amizade e pela paciência para comigo em dias stressantes,

Agradecimentos

A todos os meus amigos que sempre me encorajaram e acreditaram em mim.

A todos aqueles que trabalham no laboratório, em especial à Andreia Marques que sempre me acompanhou ao longo de um ano intenso de trabalho.

Abreviaturas

AADC - Descarboxilase dos aminoácidos aromáticos

AC - Adenilato ciclase

ATP - Trifosfato de adenosina

CNVs - *Copy Number Variations*

cAMP - Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

DA - Dopamina

DAT - Transportador da dopamina

DDC - Dopa descarboxilase

7- deaza-dGTP - Desoxi-7-deaza-guanosina trifosfato

DMS IV - *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucleico

dNTPs - Desoxinucleótidos trifosfatados

D.O - Densidade óptica

Dopa - Dihidroxifenilalanina

DOPAC- Ácido dihidroxifenilacético

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

EMCDDA - *European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction*

HapMap - *Haplotype Map*

HIV - *Human immunodeficiency vírus*

HTP - Hidroxitriptofano

5-HT - Serotonina

5-HTT - Transportador da serotonina

LSD - Dietelamida do ácido lisérgico

MAO - Monoamina oxidase

NAcb - Núcleo Accumbens

nAChR - recetores nicotínicos da acetilcolina

NE - Norepinefrina

NET - Transportador da norepinefrina

pb – pares de bases

PCR - *Polymerase chain reaction*
PGH - Projecto Genoma Humano
RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*
RNA - Ácido ribonucleico
SDS - Dodecil sulfato de sódio
SNC - Sistema Nervoso Central
SNPs - *Single Nucleotide Polymorphisms*
STRs - *Short Tandem Repeats*
TAE - Tris-Acetato-EDTA
TBE - Tris-Borato-EDTA
TH - Tirosina hidroxilase
TPH - Triptofano hidroxilase
Trp - Triptofano
‘UTR - *Untranslated region*
UV - Ultravioleta
VNTRs - *Variable Number of Tandem Repeats*
VTA - Área Tegmental Ventral
WHO - *World Health Organization*

Resumo

O aumento da prevalência da toxicod dependência a nível mundial tem vindo a revelar-se cada vez mais preocupante para a sociedade e para o próprio indivíduo. Esta representa um grave problema social, quer pelas suas consequências ao nível de saúde pública quer pela criminalidade associada. A toxicod dependência traduz-se basicamente numa dependência física e psicológica resultante do consumo excessivo e repetido de substâncias lícitas ou ilícitas. Estudos de epidemiologia genética demonstram que a componente genética contribui para o desenvolvimento da dependência da nicotina, álcool e drogas, com uma hereditariedade estimada entre 50% a 60%.

O sistema de recompensa, nomeadamente os sistemas dopaminérgico, serotoninérgico e noradrenérgico têm sido implicados na etiopatogenia das toxicod dependências. Contudo, o papel dos polimorfismos VNTR 40 pb no gene *SLC6A3*, 5-HTTLPR no gene *SLC6A4* e o polimorfismo G1287A no gene *SLC6A2*, na etiologia das toxicod dependências permanece por esclarecer, particularmente na população portuguesa. Assim, face à grande heterogeneidade clínica e genética que caracteriza as toxicod dependências pretende-se investigar uma eventual associação entre os genes mencionados e as toxicod dependências na população portuguesa, numa amostra de doentes alcoólicos do sexo masculino com e sem historial de drogas lícitas ou ilícitas.

Em relação ao polimorfismo VNTR de 40 pb do gene *SLC6A3*, os resultados obtidos revelaram associação quer para o alcoolismo ($X^2 = 11,308$; $df = 3$; $p = 0,013$) quer para a dependência de drogas ilícitas ($X^2 = 7,456$; $df = 2$; $p = 0,024$). Por outro lado não foi detetada associação entre o gene *SLC6A3* e a dependência tabágica. No seu conjunto, os resultados obtidos parecem sugerir que o gene *SLC6A3* desempenha um papel importante na etiologia do alcoolismo e das dependências de drogas ilícitas.

Com o intuito de identificar genes de susceptibilidade, investigou-se também o polimorfismo 5-HTTLPR do gene *SLC6A4* na etiologia das dependências a drogas ilícitas e lícitas, e os resultados obtidos não revelaram associação quer para o alcoolismo quer para a dependência a drogas ilícitas. Contudo, uma associação entre o polimorfismo 5-HTTLPR do gene *SLC6A4* e a dependência tabágica foi obtida ($X^2 = 7,390$; $df = 2$; $p = 0,025$), sugerindo que o polimorfismo 5-HTTLPR poderá eventualmente ser um fator de risco para a dependência tabágica na população portuguesa.

Em relação ao gene *SLC6A2*, a análise estatística revelou diferenças estatisticamente significativas entre a amostra de doentes alcoólicos versus a amostra de controlos para a distribuição genotípica ($X^2= 15,609$; $df= 2$; $p= 0,000$); entre a amostra de doentes alcoólicos com e sem historial de tabagismo, para a distribuição genotípica ($X^2= 40,094$; $df= 2$; $p= 0,000$) e para a distribuição alélica ($X^2= 10,575$; $df= 1$; $p= 0,001$). Resultados negativos, quer para o genótipo, quer para o alelo foram obtidos para a análise referente a dependência de drogas ilícitas. Os resultados obtidos permitem inferir que o polimorfismo G1287A desempenha um papel *minor* na etiologia quer do alcoolismo quer da dependência tabágica na população portuguesa.

A investigação desenvolvida permitiu identificar fatores de susceptibilidade genética para a etiologia das toxicodependências, contributo este que poderá ter repercussões quer ao nível da prevenção e identificação de indivíduos em risco, permitindo desta forma a diminuição de vítimas de toxicodependência.

Palavras Chave: Toxicodependência; Drogas lícitas e ilícitas; Genética; Sistema de Recompensa, Genes *SLC6A3*, *SLC6A4*, *SLC6A2*.

1. Introdução

1.1 Considerações gerais das toxicodependências

A toxicodependência traduz-se basicamente numa dependência física e psicológica resultante do consumo excessivo e repetido de substâncias psicoativas, nomeadamente drogas sintéticas ou naturais, sendo o seu consumo lícito ou ilícito. As drogas psicoativas podem ser classificadas como drogas psico-estimulantes (cocaína, anfetaminas, nicotina), drogas analgésicas (heroína, morfina), drogas alucinogénias (LSD, cannabis) e drogas depressivas (álcool, benzodiazepinas) (Gold & Greer, 2010). Estas substâncias caracterizam-se pelo efeito tóxico no organismo, afetando principalmente o sistema nervoso central (SNC), com repercussões na libertação de diversos neurotransmissores (Clapp et al., 2008). As toxicodependências tornaram-se num grave problema social, quer pelas suas consequências, ao nível da saúde pública quer pela criminalidade a ela associada, elevando drasticamente os índices de morbilidade e mortalidade (Skog, 2001; Klotz et al., 2007). Relacionados com estes problemas estão os enormes custos socioeconómicos, envolvidos nos tratamentos de desintoxicação e de patologias associadas ao consumo de substâncias (I.D.T., 2011; Degenhardt & Hall, 2012; Teesson et al., 2012). Estima-se que aproximadamente 230 milhões de pessoas, 5% da população mundial adulta (entre os 15-64 anos), façam uso regular de qualquer tipo de droga ilícita, segundo o relatório mundial da Secretaria das Nações Unidas para a Prevenção da Droga e Controlo do Crime (UNODC, 2012). De entre todas as substâncias psicoativas a *cannabis* é a droga mais consumida em todo o mundo (5% da população), seguida pelas anfetaminas (1,2%), o *ecstasy* (0,6%), os opiáceos (0,5%) e a cocaína (0,4%) (UNODC, 2012). Cerca de 100 mil a 250 mil óbitos registados no mundo resultaram do consumo de drogas ilícitas.

De entre as substâncias lícitas, o álcool lidera mundialmente as taxas de consumo, seguido pelo tabaco. Em 2004, a Organização Mundial de Saúde estimou 2 biliões de consumidores de álcool em todo o mundo, com um registo global de 2,5 milhões de mortes anuais a nível global, representando cerca de 3,8% de todas as mortes mundiais (WHO, 2004; WHO, 2011). Relativamente ao tabaco, um bilião da população mundial com idade compreendida entre os 15-64 anos é fumadora. Anualmente seis milhões de pessoas morrem pelo uso ou exposição ao tabaco (WHO, 2010; Bierut, 2011).

Na União Europeia (EU) existem dois milhões de toxicodependentes dos quais metade se injetam. O consumo de drogas por injeção é um veículo crucial de infeções transmitidas por via sanguínea, tais como, o VIH/SIDA e a hepatite C e B. A

toxicod dependência na Europa é responsável pela morte de 6500 a 9000 pessoas por ano, resultado de overdose. Tal como se verifica a nível mundial, na UE é a *cannabis* que lidera os índices de prevalência com mais de 78 milhões de pessoas adultas europeias, seguida da cocaína (14,5 milhões), anfetaminas (12,5 milhões), *ecstasy* (11 milhões) e opiáceos (1,3 a 1,4 milhões) (EMCDDA, 2011). Na EU registam-se os índices mais elevados do consumo de álcool, com repercussões sociais, que se traduzem em atos de violência, vandalismo, crime, problemas familiares e exclusão social, sendo os jovens e os indivíduos do sexo masculino os mais afetados (Rehm et al., 2006; WHO, 2010).

Em relação ao tabaco, um terço da população europeia é fumadora e para além dos problemas de saúde associados aos hábitos tabágicos, este vício mata mais de 650 mil fumadores europeus e 79 mil fumadores-passivos por ano (EMCDDA, 2011; WHO, 2011).

Em Portugal, tal como no resto do mundo, a toxicod dependência está a adquirir contornos inquietantes e a tomar proporções alarmantes. Os resultados dos últimos anos apontam para um aumento a nível nacional do consumo do tabaco, do álcool e de drogas ilícitas com o predomínio da *cannabis* (8,8%), estimulantes (3,4%) e LSD (dietelamida do ácido lisérgico) (2%) (I.D.T., 2010). Os consumos de várias substâncias iniciam-se cada vez mais cedo, assistindo-se a um aumento com a idade, e apesar das alterações verificadas ao nível do sexo, continuam a ser os indivíduos do sexo masculino que mais consomem. Verifica-se assim um agravamento da situação em termos de risco ou ameaça para a saúde e bem-estar dos jovens. Portugal apresenta um dos maiores índices de consumo de álcool *per capita* do mundo, situando-se no décimo segundo lugar a nível mundial (WHO, 2004). Salienta-se que aproximadamente um milhão e oitocentos mil portugueses são bebedores excessivos ou doentes alcoólicos crónicos, colocando Portugal como o segundo maior consumidor na União Europeia (WHO, 2004). Atualmente, mais de 60% dos jovens com idades compreendidas entre os 12 e os 16 anos e mais de 70% acima dos 16 anos, consomem regularmente bebidas alcoólicas

No âmbito do tabaco, a parcela superior dos fumadores também é do sexo masculino (27,6%). O tabagismo é responsável por 90% dos cancros pulmonares e é um fator de risco para acidentes cerebrovasculares e ataques cardíacos mortais (WHO, 2011).

Os fatores ambientais, tais como a disponibilidade ao tabaco, álcool e drogas, participam de uma forma crucial em cada fase do desenvolvimento da dependência, mas

a acessibilidade a uma substância é relativamente mais significativa na iniciação do uso da mesma (Bierut, 2011).

Estudos familiares, de gémeos e de adoção demonstraram também que a componente genética contribui para o desenvolvimento da dependência da nicotina, álcool e drogas, com uma hereditariedade estimada entre 50% a 60% (Bierut, 2011; Enoch, 2012). A dependência de drogas lícitas e ilícitas apresentam uma significativa complexidade e heterogeneidade, nas quais estão implicadas interações gene-gene e gene-ambiente (Enoch, 2012). Apesar das estratégias de prevenção e tratamento atualmente disponíveis, o reforço de medidas de prevenção e combate às toxicodependências e às suas consequências devastadoras são fundamentais, pelo que é imperativo efetuar estudos a nível genético.

1.2 Efeitos fisiológicos das toxicodependências

As toxicodependências traduzem-se em alterações de processos comportamentais, cognitivos e fisiológicos do organismo, que variam consoante o tipo de substância e com o tempo de exposição à mesma. As drogas psico-estimulantes caracterizam-se por provocar alterações nos processos cognitivos, induzem a euforia, aumentam a actividade motora e diminuem a fadiga reduzindo a necessidade de sono e apetite. As drogas analgésicas, tal como o seu próprio nome indica, induzem um efeito analgésico (eliminam a dor) e um efeito hipnótico (aumento da sonolência) (Salzman & Micheels, 2010). Por outro lado, as drogas alucinogénicas distorcem os sentidos, nomeadamente a visão e a audição, resultantes de alucinações, podendo levar ao estado de psicoses. Entre as drogas depressivas destaca-se com maior relevância o álcool, que diminuem e inibem as atividades cerebrais.

A primeira fase da etapa do consumo das drogas mencionadas, caracteriza-se pela ausência de efeitos negativos, apresentando apenas efeitos de reforço positivo como efeitos de estados eufóricos e estimulantes. Porém, o uso repetido destas drogas traduz-se em efeitos de reforço negativo, principalmente sintomas depressivos, descontrolo e falta de coordenação motora (Levin 2010; Breese et al., 2011). Ambos estes reforços são responsáveis por desencadarem um estado de neuroadaptação cerebral, que se traduz em alterações adaptativas no SNC (Yin, 2008), que conduzem a um estado de dependência (Camí & Farré, 2003). A dependência é normalmente manifestada pela tolerância à droga, que se traduz numa necessidade de consumo de

doses cada vez mais elevadas, até se tornarem incontroláveis, para obter o efeito desejável (Hyman & Malenka, 2001) e pelos sintomas de abstinência que se manifestam depois de uma interrupção imprevista do consumo de determinada droga, desencadeando diversos efeitos fisiológicos, nomeadamente alucinações e crises convulsivas (Camí & Farré, 2003). A crise de abstinência do álcool pode levar a sintomas de abstinência mais intensa e complicada que se traduzem geralmente no estado de *delirium tremens* (Saddichha et al., 2008). Este estado caracteriza-se numa situação extrema de embriagues que leva a condições de tremores, convulsões, alucinações e crises de ansiedade no indivíduo. Após algum tempo de abstinência, surgem as recaídas acompanhadas de um desejo intenso de procura e um consumo excessivo e incontrolável das substâncias (Becker, 2008).

O abuso do álcool e das drogas está relacionado com efeitos de recompensa e reforço causado pelo uso repetitivo da substância (Moussa et al., 2009). O consumo destas substâncias conduz ao desenvolvimento de inúmeras patologias, sobretudo doenças cardíacas, neurológicas, respiratórias e imunológicas (Rehm et al., 2009).

1.3 Sistema de recompensa e neurobiologia das toxicodependências

1.3.1 Sistema de recompensa

A procura e o consumo compulsivo das substâncias psicoativas e da alimentação são resultado do comportamento dos sentimentos de prazer e recompensa mediados pelo sistema de recompensa. Este incluiu vários sistemas de neurotransmissores, nomeadamente o sistema serotoninérgico, noradrenérgico, gabaérgico, glutamatérgico e particularmente o sistema dopaminérgico (Vangeliene et al., 2008; Tomkins & Sellers, 2001). A área tegmental ventral (VTA), o núcleo *accumbens* (NAcb), o córtex pré-frontal (figura 2) (Chen et al., 2010), incluindo o sistema mesolímbico dopaminérgico (Vangeliene et al., 2008), são as principais estruturas cerebrais envolvidas no circuito de recompensa. Este sistema está implicado na regulação do comportamento emocional e inclui uma área que é responsável pela procura de estímulos causadores de prazer (Gonzales et al., 2004), denominada de sistema de recompensa cerebral. Este sistema também assegura comportamentos fundamentais para a sobrevivência humana, nomeadamente a alimentação.

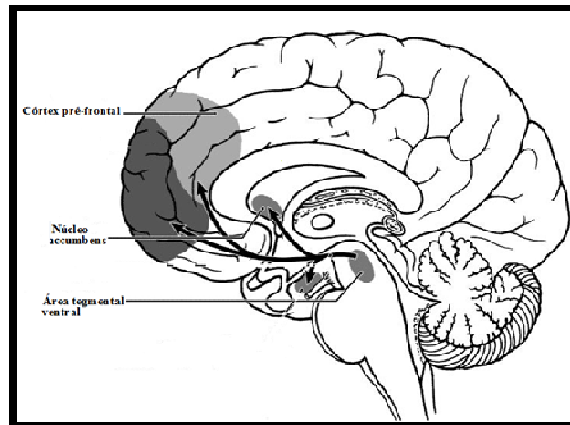


Figura 2: Áreas do SNC envolvidas no sistema de recompensa, incluindo a via mesolímbica dopaminérgica. Adaptado de Tomkins & Sellers (2001).

1.3.2 Sistema Dopaminérgico

O sistema dopaminérgico nigro-estriatal, originado na substância nigra do mesencéfalo, projetando-se para o estriado dorsal está envolvido no controlo motor. O sistema mesolímbico que tem a sua origem na VTA, projeta os seus neurónios para várias partes do sistema límbico, incluindo a amígdala, o hipocampo, o córtex ventral e o NAcb, desempenhando um papel importante nos efeitos reforçados de certos tipos de estímulos, nomeadamente no comportamento emocional. Os corpos celulares dos neurónios do sistema dopaminérgico mesocortical localizam-se também no VTA, projetando os seus axónios para o córtex frontal, afetando funções cognitivas, como a formação de memórias de curto prazo, motivação e atenção (Soderpalm & Ericson, 2011). A disfunção do sistema dopaminérgico está implicada em múltiplos distúrbios tais como a esquizofrenia, a doença de Parkinson, a dependência de drogas e o distúrbio do défice de atenção e hiperactividade (Hahn & Blakely, 2002; Zhu & Reith, 2008).

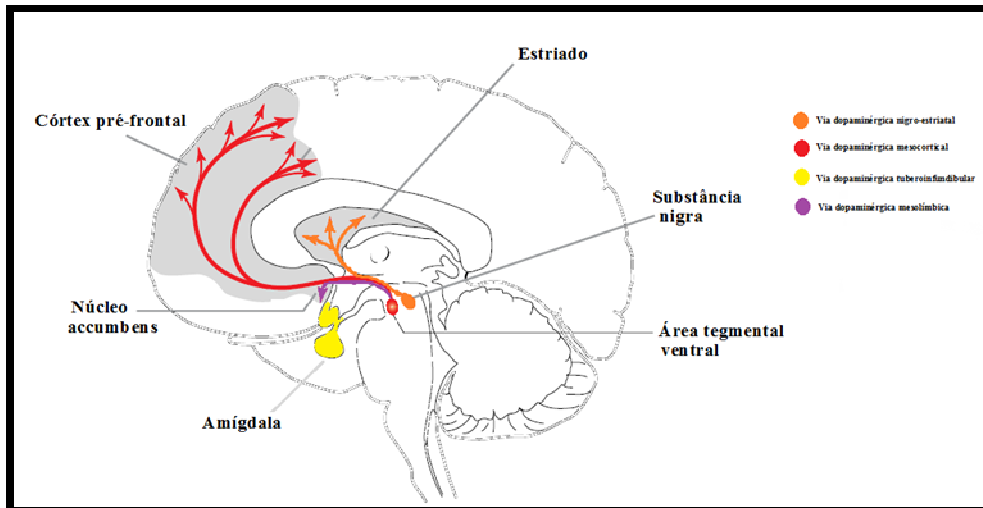


Figura 3- Representação das vias dopaminérgicas. Adaptado de Hyman et al. (2006).

O neurotransmissor dopamina (DA) pertence à família das catecolaminas. Além da DA, essa família inclui a norepinefrina e a noradrenalina. Como o próprio nome indica, a estrutura básica das catecolaminas inclui um grupo catecol e um grupo amina (Nagatsu, 2006). A síntese da DA ocorre particularmente nos neurónios dopaminérgicos da substância nigra do mesencéfalo, a partir da tirosina, que é o aminoácido precursor de todas as catecolaminas. A primeira etapa da síntese da DA consiste na conversão da tirosina a dihidroxifenilalanina (dopa) por ação da enzima tirosina hidroxilase (TH). A próxima e última etapa traduz-se na conversão da dopa a DA pela enzima dopa descarboxilase (DDC). Posteriormente à sua síntese no citoplasma do neurónio, a DA é transportada para o interior das vesículas sinápticas, permanecendo armazenada até a sua libertação. Este transporte é mediado pelo transportador vesicular que permita a troca de prótons para o exterior da vesícula, enquanto efetua o transporte simultâneo da DA para o interior da vesícula, contra o seu gradiente de concentração (Elsworth & Roth, 1997). Com o impulso nervoso, os canais de cálcio (Ca^{2+}), abrem e o influxo deste catião promove a fusão das vesículas que armazenam a DA com a membrana pré-sináptica do neurónio dopaminérgico, libertando o seu conteúdo para a fenda sináptica. Uma vez livre, a DA pode ligar-se aos seus recetores localizados na membrana do neurónio pós-sináptico, e aos seus auto-recetores que se localizam no terminal do neurónio pré-sináptico, diminuindo a síntese de DA no neurónio e conseqüentemente a libertação de dopamina.

As diversas ações fisiológicas da dopamina são mediadas pelos seus cinco recetores que estão ligados a proteínas G e que se dividem em dois grandes grupos, os

recetores do grupo D1 que inclui os recetores DRD1 e DRD5 e os recetores do grupo D2 que inclui os recetores DRD2, DRD3 e DRD4. Estes dois grupos são conhecidos por interagirem com a adenilato ciclase (AC), enzima responsável pela conversão de trifosfato de adenosina (ATP) em adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP). Este, ativa proteínas cinases que fosforilam os recetores, levando à internalização dos mesmos. Os recetores do tipo D1 estimulam a AC por intermédio da proteína G, enquanto os recetores D2 inibem a ação da mesma (Missale et al., 1998).

A ação da DA na fenda sináptica é terminada por ação da sua recaptação através do seu transportador (DAT) e por ação do seu metabolismo mediado pela enzima monoamina oxidase (MAO) (Elsworth & Roth, 1997). A DA captada no interior do neurónio pode ser reciclada nas vesículas sinápticas para uso subsequente na neurotransmissão, ou pode ser degradada pela MAO a ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) (figura 4).

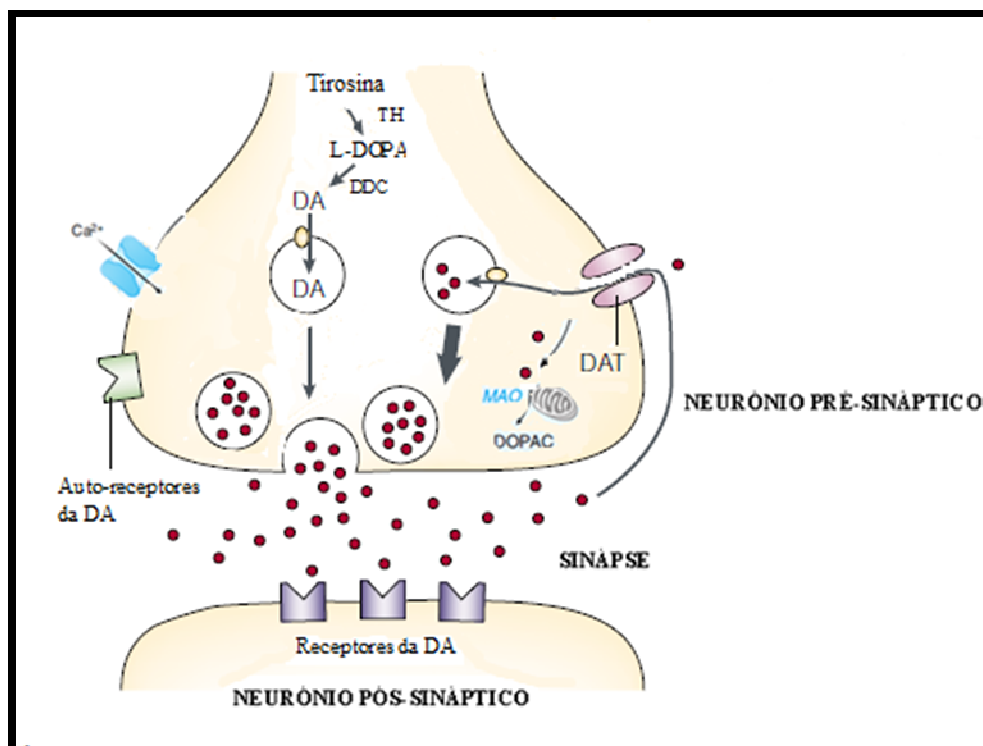


Figura 4: Representação esquemática do terminal sináptico dopaminérgico, evidenciando as entidades moleculares associadas com a síntese, libertação e recaptação da dopamina. Adaptado de Torres et al. (2003).

O DAT é uma proteína integral de membrana do terminal nervoso dopaminérgico que tem a função crítica de finalizar a atividade da DA através da recaptação pré-sináptica deste neurotransmissor. Este transportador é constituído por

doze domínios transmembranares conectados por *loops* intra e extracelulares, e pertence à família dos transportadores de neurotransmissores dependentes de sódio e cloreto ($\text{Na}^{2+}/\text{Cl}^-$) (Figura 5) (Masson et al., 1999). Estes transportadores são assim denominados porque efetuam a recaptação do neurotransmissor simultaneamente com o co-transporte de Na^{2+} . Tanto o Na^{2+} como o Cl^- são co-transportados com o neurotransmissor para o interior da célula (Torres et al., 2003).

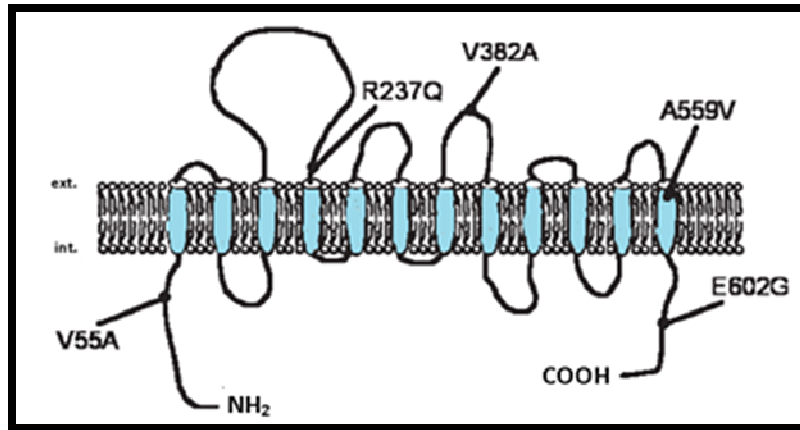


Figura 5: Representação estrutural do DAT, onde estão identificados os doze domínios transmembranares (cor azul) e as variantes dos aminoácidos. Os números indicam as posições dos aminoácidos na proteína. Adaptado de Hahn & Blakely (2002).

1.3.3 Sistema Serotoninérgico

A serotonina (5-HT), também designada de 5-hidroxitriptamina, tem sido decrita como um neurotransmissor modulatório largamente distribuído no SNC. Trata-se de uma amina biogénica que é produzida nos núcleos de Rafe, que se concentram em dois grandes grupos: dorsal e caudal, por neurónios serotoninérgicos que se projectam por aproximadamente todas as áreas cerebrais (figura 6) (Berger et al., 2009). Por esta razão, a 5-HT é responsável pela regulação de várias funções vitais do organismo, como por exemplo, o sono, o ritmo cardíaco, o sistema emocional, a alimentação, os comportamentos cognitivos e reprodutivos, e as funções cardiovasculares e respiratórias. A desregulação do sistema serotoninérgico conduz a estados patológicos tais como a depressão, obsessão, ansiedade, perda de memória e alucinações visuais e auditoras (Silber & Schmitt, 2010).

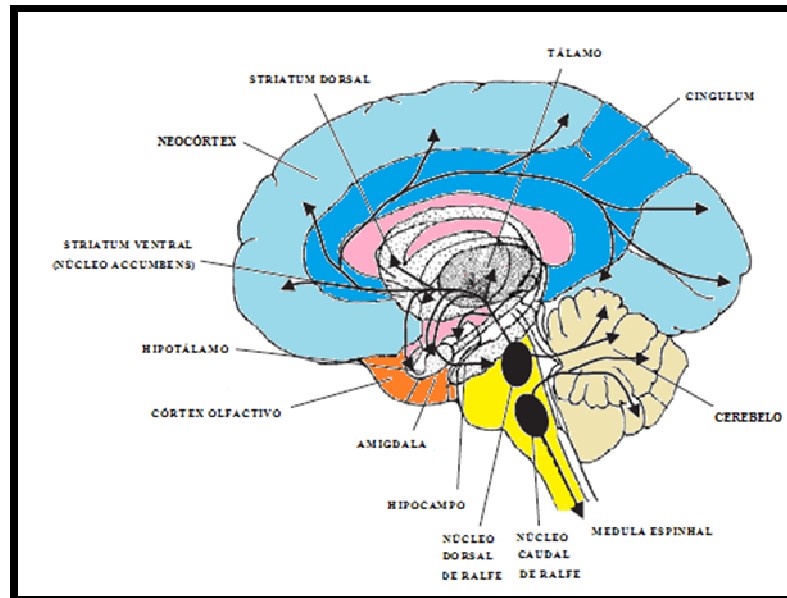


Figura 6: Representação das vias serotoninérgicas. Adaptado de Malgorzata et al. (2005).

Devido as suas propriedades hidrofílicas a 5-HT não consegue atravessar a barreira hematoencefálica, portanto a síntese é realizada dentro do próprio sistema nervoso central a partir do aminoácido triptofano (Trp). O processo envolve duas enzimas, a triptofano hidroxilase (TPH) que converte o Trp em 5-hidroxitriptofano (5-HTP) e a descarboxilase dos aminoácidos aromáticos (AADC) que converte rapidamente o 5-HTP em 5-HT (figura 7) (Silber & Schmitt, 2010; Watanabe et al., 2011).

Uma vez sintetizada, a 5-HT é armazenada em vesículas sinápticas localizadas nos terminais dos axónios por ação de um gradiente eletroquímico de prótons. Após a chegada de um impulso nervoso, a entrada de Ca^{2+} no neurónio pré-sináptico estimula a fusão das vesículas sinápticas com a membrana plasmática do neurónio resultando na libertação da 5-HT para a fenda sináptica. Parte desta liga-se aos recetores da membrana do neurónio pós-sináptico propagando o impulso nervoso, e outra parte pode ser recaptada pelo transportador da serotonina (5-HTT) para o interior do neurónio pré-sináptico, onde poderá posteriormente ser degradada pela enzima monoaminoxidase (MAO), a ácido 5-hidroxi-indol-acético (5-HIAA) ou internalizada nas vesículas sinápticas (Daubert & Barry, 2010).

Tendo em conta as diferenças estruturais, farmacológicas e bioquímicas, os recetores da 5-HT são classificados em sete famílias distintas (5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆ e 5-HT₇), possuindo vinte e oito subtipos (5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E}, 5-HT_{1F}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}, 5-HT_{3A}, 5-HT_{3B}, 5-HT_{3C}, 5-HT_{3D}, 5-HT_{3E}, 5-

HT_{4A}, 5-HT_{4B}, 5-HT_{4C}, 5-HT_{4D}, 5-HT_{4E}, 5-HT_{4F}, 5-HT_{4G}, 5-HT_{4H}, 5-HT_{4HB}, 5-HT_{5A}, 5-HT_{5B}, 5-HT_{7A}, 5-HT_{7B}, 5-HT_{7C} e 5-HT_{7D}). Todos os recetores serotoninérgicos pertencem à família dos recetores acoplados à proteína G, exceto os recetores 5-HT₃, que são canais iónicos. Os recetores 5-HT₁ e 5-HT₅ inibem a adenilciclase, ao contrário dos recetores 5-HT₄, 5-HT₆ e 5-HT₇ que estimulam a mesma. Os recetores 5-HT₂ acoplam positivamente à fosfolipase C, que conduz a um aumento do cálcio intracelular (Yun & Rhim, 2011).

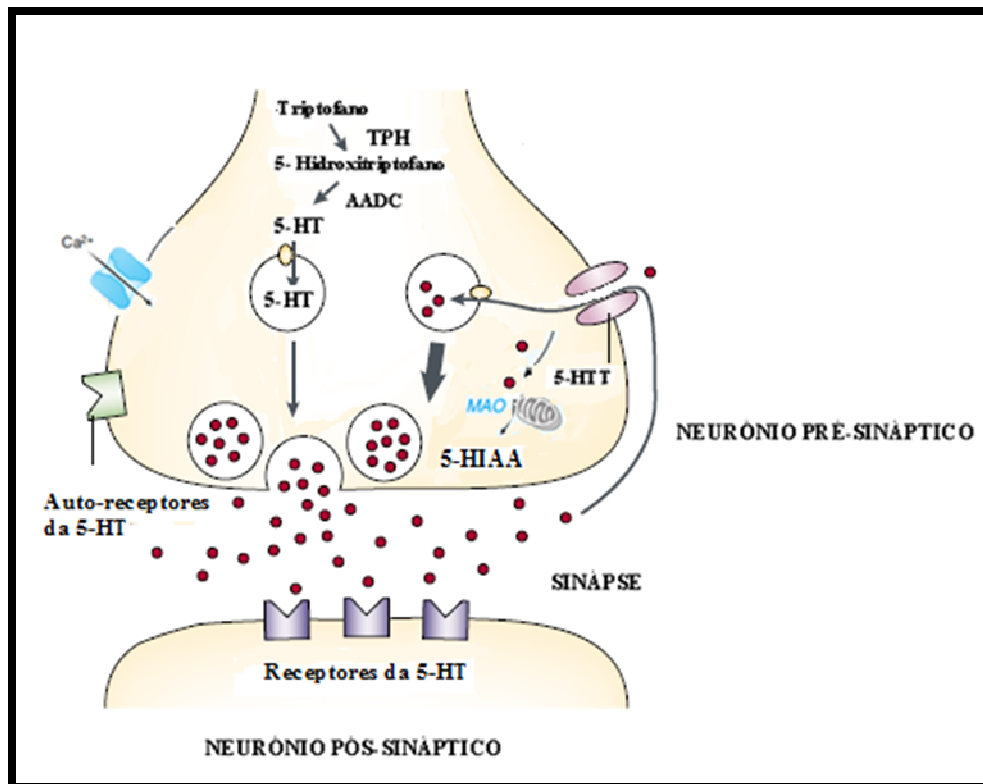


Figura 7: Representação esquemática do terminal sináptico serotoninérgico, evidenciando as entidades moleculares associadas com a síntese, libertação e recaptção da serotonina. Adaptado de Torres et al. (2003).

O 5-HTT localiza-se na membrana plasmática dos terminais axonais dos neurónios pré-sinápticos e é responsável pela captação da serotonina da fenda sináptica, regulando deste modo os níveis deste neurotransmissor e, conseqüentemente a ação do mesmo na sinapse, mantendo assim a homeostasia do sistema. Este transportador, faz parte da grande família dos transportadores de neurotransmissores dependentes Na²⁺/Cl, possui doze domínios transmembranares e um grande *loop* situado entre os domínios transmembranares 3 e 4 (figura 8) (Masson et al., 1999). Os terminais amino (-NH₂) e

carboxílico (-COOH) são intracelulares e são responsáveis pela regulação da magnitude e da durabilidade da neurotransmissão serotoninérgica.

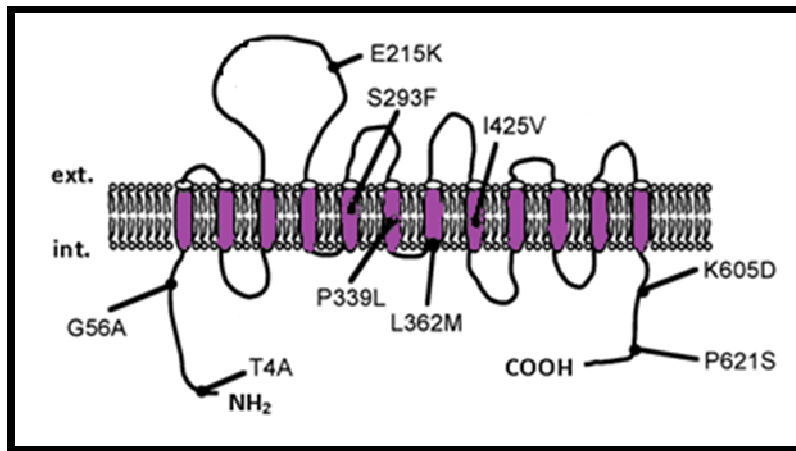


Figura 8: Representação estrutural do 5-HTT, onde estão identificados os doze domínios transmembranares (cor lilás) e as variantes dos aminoácidos. Os números indicam as posições dos aminoácidos na proteína. Adaptado de Hahn & Blakely (2002).

1.3.4 Sistema Noradrenérgico

A noradrenalina, também designada de norepinefrina (NE), assim como a dopamina, faz parte da família das catecolaminas. Os neurónios noradrenérgicos projetam-se a partir do tronco cerebral irrigando quase todas as áreas cerebrais (figura 9), tornando o sistema noradrenérgico responsável por diversas funções patológicas e fisiológicas, nomeadamente a resposta ao *stress*, memória, aprendizagem, atenção, comportamento, estados de alerta e excitação (Zhou, 2004; Sofuoglu & Sewell, 2009).

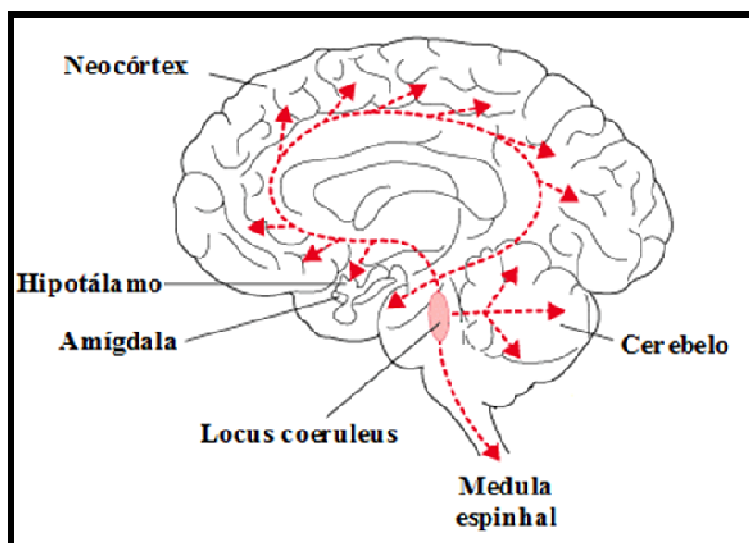


Figura 9: Representação das vias noradrenérgicas no cérebro humano.

Os neurónios produtores de NE encontram-se maioritariamente no locus *coeruleus*, responsável pela resposta ao *stress*. Nestes neurónios a NE é sintetizada a partir do aminoácido tirosina incluindo três etapas. A primeira etapa consiste na conversão da tirosina em dihidroxifenilalanina (dopa) por ação da enzima tirosina hidroxilase, seguindo-se a segunda etapa com a conversão da dopa em DA por ação da enzima dopa descarboxilase. Por fim, a última etapa consiste numa hidrolisação da DA por ação da dopamina hidroxilase originando a NE (figura 10) (Sofuoglu & Sewell, 2009). Esta, fica automaticamente armazenada no interior das vesículas sinápticas uma vez que a conversão de dopamina a NE ocorre no interior das mesmas. Quando a membrana do neurónio pré-sináptico recebe um potencial de ação, os canais de Ca^{2+} abrem e este catião difunde-se para o interior do terminal pré-sináptico. O aumento de Ca^{2+} intracelular provoca a fusão das vesículas sinápticas com a membrana neuronal estimulando a exocitose da NE para a fenda sináptica e esta liga-se aos recetores do neurónio pós-sináptico. Os recetores noradrenérgicos dividem-se em duas categorias, alfa (α) e beta (β), ou mais corretamente em três sub-categorias, α_1 , α_2 e β . Todos os subtipos destas três sub-categorias (α_1A , α_1B , α_1D , α_2A , α_2B , α_2C , β_1 , β_2 e β_3) estão acoplados a proteínas G, que por sua vez, estimulam ou inibem a adenilcilase. (Zhong & Minneman, 1999). A MAO e o transportador da norepinefrina (NET) estão envolvidos na degradação e recatção da NE. A MAO localiza-se na superfície externa das mitocôndrias e degrada a NE em compostos inativos (diidroxifenilglicol), que entram na corrente sanguínea (Zhou, 2004).

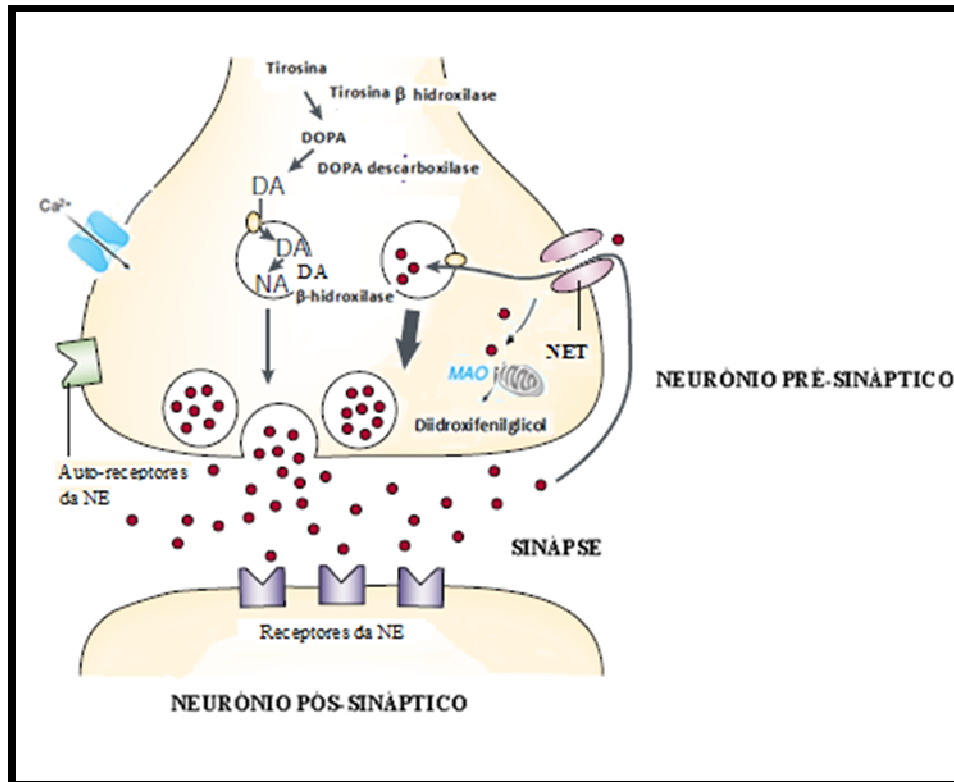


Figura 10: Representação esquemática do terminal sináptico noradrenérgico, evidenciando as entidades moleculares associadas com a síntese, libertação e recaptção da norepinefrina. Adaptado de Torres et al. (2003).

Porém, o único mecanismo de remover a NE da fenda sináptica é a recaptção mediada pelo transportador da norepinefrina (NET). Parte da NE recaptada é armazenada no interior das vesículas sinápticas por acção do transportador vesicular e outra parte é degradada pela MAO, como referido a cima. O NET localiza-se nos neurónios noradrenérgicos e trata-se de uma proteína transmembranar pertencente à família dos transportadores de neurotransmissores dependentes de $\text{Na}^{2+}/\text{Cl}^{-}$ (Masson et al., 1999). Possui doze domínios transmembranares com os terminais NH_2 e COOH intracelulares (figura 11).

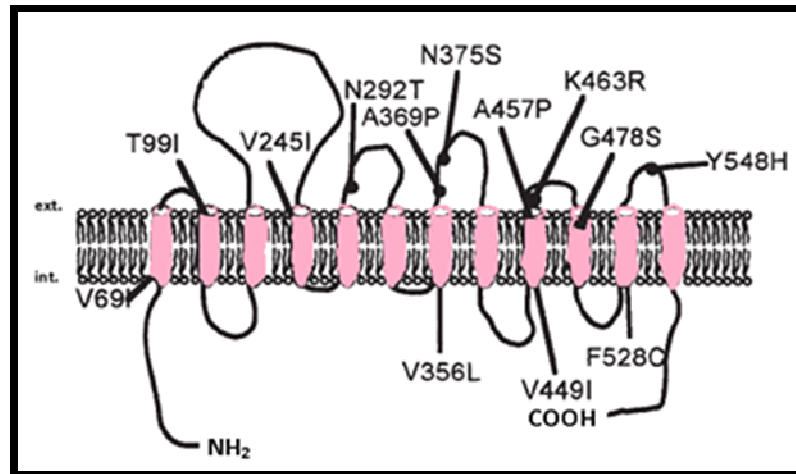


Figura 11: Representação estrutural do NET, onde estão identificados os doze domínios transmembranares (cor rosa) e as variantes dos aminoácidos. Os números indicam as posições dos aminoácidos na proteína. Adaptado de Hahn & Blakely (2002).

1.3.5 Neurobiologia das toxicodependências e genes candidatos

Todas as substâncias psicoativas que levam, ao abuso e à dependência, independentemente dos efeitos fisiológicos que provocam, têm em comum a capacidade de ativar o sistema de recompensa, nomeadamente a via mesolímbica dopaminérgica, quer por influenciar diretamente a ação da dopamina no sistema, quer por alteração da atividade de outros neurotransmissores (Wise 1998; Clapp et al., 2008).

As drogas, o tabaco e o álcool aumentam os níveis de monoaminas (DA, 5-HT e NE) extracelulares por ação de diferentes mecanismos. A cocaína liga-se aos transportadores das monoaminas, que se localizam nos terminais pré-sinápticos, bloqueando-os e inibindo a sua ação. As anfetaminas atuam como inibidores da MAO e estimulam as vesículas sinápticas a libertarem os neurotransmissores para a fenda sináptica, inibindo assim, o processo de recaptção da DA, NE e 5-HT pelos respetivos transportadores (Camí & Farré, 2003) (figura 12). Assim sendo, verifica-se uma diminuição da acumulação dos neurotransmissores e por conseguinte um aumento da quantidade de neurotransmissores livres na fenda sináptica disponíveis aos recetores pós-sinápticos. Este fenómeno desencadeia sensações intensificantes que reforçam o desejo por um novo consumo da substância psicoativa, com o intuito de satisfazer a necessidade de recompensa desencadeada.

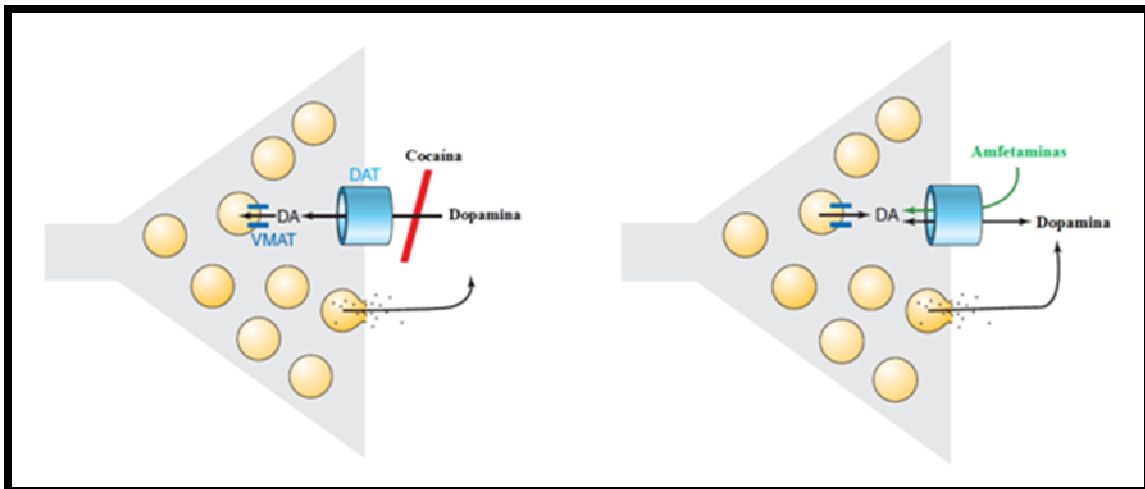


Figura 12: Ação dos psicoestimulantes no sistema dopaminérgico. A cocaína e as anfetaminas aumentam os níveis de DA extracelular. A cocaína bloqueia o DAT, localizado na membrana pré-sináptica, inibindo a recaptação da DA e aumentando a DA livre na fenda sináptica. As anfetaminas, ao contrário da cocaína, penetram nos neurônios dopaminérgicos, através dos seus transportadores de recaptação (DAT) e interagem intracelularmente com o transportador vesicular monoamínico (VMAT), estimulando a liberação de DA no terminal pré-sináptico. Por inversão do transportador, a DA é libertada para fora do neurônio na sinapse. Adaptado de Hyman et al., 2006.

Contrariamente às anfetaminas e à cocaína, o álcool e a nicotina, atuam no sistema de recompensa de uma forma indireta. Particularmente, o álcool atua ao nível dos sistemas glutamatérgico, gabaérgico e serotoninérgico, e a nicotina nos sistemas serotoninérgico (Mihailescu et al., 2002) e colinérgico, nomeadamente pelos recetores nicotínicos da acetilcolina (nAChR), que se encontram largamente distribuídos no sistema nervoso (Weiss et al., 2007). Resultados de diversos estudos animais, farmacológicos e de neuroimagem, têm sugerido alterações na neurotransmissão dos sistemas dopaminérgico, serotoninérgico e noradrenérgico. O sistema dopaminérgico tem sido relatado como o principal elemento na mediação da recompensa e efeitos estimulantes. Porém, este sistema por si só não explica a vasta gama de processos de viciação. Por exemplo, estudos farmacológicos, utilizando inibidores da dopamina, revelam que não há uma extinção completa da auto-administração de álcool e drogas por parte dos modelos animais treinados para tal (Camí e Farré, 2003, Chastain 2006; Gilpin & Koob, 2008; Sofuoglu & Sewell 2009). Assim, este efeito sugere que a dopamina é um importante, mas não essencial, componente para o reforço das drogas e que outros sistemas de neurotransmissores, nomeadamente o sistema serotoninérgico e noradrenérgico, também contribuem para manter as propriedades de recompensa e reforço das drogas de abuso.

O sistema noradrenérgico contribui para efeitos estimulantes independentemente da DA. Apesar de, poder não ser um estimulante crucial para a auto-administração dos psicostimulantes, a NE medeia os efeitos gratificantes e estimulantes da droga, bem como a recaída. Para além disso, diversos estudos revelam que uma lesão nos neurónios noradrenérgicos diminui a libertação de DA no NAcb, reciprocamente, a ativação desses neurónios aumenta a atividade dos neurónios dopaminérgicos na VTA, demonstrando assim este estudo, que existe uma conexão funcional entre a NE e a DA (Sofuoglu & Sewell, 2009). Estudos com modelos animais têm demonstrado que administração de álcool estimula a libertação de NE em macacos e estudos efetuados em doentes alcoólicos revelaram elevadas concentrações de NE, no líquido cefalorraquidiano, plasma e urina durante a abstinência (Huang et al., 2008, Sofuoglu & Sewell, 2009).

O sistema serotoninérgico também desempenha um papel importante nas propriedades de recompensa e abuso de substâncias, por ativação direta no sistema dopaminérgico (Budde et al., 2010). Experiências *in vivo* em animais revelaram níveis elevados de 5-HT no NAcb após a administração de cocaína, assim como mutuamente se verificou uma diminuição dos níveis de 5-HT no NAcb, durante a abstinência da droga de abuso (Malgorzata et al., 2005; Kirby et al., 2011). É importante referir que durante o período de abstinência de qualquer droga de abuso, os níveis de 5-HT no NAcb são reduzidos (Kirby et al., 2011) e esta redução é parcialmente revertida por auto-administração da substância durante a abstinência. Redução dos níveis do ácido 5-hidroxi-indol-acético (metabolito da 5-HT), têm sido verificados no líquido cefalorraquidiano de doentes alcoólicos associados a comportamentos agressivos (Ho et al., 2010; Heinz et al., 2011). Além disso, diversos estudos *pos-mortem* têm revelado uma disfunção funcional do sistema serotoninérgico no cérebro de doentes alcoólicos (Enoch et al., 2011).

Estudos com modelos animais também demonstraram que a nicotina, tal como o álcool e outras drogas de abuso, estimula a libertação de 5-HT no cérebro e nos períodos de abstinência verifica-se um efeito oposto. Resultados de distintos estudos de neuroimagem demonstraram que todas as drogas de abuso estimulam a libertação de dopamina em diversas áreas cerebrais, mas o efeito parece estar mais evidente no NAcb, causando euforia e reforço do comportamento (Soderpalm & Ericson, 2011; Volkow et al., 2011). O álcool, por exemplo, aumenta a DA livre no NAcb após activação directa

ou indirecta dos corpos celulares dopaminérgicos situados no VTA (Tomkins & Sellers, 2001) (figura 13). Por outro lado, a nicotina liga-se aos receptores nicotínicos da acetilcolina estimulando a libertação de DA essencialmente no VTA (Singer et al., 2004) e no NAcb.

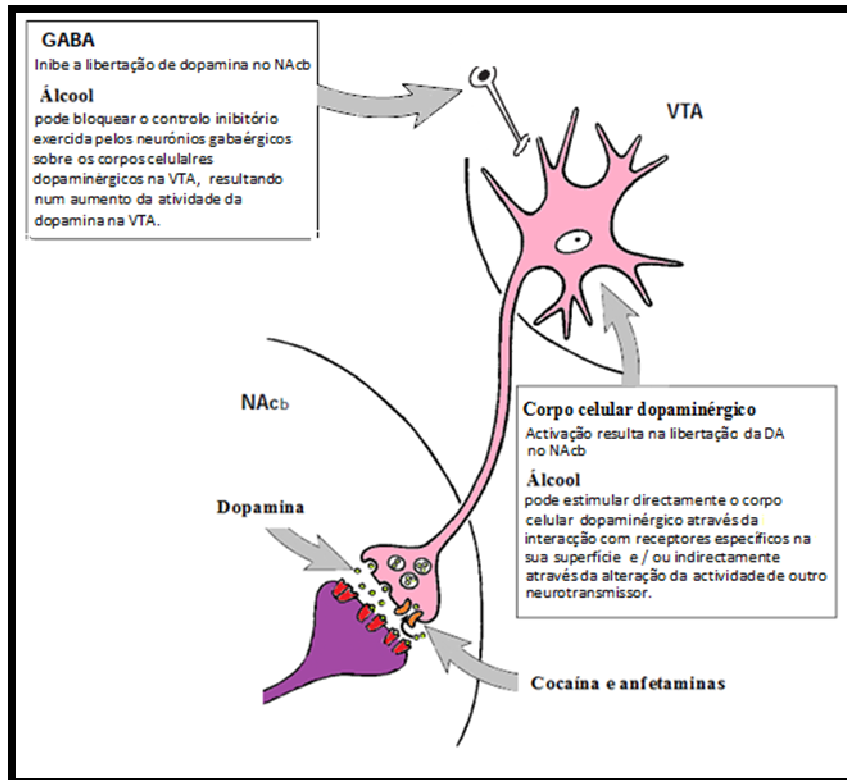


Figura 13: Esquematisação da projeção da dopamina da VTA para o NAcb, indicando o modo como as substâncias de abuso podem alterar a atividade desta via para produzir seus efeitos de recompensa.

Adapatado de Tomkins & Sellers (2001).

Nos seres humanos, os níveis de DA são substancialmente aumentadas no NAcb, em dependentes de cocaína, e estes aumentos estão associados ao *craving* (desejo) pela droga (Kohnke et al., 2005; Volkow et al., 2007). Em alcoólicos abstinentes também se têm verificado alterações no sistema dopaminérgico, nomeadamente a redução da síntese de DA. Este efeito parece estar relacionado com o *craving* e subsequentemente com a recaída. Já em alcoólicos, os níveis de DA extracelular são elevados no NAcb (Soderpalm & Ericsson).

Atualmente, o mecanismo biológico exato pelo qual as drogas licitas e ilícitas alteram a atividade da via mesolímbica dopaminérgica, que é importante na mediação da procura, da dependência e da recaída das substâncias psicoativas, assim como os fatores de susceptibilidade genética que contribuem para estas dependências

permanecem por esclarecer (Miller et al., 2007; Vangeliene et al., 2008; Kirby et al., 2011).

1.4 Considerações gerais sobre genética

1.4.1 Genoma humano

O genoma humano encontra-se distribuído em 23 pares de cromossomas, 22 pares são cromossomas autossómicos e 1 par é cromossomas sexuais (Burton et al., 2005). O DNA, cuja estrutura da dupla hélice foi descoberta por Watson e Crick (1953), é formada por quatro bases, duas purinas (adenina e guanina) e duas pirimidinas (citosina e timina) (figura 14). As diferentes combinações destas bases são responsáveis pela variabilidade genética, tendo em conta que 99,9% do genoma é comum a todos os humanos e somente 0,1% difere de pessoa para pessoa consoante a função da combinação dos genomas dos pais. Estes 0,1% determinam para além das características individuais de cada ser humano, a predisposição a determinadas patologias (Burton et al., 2005; Montpetit & Chagnon, 2006).

O gene é a unidade fundamental da hereditariedade constituído por uma sequência específica de DNA responsável pela síntese de uma determinada proteína. Cada gene pode ter inúmeras formas alternativas (alelos), que ocupam uma determinada posição (*locus*) num cromossoma (Burmeister, 1999). Genericamente os genes são constituídos por regiões codificantes (exões) que são responsáveis pela determinação da sequência de aminoácidos da proteína, por regiões não codificantes (intrões) que são removidas após o processo de *splicing* e por sequências reguladoras 5'UTR (*untranslated region*) e 3'UTR que flanqueiam o gene (Ellsworth & Manolio 1999).

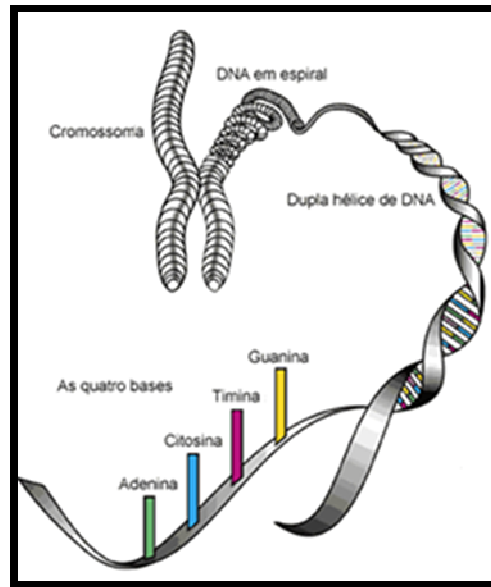


Figura 14: Modelo da estrutura do DNA segundo Watson e Crick.

1.4.2 Variantes genéticas no DNA

Os polimorfismos genéticos podem ser classificados em *Restriction Fragment Length Polymorphisms* (RFLPs), *Variable Number of Tandem Repeats* (VNTRs) ou minissatélites, *Short Tandem Repeats* (STRs) ou microssatélites, *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) e *Copy Number Variations* (CNVs).

Os RFLP's (Botstein et al., 1980), foram os primeiros marcadores genéticos a serem descobertos e utilizados em estudos genéticos. Caracterizam-se pela alteração de um par de bases que cria ou destrói um local de restrição reconhecido por uma enzima de restrição, originando diferentes fragmentos de DNA que diferem no tamanho devido à presença ou ausência de uma sequência específica (local de restrição) (figura 15) (Ellsworth & Manolio 1999; Nakamura, 2009).

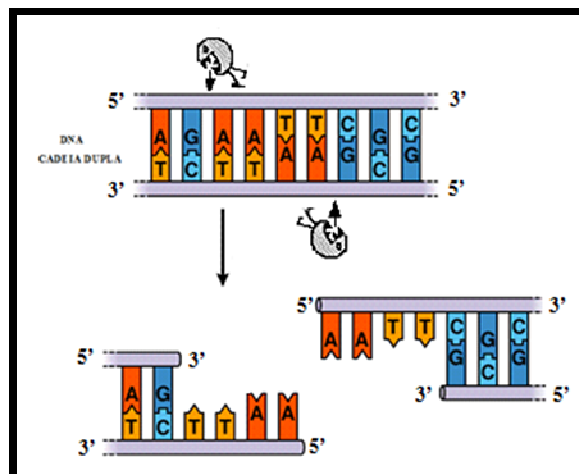


Figura 15: *Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)*. Se uma substituição de um nucleótido ocorre dentro de um local de restrição, o polimorfismo pode ser detectado por sujeição do DNA a uma enzima de restrição. Esta, corta a cadeia de DNA nos locais específicos, originando fragmentos de diferentes tamanhos. Adaptado de Madder, (1998).

Mais tarde surgiram os VNTR's ou minissatélites (Nakamura et al., 1987), que são altamente polimórficos e resultam da ocorrência de longas sequencias de DNA que variam de dez a várias centenas de pares de bases, e que se repetem um número variável de vezes ao longo da cadeia de DNA (figura 16).

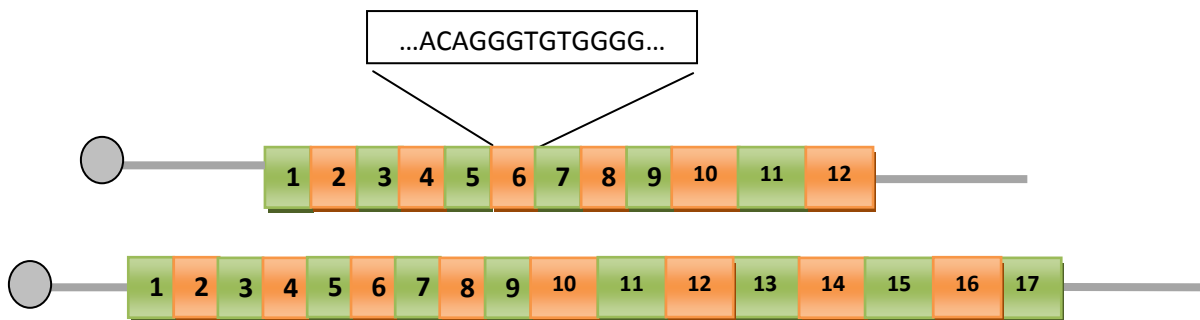


Figura 16: *Variable Number of Tandem Repeats (VNTR)* ou minissatélites, gerados por longas unidades repetidas em *tandem*, que contêm sequências de 10 a várias centenas de pares de bases.

Os microssatélites ou STR's (Weber & May, 1989), são constituídos por curtas sequências repetitivas de nucleótidos, de dois a quatro pares de bases (figura 17) (Nakamura, 2009).

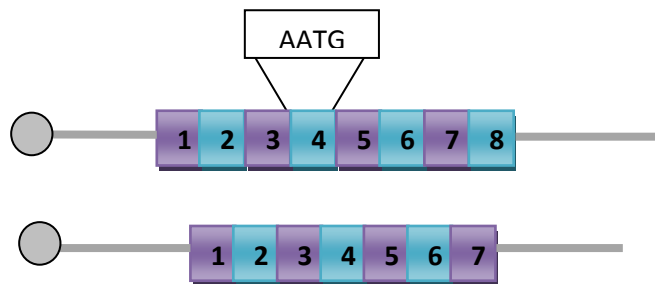


Figura 17: *Short Tandem Repeats (STR)* ou microssatélites, gerados por pequenas repetições em *tandem*, que contêm sequências de 2 a 4 pares de bases.

Os SNPs são marcadores genéticos de eleição importantes para a identificação de genes de suscetibilidade de doenças complexas (Collins et al., 1998). Consistem na substituição de um único nucleótido, originando dois alelos para o mesmo *locus* (figura 18) (Burmeister, 1999; Nakamura, 2009). São as variações genéticas mais abundantes no genoma humano (90%), estando presentes a cada 300-1000 pb. Estima-se que existam cerca de 11 milhões de SNPs com uma frequência $\geq 1\%$, representando cerca de 90% de todos os polimorfismos (The International HapMap Consortium, 2007).

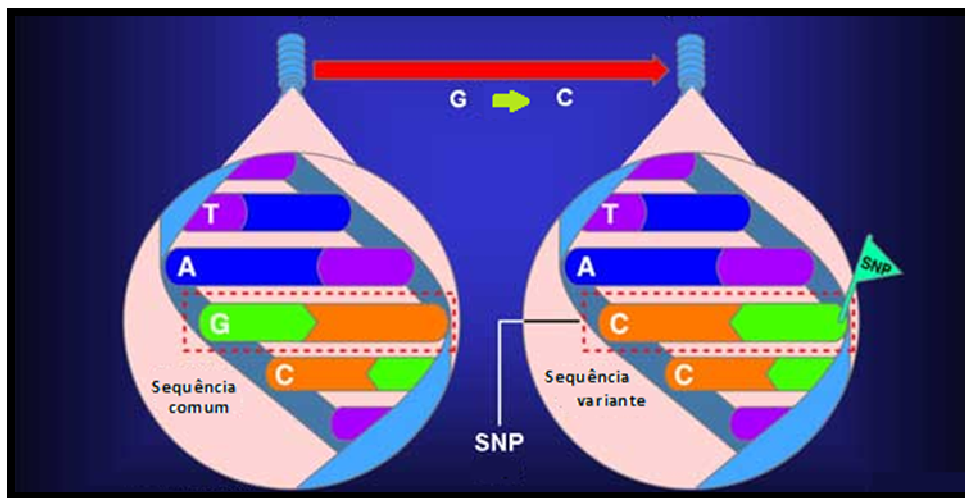


Figura 18: Representação de *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP). Substituição de uma única base, neste exemplo na sequência TAGC ocorre um SNP por alteração da base G para C, originando a sequência variante TACC, que difere apenas um nucleótido da sequência comum .

Recentemente foram descobertos os CNV's que são definidos como variações genômicas estruturais, tais como duplicações, deleções e multiplicações, resultando num decréscimo ou aumento do número de cópias de uma região genômica particular (figura 19). Os CNV's englobam um ou vários genes, com possíveis implicações funcionais devido ao variável número de cópias de determinados genes, caso uma parte de um segmento significativo do gene seja excluído ou caso uma unidade funcional, incluindo a região reguladora, de um gene em particular seja repetido ou multiplicado (Nakamura, 2009; Zhang et al., 2009).

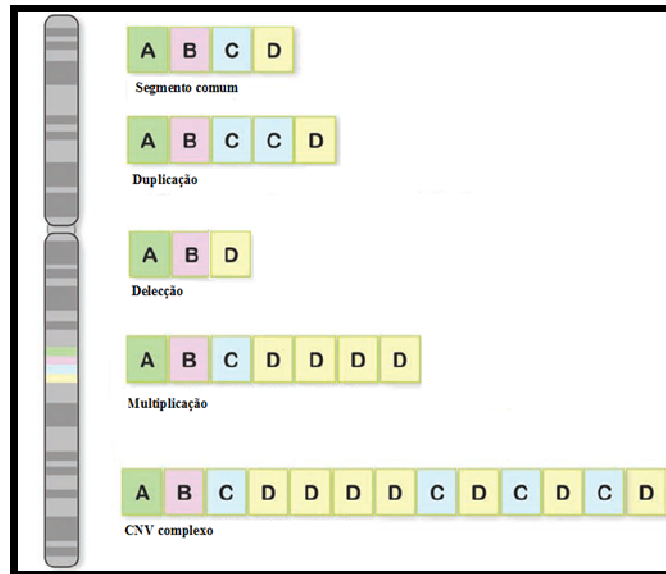


Figura 19: *Copy Number Variation* (CNV). CNVs correspondem a regiões relativamente grandes do genoma que foram suprimidas (menos do que o número normal) ou repetidas (mais do que o número normal) em certos cromossomas. Por exemplo, o cromossomo que normalmente tem segmento em ordem como ABCD pode em vez disso ter segmentos ABCCD (a duplicação de "C"), ABD (a supressão de "C"), ABCDDDD (a multiplicação de "D") ou um conjunto de alterações originando CNV's complexos (a multiplicação de "D" conjuntamente com multiplicação de "CD"). Adaptado de Estivill & Armengol, (2007).

A localização e o tipo de polimorfismo podem originar diferentes efeitos na função e expressão da proteína. Os polimorfismos podem ocorrer em regiões codificantes, em regiões reguladoras (5'UTR, 3'UTR, região promotora, regiões de splicing e intrões) e em regiões não codificantes. Os polimorfismos que ocorrem em regiões codificantes podem ser subdivididos em sinónimos, não alteram a sequência de aminoácidos da proteína, devido a redundância inerente no código genético e não-sinónimos, que alteram a sequência de aminoácidos de uma determinada proteína, podendo resultar em graves alterações da função e estrutura da proteína. Relativamente aos polimorfismos localizados nas regiões promotoras ou reguladoras (5'UTR e 3'UTR), não alteram a sequência de aminoácidos na proteína mas podem afetar a atividade do promotor e por conseguinte alterar os níveis de expressão do gene. Enquanto os polimorfismos situados em locais de *splicing* podem afetar a expressão. No caso dos polimorfismos localizados em regiões não codificantes, normalmente não têm efeitos na estrutura e função da proteína. No entanto, podem influenciar a expressão genética ou a estabilidade do mRNA (Ellsworth & Manolio, 1999; Tabor et al., 2002).

As variantes genéticas contribuíram de forma fundamental para o desenvolvimento de dois grandes marcos da história da genética humana, o Projecto do Genoma Humano (PGH) e o Projecto HapMap. O Projecto Genoma Humano integrou vários centros de investigação nos Estados Unidos, Reino Unido, França, Alemanha e Chapão, cujo seu principal objectivo era mapear todos os genes do genoma humano, bem como, descrever a sequência completa do DNA (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001). Este projeto permitiu a obtenção de informação fundamental a utilizar na identificação de fatores genéticos envolvidos em doenças genéticas humanas. Posteriormente surgiu o projecto HapMap, com o objetivo de determinar padrões de sequências variantes de DNA que afectam uma doença comum em populações geograficamente diferentes com ancestrais de África, Ásia e Europa, e tornar esta informação livremente disponível para a comunidade científica (The International HapMap Consortium, 2003). O conhecimento adquirido permitiu construir mapas destes padrões (SNPs) ao longo do genoma e identificar haplotipos (combinações de alelos que são herdados em conjunto no mesmo cromossoma, descendente de um antecessor comum) (The International HapMap Consortium, 2007). O projecto HapMap possibilitou a utilização de *tag* SNPs, um conjunto restrito de SNPs em *linkage disequilibrium* (figura 20). Os *tag* SNPs capturam a maior diversidade genética possível numa determinada região genómica, fornecendo informação sobre os restantes SNPs presentes ao longo dessa região (The International HapMap Consortium, 2005). Assim, a selecção criteriosa de *tag* SNPs permitiu a redução significativa de custos de genotipagem, tornando financeiramente viáveis os estudos genéticos de associação que abrangem todo o genoma humano, designados de *Genome Wide Association Studies* (Manolio et al., 2009).

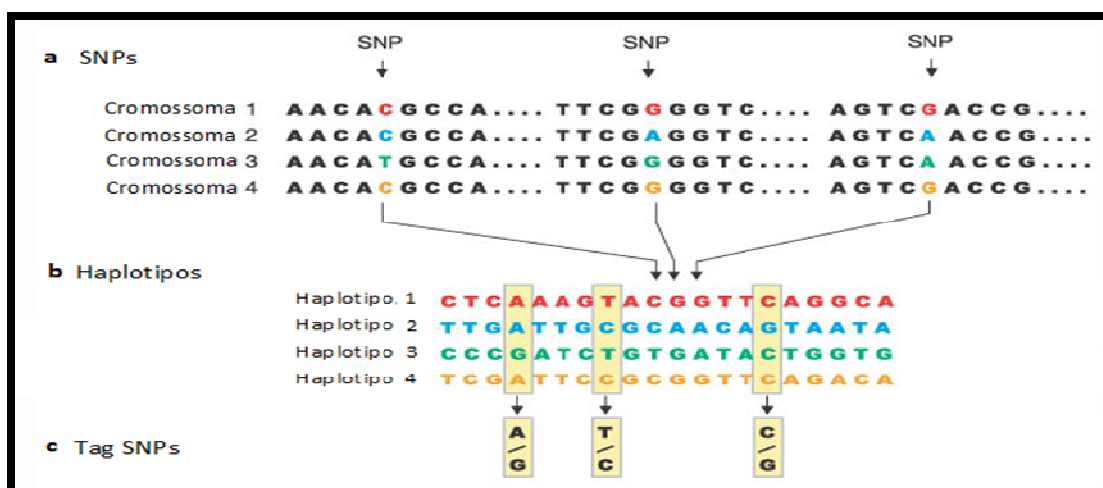


Figura 20: Esquema representativo da relação entre SNPs, haplotipos e *tag* SNPs. Representação de quatro versões de uma região específica de DNA do mesmo cromossoma em diferentes indivíduos. Cada SNP tem dois alelos possíveis. Os haplotipos são constituídos por uma combinação de alelos de SNPs próximos. A genotipagem dos três *tag* SNPs indicados é por si só suficiente para identificar os quatro haplotipos. Assim, se um determinado cromossoma possuir o padrão *A-T-C* para os três *tag* SNPs, este irá corresponder ao padrão determinado para o haplotipo 1. Adaptado de The International HapMap Consortium (2003).

1.5 Genes Candidatos

1.5.1 Gene do transportador da dopamina

O gene *SLC6A3* (*solute carrier 6, member 3*) que codifica o transportador da dopamina (DAT), localiza-se no cromossoma 5p15.3 (Vandenberg et al., 1992) e é um alvo importante de ação das drogas psicoestimulantes, nomeadamente da cocaína e das anfetaminas. A localização específica do DAT em neurónios dopaminérgicos centralmente implicados nos efeitos de recompensa, implica que esses circuitos de recompensa sejam suscetíveis de funcionar de forma diferente consoante os diferentes níveis de expressão do gene. O mecanismo biológico envolvido na regulação da disponibilidade do DAT no cérebro ainda continua por esclarecer, apesar dos vários esforços realizados por parte de inúmeras equipas científicas para tentar clarificar este mecanismo. Um estudo aponta para uma forte evidência de que o bloqueio do DAT por parte das substâncias psicoativas é crucial para estas mesmas induzirem efeitos de reforço (Thomsen et al., 2009). Em relação ao álcool também se verificou uma diminuição da preferência do consumo do mesmo por parte de modelos animais *knockout* (Zhu & Reith 2008). Diversos estudos de imagiologia cerebral realizados *in vivo*, revelaram também que os níveis de expressão do gene *SLC6A3* podem ser afetados pelo consumo de álcool, nicotina e drogas ilícitas. Doentes alcoólicos, durante os episódios de consumo, apresentam alterações significativas nos níveis de densidade cerebrais do DAT no estriado, comparados com os controlos (Kohnke et al., 2005; Kohnke 2008; Costa et al., 2011). No entanto, verifica-se que os níveis normais são repostos após um período de abstinência (Xu & Lin, 2011). Um estudo realizado em fumadores do sexo masculino também revelou uma diminuição da viabilidade do DAT comparados com os controlos, sugerindo que o tabaco pode alterar as funções dopaminérgicas, essencialmente em locais pré-sinápticos (Yang et al., 2008).

Com base nas evidências mencionadas o gene SLC6A3 é um bom candidato para a etiologia das dependências de drogas lícitas e ilícitas (Newberg et al., 2007; Zhu & Reith 2008).

1.5.2 Gene do transportador da serotonina

O gene *SLC6A4* (*solute carrier family 6, member 4*) que leva à expressão do transportador da serotonina (5-HTT), localiza-se no cromossoma 17q11.2 (Ramamoorthy et al., 1993). Tendo em conta que o 5-HTT regula a atividade serotoninérgica ao controlar a concentração extracelular de 5-HT, o gene que codifica a proteína 5-HTT tem sido investigado como gene candidato à vulnerabilidade para a dependência do álcool, da nicotina, de drogas ilícitas e para comportamentos de impulsividade/agressividade que geralmente estão associados a estas dependências (Lesch, 2005; Kohnke 2008; Chu et al., 2009; McHugh et al., 2010; Merenakk et al., 2011). Por exemplo, vários estudos de imagiologia cerebrais *in vivo*, têm demonstrado uma diminuição da função e da expressão do 5-HTT em indivíduos alcoólicos com problemas ao nível do controlo dos impulsos, agressividade e abuso de drogas (Pivac et al., 2004; Lesch, 2005; Saiz et al., 2009; Ho et al., 2011).

O gene SLC6A4 possui um polimorfismo de inserção/delecção (5-HTTLPR) na região promotora e que segundo resultados de inúmeros estudos tem sido descrito como o possível responsável pela regulação da expressão do 5-HTT (Thompson et al., 2010; Ho et al., 2011; Johnson et al., 2011). De facto, uma variante genética na região promotora do gene, acarreta repercussões a nível da transcrição, uma vez que modula os níveis de mRNA e de proteína, resultando numa expressão e função diferencial do gene (Watanabe et al., 2011) (figura 21).

O polimorfismo 5-HTTLPR possui duas variações alélicas, uma longa (L) e outra curta (S), estando esta última relacionada com os baixos níveis de transcrição do gene e por sua vez com o aumento da vulnerabilidade para o abuso de substâncias e com um elevado risco de recaídas em indivíduos abstinentes (Saiz et al., 2009; Enoch et al., 2011; Herman et al., 2011; Ho et al., 2011). Contrariamente, a forma (L) está relacionada com o aumento da expressão e da funcionalidade do 5-HTT no terminal pré-sináptico, traduzindo-se este efeito numa maior eficiência da recaptação da 5-HT e redução dos níveis da mesma na fenda sináptica (Shin et al., 2009; Thompson et al., 2010) (figura 21).

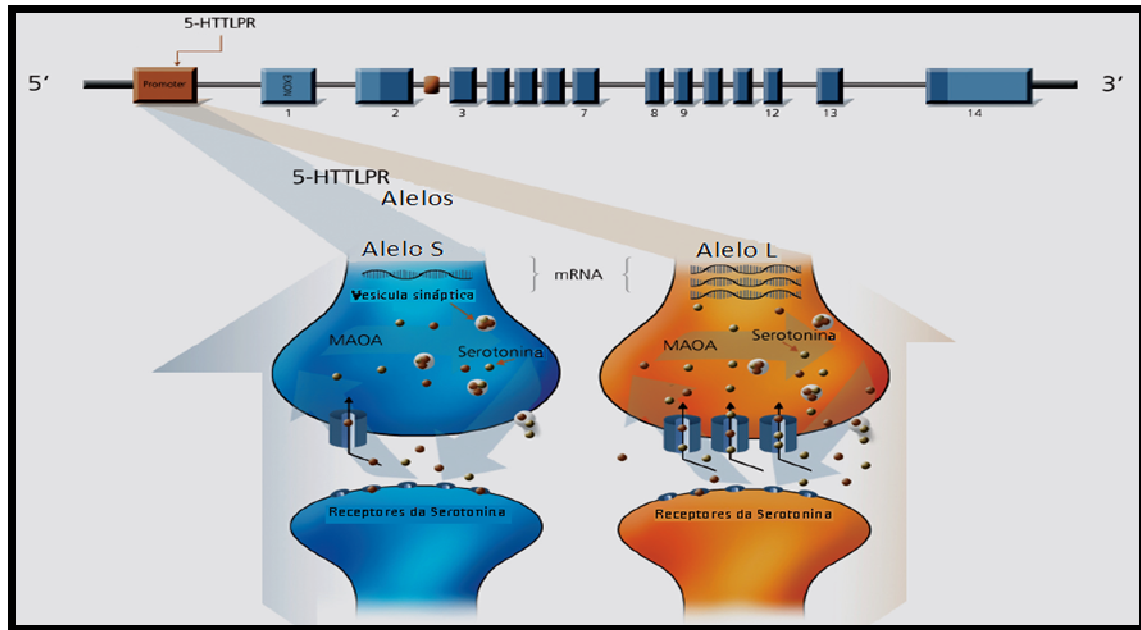


Figura 21: Representação do gene *SLC6A4* com a presença do polimorfismo 5-HTTLPR e das respectivas variantes alélicas. Adaptado de Gerretsen et al. (2009).

O risco para o abuso de substâncias está relacionado com a homoziguidade, isto é, indivíduos homozigóticos para o alelo S (S/S) apresentam maior vulnerabilidade para o abuso de drogas, lícitas e ilícitas, do que indivíduos heterozigóticos para o mesmo alelo (S/L) e homozigóticos para o alelo L (L/L) (Saiz et al., 2009; Thompson et al., 2010; Merenakk et al., 2011). No entanto, os estudos realizados até ao momento são controversos e o eventual papel do gene *SLC6A4* na etiologia das dependências a drogas lícitas e ilícitas permanece por esclarecer.

1.5.3 Gene do transportador da norepinefrina

O transportador da norepinefrina (NET) codificado pelo gene *SLC6A2* (*solute carrier family 6, member 2*) localiza-se no cromossoma 16q12.2 (Bruss et al., 1993), local de ação de vários antidepressivos e drogas de abuso, nomeadamente a cocaína (Sanders et al., 2005). Algumas evidências sugerem o gene *SLC6A2* como um possível candidato para a dependência alcoólica e nicotínica assim como, para o abuso de drogas ilícitas, relacionados com comportamentos de ansiedade e depressivos (Xu et al., 2009). Por exemplo, estudos de imagem cerebral têm sugerido que baixos níveis de expressão do NET estão associados com o alcoolismo e o tabaco (Huang et al., 2008; Danielson et al., 2011). Face ao exposto, é importante a realização de estudos genéticos com o intuito

de investigar uma eventual associação entre o gene *SLC6A2* e as dependências a drogas lícitas e ilícitas

1.6 Objectivos

As toxicodependências representam um grave problema social, quer pelas suas consequências ao nível de saúde pública quer pela criminalidade associada e o aumento da prevalência das toxicodependências a nível mundial tem vindo a revelar-se cada vez mais preocupante para a sociedade e para o próprio indivíduo. O sistema de recompensa, nomeadamente os sistemas dopaminérgico, serotoninérgico e noradrenérgico têm sido implicados na etiopatogenia das toxicodependências. Contudo, o papel das variantes genéticas VNTR, 5-HTTLPR e G1287A dos genes *SLC6A3*, *SLC6A4* e *SLC6A2*, respectivamente, na etiologia das toxicodependências permanece por esclarecer, particularmente na população portuguesa. Assim, face à grande heterogeneidade clínica e genética que caracteriza as toxicodependências pretende-se investigar uma eventual associação entre os genes mencionados e as toxicodependências na população portuguesa, numa amostra de doentes alcoólicos do sexo masculino com e sem historial de drogas lícitas ou ilícitas

2. Materiais e Métodos

2.1 Caracterização e critérios de diagnóstico da amostra

Os doentes alcoólicos do sexo masculino com comorbidades de drogas lícitas e ilícitas foram selecionados no Centro Regional de Alcoologia do Centro Maria Lucília Mercês de Melo, em Coimbra, e após o esclarecimento do estudo e a obtenção do consentimento informado por escrito, procedeu-se à colheita de sangue para os estudos genéticos. A definição do fenótipo é crucial para os estudos genéticos e o diagnóstico foi efetuado de acordo com os critérios internacionais para a dependência alcoólica da *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV)* e a *International Classification of Diseases (ICD-10)*, da Organização Mundial de Saúde (OMS). De um total de 2050 doentes alcoólicos, Caucasianos da população portuguesa, selecionou-se uma amostra de 633 doentes alcoólicos com e sem historial de drogas lícitas ou ilícitas (doentes alcoólicos = 285; doentes alcoólicos com historial de tabagismo= 284; doentes alcoólicos com historial de drogas ilícitas= 64), com idades compreendidas entre 26 e 77 anos. O estudo incluiu também uma amostra controlo do sexo masculino constituída por 275 indivíduos, selecionada na população geral sem antecedentes de doenças psiquiátricas ou drogas lícitas e ilícitas, com idades compreendidas entre 22 e 76 anos. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Centro Regional de Alcoologia do Centro Maria Lucília Mercês de Melo.

2.2 Extração do DNA genómico.

O DNA genómico pode ser extraído de qualquer tipo de tecido e fluído biológico a partir de células nucleadas. No entanto, o DNA obtido de sangue periférico é mais rentável (Dickinson et al., 2001; Richardson et al., 2006). Na literatura estão descritos diversos protocolos de extração de DNA genómico, nomeadamente o método enzimático, o não enzimático e o método do fenol-clorofórmio, entre outros. O método enzimático proposto por Miller em 1988, proporciona a obtenção de DNA genómico com elevado grau de pureza e com alto peso molecular. Como o próprio nome indica, este método faz uso de uma enzima, designada proteínase K que efectua a digestão proteica e inibe a ação das enzimas hidrolíticas (DNAses) que degradam o DNA. O uso de um detergente, o dodecil sulfato de sódio (SDS), promove a acção da proteínase K solubilizando os lípidos e desnaturando as proteínas, resultando na disrupção das

membranas celulares. O método referido apresenta algumas vantagens em detrimento dos outros métodos mencionados, pois este não faz uso de solventes orgânicos tóxicos que podem interferir com a amplificação do DNA no emparelhamento dos *primers* e inibir a actividade da *Taq* polimerase na técnica de *Polymerase chain reaction* (PCR), sendo esta uma técnica altamente sensível a contaminantes.

Neste estudo, o DNA genómico foi extraído de sangue total através do método enzimático descrito por Miller et al. (1988), modificado. As amostras de DNA foram obtidas de sangue periférico da população em estudo, utilizando tubos contendo o anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). A 10 ml de sangue adicionaram-se três volumes de solução tampão de lise de glóbulos vermelhos (155 mM NH_4Cl , 10 mM KHCO_3 e 1 mM $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH 7.4) (Sigma®), homogeneizou-se e incubou-se em gelo durante 20 minutos, seguido de uma centrifugação a 2500 rpm (Rotanta 460R, Hettich®), durante 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, desprezou-se o sobrenadante cuidadosamente, ressuspendeu-se o sedimento resultante em dois volumes de solução de lise de glóbulos vermelhos e centrifugou-se novamente a 2800 rpm (Rotanta 460R, Hettich®), durante 15 minutos a 4°C. Ao sedimento obtido desta segunda centrifugação e após a rejeição do sobrenadante, adicionaram-se 4 ml de solução tampão de lise de glóbulos brancos (10 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl e 2 mM $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH 8) (Sigma®), 350 μl de SDS a 10% (BioRad®), 30 μl de proteinase K (20 mg/ml) (Roche®) e incubou-se no *shaker* (Forma Orbital Shaker, Thermo®) com agitação constante a 37°C *overnight*. Depois da digestão enzimática, por acção da proteinase K, precipitaram-se as proteínas, adicionando-se 3 ml de uma solução saturada de NaCl 6 M (Sigma®) e centrifugou-se a 3750 rpm (Rotanta 460R, Hettich®), durante 30 minutos a 25°C. Ao sobrenadante resultante, adicionaram-se duas vezes o volume de etanol absoluto frio para precipitação do DNA. A temperatura interfere com a solubilidade do DNA, assim, quanto menor a temperatura, menor é a solubilidade do DNA, facilitando a sua separação. Por fim, o DNA foi lavado em etanol a 70% e adicionou-se Tris-EDTA (10 mM Tris-HCl e 2 mM $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH 7.4) (Sigma®). As amostras de DNA foram posteriormente incubadas na estufa *Incubator S160D* (Stuart Scientific®) em agitação constante a 37°C. Após total solubilização, as amostras foram armazenadas e conservadas a 4°C para posterior utilização.

2.3 Quantificação e determinação do grau de pureza do DNA.

O método mais utilizado para determinar a concentração do DNA obtido e estimar a sua pureza é o método espectrofotométrico. As proteínas apresentam uma absorção máxima num comprimento de onda de 280 nm e os nucleótidos num comprimento de onda de 260 nm, tendo em conta que uma unidade de $D.O_{260nm}$ corresponde a 50 $\mu\text{g/mL}$ de DNA de cadeia dupla (Sambrook et al., 1989). Após a extracção do DNA, a sua concentração, assim como os valores das absorvâncias a 260nm e 280nm e as respectivas razões foram obtidas por leitura no espectrofotômetro (*SmartSpecTM Plus Spectrophotometer*, BioRad®). Assim, a concentração de DNA é determinada segundo a seguinte fórmula:

$$[\text{DNA}]_{\mu\text{g/mL}} = D.O_{260 \text{ nm}} \times \text{Factor de Diluição} \times \text{Constante da dupla hélice}$$

A pureza do DNA isolado, é obtida através da relação da absorvância a 260nm e 280nm (razão $D.O_{260}/D.O_{280}$) (Wilfinger et al., 1997), cujos valores da razão se devem situar no intervalo 1,8 e 2,0 (Miller et al., 1988). Se a razão não estiver compreendida entre estes valores, poderá indicar a presença de proteínas abaixo de 1.8 e a presença de RNA acima de 2.

2.4 Genotipagem

2.4.1 Considerações gerais das técnicas

2.4.1.1 Amplificação do DNA

A amplificação do DNA é realizada pela técnica PCR, desenvolvida por Kary Mullis na década de 1980. Esta, revolucionou a genética molecular, permitindo a amplificação de pequenos fragmentos de DNA, sendo atualmente, uma das técnicas mais utilizadas na realização de sequenciação de genes, no diagnóstico de doenças genéticas, etc (Sambrook et al., 1989). É um método de elevada sensibilidade e especificidade devido ao uso de *primers* específicos para o gene ou região do DNA de interesse, originando milhões de cópias do fragmento alvo.

O processo da PCR traduz-se em três etapas distintas: desnaturação, hibridização ou *annealing* e extensão (figura 22), que se repetem em 30 a 40 ciclos no termociclador, sem intervenção manual.

Para efetuar uma reação de PCR são necessários os seguintes componentes: DNA molde, um par de *primers*, que são pequenas sequências oligonucleótídicas (18-24pb) complementares a cada uma das cadeias moldes conferindo especificidade, desoxinucleótidos trifosfatados (dGTP, dCTP, dATP e dTTP), *Taq* DNA polimerase, que possui a capacidade de resistir a altas temperaturas e efetua a ligação dos dNTPs ao DNA molde, catiões divalentes (magnésio ou íons de magnésio) que funcionam como co-fatores da *Taq* polimerase e uma solução tampão para manter o pH nas condições ideais.

Os parâmetros de otimização da reação de PCR são extremamente cruciais para o sucesso da amplificação do DNA e incluem, a alteração da concentração de magnésio (Mg^{2+}), dos tempos de desnaturação, *annealing* e extensão, da alteração da temperatura de *annealing* dos *primers* e da alteração da quantidade de DNA e da *Taq* DNA polimerase (Innis et al., 1990). Por vezes, a reação de PCR não é bem-sucedida devido ao baixo rendimento da sequência de DNA alvo e à obtenção de amplificação de bandas indesejáveis não específicas, principalmente quando o conteúdo de guanina e citosina (GC) na sequência alvo é elevado (Sambrook et al., 1989). As zonas ricas em GC são difíceis de amplificar e favorecem a formação de estruturas secundárias, que são reconhecidas pela *Taq* polimerase como locais de terminação, ocorrendo deste modo ampliações incompletas e resultando em produtos de PCR com múltiplas bandas. Assim, condições especiais são necessárias para contornar estas situações. A adição de pequenas quantidades de desoxi-7-deaza-guanosina trifosfato (7-deaza-dGTP) e dimetilsulfóxido (DMSO) à mistura da reação, diminuem a formação de estruturas secundárias e melhoram o rendimento da reação (Chakrabarti & Schutt, 2001; Musso et al., 2006).

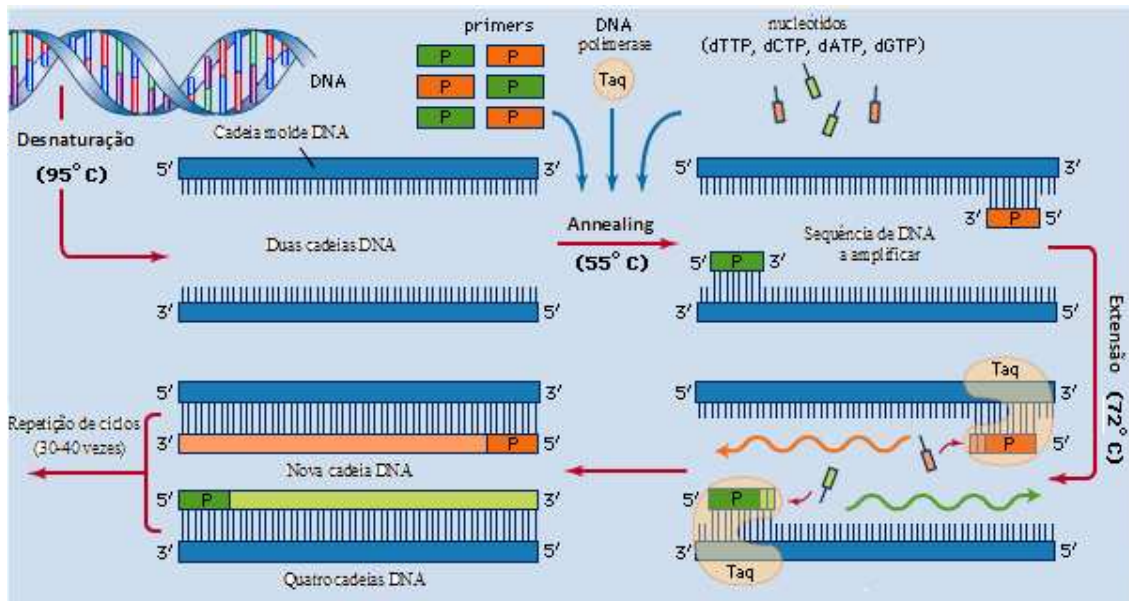


Figura 22: Representação das três etapas da PCR. Etapa 1: Desnaturação do DNA que consiste na separação da dupla cadeia de DNA através do calor a 95°C. Etapa 2: hibridização ou *annealing*, que se traduz no emparelhamento dos primers a cada uma das cadeia moldes de DNA, a uma temperatura que pode variar de 50-60°C. Etapa 3: extensão dos *primers* anelados por ação de uma DNA polimerase termoestável (*Taq* polimerase) a 72°C sintetizando uma nova molécula de DNA. Adaptado de: Anderson, (2010).

2.4.1.2 Digestão com enzimas de restrição

Após a PCR, os produtos amplificados são submetidos a uma digestão por endonucleases de restrição, previamente selecionadas a partir do local de restrição de interesse para o polimorfismo a ser analisado.

As enzimas de restrição são enzimas bacterianas que clivam as moléculas de DNA de cadeia dupla, em locais que apresentam uma determinada sequência específica de 4 a 6 nucleótidos. Estes locais são designados de locais de restrição que após a clivagem, geram fragmentos de DNA de diferentes tamanhos.

2.4.1.3 Electroforese em gel de agarose.

O produto amplificado e o produto digerido, são separados por electroforese em gel de agarose, de acordo com o seu tamanho e carga, por ação de um campo elétrico. A agarose é um polissacarídeo não tóxico, de fácil preparação e permite separar longos fragmentos de DNA (200 bp-50 kb) com diferentes concentrações. O tamanho dos poros do gel (definido pela concentração de agarose) é diretamente proporcional ao tamanho dos fragmentos que se pretendem separar, ou seja, quanto menor for a concentração do gel maior é a porosidade e assim, maior é o fragmento de DNA que poderá ser separado.

A mobilidade electroforética das amostras é afetada pela composição e a força iónica do tampão (Sambrook et al., 1989). O Tris-Acetato-EDTA (TAE) e o Tris-Borato-EDTA (TBE), são os tampões mais vulgarmente utilizados em electroforese, embora o TAE possua menor capacidade tamponante que o TBE. A pH neutro o DNA apresenta carga negativa devido aos grupos fosfatos, migrando deste modo em direcção ao polo positivo (cátodo). Às amostras e ao marcador de peso molecular, é adicionado um corante (*loading dye*) de forma a corar e aumentar a densidade das amostras e assim, permitir a visualização do percurso dos fragmentos durante a corrida electroforética. O marcador de peso molecular permite determinar o tamanho dos fragmentos de DNA.

As bandas resultantes da electroforese são visualizadas num sistema de imagem na presença de brometo de etídio, que intercala nas cadeias de DNA e imite fluorescência após exposição aos raios ultravioleta (UV).

2.4.2 Estudo dos genes candidatos

2.4.2.1 Polimorfismo VNTR 40-pb do gene *SLC6A3*

Para o estudo do polimorfismo VNTR de 40 pb da região não codificante 3'UTR do gene *SLC6A3*, a amplificação do DNA foi otimizada segundo o protocolo descrito por Vandenberg et al., (1992), utilizando os *primers* (Invitrogen®) *forward* (5'-TGTGGTGTAGGGAACGGCCTGAG-3') e *reverse* (5'-CTTCCTGGAGGTCACGGCTCAAGG-3'). A amplificação foi realizada num volume final de 25µl, contendo 75 ng de DNA genómico, 1X a solução tampão (Invitrogen®), 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs (Invitrogen®), 0,25 mM de cada *primer* (Invitrogen®), e 0,05 U/µl *Taq* polimerase (Invitrogen®). O protocolo de amplificação foi realizado num termociclador (GeneAmp® PCR System 9700, *Applied Biosystems*) num total de 30 ciclos. Após uma desnaturação inicial de 3 minutos a 94°C, cada ciclo consistiu em desnaturação a 93°C (60s), emparelhamento dos *primers* a 65°C (60s) e extensão da cadeia a 72°C (60s), seguida de uma extensão final a 72°C durante 5 minutos.

O produto amplificado foi corado com 5 µl de solução corante (*loading dye solution*; xileno cianol 0.025% (m/V) (Sigma®); azul bromofenol 0.025% (m/V) (Sigma®) e glicerol 30% (m/V) (Invitrogen®)) e colocado num gel de agarose a 3%, previamente corado com brometo de etídeo (10 mg/ml) (Bio-Rad®). Subsequentemente, procedeu-se à separação dos fragmentos por electroforese num

sistema horizontal (Bio-Rad®), contendo 1X o tampão TBE (89 mM Tris-base; 89 mM ácido bórico e 2 mM Na₂EDTA.2H₂O, pH 8) e a visualização dos mesmos, no sistema Gel DocTM EQ, (Bio-Rad®). O tamanho dos fragmentos foi determinado com base no número de pb específico de cada repetição descritos por Vandenberg et al. (1992) (Tabela I) e por comparação com o marcador de peso molecular Gene RulerTM 100 pb DNA ladder (MBI Fermentas®).

Tabela I- Número de cópias e respectivos tamanhos em pb dos fragmentos amplificados do VNTR de 40 pb do gene SLC6A3. Adaptado de Vandenberg et al. (1992).

Número de cópias VNTR (pb)
3 (200)
5 (280)
7 (360)
8 (400)
9 (440)
10 (480)
11 (520)

2.4.2.2 Polimorfismo 5-HTTLPR do gene SLC6A4

O protocolo de amplificação do DNA referente ao polimorfismo 5-HTTLPR de 44 pb, localizado na região promotora do gene *SLC6A4*, foi otimizado de acordo com as condições experimentais descritas por Mynett-Johnson et al. (2000). Para um volume final de 25 µl de reação, desnaturou-se 100 ng de DNA genômico a 95°C durante 5 minutos, e adicionou-se 1X a solução tampão (Invitrogen®), 1,5 mM MgCl₂ (Invitrogen®), 0,2mM dNTP's + 50% 7-deaza-dGTP (Invitrogen®), 1µM de cada *primer* (Invitrogen®), *forward* (5'-GGCGTTGCCGCTCTGAATGC-3') e *reverse* (5'-GAGGGACTGAGCTGGACAACCAC - 3'), 10% DMSO (Invitrogen®) e 0,04 U/µl *Taq* polimerase (Invitrogen®). As condições de amplificação da região de interesse consistiram em 40 ciclos. Cada ciclo foi realizado sob condições de desnaturação a 95°C, durante 30 segundos, emparelhamento dos *primers* a 61°C, durante 30 segundos e extensão da cadeia a 72°C, durante 60 segundos, finalizando com uma extensão final a 72°C durante 10 minutos (GeneAmp® PCR System 9700, *Applied Biosystems*).

Ao DNA amplificado adicionou-se 5 µl de solução corante (xileno cianol 0.025% (m/V) (Sigma®); azul bromofenol 0.025% (m/V) (Sigma®) e glicerol 30%

(m/V) (Invitrogen®)). Os fragmentos resultantes foram separados num gel de agarose a 2,5%, corado com brometo de etídio (10 mg/mL) (Bio-Rad®)

A electroforese decorreu num sistema de electroforese horizontal (Bio-Rad®) contendo 1X o tampão TBE (89 mM Tris-base; 89 mM ácido bórico e 2 mM Na₂EDTA.2H₂O, pH 8), a uma voltagem de 120V e o tamanho dos fragmentos visualizados no sistema Gel DocTM EQ, (Bio-Rad®) foram determinados por comparação com o marcador de peso molecular Gene RulerTM 100 pb DNA ladder (MBI Fermentas®)

2.4.2.3 Polimorfismo G1287A do gene *SLC6A2*

O polimorfismo G1287 do gene *SLC6A2*, localizado no exão 9, foi genotipado após otimização com base no protocolo descrito por Jonsson et al., (1998). O fragmento de 241 pb foi amplificado pela técnica PCR, num volume total de reação de 25 µl incluindo 50 ng de DNA genómico, 0,4 µM de cada *primer* (Invitrogen®) *forward* (5'-TCCAGGGAGACCCTAATTCC-3') e *reverse* (5'-TTGACTTTATTGAAATGCGGC-3'), 1X solução tampão (Invitrogen®), 1,5 mM MgCL₂ (Invitrogen®), 0,2 mM dNTPs (Invitrogen®) e 0,02 U/µl *Taq* polimerase (Invitrogen®).

As condições de amplificação consistiram numa desnaturação inicial do DNA durante 5 minutos a 94°C, seguida de 35 ciclos que incluíram a desnaturação a 94°C (30s), o emparelhamento dos *primers* a 57°C (30s) e a extensão da cadeia a 72°C (30s). Após o último ciclo, seguiu-se uma extensão final de 5 minutos a 72°C (GeneAmp® PCR System 9700, *Applied Biosystems*).

De forma avaliar se ocorreu amplificação, 5 µl do produto do PCR foi aplicado num gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio. O produto amplificado foi incubado com 5U da enzima de restrição *Sau96I* (New England BioLabs®) a 37°C *overnight*. Os fragmentos digeridos, previamente corados com 5 µl de solução corante (xileno cianol 0,025% (m/V) (Sigma®); azul bromofenol 0,025% (m/V) (Sigma®) e glicerol 30% (m/V) (Invitrogen®)), foram separados em gel de agarose Nusieve 3:1 (Karlson®) a 3%, contendo 1X o tampão TBE (89 mM Tris-base; 89 mM ácido bórico e 2 mM Na₂EDTA.2H₂O, pH 8) com uma voltagem de 110V, num sistema horizontal (Bio-Rad®). Posteriormente, os alelos foram visualizados no sistema Gel DocTM EQ, (Bio-Rad®) e os tamanhos foram determinados por comparação com o marcador de peso molecular Gene RulerTM 100 pb DNA ladder (MBI Fermentas®)

2.5 Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados com o *Primer of Biostatistics program* (versão 3.01) (Glantz, 1992). A amostra total de 908 indivíduos (633 doentes alcoólicos com e sem historial de drogas lícitas ou ilícitas; 275 controlos sem antecedentes de doenças psiquiátricas ou drogas lícitas e ilícitas) foi fragmentada e a comparação da distribuição dos genótipos e dos alelos nos diferentes grupos foi efetuada recorrendo a tabelas de contingência utilizando o Qui-quadrado. Para valores de $p < 0,05$ os resultados foram considerados estatisticamente significativos. Procedeu-se à análise dos genótipos e alelos comparando: 1) uma amostra de doentes alcoólicos versus controlos; 2) uma amostra de doentes alcoólicos versus doentes alcoólicos com historial de tabagismo; e 3) uma amostra de doentes alcoólicos versus doentes alcoólicos com historial de drogas ilícitas.

3. Resultados e discussão

3.1 Análise do polimorfismo VNTR do gene *SLC6A3*

O gene *SLC6A3* localiza-se no braço curto (p15.3) do cromossoma 5 (Vandenbergh et al., 1992) e é constituído por 15 exões e 14 intrões (Donovan et al., 1995). A variante genética VNTR de 40 pb no gene *SLC6A3* localizada na região 3'UTR está representada na Figura 23 (Vandebergh et al., 1992).

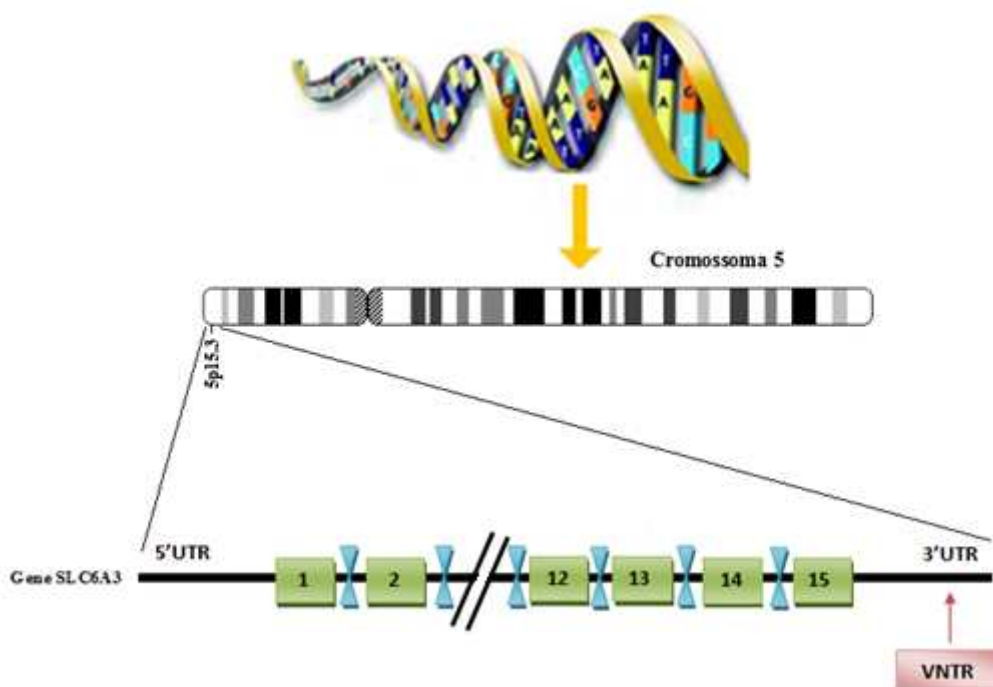


Figura 23: Representação esquemática da estrutura do gene *SLC6A3* com a localização do polimorfismo VNTR na região 3'UTR. Legenda da figura: 1 a 15- exões do gene, 'UTR- (*Untranslated Region*), - intrões do gene.

Para investigar a variante genética do gene *SLC6A3*, amplificou-se o DNA genómico segundo a metodologia descrita em 2.4.2.1 de Materiais e Métodos do capítulo 2 e o perfil electroforético está representado na Figura 24.

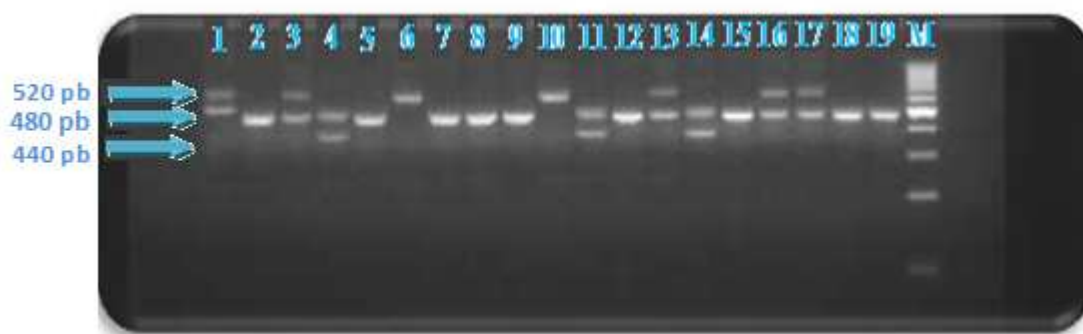


Figura 24: Imagem electroforética dos segmentos de DNA amplificados, referentes ao polimorfismo VNTR da região 3'UTR do gene *SLC6A3*, em gel de agarose a 3%. Legenda da figura: 1, 3, 13, 16 e 17- amostras heterozigóticas para as repetições 10 (480 pb) e 11 (520 pb) nº de cópias. 2, 5, 7, 8, 9, 12, 15, 18 e 19- amostras homozigóticas para a repetição de 10 (480 pb) nº de cópias. 4, 11 e 14- amostras heterozigóticas correspondentes as repetições de 9 (440 pb) e 10 (480 pb) nº de cópias. 6 e 10- amostras homozigóticas para a repetição de 11 (520 pb) nº de cópias. M- marcador de peso molecular *Gene Ruler™ 100 pb DNA ladder* (MBI Fermentas®).

A análise da distribuição genotípica e alélica, referente ao polimorfismo VNTR de 40 pb do gene *SLC6A3*, esta representada na Tabela II e a análise estatística revelou uma associação entre o alcoolismo e o gene *SLC6A3*, para o genótipo ($X^2 = 11,308$; $df=3$; $p= 0,013$), o que parece sugerir que o polimorfismo VNTR de 40 pb está envolvido na pré-disposição ao alcoolismo, na população portuguesa, apesar destes resultados carecerem de replicação. Os nossos resultados estão de acordo com estudos realizados em várias populações caucasianas de diferentes áreas geográficas (Lin & Xu, 2011).

Contrariamente, os resultados referentes à distribuição alélica foram negativos ($X^2= 2,666$; $df= 2$; $p= 0,264$). De facto, a disponibilidade e a funcionalidade do DAT no cérebro podem estar dependentes de variantes genéticas. Dos vários *repeats* do polimorfismo VNTR de 40 pb os alelos 9 e 10 são os mais frequentes na maioria das populações humanas (Vandebergh et al., 1992; vanNess et al., 2005; Lin & Xu, 2011). Similarmente, no nosso estudo também se verificou que os alelos 9 e 10 são os mais comuns na população portuguesa (Tabela II).

Tabela II: Distribuição genotípica e alélica, com as respetivas frequências, do polimorfismo VNTR do gene *SLC6A3* em doentes alcoólicos com comorbidade de drogas ilícitas e lícitas (tabaco) e controlos.

	Genótipos (%)				Alelos (%)		
	9,9	9,10	10,10	Raros*	9	10	Raros**
Alcoolismo	59 (10,1)	247 (42,1)	248 (42,2)	33 (5,6)	378 (32,2)	760 (64,7)	36 (3,1)
Controlos	29 (12,3)	71 (30,2)	124 (52,8)	11 (4,7)	134 (28,5)	324 (68,9)	12 (2,6)
	$X^2 = 11,308$; $df = 3$; $p = 0,013$				$X^2 = 2,666$; $df = 2$; $p = 0,264$		

*Genótipos raros: 3,10; 2,9; 9,11; 3,9; 10,11; 7,7; 8,10; 5,9; 5,10.

**Alelos raros: 3,2, 11, 7, 8, 5.

Devido à localização do polimorfismo na região 3'UTR do gene, as variantes alélicas não resultam em alterações funcionais e estruturais do transportador. No entanto, podem afetar a estabilidade do mRNA e a regulação da síntese da proteína, alterando os níveis de expressão (VanNess et al., 2005; Xu & Lin, 2011). Por exemplo, vários estudos demonstraram que o alelo 9 conduz a uma menor expressão do DAT (Vandenbergh et al., 1992; Heinz et al., 2000; vanDyck et al., 2005), o que implica um aumento da DA livre na fenda sináptica, que por conseguinte leva ao reforço e a intensificação do consumo da substância.

No sentido de se investigar uma eventual associação entre o polimorfismo VNTR de 40 pb do gene *SLC6A3* e as drogas ilícitas, procedeu-se a análise estatística comparando uma amostra de doentes alcoólicos com historial de droga ilícitas versus doentes alcoólicos, e os resultados obtidos não revelaram associação para o genótipo ($X^2 = 4,961$; $df = 3$; $p = 0,232$) (Tabela III). No entanto, relativamente à distribuição alélica, detetou-se associação entre a dependência de drogas ilícitas ($X^2 = 7,456$; $df = 2$; $p = 0,024$) e o polimorfismo VNTR de 40 pb do gene *SLC6A3*, o que parece sugerir que este polimorfismo é um fator de risco para na população portuguesa. Face aos resultados apresentados na Tabela III, verificou-se que o genótipo 9,10 (49,3%) é mais frequente no grupo referente aos doentes alcoólicos com comorbidade de drogas ilícitas e que o alelo 10 (54,3%) é predominante nos doentes alcoólicos com comorbidade de drogas ilícitas. A associação detetada neste estudo entre o gene *SLC6A3* e a dependência de

drogas ilícitas não esta de acordo com os resultados apresentados por Gelernter et al. (2004) e Persico et al. (1993).

Tabela III: Distribuição genotípica e alélica, com as respetivas frequências, do polimorfismo VNTR do gene *SLC6A3* em doentes alcoólicos com ou sem comorbidade de drogas ilícitas.

	Genótipos				Alelos		
	(%)				(%)		
	9,9	9,10	10,10	Raros*	9	10	Raros**
Alcoolismo+Drogas ilícitas	11 (15,9)	34 (49,3)	19 (27,5)	5 (8,7)	57 (41,3)	75 (54,3)	6 (4,3)
Alcoolismo	6 (8,5)	31 (43,7)	31 (43,7)	3 (4,2)	43 (31,4)	93 (67,9)	1 (0,7)
	$X^2 = 4,961$; $df = 3$; $p = 0,232$				$X^2 = 7,456$; $df = 2$; $p = 0,024$		

*Genótipos raros: 8,8; 7,10; 10,11; 7,9.

**Alelos raros 8, 7, 11.

Procedeu-se também à análise estatística comparando uma amostra de doentes alcoólicos com historial de tabagismo versus uma amostra de doentes alcoólicos e os resultados obtidos referentes à distribuição genotípica ($X^2 = 0,777$; $df = 3$; $p = 1,000$) e alélica ($X^2 = 0,105$; $df = 2$; $p = 0,949$) do gene *SLC6A3* são negativos (Tabela IV).

Tabela IV: Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo VNTR do gene *SLC6A3* em doentes alcoólicos fumadores e não fumadores.

	Genótipos (%)				Alelos (%)		
	9,9	9,10	10,10	Raros*	9	10	Raros**
Alcoolismo+Tabagismo	21 (8,8)	103 (43,1)	103 (43,1)	12 (5,02)	149 (31,2)	316 (66,1)	13 (2,7)
Alcoolismo	27 (9,7)	110 (39,4)	126 (45,2)	16 (5,7)	172 (30,8)	369 (66,1)	17 (3,0)
	$X^2 = 0,777$; $df = 3$; $p = 1,000$				$X^2 = 0,105$; $df = 2$; $p = 0,949$		

*Genótipos raros: 10,11; 9;11; 5,10; 2,3.

**Alelos raros: 11; 5, 2, 3.

Com base nos resultados obtidos podemos inferir que o gene *SLC6A3* está implicado na etiologia do alcoolismo e na dependência de drogas ilícitas, na população estudada. É importante referir que apesar deste polimorfismo ter sido investigado em

várias populações mundiais, com o intuito de tentar esclarecer o eventual papel deste na etiologia das toxicodependências, os resultados são inconclusivos (Samochowiec et al., 2006; Xu & Lin, 2011; Costa et al., 2011), carecendo de estudos adicionais com amostras maiores e em outras populações que ainda não tenham sido estudadas.

3.1 Análise do polimorfismo 5-HTTLPR do gene *SLC6A4*

O gene *SLC6A4* que codifica o transportador da serotonina, localiza-se no braço longo (q11.2) (Ramamoorthy et al., 1993) (Figura 25). O polimorfismo em estudo (5-HTTLPR) situa-se na região promotora do gene *SLC6A4* e caracteriza-se pela presença de duas formas alélicas, a variante longa (L) e a variante curta (S) (Figura 25) (Heils et al., 1996).

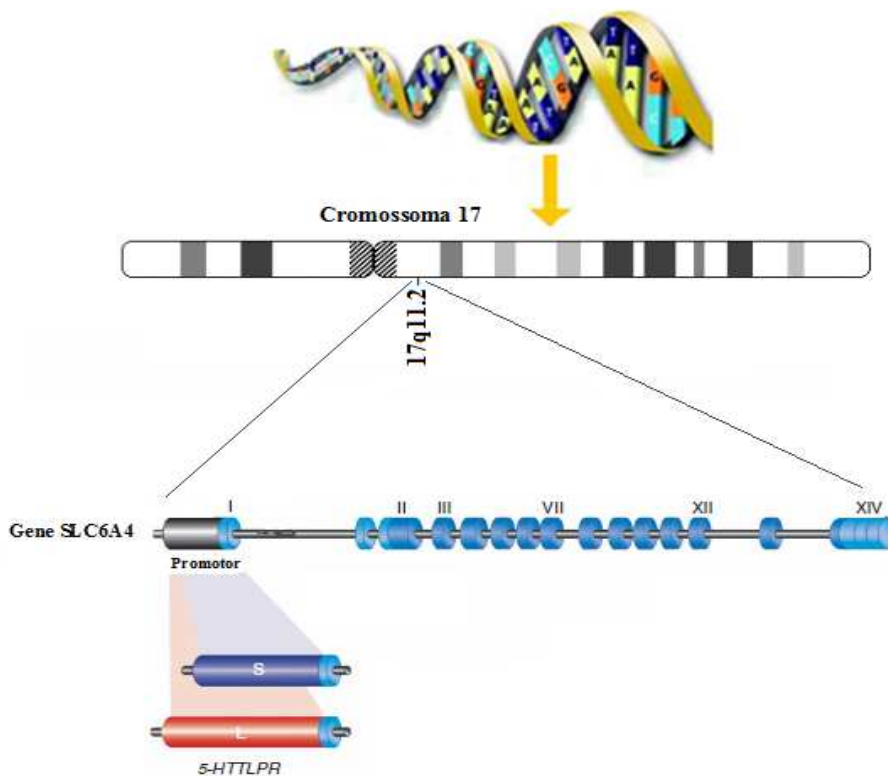


Figura 25: Representação esquemática da estrutura do gene *SLC6A4* com a localização do polimorfismo 5-HTTLPR na região promotora do gene. Legenda da figura: I a XIV- Exões, S- variação alélica curta, L- variação alélica longa. Adaptado de Canli & Lesch, (2007).

O polimorfismo 5-HTTLPR foi genotipado de acordo com as condições descritas em 2.4.2.2 do capítulo 2 de Materiais e Métodos. Na Figura 26 está representado o perfil electroforético dos produtos amplificados pela PCR.

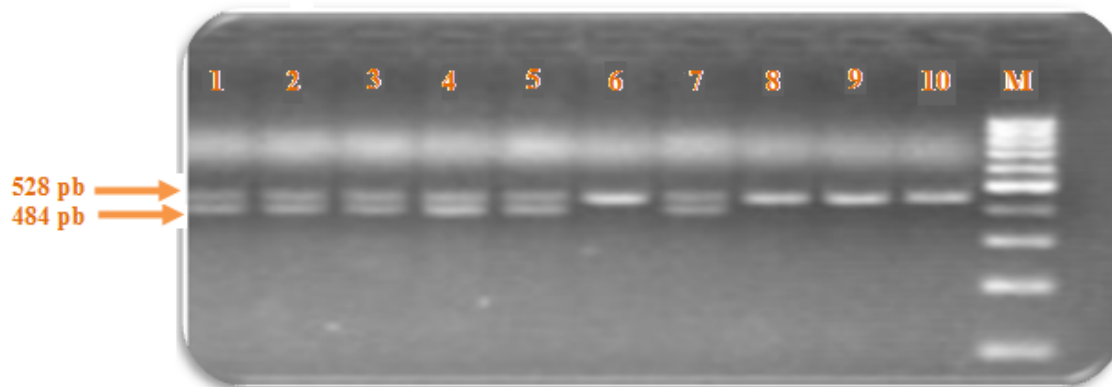


Figura 26: Imagem electroforética dos segmentos de DNA amplificados, referentes ao polimorfismo 5-HTTLPR da região promotora do gene *SLC6A4*, em gel de agarose a 2,5 %. Legenda da figura: 1, 2, 3, 4, 5 e 7- indivíduos heterozigóticos para as variantes S (484 pb) e L (528 pb) . 6, 8, 9 e 10- indivíduos homozigóticos para a variante L (528 pb). M- marcador de peso molecular *Gene Ruler™ 100 pb DNA ladder* (MBI Fermentas®).

Os resultados referentes à análise do polimorfismo 5-HTTLPR do gene *SLC6A4* em doentes alcoólicos e controlos, doentes alcoólicos com e sem historial de drogas ilícitas estão representados na Tabela V e VI, respetivamente. Estes, não revelaram diferenças estatisticamente significativas para os diferentes grupos, quer para o genótipo ($X^2= 0,373$; $df=2$; $p= 0,830$), ($X^2=0,991$; $df =2$; $p= 0,609$) quer para o alelo ($X^2= 0,001$; $df=1$; $p= 0,961$), ($X^2= 0,242$; $df=1$; $p= 0,623$).

No entanto, verificou-se um aumento da percentagem do genótipo L/L em doentes alcoólicos e doentes alcoólicos com historial de drogas ilícitas comparativamente com o genótipo S/S. Similarmente, os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com os efectuados nas populações alemã, Afro-Americana e Japonesa (Kohnk et al. (2006) e Gelernter et al. (1997)). No entanto, os resultados não estão de acordo com estudos nos quais foi encontrada associação entre o gene *SLC6A4* com o alcoolismo (Feinn et al., 2005; Lichterman et al., 2000).

Tabela V: Distribuição genotípica e alélica, com as respectivas frequências, do polimorfismo 5-HTTLPR do gene *SLC6A4* em doentes alcoólicos com comorbidades e controles.

	Genótipos (%)			Alelos (%)	
	L/L	S/L	S/S	L	S
Alcoolismo	193 (34,5)	282 (50,4)	85 (15,2)	668 (59,6)	452 (40,4)
Controlos	95 (33,5)	149 (52,5)	40 (14,1)	339 (59,7)	229 (40,3)
	$X^2=0,373$; $df=2$; $p=0,830$			$X^2=0,001$; $df=1$; $p=0,961$	

Tabela VI: Distribuição genotípica e alélica, com as respectivas frequências, do polimorfismo 5-HTTLPR do gene *SLC6A4* em doentes alcoólicos com ou sem comorbidade de drogas ilícitas.

	Genótipos (%)			Alelos (%)	
	L/L	S/L	S/S	L	S
Alcoolismo+	25	32	13	82	58
Drogas ilícitas	(35,7)	(45,7)	(18,6)	(58,6)	(41,4)
Alcoolismo	15 (27,8)	29 (53,7)	10 (18,5)	59 (54,6)	49 (45,4)
	$X^2=0,991$; $df=2$; $p=0,609$			$X^2=0,242$; $df=1$; $p=0,623$	

Analisando os dados referentes aos casos de alcoolismo com historial de tabagismo e alcoolismo sem historial de tabagismo representados na Tabela VII, não se detetaram diferenças estatisticamente significativas na distribuição alélica ($X^2=0,775$; $df=1$; $p=0,382$). No entanto, uma associação positiva entre a dependência tabágica e o gene *SLC6A4* foi detetada para o genótipo ($X^2=7,390$; $df=2$; $p=0,025$), sugerindo que o polimorfismo 5-HTTLPR poderá desempenhar um papel importante na etiologia da dependência tabágica na população portuguesa. Os nossos resultados estão de acordo com os resultados obtidos em diferentes populações mundiais (Ishikawa et al., 1999; Hu et al., 2000; Lerman et al., 2000; Kremer et al., 2005; Gerra et al., 2005; Chu et al., 2009; Nilsson et al., 2009).

Tabela VII: Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo 5-HTTLPR do gene *SLC6A4* em doentes alcoólicos fumadores e não fumadores.

	Genótipos (%)			Alelos (%)	
	L/L	S/L	S/S	L	S
Alcoolismo +	61	122	27	244	176
Tabagismo	(29,0)	(58,1)	(12,9)	(58,1)	(41,9)
Alcoolismo	107	128	45	342	218
	(38,2)	(45,7)	(16,1)	(61,1)	(38,9)
	$X^2= 7,390$; $df=2$; $p= 0,025$			$X^2= 0,775$; $df= 1$; $p= 0,382$	

Os resultados obtidos são importantes uma vez que uma variação genética na região promotora do gene, acarretando repercussões a nível da transcrição, da alteração dos níveis de mRNA e da proteína, resultando numa expressão e função diferencial do gene (Watanabe et al., 2011).

3.1 Análise do polimorfismo G1287A do gene *SLC6A2*

O gene *SLC6A2* que codifica o transportador da norepinefrina, responsável pela regulação da norepinefrina nas sinapses, é constituído por 14 exões e 13 intrões (Porzgen et al., 1995). Para o estudo do polimorfismo G1287A do gene *SLC6A2*, localizado no exão 9, resultante da substituição de uma guanina (G) por uma adenina (A) (Figura 27), procedeu-se à amplificação do DNA genómico, segundo a metodologia descrita em 2.4.2.2 do capítulo 2 de Materiais e Métodos.

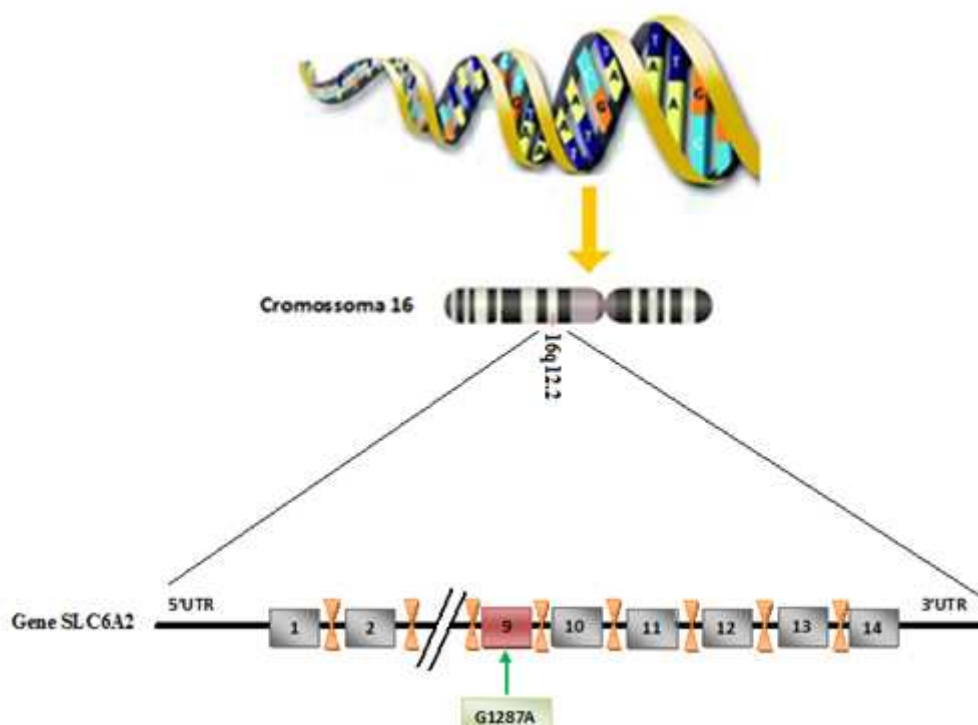



Figura 27: Representação esquemática da estrutura do gene *SLC6A2* com a localização do polimorfismo G1287A no exão 9 do gene. Legenda da figura: 1 a 14- exões do gene, 'UTR- (*Untranslated Region*), - intrões do gene.

O segmento de 241 pb foi amplificado pela técnica PCR e o perfil electroforético está representado na Figura 28.



Figura 28: Imagem electroforética dos segmentos de DNA amplificados, referentes ao polimorfismo G1287A no exão 9 do gene *SLC6A2*, em gel de agarose a 2%. Legenda da figura: 1 a 6- bandas de amplificação de 241 pb das amostras de DNA estudadas. 7- Controle negativo da reacção de amplificação. M- marcador de peso molecular *Gene Ruler™ 100 pb DNA ladder* (MBI Fermentas®).

Os produtos amplificados foram digeridos com a enzima de restrição *Sau96I*, segundo as condições descritas em 2.4.2.2 do capítulo 2 de Materiais e Métodos. A digestão revelou a existência de bandas com peso molecular de 113+76+31+21 pb que correspondem a indivíduos homozigóticos *wild-type* (GG), fragmentos de 113+97+31 pb que correspondem a indivíduos homozigóticos para o alelo mutante (AA) e bandas de 113+76+97+31+21 pb referentes a indivíduos heterozigóticos (GA) (Figura 29). A clivagem de locais não polimórficos produz fragmentos constantes de 113 pb e 31 pb.

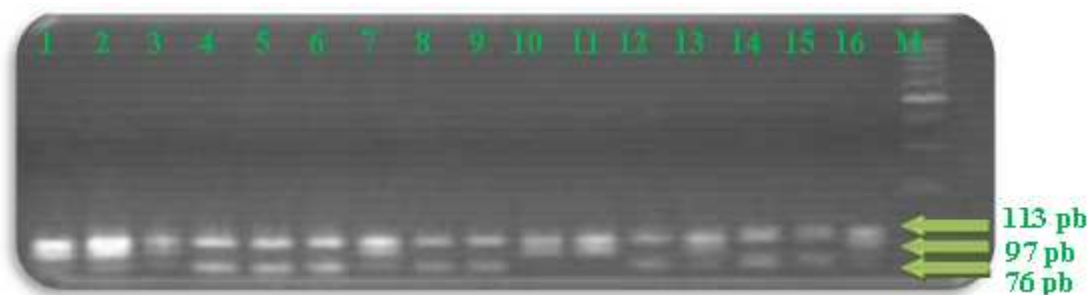


Figura 29: Electroforese dos produtos obtidos após a digestão com a enzima *Sal 96I*, referentes ao polimorfismo G1287A do gene *SLC6A2*. Os produtos digeridos foram separados em gel Nusieve 3:1 a 3%. Legenda da figura: 1, 2, 3, 7, 13 e 16- heterozigóticos (GA); 4, 5, 6, 8, 9, 12, 14 e 15- homozigóticos *wild-type* (GG); 10 e 11- homozigóticos (AA); M- marcador - marcador de peso molecular *Gene Ruler™ 100 pb DNA ladder* (MBI Fermentas®).

Na Tabela VIII estão representados os genótipos e as frequências alélicas referentes ao gene *SLC6A2* obtidas de uma amostra de doentes alcoólicos e controlos. A análise estatística referente ao genótipo revelou associação entre o alcoolismo e o gene *SLC6A2* na população portuguesa ($X^2= 15,609$; $df= 2$; $p= 0,000$). Estes resultados não estão de acordo com os resultados obtidos nas populações caucasianas e chinesas (Samochowiec et al., 2002; Huang et al., 2008). Relativamente à frequência alélica, não se detetaram diferenças estatisticamente significativas entre a amostra de doentes alcoólicos e a amostra controlos ($X^2= 0,015$; $df= 1$; $p= 0,902$). Contudo verificou-se que o alelo G é mais frequente em alcoólicos (67%), estando este resultado de acordo com outros estudos nos quais o alelo G também foi mais frequente no grupo de doentes alcoólicos da população chinesa e caucasiana (Samochowiec et al., 2002; Huang et al., 2008).

Tabela VIII: Distribuição genotípica e alélica, com as respectivas frequências, do polimorfismo G1287A do gene *SLC6A2* em doentes alcoólicos com comorbidade de drogas ilícitas e lícitas (tabaco) e controlos.

	Genótipos (%)			Alelos (%)	
	A,A	A,G	G,G	A	G
Alcoolismo	87 (15,2)	203 (35,5)	282 (49,3)	377 (32,9)	767 (67,0)
Controlos	24 (8,9)	131 (48,9)	113 (42,2)	179 (33,4)	357 (66,6)
	$X^2= 15,609$; df= 2; p= 0,000			$X^2= 0,015$; df= 1; p= 0,902	

Uma vez que o gene *SLC6A2* esta implicado em comportamentos depressivos e de ansiedade que por sua vez, estão envolvidos no abuso de drogas, propôs-se o estudo de averiguar o eventual papel deste gene numa amostra de alcoólicos com e sem historial de drogas ilícitas. Analisando os resultados estatísticos, não foi revelada associação entre o gene e a dependência a drogas ilícitas quer para os génotipos ($X^2= 4,571$; df = 2; p= 0,102) quer para os alelos ($X^2= 2,118$; df= 1; p= 0,146). Este estudo carece de ser replicado em outras populações.

Tabela IX: Distribuição genotípica e alélica, com as respectivas frequências, do polimorfismo G1287A do gene *SLC6A2* em doentes alcoólicos com ou sem comorbidade de drogas ilícitas.

	Genótipos (%)			Alelos (%)	
	A,A	A,G	G,G	A	G
Alcoolismo + Drogas ilícitas	6 (8,6)	22 (31,4)	42 (60,0)	34 (24,3)	106 (75,7)
Alcoolismo	6 (8,6)	34 (48,6)	30 (42,9)	46 (32,9)	94 (67,1)
	$X^2= 4,571$; df = 2; p= 0,102			$X^2= 2,118$; df= 1; p= 0,146	

Os hábitos tabágicos também foram averiguados na população portuguesa, revelando associação genotípica e alélica entre o gene *SLC6A2* e a dependência ao tabaco (Tabela X). Em relação as frequências alélicas, verificou-se um aumento do alelo G em fumadores (70,4%) comparativamente com os controlos (60,4%).

Tabela X: Distribuição genotípica e alélica do polimorfismo G1287A do gene *SLC6A2* em doentes alcoólicos fumadores e não fumadores.

	Genótipos (%)			Alelos (%)	
	A,A	A,G	G,G	A	G
Alcoolismo +	20	121	131	161	383
Tabagismo	(7,4)	(44,5)	(48,2)	(29,6)	(70,4)
Alcoolismo	61	60	109	182	278
	(26,5)	(26,1)	(47,4)	(39,6)	(60,4)
	X ² = 40,094; df= 2; p= 0,000			X ² = 10,575; df= 1; p= 0,001	

No seu conjunto os resultados obtidos, apesar de carecerem de replicação implicam o gene *SLC6A2* na etiologia quer da dependência alcoólica quer da dependência tabágica, na população portuguesa. O polimorfismo G1287A do gene *SLC6A2*, que não resulta numa alteração da sequência de aminoácidos, no entanto quando em *linkage desequilibrium* com outro polimorfismo no mesmo gene poderá ter repercussões ao nível da estrutura do NET, que por sua vez poderá interferir com a recaptação da NE da fenda sináptica.

4. Conclusões

Neste trabalho, utilizando a estratégia do gene candidato, investigou-se uma eventual associação entre os polimorfismos VNTR de 40 pb, 5-HTTLPR e G1287A dos genes *SLC6A3*, *SLC6A4*, *SLC6A2*, respectivamente, na etiologia das toxicodependências.

Relativamente ao polimorfismo VNTR de 40 pb do gene *SLC6A3*, os resultados obtidos revelaram associação quer para o alcoolismo quer para a dependência de drogas ilícitas. Estes resultados sugerem que o polimorfismo VNTR de 40 pb poderá desempenhar um papel importante na etiologia do alcoolismo e na dependência de drogas ilícitas, na população estudada.

No que se refere ao polimorfismo 5-HTTLPR do gene *SLC6A4* não se observou associação tanto para o alcoolismo como para as drogas ilícitas, contudo observou-se uma associação entre o gene *SLC6A4* e a dependência ao tabaco, sugerindo que o polimorfismo 5-HTTLPR poderá eventualmente ser um fator de risco para a dependência tabágica na população portuguesa.

Em relação ao gene *SLC6A2*, os resultados obtidos permitem inferir que o polimorfismo G1287A desempenha um papel *minor* na etiologia quer do alcoolismo quer da dependência tabágica na população portuguesa.

Resumindo, apesar dos resultados obtidos carecerem de replicação, são cruciais para o desenvolvimento de estratégias de prevenção e tratamento, permitindo também identificar precocemente indivíduos em risco, contribuindo deste modo, para uma diminuição do número de vítimas de toxicod dependência.

Referências Bibliográficas

- Aderson P.** (2010). *The Polymerase Chain Reaction (PCR): Cloning DNA in the Test Tube*. St. Rosemary Educational Institution.
- Becker H.C.** (2008). *Alcohol Dependence, Withdrawal, and Relapse*. *Alcohol Research & Health* 31:348-361.
- Berger M., Gray J.A., Roth B.L.** (2009). *The expanded biology of serotonin*. *Annual Review of Medicine* 60:355-366.
- Bierut L.J.** (2011). *Genetic vulnerability and susceptibility to substance dependence*. *Neuron* 69:618-627.
- Botstein D., Withe R. L., Skolnick M., Davis W.** (1980). *Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms*. *American Journal Human Genetics* 32:314-331.
- Burmeister M.** (1999). *Basic concepts in the study of diseases with complex genetics*. *Biological Psychiatry* 45:52-532.
- Burton P.R., Tobin M.D., Hopper J.L.** (2005). *Key concepts in genetic epidemiology*. *Lancet* 366:941-951.
- Breese G.R., Sinha R., Heilig M.** (2011). *Chronic alcohol neuroadaptation and stress contribute to susceptibility for alcohol craving and relapse*. *Pharmacology & therapeutics* 129:149-171.
- Bruss M., Kunz J., Lingen B., Bonisch H.** (1993). *Chromosomal mapping of the human gene for the tricyclic antidepressant-sensitive noradrenaline transporter*. *Human Genetics* 91:278-280.
- Camí J. & Farré M.** (2003). *Mechanisms of disease. Drug addiction*. *New England Journal of Medicine* 349:975-986.
- Canli T. & Lesch K.P.** (2007). *Long story short: the serotonin transporter in emotion regulation and social cognition*. *Nature Neuroscience* 10:1103-1109.
- Chakrabarti R. & Schutt C.E.** (2001). *The enhancement of PCR amplification by low molecular –weight sulfones*. *Gene* 274:293-298.
- Chastain G.** (2006). *Alcohol, neurotransmitter systems and behavior*. *Journal of General Psychology* 133:329-335.

- Chen B.T.**, Hopf F.W., Bonci A. (2010). *Synaptic plasticity in the mesolimbic system: therapeutic implication for substance abuse*. Annals of the New York Academy of Sciences 1187:129-139.
- Chu S.L.**, Xiao D., Wang C., Jing H. (2009). *Association between 5-hydroxytryptamine transporter gene-linked polymorphic region and smoking behavior in Chinese males*. Chinese Medical Journal 122:1365-1368.
- Clapp P.**, Bhave S.V., Hoffman P.L. (2008). *How Adaptation of the brain to alcohol leads to dependence. A pharmacological perspective*. Alcohol Research & Health 31:310-339.
- Collins F. S.**, Patrinos A., Jordan E., Chakravarti A., Gesteland R., Walters L. (1998). *New goals for the U.S. Human Genome Project: 1998-2003*. Science 282:682-689.
- Costa A.**, Riedel M., Muller U., Moller H.J., Ettinger U. (2011). *Relationship between SLC6A3 genotype and striatal dopamine transporter availability: a meta-analysis of human single photon emission computed tomography studies*. Synapse 65:998-1005.
- Danielson K.**, Truman P., Kivell B.M. (2011). *The effects of nicotine and cigarette smoke on the monoamine transporters*. Synapse 65:866-879.
- Daubet E.A.** & Barry G.C. (2010). *Serotonin: a regulatory of neuronal morphology and circuitry*. Trends in Neurosciences 33:424-434.
- Degenhardt L.** & Hall W. (2012). *Extent of illicit drug use and dependence, and their contribution to the global burden of disease*. Lancet 379:55-70.
- Dickinson J.L.**, Sale M.M., Craig J.E., Mackey D.A. (2001). *Laboratory methods in ophthalmic genetics: obtaining DNA from patients*. Ophthalmic Genetics 22:49-60.
- Donovan D.M.**, Vandenberg D.J., Perry M.P., Bird G.S., Ingersoll R., Nanthakumar E., Uhl G.R. (1995). *Human and mouse dopamine transporter genes: conservation of 5'-flanking sequence elements and gene structures*. Brain Research Molecular Brain Research 30:327-335.
- Ellsworth D.L.** & Manolio T.A. (1999). *The emerging importance of genetics in epidemiological research. I. basic concepts in human genetics and laboratory technology*. Annals of Epidemiology 9:1-16.

- Elsworth J.D.** & Roth R.H. (1997). *Dopamine synthesis, uptake, metabolism, and receptors: relevance to gene therapy of Parkinson's disease*. *Experimental Neurology* 144:4-9.
- EMCDDA**, 2011. *Annual report on the state of the drugs problem in Europe 2011*. European Monitoring Center for Drugs and Drug Addiction. Luxembourg.
- Enoch M.A.**, Gorodetsky E., Hodgkinson C., Roy A., Goldman D. (2011). *Functional genetic variants that increase synaptic serotonin and 5-HT₃ receptor sensitivity predict alcohol and drug dependence*. *Molecular Psychiatry* 16:1139-46.
- Enoch M.A.** (2012). *The influence of gene-environment interactions on the development of alcoholism and drug dependence*. *Current Psychiatry Reports* 14:150-158.
- Estivill X.** & Armengol L. (2007). Copy number variants and common disorders: filling the gaps and exploring complexity in genome-wide association studies. *PLoS Genetics* 3:1787-1799.
- Gelernter J.** & Kranzler H.R. (2009). *Genetics of alcohol dependence*. *Human Genetics* 126:91-99.
- Gerretsen P.**, Muller D.J., Tiwari A., Mamo D., Pollock B.G. (2009). *The intersection of pharmacology, imaging, and genetics in the development of personalized medicine*. *Dialogues in Clinical Neuroscience* 11:363-376.
- Gilpin N.W.** & Koob G.F. (2009). *Neurobiology of alcohol dependence: focus on motivational mechanisms*. *Alcohol Research Health* 31:185-195.
- Gold M.S.** & Gerrer R.A. (2010). *Pharmacological Drug Effects on Brain and Behavior in Principles of Addiction and the Law*. [ed.] Norman S. Miller. First Edition. Elsevier Inc.
- Gonzalez R.A.**, Job M.O., Doyon W.M. (2004). *The role of mesolimbic dopamine in the development and maintenance of ethanol reinforcement*. *Pharmacology and Therapeutics* 103:121-146.
- Hahn M.K.** & Blakely R.D. (2002). *Monoamine transporter gene structure and polymorphisms in relation to psychiatric and other complex disorders*. *Pharmacogenomics Journal* 2:217-235.
- Hartz S.M.** & Bierut L.J. (2010). *Genetics of addictions*. *The Psychiatry Clinics of North America* 33:107-124.

- Heils A.**, Teufel A., Petri S., Stober G., Riederer P., Bengel D., Lesch K.P. (1996). *Allelic variation of human serotonin transporter gene expression*. *Journal of Neurochemistry* 66:2621-2624.
- Heinz A.**, Goldman D., Jones D.W., Palmour R., Hommer D., Gorey J.G., Lee K.S., Linnoila M., Weinberger D.R. (2000). *Genotype influences in vivo dopamine transporter availability in human striatum*. *Neuropsychopharmacology* 22:133–139.
- Heinz A.J.**, Beck A., Meyer-Lindenberg A., Sterzer P., Heinz A. (2011). *Cognitive and neurobiological mechanisms of alcohol-related aggression*. *Nature Reviews Neuroscience* 12:400-413.
- Herman A.I.**, Conner T.S., Anton R.F., Gelernter J., Kranzler H.R., Covault J. (2011). *Variation in the gene encoding the serotonin transporter is associated with a measure of sociopathy in alcoholics*. *Addiction Biology* 16:124-132.
- Ho P.S.**, Shih M.C., Ma K.H., Huang W.S., Ho K.K., Yen C.H., Lu R.B., Huang S.Y. (2011). *Availability of the serotonin transporter in patients with alcohol dependence*. *World Journal of Biological Psychiatry* 12: 134–142.
- Hyman S.E.** & Malenka R.C. (2001). *Addiction and the brain: the neurobiology of compulsion and its persistence*. *Nature Reviews Neuroscience* 2:695-703.
- Hyman S.E.**, Malenka R.C., Nestler E.J. (2006). *Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory*. *Annual Review of Neuroscience* 29:565-598.
- I.D.T.** (2011). *Relatório anual 2010 - A situação do país em termos de drogas e toxicodependências*. Instituto da Droga e da Toxicodependência, I.P., Portugal.
- Innis M.A.**, Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. (1990). *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, Inc.
- International Human Genome Sequencing Consortium** (2001). *Initial sequencing and analysis of the human genome*. *Nature* 409:860-920.
- International Human Genome Sequencing Consortium** (2004). *Finishing the euchromatic sequence of the human genome*. *Nature* 431:931-945.
- Johnson E.G.**, Nothen M.M., Gustavsson J.P., Gustavsson J.P., Neidt H., Bunzel R., Propping P., Sedvall G.C. (1998). *Polymorphisms in the dopamine, serotonin, and norepinephrine transporter genes and their relationships to monoamine*

metabolite concentrations in CSF of healthy volunteers. Psychiatry Research 79:1-9.

Johnson B.A., Ait-Daoud N., Seneviratne C., Roache J.D., Javors M.A., Wang X.Q., Liu L., Penberthy J.K., Diclemente C.C., Li M.D. (2011). *Pharmacogenetic approach at the serotonin transporter gene as a method of reducing the severity of alcohol drinking.* American Journal of Psychiatry 168:265-275.

Kimura M. & Higuchi S. (2011). *Genetics of alcohol dependence.* Psychiatry and Clinical Neurosciences 65:213-225.

Kirby L.G., Zeeb F.D., Winstanley C.A. (2011). *Contributions of serotonin in addiction vulnerability.* Neuropharmacology 61:421-432.

Klotz F., Petersson A., Isacson D., Thiblin I. (2007). *Violent crime and substance abuse: a medico-legal comparison between users of anabolic androgenic steroids and abusers of illicit drugs.* Forensic Sciences International 173:57-63.

Kohnke M.D., Batra A., Kolb W., Kohnke A.M., Lutz U., Schick S., Gaertner I. (2005). *Association of the dopamine transporter gene with alcoholism.* Alcohol & Alcoholism 40:339-342.

Kohnke M.D. (2008). *Approach to the genetics of alcoholism: a review based on pathophysiology.* Biochemical Pharmacology 75:160-177.

Kumar M.V., Vetrivelan R., Mallick H.N. (2007). *Noradrenergic afferents and receptors in the medial preoptic area: neuroanatomical and neurochemical links between the regulation of sleep and body temperature* Neurochemistry International 50:783–790.

Lesch K.P. (2005). *Alcohol dependence and gene x environment interaction in emotion regulation: is serotonin the link?* European Journal of Pharmacology 526:113-124.

Levin J. (2010). *Alcoholism in Clinical Addiction Psychiatry.* [ed.] David Brizer and Ricardo Castaneda. First Edition. Cambridge University Press.

Madder S.S. (1998). *Biology 6th edition.* The McGraw-Hill Companies, Inc.

Malgorzata F., Malgorzata F., Zaniewska M., Golda A., Przegalinski E. (2005). *The serotonin and its role in cocaine addiction.* Pharmacological Reports 57:685-700.

- Manolio T.A.**, Collins F.S., Cox N.J., Goldstein D.B., Hindorff L.A., Hunter D.J., McCarthy M.I., Ramos E.M., Cardon L.R., Chakravarti A., Cho J.H., Guttmacher A.E., Kong A., Kruglyak L., Mardis E., Rotimi C.N., Slatkin M., Valle D., Whittemore A.S., Boehnke M., Clark A.G., Eichler E.E., Gibson G., Haines J.L., Mackay T.F.C., McCarroll S.A., Visscher P.M. (2009). *Finding the missing heritability of complex diseases*. *Nature* 461:747-753.
- Masson J.**, Sagné C., Hamon M., El Mestikawy S. (1999). *Neurotransmitter transporters in the central nervous system*. *Pharmacological Reviews* 51:439-464.
- McHugh R. K.**, Hofmann S.G., Asnaani A., Sawyer A.T., Otto M.W. (2010). *The serotonin transporter gene and risk for alcohol dependence: a meta-analytic review*. *Drug Alcohol Dependence* 108:1-6.
- Merennakk L.**, Maestu J., Nordquist N., Parik J., Oreland L., Loit H.M., Harro J. (2011). *Effects of the serotonin transporter (5-HTTLPR) and α_{2A} -adrenoceptor (C-1291G) genotypes on substance use in children and adolescents: a longitudinal study*. *Psychopharmacology* 215:13-22.
- Mihailescu S.**, Guzmán-Marín R., Domínguez M.C., Drucker-Colín R. (2002). *Mechanisms of nicotine actions on dorsal raphe serotonergic neurons*. *European Journal Pharmacology* 452:77-82.
- Miller L.R;** Mukherjee S., Ansah T.A., Das S.K. (2007). *Cigarette smoke and dopaminergic system*. *Journal Biochemical Molecular Toxicology* 21:325-335.
- Miller S.A.**, Dykes D.D., Polesky H.F. (1988). *A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells*. *Nucleic Acids Research* 16:1215.
- Missale C.**, Nash S.R., Robinson S.W., Jaber M., Caron M.G. (1998). *Dopamine receptors: from structure to function*. *Physiological Reviews* 78:189-225.
- Montpetit A.** & Chagnon F. (2006). *The haplotype map of the human genome: a revolution in the genetics of complex diseases*. *Médecine Sciences* 22:1061-1067.
- Moussas G.**, Christodoulou C., Douzenis A. (2009). *A short review on the aetiology and pathophysiology of alcoholism*. *Annals of General Psychiatry* 14:8-10.
- Murphy D.L.** & Lesch K.P. (2008). *Targeting the murine serotonin transporter: insights into human neurobiology*. *Nature Reviews Neuroscience* 9:85-96.
- Musso M.**, Bocciardi R., Parodi S., Ravazzolo R., Ceccherini I. (2006). *Betaine, dimethyl sulfoxide and 7-Deaza-dGTP, a powerful mixture for amplification of GC-rich DNA sequences*. *Journal of Molecular Diagnostics* 8:544-550.

- Mynett-Johnson L.**, Kealey C., Claffey E., Curtis D., Bouchier-Hayes L., Powell C., McKeon P. (2000). *Multimarkerhaplotypes within the serotonin transporter gene suggest evidence of an association with bipolar disorder*. *American Journal of Medical Genetics* 96:845-849.
- Nagatsu T.** (2006). *The catecholamine system in health and disease: relation to tyrosine 3-monooxygenase and other catecholamine-synthesizing enzymes*. *Proceedings of the Japan Academy* 82:388-415.
- Nakamura Y.** (2009). *DNA variations in human and medical genetics: 25 years of my experience*. *Journal of Human Genetics* 54:1-8.
- Nakamura Y.**, Leppert M., O'Connell P., Wolff R., Holm T., Culver M., Martin C., Fujimoto E., Hoff M., Kumlin E., et al., (1987). *Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping*. *Science* 235:1616-1622.
- Newberg A.**, Lerman C., Wintering N., Ploessl K., Mozley P.D. (2007). *Dopamine transporter binding in smokers and nonsmokers*. **Clinical Nucleic Medicine** 2007;32:452-5.
- Ott J.**, Kamatani Y., Lathrop M. (2011). *Family-based designs for genome-wide association studies*. *Nature Reviews Genetics* 12:465-474.
- Pivac N.**, Seler-Muck D., Mustapic M., Nenadicviglin K., Kozaric-Kovacic D. (2004). *Platelet serotonin concentration in alcoholic subjects*. *Life Sciences* 76:521-531.
- Porzgen P.**, Bonisch H., Bruss M. (1995). *Molecular cloning and organization of the coding region of the human norepinephrine transporter gene*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 215:1145-1150.
- Ramamoorthy S.**, Bauman A.L., Moore K.R., Han H., Yang-Feng T., Chang A.S., Ganapathy V., Blakely R.D. (1993). *Antidepressant and cocaine-sensitive human serotonin transporter: molecular cloning, expression, and chromosomal localization*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:2542-2546.
- Redon R.**, Ishikawa S., Fitch K.R., Feuk L., Perry J.H., Andrews T.D., Fiegler H., Shapero M.H., Carson A. R., Chen W., Cho E.K., Dallaire S., Freeman J.L., Gonzalez J.R., Gratacos M., Huang J., Kalaitzopoulos D., Komura D., MacDonald J.R., Marshall C.R., Mei R., Montgomery L., Nishimura K., Okamura K., Shen F., Somerville M.J., Tchinda J., Valsesia A., Woodwark C., Yang F.,

- Zhang J., Zerjal T., Zhang J., Armengol L., Conrad D.F., Estivill X., Tyler-Smith C., Carter N. P., Aburatani H., Lee C., Jones K.W., Scherer S.W., Hurles M.E., (2006). *Global variation in copy number in the human genome*. Nature 444:444-454.
- Rehm J.**, Taylor B., Patra J. (2006). *Volume of alcohol consumption, patterns of drinking and burden of disease in the European region 2002*. Addiction 101:1086-95.
- Rehm J.**, Mathers C., Popova S., Thavorncharoensap M., Teerawattananon Y., Patra J. (2009). *Global burden of disease and injury and economic cost attributable to alcohol use and alcohol-use disorders*. The Lancet 373:2223-2233.
- Richardson A.J.**, Narendran N., Guymer R.H., Vu H., Baird P.N. (2006). *Blood storage at 4°C – factors involved in DNA yield and quality*. Journal of laboratory and clinical medicine 147:290-294.
- Saddichha S.**, Manjunatha N., Sinha B.N., Khess C.R. (2008). *Delayed-onset delirium tremens – a diagnostic and management challenge*. Acta Neuropsychiatrica 20:152-156.
- Saiz P.A.**, Garcia-Portilla M.P., Florez G., Arango C., Corcoran P., Morales M., Bascaran M.T., Alvarez C., Narciso G.S., Carreno E., Alvarez V., Coto E., Bobes J. (2009). *Differential role of serotonergic polymorphisms in alcohol and heroin dependence*. Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry 33:695-700.
- Salzman B.** & Micheels P. (2010). *Psychoactive prescription drug abuse in Clinical Addiction Psychiatry*. [ed.] David Brizer and Ricardo Castaneda. Cambridge University Press.
- Sambrook J.**, Fritsch E.F., Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning, a laboratory manual. Second Edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Samochowiec J.**, Kucharska-Mazur J., Grzywacz A., Jabłonski M, Rommelspacher H., Samochowiec A., Sznabowicz M., Horodnicki J., Sagan L., Pełka-Wysiecka J. (2006). *Family-based and case-control study of DRD2, DAT, 5HTT, COMT genes polymorphisms in alcohol dependence*. Neuroscience Letters 410:1-5.
- Shin S.**, Stewart R., Ferri C.P., Kim J.M., Shin I.S., Kim S.W., Yang S.J., Yoon J.S. (2009). *An investigation of associations between alcohol use disorder and*

polymorphisms on ALDH2, BDNF, 5-HTTLPR and MTHFR genes in older Korean men. International Journal of Geriatric Psychiatry 25:441-448.

Silber B.Y. & Schmitt J.A.J. (2010). *Effects of tryptophan loading on human cognition, mood, and sleep. Neuroscience and Biobehavioral Reviews 34:387-407.*

Singer S., Rossi S., Verzosa S., Hashim A., Lonow R., Cooper T., Sershen H., Lajtha A. (2004). *Nicotine-induced changes in neurotransmitter levels in brain areas associated with cognitive function. Neurochemical Research 29:1779-1792.*

Skog O.J. (2001). *Alcohol consumption and mortality rates from traffic accidents, accidental falls, and other accidents in 14 European countries. Addiction 96 Suppl 1:S49-58.*

Soderpalm B. & Ericsson M. (2011). *Neurocircuitry involved in the development of alcohol addiction: the dopamine system and its access points. Current Topics in Behavioral Neurosciences.*

Sofuoglu M. & Sewell R.A. (2009). *Norepinephrine and stimulant addiction. Addiction Biology 14:119-129.*

Stober G., Nothen M.M., Porzgen P., Bruss M., Bonisch H., Knapp M., Beckman H., Propping P. (1996). *Systematic search for variation in the human norepinephrine transporter gene: identification of five naturally occurring missense mutations and study of association with major psychiatric disorders. American Journal of Medical Genetics 67:523-532.*

Tabor H. K., Risch N.J., Myers R.M. (2002). *Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. Nature Reviews Genetics 3:391-397.*

Teesson M., Farrugia P., Mills K., Hall W., Baillie A. (2012). *Alcohol, tobacco, and prescription drug: the relationship with illicit drugs in the treatment of substance users. Substance Use & Misuse 47:963-971.*

The International HapMap Consortium (2003). *The international HapMap project. Nature 426:789-796.*

The International HapMap Consortium (2005). *A haplotype map of the human genome. Nature 437:1299-1320.*

The International HapMap Consortium (2007). *A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. Nature 449:851-861.*

- Tomkins D.M.** & Sellers E.M. (2001). *Addiction and the brain: the role of neurotransmitters in the cause and treatment of drug dependence*. Canadian Medical Association Journal 164:817-821.
- Thompson R.D.**, Heffner J.L., Strong J.A., Blom T.J., Anthenelli R.M. (2010). *Relationship between the serotonin transporter polymorphism and obsessive-compulsive alcohol craving in alcohol-dependent adults: a pilot study*. Alcohol 44:401-406.
- Thomsen M.**, Han D.D., Gu H.H., Caine S.B. (2009). *Lack of cocaine self-administration in mice expressing a cocaine-intensive dopamine transporter*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 331:204-211.
- Torres G.E.**, Gainetdinov R.R., Caron M.G. (2003). *Plasma membrane monoamine transporters structure, regulation and function*. Nature Reviews Neuroscience 4:13-25.
- UNODC** (2012). *World drug report 2012*. United Nations Office on Drugs and Crime. New York.
- Vandenbergh D.J.**, Persico A.M., Hawkins A.L., Griffin C.A., Li X., Jabs E.W., Uhl G.R. (1992). *Human dopamine transporter gene (DAT1) maps to chromosome 5p15.3 and displays a VNTR*. Genomics 14:1104-1106.
- Vangeliene V.**, Bilbao A., Molander A., Spanagel R. (2008). *Neuropharmacology of alcohol addiction*. British Journal of Pharmacology 154:299-315.
- vanDyck C.H.**, Malison R.T., Jacobsen L.K., Seibyl J.P., Staley J.K., Laruelle M., Baldwin R.M., Innis R.B., Gelernter J. (2005). *Increased dopamine transporter availability associated with the 9-repeat allele of the SLC6A3 gene*. J Nucl Med. 2005; 46:745-751.
- vanNess S.H.**, Owens M.J., Kilts C.D. (2005). *The variable number of tandem repeats element in DAT1 regulates in vitro dopamine transporter density*. BMC Genetics 6:55.
- Volkow N.D.**, Fowler J.S., Wang G.J., Swanson J.M., Telang F. (2007). *Dopamine in drug abuse and addiction: results of imaging studies and treatment implications*. Archives of Neurology 64:1575-1579.
- Volkow N.D.**, Wang G.J., Fowler J.S., Tomasi D., Telang F. (2011). *Addiction: beyond dopamine reward circuitry*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 108:15037-15042.

- Xu M.** & Lin Z. (2011). *Genetic influences of dopamine transport gene on alcohol dependence: a pooled analysis of 13 studies with 2483 cases and 1753 controls*. Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry 35:1255-1260.
- Watanabe M.A.**, Nunes S.O., Amarante M.K., Guembarovski R.L., Oda J.M., Alves de Lima K.W., Fungaro M.H. (2011). *Genetic polymorphism of serotonin transporter 5-HTTLPR involvement in smoking behavior*. Journal of Genetics 90:179-185.
- Watson J.D.** & Crick H.C. (1953). *Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid*. Nature 171:964-967.
- Weber J.L.** & May P.E. (1989). Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. American Journal Human Genetics 44:388-396.
- Weiss S.**, Tzavara E.T., Davis R.J., Nomikos G.G., McIntosh J.M., Giros B., Martres M.P. (2007). Functional alterations of nicotinic neurotransmission in dopamine transporter knock-out mice. Neuropharmacology 52:1496-1508.
- Whitaker-Azmitia P.M.** (1999). *The discovery of serotonin and its role in neuroscience*. Neuropsychopharmacology 21:2S-8S.
- Wilfinger W.W.**, Mackey K., Chomczynsky P. (1997). *Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity*. Biotechniques 22:474-481.
- Wise R.A.** (1998). *Drug-activation of brain reward pathways*. Drug and Alcohol Dependence 51:13-22.
- WHO** (2004). *Global status report on alcohol 2004*. Departement of Mental Health and Substance Abuse. Geneva, Switzerland.
- WHO** (2010). *Global status report on noncommunicable diseases 2010*. World Health Organization. Geneva, Switzerland.
- WHO** (2011). *Global status report on alcohol and health*. World Health Organization. Geneva, Switzerland.
- WHO** (2011). *Report on the Global Tobacco Epidemic, 2011. Country Profile Portugal*. World Health Organization. Geneva, Switzerland.
- Yang Y.K.**, Yao W.J., Yeh T.L., Lee I.H., Chen P.S., Lu B.R., Chiu N.T. (2008). *Decreased dopamine transporter availability in male smokers — A dual isotope*

SPECT study. Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry 32:274–279.

Yin H.H. (2008). *From Actions to Habits. Neuroadaptations Leading to Dependence*. Alcohol Research & Health 31:340-344.

Yun H.M. & Rhim H. (2011). *The serotonin-6 receptor as a novel therapeutic target*. Experimental Neurobiology 20:159-168.

Zhang F., Gu W., Hurles M.E., Lupski J.R. (2009). *Copy number variation in human health, disease, and evolution*. Annual Review of Genomics and Human Genetics 10:451-481.

Zhong H. & Minneman K.P. (1999). $\alpha 1$ – Adrenoceptor subtypes. European Journal of Pharmacology 375:261-276.

Zhou J. (2004). *Norepinephrine transporter inhibitors and their therapeutic potential*. Drugs Future 29:1235-1244.

Zhu J. & Reith M.E. (2008). *Role of dopamine transporter in the action of psychostimulants, nicotine, and other drugs of abuse*. CNS Neurological Disorders drug Targets 7:393-409.