

capa

Subcapa

“Tudo é ousado para quem nada se atreve”

Fernando Pessoa



“ A essência do conhecimento consiste em aplica-lo, uma vez possuído”

Confúcio



“Esperar pelo melhor e preparar-se para o pior: eis a regra”

Fernando Pessoa



“O meu mundo não é como o
dos outros, quero demais, exijo
demais, há em mim uma sede
de infinito, uma angústia
constante que nem eu mesma
compreendo, pois estou longe
de ser uma pessimista, sou antes
uma exaltada, com uma alma
intensa, violenta, atormentada,
uma alma que se não sente bem
onde está, que tem
saudades...sei lá de quê!”

Florabela Espanca



Agradecimentos

Agradeço à Professora Doutora Alda Cardoso, por todo o apoio, orientação, conhecimento, dedicação, pela inestimável amizade e pela inesgotável energia, confiança e força que me transmitiu ao longo deste trabalho. É sem dúvida uma orientadora fora do papel.

Ao Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses e à Unidade de Genética Clínica e Molecular, pelo acolhimento e pela possibilidade de realizar este trabalho.

Aos doentes que aceitaram participar voluntariamente neste estudo.

Ao Centro Regional de Alcoologia do Centro Maria Lucília Mercês de Mello, particularmente aos doutores Augusto Pinto, Maria Rosário Lameiras, Alexandra Almeida e Ana Feijão, que tem selecionado os doentes para que fosse possível a realização deste trabalho.

Aos meus colegas de laboratório, Pedro, Sandra e Helena, por todo o apoio demonstrado ao longo do ano. Agradeço ainda à Mafalda e à Sofia, pela amizade e por todo o auxílio nas horas de maior trabalho.

Aos meus pais, Francisco e Fátima pelo esforço e apoio, mas em particular à minha mãe, pelo amor incondicional e por nunca deixar de acreditar em mim.

Aos meus padrinhos, Adelino e Alice, por cuidarem de mim, por estarem sempre presentes e por me apoiarem como verdadeiros pais que são. Sem eles este trabalho não seria possível.

Ao Alexandre. Pelo amor, pela paciência, pela ajuda e por nunca me deixar ficar só.

À Sara Faria, agradeço pela amizade e por tudo o que me ensinou.

Aos meus amigos de longa data, Fábio, Afonso, Nelson, e em particular à Helena Carina, por estarem sempre presentes, apesar da distância.

Aos meus colegas de mestrado, em especial à Andreia Fonseca, por toda orientação, acolhimento e amizade.

Ao Diogo, pois mesmo sem saber, ajudou a que este trabalho se realizasse.

Ao Paulo, pelo alojamento e amizade.

A todos aqueles que direta ou indiretamente participaram neste estudo, agradeço sinceramente a amizade e o apoio.

Resumo

A nível global, a dependência de drogas lícitas e ilícitas é um grave problema de saúde pública, com implicações sociais devastadoras, sobretudo associadas à criminalidade, económicas, culturais e familiares. A problemática da dependência de drogas não se resume às mortes e doenças instigadas aos consumidores, encontrando-se muitas vezes subjacente a esta a violência doméstica, a qual representa igualmente um grave problema de saúde pública e uma violação dos direitos fundamentais das mulheres. Apesar das estratégias de prevenção e tratamento atualmente disponíveis para a dependência, a identificação de fatores de risco genéticos poderá dar um grande contributo na prevenção da dependência de drogas lícitas e ilícitas de forma a mitigar as consequências sociais, criminais e económicas devastadoras.

Várias evidências sugerem que as neurotrofinas, particularmente o BDNF e o seu recetor $p75^{NTR}$ poderão desempenhar um papel importante na etiologia da dependência de álcool, tabaco, drogas ilícitas e violência doméstica. Assim, neste trabalho investigou-se os polimorfismos Val66Met e S205L dos genes *BDNF* e *p75^{NTR}*, respetivamente, na etiologia da dependência de drogas lícitas e ilícitas e violência doméstica, numa amostra da população portuguesa de dependentes de álcool, com e sem historial de dependência de tabaco, de drogas ilícitas e de violência doméstica, através da metodologia PCR-RFLP.

No que se refere ao polimorfismo Val66Met do gene *BDNF*, utilizando a estratégia de associação, não se observou diferenças estatisticamente significativas entre a amostra de doentes dependentes de álcool e a amostra controlo, para os genótipos ($\chi^2=0,979$; $df=2$; $p=0,613$) e para alelos ($\chi^2= 0,194$; $df=1$; $p=0,660$). Resultados similares foram obtidos para a dependência de consumo de tabaco (distribuição genotípica: $\chi^2=1,478$; $df=2$; $p=0,478$; distribuição alélica: $\chi^2= 0,232$; $df=1$; $p=0,630$), drogas ilícitas (distribuição genotípica: $\chi^2=0,111$; $df=2$; $p=0,946$; distribuição alélica: $\chi^2=0,013$; $df=1$; $p=0,909$), e violência doméstica (distribuição genotípica: $\chi^2=0,110$; $df=2$; $p=0,946$; distribuição alélica: $\chi^2=0,039$; $df=1$; $p=0,843$).

Relativamente ao polimorfismo S205L do gene *p75^{NTR}*, os resultados obtidos revelaram associação entre o polimorfismo mencionado e a dependência de álcool (distribuição genotípica: $\chi^2=6,620$; $df=2$; $p=0,037$) e tabaco (distribuição genotípica: $\chi^2=9,235$; $df=2$; $p=0,010$; distribuição alélica: $\chi^2=9,115$; $df=1$; $p=0,003$). Resultados

negativos foram obtidos para a dependência de drogas ilícitas e para a violência doméstica. Os resultados obtidos sugerem que o polimorfismo Val66Met do gene *BDNF* não desempenha um papel direto na etiologia da dependência de drogas e da violência doméstica na população estudada. Por outro lado, o polimorfismo S205L do gene *p75^{NTR}* poderá ser um fator de risco genético para a dependência de álcool e de tabaco na população portuguesa. Os resultados obtidos são particularmente importantes no que diz respeito ao polimorfismo S205L do gene *p75^{NTR}*, uma vez que, não existem estudos efetuados a nível mundial e poderão contribuir para a identificação de indivíduos em risco e a respetiva prevenção da problemática da dependência, bem como de todas as consequências nefastas associadas.

Palavra chaves: Dependência de drogas lícitas e ilícitas; Violência doméstica; Neurotrofinas; Genética; Genes candidatos

Índice

1. Introdução.....	8
1.1. Drogas lícitas e ilícitas	8
1.2. Epidemiologia da dependência	8
1.3. Mecanismos envolvidos na dependência de drogas.....	11
1.4. Genética da dependência de drogas lícitas e ilícitas	13
1.5. Caracterização das neurotrofinas e dos seus recetores	14
1.5.1. Neurotrofinas.....	14
1.5.2. Recetores de neurotrofinas e mecanismos de ação	15
1.6. Genes candidatos das neurotrofinas: genes <i>BDNF</i> e <i>p75^{NTR}</i>	19
1.7. Considerações gerais sobre genética.....	21
1.8. Objetivo	25
2. Materiais e Métodos	27
2.1. Critérios de diagnósticos e casuística	27
2.2. Extração de DNA.....	27
2.3. Quantificação do DNA genómico por método espectrofotométrico	28
2.4. Genotipagem.....	29
2.4.1. Contextualização geral da metodologia para a genotipagem.....	29
2.4.1.1. Reação em cadeia da polimerase.....	29
2.4.1.2. Enzimas de restrição.....	31
2.4.1.3. Eletroforese.....	32
2.4.2. Protocolos experimentais de genotipagem para o estudo de genes das neurotrofinas.....	33
2.4.2.1. Polimorfismo Val66Met do gene <i>BDNF</i>	33
2.4.2.2. Polimorfismo S205L do gene <i>P75^{NTR}</i>	34
2.5. Análise estatística	35
3. Resultados e discussão	38
3.1. Gene candidato <i>BDNF</i>	38
3.1.1. Polimorfismo Val66Met e a dependência de álcool.....	39
3.1.2. Polimorfismo Val66Met e consumo de tabaco	41
3.1.3. Polimorfismo Val66Met e consumo de drogas ilícitas	43
3.1.4. Polimorfismo Val66Met e violência doméstica.....	44

3.2. Gene candidato <i>p75^{NTR}</i>	46
3.2.1. Polimorfismo S205L e a dependência de álcool	47
3.2.2. Polimorfismo S205L e o consumo de tabaco.....	48
3.2.3. Polimorfismo S205L e consumo de drogas ilícitas.....	49
3.2.4. Polimorfismo S205L e violência doméstica.....	51
4. Conclusões.....	54
5. Perspetivas futuras.....	56
6. Referências bibliográficas	59

Lista de tabelas

Tabela 1 - Polimorfismo Val66Met do gene <i>BDNF</i> na amostra total de doentes dependentes de álcool e controlos: distribuição genotípica e alélica	40
Tabela 2 – Polimorfismo Val66Met do gene <i>BDNF</i> na amostra de doentes dependentes de álcool e com historial de consumo de tabaco: distribuição genotípica e alélica.....	42
Tabela 3 - Polimorfismo Val66Met do gene <i>BDNF</i> na amostra de doentes dependentes de álcool e com historial de consumo de drogas ilícitas: distribuição genotípica e alélica.....	43
Tabela 4 - Polimorfismo Val66Met do gene <i>BDNF</i> na amostra de doentes dependentes de álcool com historial de violência doméstica: distribuição genotípica e alélica.....	45
Tabela 5 – Polimorfismo S205L do gene <i>p75^{NTR}</i> na amostra total de doentes dependentes de álcool e controlos: distribuição genotípica e alélica	47
Tabela 6 - Polimorfismo S205L do gene <i>p75^{NTR}</i> na amostra de doentes dependentes de álcool e com historial de consumo de tabaco: distribuição genotípica e alélica.....	49
Tabela 7 - Polimorfismo S205L do gene <i>p75^{NTR}</i> na amostra de doentes dependentes de álcool e com historial de consumo de drogas ilícitas: distribuição genotípica e alélica.....	50
Tabela 8 – Polimorfismo S205L do gene <i>p75^{NTR}</i> na amostra de doentes dependentes de álcool com historial de violência doméstica: distribuição genotípica e alélica.....	51

Lista de figuras

Figura 1 - Distribuição do consumo de álcool per capita em adultos (com idade superior a 15anos) a nível mundial, em litros de álcool puro.....	10
Figura 2 - Modelo do sistema de recompensa cerebral.....	11
Figura 3 - Etapas do desenvolvimento da dependência de drogas.....	13
Figura 4 – Interação das neurotrofinas com os seus recetores.....	16
Figura 5 – Vias de sinalização reguladas pelas neurotrofinas.....	18
Figura 6 - Estrutura do gene <i>BDNF</i>	19
Figura 7 - Esquema do gene <i>p75^{NTR}</i>	10
Figura 8 – Estrutura da dupla cadeia do DNA.....	21
Figura 9 – DNA, a molécula da vida.....	22
Figura 10 - Reação em cadeia da polimerase.....	30
Figura 11 - Extremidades produzidas por diferentes enzimas de restrição.....	31
Figura 12 - Local de corte da enzima de restrição <i>Eco72I</i>	34
Figura 13 - Local de corte da enzima de restrição <i>BanII</i>	35
Figura 14 – Eletroforese em gel de agarose a 3,5 % relativa ao produto amplificado do polimorfismo Val66Met do gene <i>BDNF</i>	38
Figura 15 – Separação dos fragmentos de DNA do polimorfismo Val66Met do gene <i>BDNF</i> , em gel de agarose a 3,5%, resultantes da digestão com a enzima <i>Eco72I</i>	39
Figura 16 – Eletroforese em gel de agarose a 3% com o produto de amplificação do polimorfismo S205L do gene <i>p75^{NTR}</i>	46
Figura 17 - Separação dos fragmentos de DNA do polimorfismo S205L do gene <i>p75^{NTR}</i> , em gel de agarose a 3%, resultantes da digestão com a enzima <i>BanII</i>	47
Figura 18 - alterações induzidas pela cocaína na expressão de <i>BDNF</i> na via mesolímbica.....	56

Lista de abreviaturas

A – Adenina

BDNF – *Brain-derived neurotrophic factor*

C – Citosina

CNVs – *Copy number variations*

CREB – *cAMP responsive element-binding*

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dNTPs – Desoxirribonucleótidos trifosfatos

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

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

G – Guanina

ICD-10 – *International Classification of Diseases*

L – Leucina

MeCP2 – *Methyl CpG binding protein 2*

Met – Metionina

NAc – Nucleus accumbens

NGF – *Nerve growth factor*

NLB – Tampão de glóbulos brancos

NT-3 – Neurotrofina-3

NT-4 – Neurotrofina-4

OMS – Organização Mundial de Saúde

p75^{NTR} – Recetor de neurotrofinas p75

Pb – Pares de bases

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PGH – Projeto do Genoma Humano

PI3 cinase – Fosfatidilinositol-3 cinase

PLC- γ 1 – Fosfolipase C- γ 1

RBC – Tampão de lise de glóbulos vermelhos

RFLPs – *Restrict fragments length polymorphisms*

S – Serina

SNC – Sistema Nervoso Central

SNPs – *Single nucleotide polymorphisms*

STRPs - *Short tandem repeat polymorphisms*

T – Timina

TAE – Tris-acetato

TBE – Tris-borato

TPE – Tris-fosfato

Trk – Recetores de tirosinas cinases

TrkA -Recetores de tirosinas cinases A

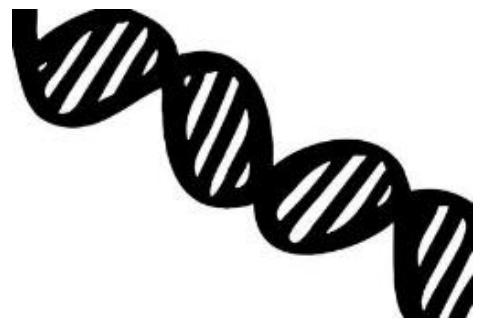
TrkB- Recetores de tirosinas cinases B

TrkC- Recetores de tirosinas cinases C

Val – Valina

VNTRs – *Variable number of tandem repeats*

WHO – *World Health Organization*



Introdução

1. Introdução

1.1. Drogas lícitas e ilícitas

A nível global, a dependência de drogas lícitas e ilícitas é um problema de saúde pública, com graves implicações sociais, sobretudo associadas à criminalidade, económicas, culturais e familiares (Skog, 2001; Klotz *et al.*, 2007; IDT., 2011; Rehm *et al.*, 2011; Degenhardt e Hall, 2012; Teesson *et al.*, 2012). Segundo o *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-Fourth Edition* (DSM-IV), dependência representa um quadro clínico marcado pelo uso compulsivo de drogas que o indivíduo simplesmente não consegue controlar (American Psychiatric Association, 1994). Por definição, droga é qualquer substância que afeta especificamente o sistema nervoso central (SNC), alterando o estado de consciência e percepção. A título de exemplo, o consumo excessivo de álcool desencadeia numerosos perigos para a saúde, como o alcoolismo, a tensão alta, a obesidade, o cancro, o suicídio, acidentes de viação e violência doméstica.

As drogas podem ser classificadas em lícitas, como o álcool e o tabaco, podendo ser consumidas livremente, ou ilícitas, como a cocaína, a heroína ou a canábis, cujo consumo é proibido por lei. De acordo com o efeito que as drogas provocam no SNC são consideradas ainda como estimulantes, as que aumentam o estado de alerta, excitação, euforia, pulsação e pressão arterial, e depressivas as que inibem o SNC. Nas drogas estimulantes incluem-se as anfetaminas, a cocaína, o café e a nicotina, e nas depressivas o álcool e as benzodiazepinas (Hanson *et al.*, 2009).

1.2. Epidemiologia da dependência

O consumo de drogas lícitas e ilícitas está associado a elevadas taxas de mortalidade e morbidade a nível mundial. Em 2011, entre 167 e 315 milhões de indivíduos, com idades compreendidas entre 15 a 64 anos, revelaram consumir drogas ilícitas, correspondendo estes valores a uma percentagem entre 3,6% a 6,9% da população mundial adulta. Por exemplo, desde 2009 a prevalência do consumo de canábis, opióides e opiáceos tem vindo a aumentar, contrariamente ao consumo de

cocaína e anfetaminas que parece ter diminuído entre os anos de 2009 e 2011 (UNODC, 2013).

Entre as diferentes formas de administração das drogas encontra-se a injeção intravenosa das mesmas. Em 2012 um total de 14 milhões de indivíduos utilizaram este método, o que corresponde a 0,31% da população mundial, com idades entre os 15 e os 64 anos. A nível Europeu, a prevalência de drogas injetáveis é bastante elevada, particularmente na Europa oriental e no sudoeste Europeu, onde a percentagem de indivíduos que consome este tipo de drogas é 4 vezes maior que a média global, representando 21% do número total de pessoas que se injetam (UNODC, 2013). Esta forma de consumo está associada a elevados riscos de doenças infetocontagiosas, estimando-se que 1,6 milhões de indivíduos estejam infetados com HIV (11,5%), 7,2 milhões com hepatite C (51%) e 1,2 milhões com hepatite B (8,4%) (UNODC, 2013).

No que diz respeito às taxas de mortalidade, estas são igualmente elevadas e preocupantes. Em 2011, ocorreram entre 102000 e 247000 mortes relacionadas com drogas, correspondendo a uma taxa de mortalidade entre 22,3 e 54,0 de mortes por milhão, na população com idades entre os 15 e os 64 anos. Importa salientar que a mortalidade relacionada com o consumo de drogas atinge maioritariamente pessoas mais jovens, com uma idade entre os 26 e os 44 anos (EMCDDA, 2014).

Como referido anteriormente, o álcool e o tabaco, apesar de lícitas, têm também um impacto bastante negativo na sociedade. O consumo de álcool provocou aproximadamente 3,3 milhões de mortes em 2012, representando este valor aproximadamente 5,9% das mortes em todo o mundo. Este comportamento é principalmente grave no sexo masculino, com 7,6% destas mortes a serem atribuídas ao álcool, enquanto no sexo feminino esta percentagem é de 4,0% (WHO, 2014a).

Em 2010, a média a nível mundial do consumo de álcool *per capita* era de 6,2 litros de álcool puro por cada indivíduo com idade igual ou superior a 15 anos, o que se traduz em 13,5 gramas de álcool puro por dia. Estes valores variam conforme a região (figura 1). Os países desenvolvidos, incluindo países da Europa oriental e ocidental, encontram-se entre os que mais consomem álcool. Na figura 1 pode observar-se que Portugal está neste grupo de países, com mais de 12,5 litros de álcool puro consumido por adulto, com idade superior a 15 anos (WHO, 2014a). Este valor reflete-se no número de mortes, tendo em 2011 ocorrido 2309 óbitos relacionados com este comportamento, o que corresponde a uma taxa de mortalidade de 23% (DGS, 2013).

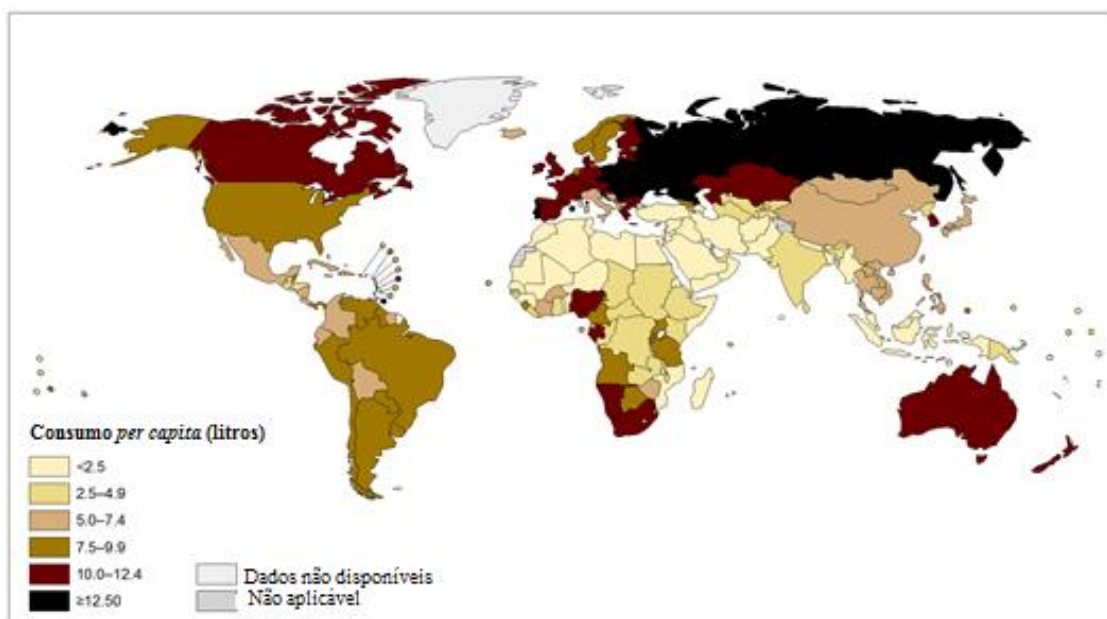


Figura 1 - Distribuição do consumo de álcool per capita em adultos (com idade superior a 15 anos) a nível mundial, em litros de álcool puro. Os maiores consumidores encontram-se na Europa ocidental e oriental, mas também na Argentina, Austrália e Nova Zelândia. Os consumidores médios encontram-se no Sul de África (Namíbia e África do Sul) e na América do Norte e do Sul. Os países que menos consomem álcool encontram-se no norte de África e na África sub-Sahariana, no sudoeste Asiático e no oceano Índico (Adaptado de WHO,2014a).

Em relação ao consumo de tabaco, este é a primeira causa evitável de doença, incapacidade e morte prematura nos países desenvolvidos, contribuindo para seis das oito primeiras causas de morte a nível mundial. O tabaco foi responsável pela morte de 100 milhões de indivíduos no século XX, podendo vir a matar muito mais se não forem tomadas precauções (WHO, 2008). Atualmente, o consumo de tabaco mata cerca de 6 milhões de indivíduos a cada ano. Mais de 5 milhões dessas mortes são o resultado do consumo direto, enquanto cerca 600 000 são mortes de fumadores passivos, apenas expostos ao fumo do tabaco de outros (WHO, 2014b). Em Portugal, estima-se que o consumo de tabaco seja responsável por 1 em cada 10 mortes na população adulta e por 1 em cada 4 mortes na população dos 45 aos 59 anos (WHO, 2012).

Em 2012, 28% dos inquiridos europeus com idade igual ou superior a 15 anos eram fumadores. A Grécia, a Bulgária e a Letónia encontram-se no topo dos países com maior percentagem de fumadores, com 40%, 36% e 36%, respetivamente (European

Commission, 2012). Neste mesmo ano, os fumadores portugueses consumiam em média 14,4 cigarros por dia, valor semelhante ao observado na União Europeia e inferior ao observado em 2009, sendo este de 15,5 cigarros diários (DGS, 2013).

Os gastos associados ao consumo de drogas representam um grande encargo económico para os países de todo o mundo. Em 2003, na União Europeia foram gastos 125 biliões de euros com questões relacionadas com o consumo de álcool (Anderson e Baumberg, 2006). Em 2007, o sistema de saúde público português gastou cerca de 126 milhões de euros em internamentos hospitalares no sistema nacional de saúde e mais de 363 milhões de euros no ambulatório (medicamentos, consultas em centros de saúde e hospitais, meios complementares de diagnóstico) devido ao tabaco (DGS, 2013).

A problemática da dependência de drogas não se resume às mortes e doenças instigadas aos consumidores, encontrando-se muitas vezes subjacente a esta a violência doméstica, a qual representa um grave problema de saúde pública e uma violação dos direitos fundamentais das mulheres. Quase 30% das mulheres que estiveram numa relação foram vítimas de violência física e/ou sexual por parte do parceiro e 38% dos homicídios, cujas vítimas eram do sexo feminino, foram cometidos pelos seus parceiros (WHO, 2013). De facto, estudos realizados indicam que o consumo de álcool está fortemente associado com a violência doméstica (Foran e O'Leary, 2008), tornando cada vez mais imprescindível a compreensão, tratamento e prevenção deste fenómeno.

1.3. Mecanismos envolvidos na dependência de drogas

Todas as drogas que são consumidas em excesso têm em comum a ativação direta do sistema de recompensa, que está envolvido no reforço de comportamentos e produção de memórias (American Psychiatric Association, 2013). A dependência de drogas é caracterizada por um comportamento anormal resultante de alterações nos circuitos cortico-estriado-límbico, que por sua vez coordenam comportamentos relacionados com a recompensa (Cadet *et al.*, 2014). A figura 2 apresenta um modelo do sistema de recompensa cerebral.

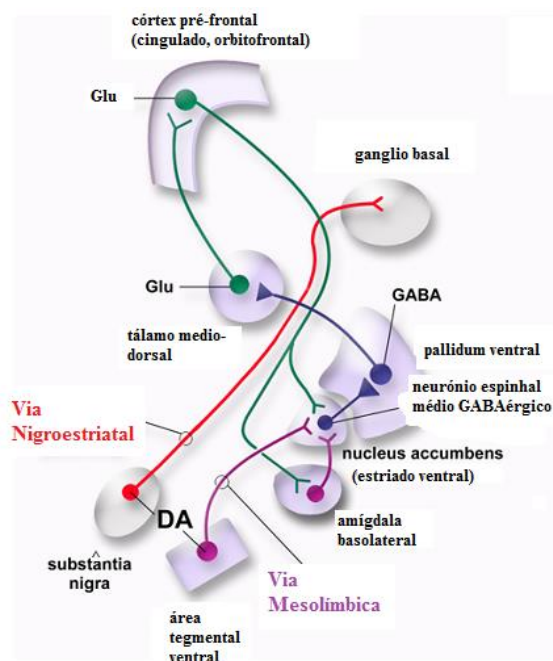


Figura 2 - Modelo do sistema de recompensa cerebral. O nucleus accumbens (estriado ventral) é o maior alvo do sistema dopaminérgico mesolímbico. Este contém neurónios GABAérgicos que projetam para o ventral pallidum. Recompensas naturais e a dependência de drogas aumentam a libertação de dopamina a partir dos terminais das projeções dopaminérgicas provenientes da área tegmental ventral. As vias dopaminérgica e nigroestriatal também participam nos processos relacionados com a recompensa (adaptado de Cadet et al., 2014).

Alterações no complexo estriado devido ao consumo de drogas podem imitar ou interferir com a plasticidade sináptica, promovendo o consumo regular. Estas alterações ocorrem ao nível do estriado dorsal e do nucleus accumbens (NAc), uma sub-região estriatal importante para a recompensa e o reforço das drogas (Grueter *et al.*, 2012).

Os efeitos relacionados com o consumo de drogas de abuso podem ser positivos ou negativos. A via mesolímbica interfere no estado positivo, acentuando os efeitos eufóricos e promovendo um aumento do consumo, permitindo que o indivíduo volte a sentir o bem-estar inicial. Por outro lado, no estado negativo interferem regiões cerebrais amígdaloides, promovendo o desenvolvimento de ansiedade, depressão e outros estados disfóricos, levando a um aumento do consumo da droga para contrariar estes efeitos negativos (Moonat *et al.*, 2010).

O consumo de drogas também afeta o hipocampo. Por exemplo, estudos demonstram que o consumo de canábis (Yücel *et al.*, 2008) e de anfetaminas

(Thompson *et al.*, 2004) provocam alterações no seu volume. Por outro lado, o hipocampo está relacionado com a formação de memória a longo prazo. Estímulos associados com as drogas podem evocar memórias, induzindo o desejo de consumo (Gawin *et al.*, 1986; O'Brien *et al.*, 1998).

1.4. Genética da dependência de drogas lícitas e ilícitas

Os estudos de epidemiologia genética (estudos familiares, de gémeos e de adoção) demonstram que os fatores genéticos, estimados entre 50 a 60% contribuem para a predisposição da dependência de drogas lícitas e ilícitas (Cloninger *et al.*, 1981; Bierut *et al.*, 1998; Brook *et al.*, 2002; Bierut, 2011; Enoch, 2012). A dependência de drogas lícitas e ilícitas é multifatorial, resultante de uma grande complexidade e heterogeneidade que inclui interações gene-gene e gene-ambiente (Enoch, 2012). O desenvolvimento de dependência requer o consumo de uma droga e uma cadeia de eventos comportamentais, estando envolvidos nestes a iniciação do respetivo consumo e a conversão de experimental a regular, contribuindo este para a dependência (figura 3).



Figura 3 - Etapas do desenvolvimento da dependência de drogas (adaptado de Bierut, 2011).

Cada uma destas etapas é influenciada por fatores genéticos e ambientais. No geral os fatores ambientais parecem ter uma maior influência na iniciação do consumo de droga e os fatores genéticos parecem influenciar mais a passagem do consumo

regular para a dependência (Vink *et al.*, 2005). Apesar das estratégias de prevenção e tratamento atualmente disponíveis para a dependência, a identificação de fatores de risco genéticos poderá dar um grande contributo para prevenir e combater a dependência de drogas lícita e ilícitas de forma a mitigar as consequências sociais e económicas devastadoras a nível mundial, pelo que é imperativo efetuar estudos a nível genético. Dos estudos genéticos efetuados, que incluem estudos de *linkage*, *genome wide linkage studies*, *genome wide association studies* e estudos de associação de genes candidatos, implicam um elevado número de genes *minor* na etiologia da dependência de drogas (Li *et al.*, 2008; Bierut, 2011; Rietschel e Treutlein, 2013).

1.5. Caracterização das neurotrofinas e dos seus recetores

1.5.1. Neurotrofinas

As neurotrofinas são uma família de proteínas estruturalmente relacionadas, tendo sido inicialmente identificadas como fatores de sobrevivência para os neurónios sensoriais e simpáticos. Ao longo do tempo tem sido demonstrado que as neurotrofinas controlam vários aspetos relacionados com a sobrevivência, o desenvolvimento e o funcionamento dos neurónios, quer ao nível do SNC quer do periférico, tendo um papel essencial na plasticidade sináptica (McAllister *et al.*, 1999; Thoenen, 2000; Reichardt, 2006). Nos mamíferos são expressas quatro neurotrofinas distintas, o *nerve growth factor* (NGF), o *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), a neurotrofina-3 (NT-3) e a neurotrofina-4 (NT-4). O NGF foi o primeiro a ser descoberto, seguido do BDNF (Barde *et al.*, 1982; Levi- Levi-Montalcini, 1987).

O BDNF é o membro da família das neurotrofinas mais amplamente distribuído no organismo (Huang e Reichardt, 2001), sendo particularmente expresso em grande abundância na região cerebral do hipocampo (Binder e Scharfman, 2004), assim como em várias regiões cerebrais relacionadas com o sistema de recompensa e com a dependência de drogas (Davis, 2008).

As neurotrofinas são inicialmente expressas na forma de pro-neurotrofinas no retículo endoplasmático, sofrendo maturação através de proteólise. O BDNF em particular é traduzido como uma pró-proteína de 30-35 kDa, sendo esta constituída por um pré-pró-domínio, um pró-domínio e um domínio C-terminal da neurotrofina

madura. O pró-BDNF é produzido no retículo endoplasmático e armazenado na rede trans-Golgi, via aparelho de Golgi, podendo ser clivado no retículo endoplasmático por furinas ou nas vesículas secretoras reguladas por enzimas pró-convertases (Teng *et al.*, 2010). O pró-BDNF liga-se à sortilina, uma *chaperone* intracelular, através do pró-domínio, permitindo o correto enrolamento do domínio do BDNF maduro. Este domínio maduro liga-se à carboxipeptidase E, conduzindo assim o BDNF para a via secretora regulada (Lu *et al.*, 2005). A expressão do BDNF é altamente regulada pela atividade neuronal, através de mecanismos dependentes de cálcio (Mellstrom *et al.*, 2004). A neurotrofina BDNF, a nível cerebral, atua na sobrevivência e crescimento dos neurónios, na neurogênese, na transmissão sináptica e ainda na plasticidade sináptica, estando assim envolvido nos processos de aprendizagem e memória (Binder e Scharfman, 2004). Outros estudos demonstram que a exposição a drogas ilícitas como a cocaína levam a alterações em elementos promotores da expressão de BDNF, como é o caso das proteínas *cAMP responsive element-binding* (CREB) e *methyl CpG binding protein 2* (MeCP2), aumentando assim a concentração deste no organismo e provocando alterações na plasticidade sináptica (McCarthy *et al.*, 2012).

1.5.2. Recetores de neurotrofinas e mecanismos de ação

Existem diferentes recetores de neurotrofinas (Reichardt, 2006). O primeiro a ser descoberto foi o recetor de neurotrofinas p75 (p75^{NTR}), inicialmente identificado como um recetor de baixa afinidade para o NGF, mas que se demonstrou ter igual afinidade para todas as outras neurotrofinas. Mais tarde foram identificados outros tipos de recetores, os recetores de tirosinas quinases (Trk) (TrkA, TrkB e TrkC) (Allen e Dawbarn, 2006; Reichardt, 2006). As pro-neurotrofinas ligam-se ao p75^{NTR}, mas não aos recetores Trk. As neurotrofinas maduras continuam com capacidade de se ligarem ao p75^{NTR}, mas com menor afinidade, ligando-se com maior afinidade aos recetores Trk (Reichardt, 2006). A figura 4 mostra a interação das pro-neurotrofinas e neurotrofinas com os diferentes tipos recetores.

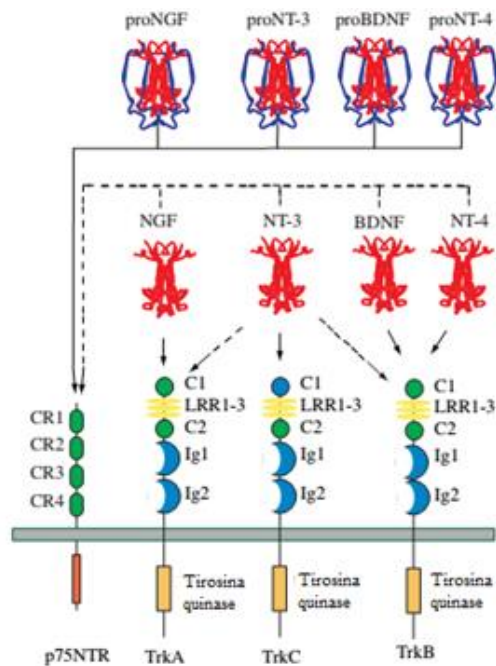


Figura 4 – Interação das neurotrofinas com os seus recetores. Cada pró-neurotrofina liga-se ao $p75^{NTR}$, mas não aos recetores Trk. Após as pró-neurotrofinas sofrerem maturação por proteólise, cada neurotrofina madura liga-se e ativa o $p75^{NTR}$, mas liga-se com maior afinidade com os três recetores Trk. O NGF liga-se especificamente ao recetor TrkA, o BDNF e o NT-4 ao recetor TrkB, e o NT-3 ao TrkC. Em alguns casos o NT-3 também se pode ligar aos recetores TrkA e TrkB. A figura mostra também a constituição dos recetores, onde CR1, CR2, CR3 e CR4 representam domínios ricos em cisteínas, C1 um domínio rico em cisteína, LRR1-3 repetições ricas em leucinas, e Ig1 e Ig2 domínios do tipo imunoglobulinas (adaptado de Reichardt, 2006).

O $p75^{NTR}$ é um membro da superfamília de recetores de necrose tumoral, constituído por um domínio extracelular com quatro motivos ricos em cisteínas, um domínio transmembranar único e um domínio citoplasmático que inclui um *death domain* semelhante ao que existe noutros membros desta família (Liepinsh *et al.*, 1997; He e Garcia, 2004). Apesar de não ter um motivo catalítico, este recetor interage com várias proteínas que transmitem importantes sinais para a regulação da sobrevivência e diferenciação neuronal, bem como para a plasticidade sináptica (Chen *et al.*, 2009). O $p75^{NTR}$ é largamente expresso no sistema nervoso em desenvolvimento. Os neurónios sensoriais e simpáticos, os neurónios motores da medula espinal e do tronco cerebral, e os neurónios do córtex cerebral, cerebelo, hipocampo, prosencéfalo basal e putamen

caudado, também expressam este recetor numa dada altura do desenvolvimento. (Friedman *et al.*, 1991; Wyatt *et al.*, 1990; Ernfors *et al.*, 1989; Mobley *et al.*, 1989). Na maioria das células a expressão do p75^{NTR} cessa no estado adulto. No entanto, este continua a ser expresso em baixos níveis nos neurónios colinérgicos do prosencéfalo basal, nos neurónios sensoriais e nos neurónios motores da medula espinal (Friedman *et al.*, 1991; Ernfors *et al.*, 1989; Verge *et al.*, 1992).

Este recetor regula três grandes vias de sinalização, estando envolvido na ativação do fator nuclear- $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) (Carter *et al.*, 1996), na via das Jun Cinase (Harrington *et al.*, 2002) e na família das Rho (Yamashita e Tohyama, 2003). Se por um lado a ativação do NF- $\kappa\beta$ resulta na transcrição de vários genes que incluem alguns promotores da sobrevivência neuronal, por outro, a via das Jun Cinases promove a ativação de genes que potenciam a apoptose neuronal, atribuindo assim ao p75^{NTR} um papel duplo e oposto.

Em relação aos recetores Trk, estes constituem a segunda maior classe de recetores de neurotrofinas. O domínio extracelular de cada Trk consiste num aglomerado rico em cisteínas, seguido de três repetições ricas em leucinas, um outro aglomerado rico em cisteínas e dois domínios do tipo imunoglobulina (figura 4). O domínio citoplasmático é formado por um domínio tirosina cinase envolvido por várias tirosinas que servem como locais de acoplamento para adaptadores citoplasmáticos e enzimas (Chao, 2003).

As neurotrofinas ao ligarem-se aos recetores Trk promovem a sua ativação através da transfosforilação das cinases presentes no seu domínio citoplasmático (Chao *et al.*, 2006). As quatro neurotrofinas são específicas no que diz respeito à interação com os recetores. O NGF ativa o TrkA, o BDNF e o NT-4 ativam o TrkB e o NT-3 ativa o TrkC (figura 4). O local de maior interação entre as neurotrofinas e estes recetores é no domínio do tipo imunoglobulina na membrana proximal. Os recetores Trk estão envolvidos na regulação de várias vias de sinalização, incluindo a via das MAP-Cinases, dependentes da ativação da Ras, da fosfatidilinositol-3 cinase (PI3 cinase) e da fosfolipase C- γ 1 (PLC- γ 1) (Reichardt, 2006). A figura 5 apresenta esquematicamente as vias de sinalização das neurotrofinas de acordo com os recetores p75^{NTR} e os recetores da família Trk.

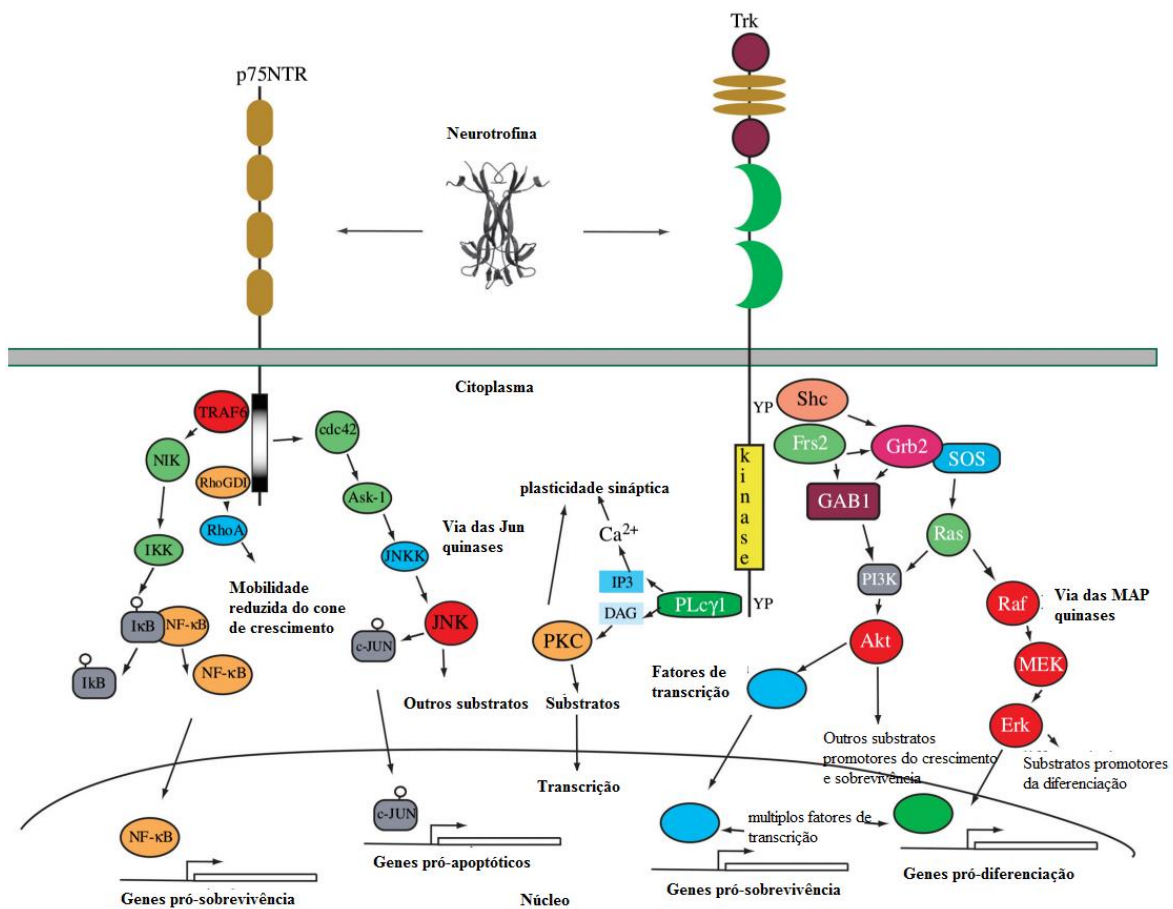


Figura 5 – Vias de sinalização reguladas pelas neurotrofinas. O p75^{NTR} regula três grandes vias de sinalização. A ativação do NF-κB resulta na transcrição de vários genes que promovem quer a sobrevivência, quer a apoptose neuronal. A ligação das neurotrofinas ao p75^{NTR} também regula a atividade da Rho, a qual controla a mobilidade do cone de crescimento. A ativação da via das Jun cinases controla a expressão de vários genes promotores da apoptose neuronal. Cada recetor Trk também controla três grandes vias de sinalização: a via da Ras, que resulta na ativação da cascata de sinalização da MAP-cinase, promovendo a diferenciação neuronal; a via da PI3 cinase através da Ras ou da GAB1, que promove a sobrevivência e o crescimento de neurónios e outras células; e a via da PLC-γ1, que por sua vez ativa as vias reguladas por Ca²⁺ e pela proteína cinase C, promotoras da plasticidade sináptica. Cada uma destas vias regula também a transcrição de genes (adaptado de Reichardt, 2006).

1.6. Genes candidatos das neurotrofinas: genes *BDNF* e *p75^{NTR}*

Evidências diretas e indiretas implicam o sistema neurotrófico na etiologia da dependência de álcool, tabaco, drogas ilícitas e violência doméstica, particularmente o *BDNF* e o *p75^{NTR}* (Davis, 2008; Jiang *et al.*, 2009; Hilburn *et al.*, 2011; McCarthy *et al.*, 2012). Por exemplo, estudos em humanos revelaram uma diminuição nos níveis de *BDNF* no plasma de indivíduos dependentes de álcool (Joe *et al.*, 2007) e um aumento nos níveis de *BDNF* no plasma de indivíduos em abstinência de álcool, cocaína e matanfetaminas (Hilburn *et al.*, 2011). Além disso, estudos efetuados em ratinhos com déficit de *BDNF* revelaram que estes apresentam uma maior apetência para o consumo de álcool (Hensler *et al.*, 2003) e são mais agressivos (Lyons *et al.*, 1999). Face ao exposto, o gene *BDNF* é um bom candidato para a etiologia da dependência de álcool, tabaco, drogas ilícitas e violência doméstica.

O gene *BDNF* localiza-se na região cromossômica 11p13 e é constituído por onze exões, representados na figura 6, e nove promotores funcionais que são utilizados de forma específica em diferentes tecidos e regiões cerebrais (Maisonpierre *et al.*, 1991; Pruunsild *et al.*, 2007).

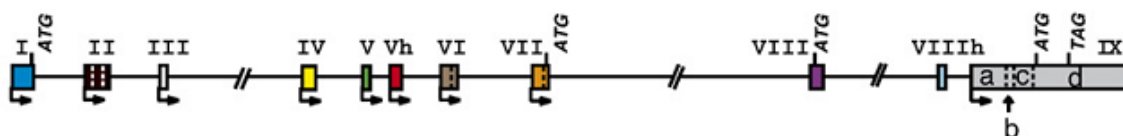


Figura 6 - Estrutura do gene *BDNF*. Os exões estão representados em caixas e pelos números I, II, III, IV, V, Vh, VI, VII, VIII, VIIIh e IX (adaptado de Pruunsild *et al.*, 2007).

No gene *BDNF* tem sido identificados vários *single nucleotide polymorphisms* (SNPs), sendo o Val66Met o mais estudado. Este resulta da troca do nucleótido guanina (G) para o nucleótido adenina (A) na posição 196 da sequência do gene que codifica a proteína, assim como na subsequente troca do aminoácido Valina (Val) para Metionina (Met) na posição 66 do pró-domínio da proteína *BDNF* (Dincheva *et al.*, 2012). Até ao momento, os resultados de estudos genéticos do polimorfismo Val66Met no gene *BDNF* relacionados com a dependência de álcool e tabaco são contraditórios quer em estudos individuais (Matsushita *et al.*, 2004; Lang *et al.*, 2007; Montag *et al.*, 2008;

Wojnar *et al.*, 2009; Novak *et al.*, 2010; Su *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012; Benzerouk *et al.*, 2013; Nedic *et al.*, 2013), quer numa meta-análise de *genome-wide association studys*, a qual revelou associação entre o polimorfismo Val66Met no gene *BDNF* e a iniciação do consumo de tabaco (The Tobacco and Genetics Consortium, 2010). Assim face à inconsistência dos resultados, estudos adicionais são necessários em novas populações e com tamanho de amostras maiores a fim de se esclarecer o papel do gene na etiologia da dependência.

Relativamente ao gene *p75^{NTR}*, recentemente, um estudo em humanos mostrou que o consumo de etanol aumenta a expressão do *p75^{NTR}* (Do *et al.*, 2013). Estudos com modelos animais demonstraram também que a perda de *p75^{NTR}* leva a alterações na sinalização colinérgica no hipocampo (Martinowich, 2012). Por sua vez, o sistema colinérgico está relacionado com o tabagismo, na medida em que a nicotina assim como outras drogas capazes de causar dependência funcionam como agonistas seletivos dos recetores colinérgicos nicotínicos (De Biasi e Dani, 2011). Com base nas considerações anteriores o gene *p75^{NTR}* é um candidato altamente promissor para a dependência de drogas licitas e ilícitas, apesar desta hipótese não ter sido ainda explorada.

O gene *p75^{NTR}* localiza-se no cromossoma 17q21-q22 (Huebner *et al.*, 1986) e é constituído por seis exões e cinco intrões (figura 7) (Sehgal *et al.*, 1988). No exão IV foi identificado um SNP, o S205L, que consiste na alteração de um nucleótido citosina (C) por um nucleótido timina (T) na posição 727, dando origem à troca do aminoácido serina (S) pelo aminoácido leucina (L) no codão 205 do recetor *p75^{NTR}* (Haga *et al.*, 2002).

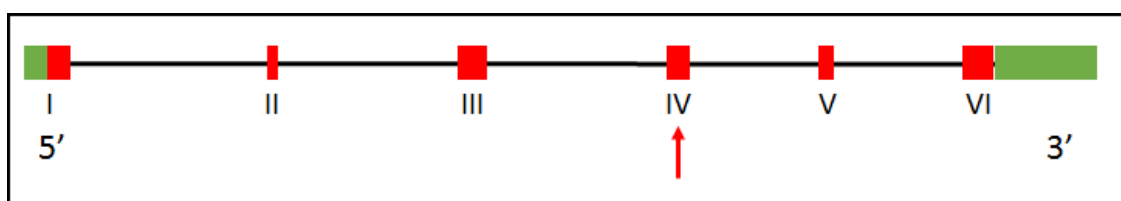


Figura 7 - Esquema do gene *p75^{NTR}*. Estão representados os seis exões do gene *p75^{NTR}*, a vermelho. A seta indica a localização do polimorfismo S205L no exão IV.

Apesar das evidências mencionadas, até à data, não se conhecem estudos genéticos efetuados entre este polimorfismo e a dependência de drogas e violência doméstica a nível mundial.

1.7. Considerações gerais sobre genética

Ácido desoxirribonucleico (DNA) é o nome químico que se dá à molécula que contém toda a informação genética nos seres vivos, tendo sido acidentalmente isolado pela primeira vez em 1869 pelo médico suíço Friedrich Miescher, que ao purificar proteínas se deparou com uma substância desconhecida (rever Dahm, 2005). Apenas quase um século depois, em 1953, é que a estrutura do DNA foi descoberta pelos cientistas Watson e Crick, tendo estes verificado que se tratava de uma estrutura com duas cadeias que enrolam uma na outra para formar uma dupla hélice (Watson e Crick, 1953). Cada cadeia é constituída por grupos alternados de fosfatos e de açúcares (desoxirribose) que se ligam entre si através de ligações fosfodiéster. Ligado a cada açúcar está uma de quatro bases, A, T, G ou C. As duas cadeias da molécula de DNA estão ligadas através das bases, respeitando a sua complementaridade – A-T, C-G, sendo estas ligações feitas através de pontes de hidrogénio, como pode ser observado na figura 8 (Pasternak, 2005).

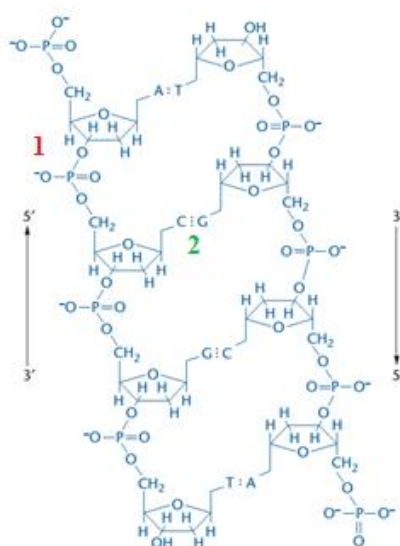


Figura 8 – Estrutura da dupla cadeia do DNA. Na figura podem observar-se as ligações fosfodiéster (1), bem como as pontes de hidrogénio, duas na ligação A-T e três na ligação C-G, que ligam as duas cadeias através das bases azotadas (2) (adaptado de Pasternak, 2005).

O genoma contém os genes, estruturalmente formados por exões (sequências codificantes de aminoácidos), intrões (sequências não codificantes) e sequências reguladoras 5'UTR e 3'UTR. O genoma humano em particular está organizado em 23

pares de cromossomas, 22 autossómicos e 1 sexual, com cerca de 3 biliões de pares de bases e um total de cerca de 30000 genes. Faz também parte do genoma humano o DNA mitocondrial (Pasternak, 2005). A figura 9 representa a interação entre os conceitos de célula, cromossomas, DNA e genes.

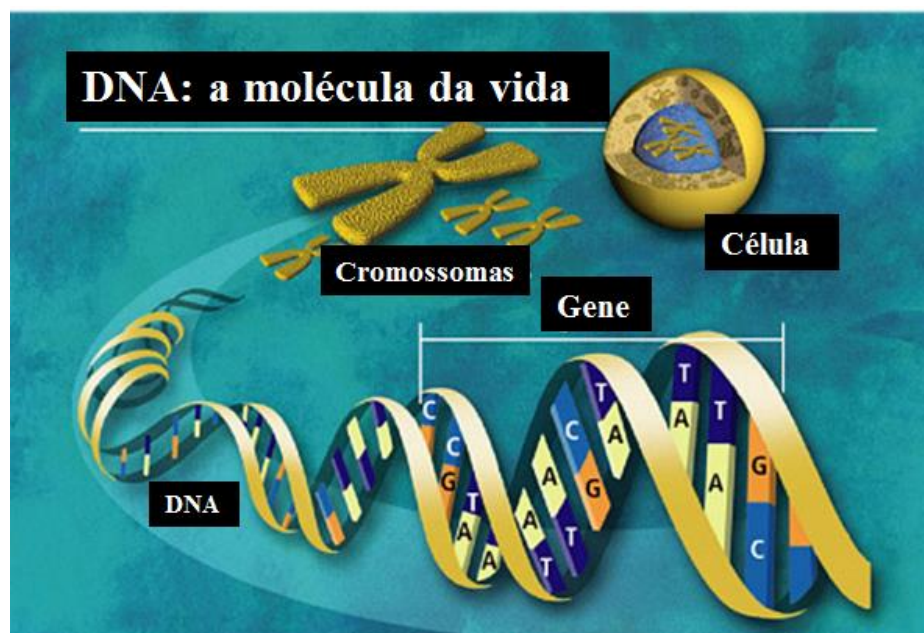


Figura 9 – DNA, a molécula da vida. Dentro do núcleo de cada célula o DNA está organizado em cromossomas. O DNA contém os genes, sequências codificantes de proteínas, formados pelos nucleótidos Adenina, Timina, Guanina e Citosina (adaptado Denis e Gallangher, 2001).

Cada gene tem pelo menos duas formas alternativas, os alelos, estando estes localizados numa zona do cromossoma denominada de locus. Genericamente, quando um alelo está presente numa população com percentagem igual ou superior a 1%, considera-se um polimorfismo (Frazer *et al.*, 2009). Os polimorfismos podem ser classificados em *restrict fragment length polymorphisms* (RFLPs), *variable number of tandem repeats* (VNTRs) ou minissatélites, *short tandem repeat polymorphisms* (STRPs) ou microssatélites, SNPs e *copy number variations* (CNVs).

A deteção de RFLPs é feita com o auxílio de enzima de restrição, uma vez que, após digestão enzimática, o tamanhos dos fragmentos de DNA daí resultante é diferente devido à substituição de um par de bases no local que estas reconhecem. Este foi o primeiro polimorfismo a ser descoberto e utilizados para pesquisa médica (Botstein *et*

al., 1980). Os VNTRs são polimorfismos cujos alelos diferem no número de repetições, podendo ter até milhares de repetições de 7 a centenas de pares de bases. São altamente polimórficos numa determinada população devido ao número de cópias da sequência de DNA repetidas (Nakamura, 2009). Os STRPs são segmentos de DNA mais curtos (inferiores a 13 pb) repetidos em tandem (Weber e May, 1989; Watson *et al.*, 2007).

Os SNPs consistem na alteração de apenas um par de bases e são a classe de variante genética mais prevalente entre indivíduos e, estimando-se que o genoma humano tenha mais de 38 milhões de SNPs (The 1000 genomes project consortium, 2012). Pelo menos 11 milhões são considerados variantes comuns presentes nas populações numa taxa superior a 1%. Os CNVs são uma forma de variação estrutural genética, referindo-se a diferenças no número de cópias de uma região genómica em particular (Frazer *et al.*, 2009). A maior cópia que se identificou foi no genoma de John Venter, com quase 2Mb de comprimento (Levy *et al.*, 2007).

Ao longo das últimas décadas projetos internacionais têm contribuído para a descoberta da variabilidade genética entre indivíduos. Em 1988 começou a ser planeado o Projeto do Genoma Humano (PGH), que tinha como principal objetivo mapear e sequenciar todo o genoma humano, ou seja, cada um dos 3 biliões de pares de bases (US Department of Health and Human Services, 1990). Em 2003 mais de 90% do genoma humano tinha sido sequenciado e várias descobertas tinham sido feitas. Uma das principais foi o número de genes descoberto, cerca de 30 mil, muito inferior aos 100 mil esperados. Daí concluiu-se que menos de 2% do genoma humano codifica proteínas, e cada gene codifica em média três proteínas. Percebeu-se ainda que o DNA de dois indivíduos é 99,9% semelhante e apenas 0,1% diferente. Foram também identificados cerca de 3 milhões de SNPs (Collins *et al.*, 2003).

As descobertas do PGH são essenciais para o avanço dos estudos em genética, particularmente de doenças complexas e potenciaram também a implementação de um novo projeto designado de projeto HapMap. Este visa dar continuidade e responder a questões levantadas pelo PGH. O projeto HapMap criado por um consórcio que incluía cientistas do Japão, do Reino Unido, Canadá, China, Nigéria e EUA, focou-se nos 0,1% da variação do genoma nas populações humanas, estudando o genoma de indivíduos da Nigéria, Japão, China e EUA, que seriam representativos das populações africanas, asiáticas e europeias ancestrais (The International HapMap Consortium, 2003). Deste projeto provieram mapas de haplotipos, baseados em tagSNPs, que permitem atualmente obter uma grande quantidade de informação genética de todo o genoma

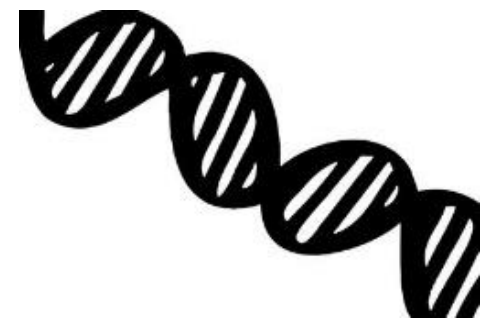
através da genotipagem de apenas 200000 a 1000000 destes SNPs (The International HapMap Consortium, 2007).

Mais recentemente, numa terceira fase do projeto HapMap, integraram-se CNVs e SNPs de baixa frequência com SNPs comuns num conjunto maior da população humana (The International HapMap 3 Consortium, 2010). Este estudo trouxe poucas respostas, mas abriu caminho à criação do projeto dos 1000 Genomas, cujo objetivo era descobrir, genotipar e providenciar informações precisas de todos os polimorfismos no DNA humano, em várias populações, caracterizando cerca de 95% das variantes genéticas com frequência alélica igual ou superior a 1% e também catalogar os alelos de baixa frequência ($<0,1\%$). O propósito era genotipar 1000 genomas de indivíduos de populações da Europa, Ásia do este e do sul, África do oeste e Américas (The 1000 Genomes Consortium, 2010).

O projeto dos 1000 Genomas, que começou em 2008, teve os primeiros dados publicados em 2010, e a segunda geração de dados em 2012. Nesta segunda fase, através da análise do genoma de 1092 indivíduos de 14 populações diferentes foi possível a identificação de 38 milhões de SNPs, 1,4 milhões de pequenas inserções e deleções, e mais de 14 milhões de grandes deleções. Demonstrou-se ainda que indivíduos de populações diferentes têm perfis diferentes de variantes raras e comuns. Este projeto ainda se encontra a decorrer, e prevê-se que na próxima fase seja feita a sequenciação do genoma de 2500 indivíduos de 27 populações (The 1000 Genomes Project Consortium, 2012).

1.8. Objetivo

As neurotrofinas, particularmente o BDNF e o seu recetor $p75^{NTR}$, têm sido implicadas na etiologia da dependência de drogas lícitas e ilícitas. O objetivo deste trabalho é estudar a associação entre os polimorfismos Val66Met e S205L dos genes *BDNF* e *p75^{NTR}*, respetivamente, e a dependência de álcool, tabaco e drogas ilícitas, numa população portuguesa de dependentes de álcool, com e sem historial de dependência de tabaco e drogas ilícitas. Pretende-se ainda verificar se existe associação entre os referidos polimorfismos e a violência doméstica, numa população portuguesa de dependentes de álcool do sexo masculino com historial de violência doméstica.



Materials e Métodos

2. Materiais e Métodos

2.1. Critérios de diagnósticos e casuística

Para o desenvolvimento deste projeto de investigação, aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, foram selecionados doentes dependentes de álcool, de acordo com os critérios da *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV)* e da *International Classification of Diseases (ICD-10)*, da Organização Mundial de Saúde (OMS), após a obtenção do consentimento informado por escrito. A amostra em estudo de doentes de ambos os sexos foi selecionada no Centro Regional de Alcoologia do Centro Maria Lucília Mercês de Melo, Coimbra, e para efetuar os estudos genéticos recolheram-se 10 ml de sangue periférico por punção venosa. A amostra total de 2350 doentes dependentes de álcool de ambos os sexos com idades compreendidas entre 22 e 77 anos, Caucasianos da população portuguesa foi estratificada por grupos: doentes dependentes de álcool de ambos os sexos; doentes dependentes de álcool de ambos os sexos com historial de consumo de tabaco; doentes dependentes de álcool do sexo masculino com historial de consumo de drogas ilícitas; doentes dependentes de álcool do sexo masculino com historial de violência doméstica. Uma amostra de controlos, com idades compreendidas entre 22 e 76, de ambos os sexos, sem historial de doenças psiquiátricas ou dependência de drogas lícitas ou ilícitas foi incluída neste estudo e foi selecionada na população geral.

2.2. Extração de DNA

O DNA pode ser extraído de diferentes fontes biológicas, tais como tecidos, células ou vírus. Existem várias formas de proceder à extração de DNA, tendo sido desenvolvidos vários protocolos baseados nas suas propriedades químicas e físicas, destacando-se o enzimático, o fenol-clorofórmio e o salting-out (Carpi *et al.*, 2011). Entre estes, o método enzimático é o mais adequado de acordo com o tipo de amostra e fim a que se destina o DNA extraído, uma vez que este é utilizado em técnicas de genotipagem, como por exemplo, a reação em cadeia da polimerase (PCR), a digestão com enzimas de restrição e os contaminantes do DNA interferem nas mesmas.

O DNA genómico utilizado nos processos experimentais aqui descritos foi extraído a partir de aproximadamente 10 ml de sangue periférico, recolhido para tubos contendo o anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (Vacutainer), utilizando um método enzimático, adaptado de Miller *et al.* (1988). A cada amostra adicionaram-se 30 ml de uma solução tampão de lise de glóbulos vermelhos (RBC) (NH_4Cl 155 mM, KHCO_3 10 mM, $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 mM; pH=7,4) (Sigma) e foram colocadas em gelo durante 20 minutos, para potenciar a hemólise dos glóbulos vermelhos. As amostras foram centrifugadas a 2500 rpm, a 4°C, durante 15 minutos numa centrífuga refrigerada (Rotanta 460R, Hettich).

Rejeitou-se o sobrenadante e adicionaram-se 20 ml de RBC e o *pellet* foi ressuspendido efetuando-se uma segunda centrifugação a 2500 rpm, a 4°C, durante 15 minutos. O sobrenadante resultante da centrifugação foi rejeitado e foram adicionados 4 ml de solução tampão de glóbulos brancos (NLB) (Tris-HCl 10 mM, NaCl 400 mM, $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2mM; pH=8) (Sigma), 250 µl de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% (Sigma) e 30 µl de proteinase k (20 mg/ml) (Roche). As amostras foram colocadas numa incubadora (Incubator S160D, Stuart Scientific) a 37°C durante 1 a 2 dias, em agitação constante.

Após este período, adicionaram-se às amostras 3 ml de NaCl 6M (Sigma), de forma a precipitar as proteínas, tendo sido posteriormente centrifugadas a 3750 rpm à temperatura ambiente, durante 30 minutos. Ao sobrenadante obtido após a centrifugação foram adicionados 2 volumes de etanol absoluto frio, de forma a precipitar o DNA genómico, o qual foi depois lavado em etanol a 70% e colocado em *ependorfs* com Tris-EDTA (Tris-HCl 10 mM, $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 mM; pH=8) (Sigma).

2.3. Quantificação do DNA genómico por método espectrofotométrico

A quantificação de DNA genómico tem como objetivo determinar a pureza e a concentração do DNA, propriedades importantes para diversas técnicas laboratoriais, a título de exemplo a PCR. O método espectrofotométrico foi utilizado para quantificar as amostras, sendo que o DNA tem um pico de absorção a um comprimento de onda de 260 nm, devido às bases purinas e pirimidinas. Por outro lado, os aminoácidos aromáticos absorvem essencialmente a 280 nm. Assim, as absorvâncias foram lidas no espectrofotómetro (Smart Spec Plus, Bio-Rad), tendo sido as amostras previamente

diluídas num fator de 25 vezes em H₂O MiliQ, submetidas a agitação no vórtex (MS1 Minishaker, IKA) para homogeneização e colocadas numa cuvete de quartzo para leitura.

A concentração, em µg/ml, é calculada recorrendo ao valor da absorvância a 260 nm, considerando a seguinte relação: uma absorvância de 1,0 equivale a 50 µg/ml de DNA de cadeia dupla. (Nicklas e Buel, 2003). Assim sendo, a concentração é calculada através da seguinte equação:

$$[\text{DNA}]_{\mu\text{g/ml}} = \text{Absorvância}_{260\text{ nm}} \times \text{Fator de Diluição} \times \text{Constante da dupla hélice}$$

A pureza do DNA genómico é calculada através do quociente entre os valores das absorvâncias a 260 nm e a 280 nm, devendo este valor estar entre 1,5 e 2,0. Para valores inferiores a 1,5 considera-se que a amostra pode estar contaminada por proteínas e para valores superiores a 2,0, pode estar perante uma contaminação com RNA.

2.4. Genotipagem

2.4.1. Contextualização geral da metodologia para a genotipagem

2.4.1.1. Reação em cadeia da polimerase

A PCR é uma técnica que permite amplificar um segmento de DNA entre duas regiões com sequências conhecidas, tendo sido desenvolvida em 1984 pelo bioquímico americano Kary Mullis (Mullis, 1990). O constituinte mais importante da PCR é um par de oligonucleótidos, designados de *primers*. Cada *primer* tem um comprimento entre 15 a 30 nucleótidos, e são complementares às regiões que flanqueiam a sequência de DNA que se pretende amplificar. O tamanho dos *primers* é de grande importância, pois se estes forem demasiado curtos podem hibridizar com sequências que não são as desejadas, e sendo demasiado compridos tornam a taxa de hibridização muito lenta (Brown, 2008).

Outros constituintes necessários para a PCR são um buffer (uma solução tampão) e desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTPs) correspondentes aos quatro tipos de nucleótidos que formam as cadeias de DNA (dATP, dTTP, dCTP, dGTP). O buffer

permite manter o pH constante da solução de reação, enquanto que os dNTPs servem para a formação das novas cadeiras durante a amplificação. É ainda necessário adicionar a Taq DNA polimerase, uma enzima termoestável que liga os dNTPs de acordo com a complementaridade das bases. Esta enzima requer como cofator o íon Mg^{++} , cuja concentração deve ser ajustada a cada reação de amplificação (Sambrook *et al.*, 1989). A síntese de DNA é feita em ciclos, repetidos de 30 a 40 vezes, sendo que cada ciclo consiste na desnaturação da cadeia de DNA molde, através do aumento da temperatura até $95^{\circ}C$, seguido do emparelhamento dos *primers* às respectivas cadeias, a uma temperatura mais baixa entre $50-60^{\circ}C$, e por fim, extensão dos mesmos, a uma temperatura de aproximadamente $72^{\circ}C$, que é a temperatura ideal de atuação da TaqDNA polimerase. A temperatura de emparelhamento dos *primers* é particularmente importante. Esta deve ser baixa o suficiente para permitir a ligação dos *primers* às respectivas cadeias, mas suficientemente alta para prevenir as ligações não específicas, o que pode acontecer a temperaturas mais baixas, fazendo com que os *primers* percam a sua especificidade (Brown, 2008). Na figura 10 está representado o processo de amplificação.

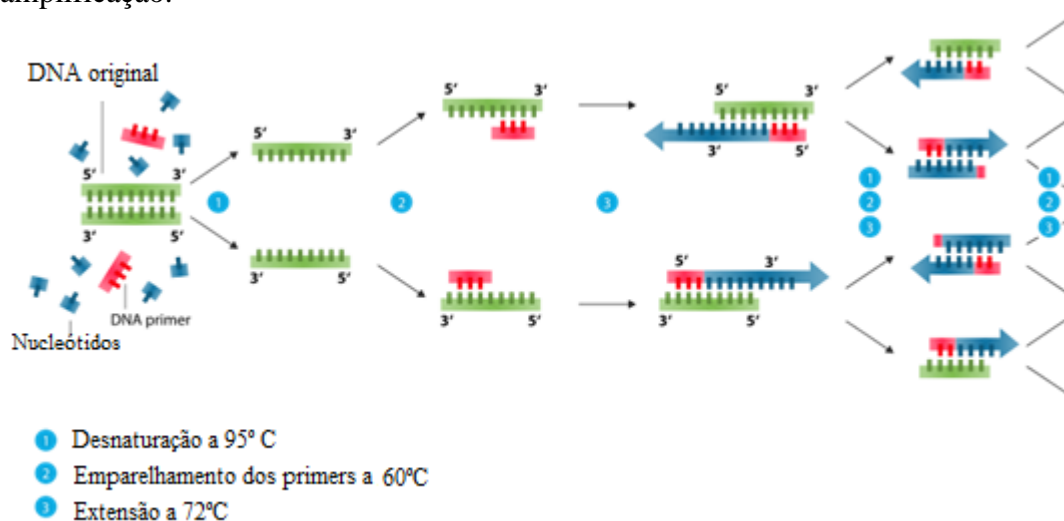


Figura 10 - Reação em cadeia da polimerase. A figura apresenta os três passos da PCR:

1) desnaturaçãõ- a cadeia dupla de DNA é desnaturada recorrendo ao aumento da temperatura; 2) emparelhamento dos *primers*- os *primers* ligam-se às cadeias simples do DNA; 3) extensão- a Taq DNA polimerase liga os dNTPs à cadeia molde, de acordo com a complementaridade das bases. A repetição dos três passos permite obter uma quantidade elevada de DNA no final dos ciclos de amplificação.

O produto de amplificação de um ciclo serve como molde para o ciclo seguinte, duplicando assim o produto amplificado. No final da PCR obtém-se uma quantidade exponencial de DNA de 2^n , onde n corresponde ao número de ciclos (Sambrook *et al.*, 1989).

2.4.1.2. Enzimas de restrição

A digestão enzimática dos fragmentos de DNA amplificados é feita com recurso a enzimas de restrição. Estas reconhecem uma sequência específica de DNA de cadeia dupla e clivam as ligações fosfodiéster em ambas as cadeias, entre determinados nucleótidos. As extremidades resultantes da clivagem podem ser do tipo cegas (figura 11a) ou do tipo coesivas (figura 11b). As enzimas de restrição permitem localizar mutações, gerar mapas de linkage ou identificar genes de suscetibilidade (Loenen *et al.*, 2013).

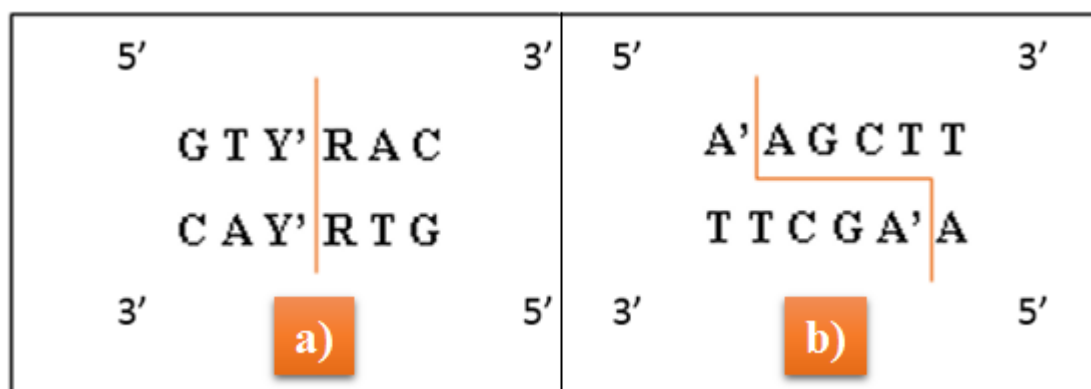


Figura 11 - Extremidades produzidas por diferentes enzimas de restrição. Em a) está representada uma extremidade cega produzida pela enzima HindII. Y= C ou T; R= A ou G. Em b) está representada uma extremidade coesiva produzida pela enzima HindII.

Os fragmentos que resultam da digestão enzimática podem ser observados por eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida.

2.4.1.3. Eletroforese

A eletroforese é uma técnica utilizada para separar, identificar e purificar fragmentos de DNA, que de outra forma não seria possível visualizar. Existem diferentes tipos, como por exemplo a eletroforese em gel de agarose ou em gel de poliacrilamida. A eletroforese em gel de poliacrilamida é mais eficiente quando se trata da separação de fragmentos mais pequenos e tem um poder de resolução elevado, permitindo a separação de fragmentos que difiram apenas por um par de bases. A eletroforese em gel de agarose é uma das mais utilizadas. Este tipo de eletroforese permite separar fragmentos de 200 pb a 50 kb. Apesar de ter um poder de resolução menor que a eletroforese em gel de poliacrilamida, tem uma taxa de separação melhor. Pode ser corrida numa configuração horizontal ou vertical, com um campo elétrico constante ou pulsado, sendo mais frequente utilizar-se uma configuração horizontal e um campo elétrico constante (Sambrook *et al.*, 1989).

Quando se aplica o campo elétrico ao gel de agarose, o DNA, que tem carga negativa a pH neutro, migra em direção ao ânodo (elétrodo positivo). A velocidade de migração dos fragmentos de DNA depende, em grande parte, do tamanho dos mesmos, sendo que fragmentos mais pequenos migram a velocidades maiores, permitindo a separação. Outros fatores, como a concentração do gel de agarose, a conformação do DNA, a voltagem aplicada, a presença de corantes e a composição do buffer (solução tampão), também têm influência na velocidade de migração dos fragmentos de DNA durante a eletroforese. Nesta podem ser utilizados diferentes tipos de solução tampão, as quais contêm EDTA e Tris-acetato (TAE) ou Tris-borato (TBE) e ou Tris-fosfato (TPE). O tampão TBE é um dos mais utilizados por ter uma maior capacidade de tamponamento.

De forma a permitir a visualização dos fragmentos de DNA resultantes da separação durante a eletroforese, adiciona-se ao gel um corante fluorescente, o brometo de etídio, que se intercala entre as bases do DNA. A radiação com um comprimento de onda de 254 nm é absorvida pelo DNA e transmitida para o corante e a radiação com 302 nm e 366 nm é absorvida pelo próprio corante. Em ambos os casos, a energia é retransmitida a 590 nm na região do vermelho-alaranjado do espectro de luz visível. Assim, quando se faz incidir radiação sobre o gel de agarose, as zonas que contêm DNA

ligado ao brometo de etídio vão exibir um campo com maior fluorescência que o restante gel.

Antes de se carregarem as amostras no gel, adiciona-se uma solução corante que permite dar densidade e cor às amostras. Dois exemplos de corantes são o azul de bromofenol e o xileno de cianol. O azul de bromofenol migra 2,2 vezes mais rápido que o xileno de cianol, independentemente da concentração do gel e em TBE 0,5X migra aproximadamente à mesma taxa que um fragmento de DNA de cadeia dupla com 300 pb. O xileno de cianol migra à mesma taxa que um fragmento de 4 kb. Este corante facilita a visualização da evolução da migração do DNA durante a eletroforese (Sambrook *et al.*, 1989).

2.4.2. Protocolos experimentais de genotipagem para o estudo de genes das neurotrofinas

2.4.2.1. Polimorfismo Val66Met do gene *BDNF*

O polimorfismo Val66Met do gene *BDNF* localizado no cromossoma 11 foi estudado através da amplificação de DNA de acordo com o protocolo adaptado de Neves-Pereira *et al.* (2002).

A solução de reação do PCR foi feita para um volume final de 25µl, tendo sido inicialmente desnaturado 125 ng de DNA genómico, a 95°C durante 5 minutos. Ao DNA desnaturado adicionou-se uma solução tampão 1x de Taq DNA polimerase (Tris-HCl 200 mM, KCl 500 mM; pH=8,4) (Invitrogen), MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 200µM (Invitrogen), *primers* 0,4 µM (Invitrogen) cada e Taq DNA polimerase 0,04 U/µl (Invitrogen).

A amplificação ocorreu num termociclador (Bio-Rad), tendo sido cada ciclo do PCR realizado a 94°C durante 30 segundos para desnaturação, 60°C durante 30 segundos para *annealing* e 72°C durante 30 segundos para extensão, num total de 30 ciclos e uma extensão final a 72°C durante 5 minutos. Após amplificação foram testados 5 µl de produto amplificado, em gel de agarose a 3,5%. Posteriormente, o produto de amplificação foi digerido com a enzima de restrição Eco72I (MBI Fermentas) (ver figura 12), a 37°C durante a noite.

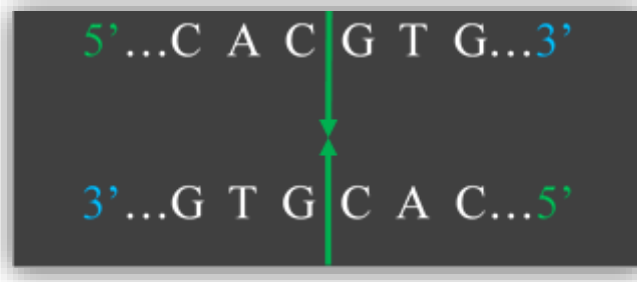


Figura 12 - Local de corte da enzima de restrição Eco72I. Esta enzima, ao cortar a cadeia de DNA dá origem a uma extremidade do tipo cega.

A separação dos fragmentos foi visualizada recorrendo a um gel de agarose a 3,5%, corado previamente com brometo de etídio (10mg/ml) (Invitrogen), num sistema de eletroforese horizontal (Bio-Rad), sujeito a uma voltagem de 100V. Como tampão, foi utilizado TBE 1x (Tris-base 89 mM, ácido bórico 89 mM, Na₂EDTA.2H₂O 2 mM). Antes de serem carregadas no gel de agarose, as amostras foram coradas com uma solução corante constituído por azul de bromofenol (0,05 m/v), xileno cianol (0,05 m/v) e glicerol (30% v/v). Ao gel adicionou-se ainda um marcador de peso molecular (Gene Ruler 100pb DNA ladder, MBI Fermentas) de forma a ser possível comparar o tamanho dos fragmentos de DNA. O gel foi visualizado no aparelho Gel Doc (Bio-Rad).

2.4.2.2. Polimorfismo S205L do gene *p75^{NTR}*

Para o estudo do polimorfismo S205L, localizado no exão 5 do gene *p75^{NTR}* (Huebner *et al.*, 1986), foi utilizada a técnica de Kunugi *et al.* (2004), com algumas alterações, para a amplificação de DNA.

Inicialmente foram desnaturados 50 ng de DNA genómico, a 95°C durante 10 minutos. Ao DNA desnaturado adicionou-se uma solução tampão 1x de Taq DNA polimerase (Tris-HCl 200 mM, KCl 500 mM, pH=8,4) (Invitrogen), MgCl₂ 1,25 mM, dNTPs 100 µM (Invitrogen), primers 0,1 µM (Invitrogen) e Taq DNA polimerase 0,04 U/µl (Invitrogen), de forma a perfazer um volume final da solução de reação de 25µl.

Para a realização da amplificação recorreu-se a um termociclador (Bio-Rad). Cada ciclo do PCR foi realizado a 95°C durante 30 segundos para desnaturação, 58°C durante 20 segundos para *annealing* e 72°C durante 30 segundos para extensão, num total de 35 ciclos e uma extensão final a 72°C durante 3 minutos. Com o objetivo de

testar a amplificação, antes de proceder à digestão com a enzima de restrição, 5µl do produto amplificado foram testados.

O produto de amplificação foi digerido com a enzima de restrição BanII (New England Biolabs) (ver figura 13), a 37°C durante a noite.



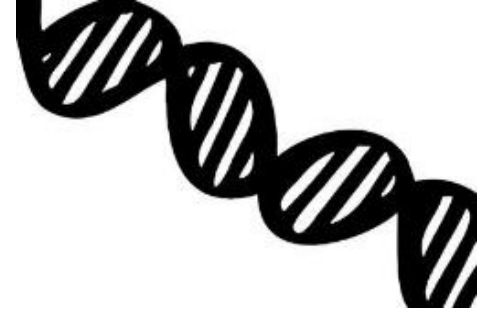
Figura 13 - Local de corte da enzima de restrição BanII. Esta enzima, ao cortar a cadeia de DNA dá origem a uma extremidade do tipo coesiva. Legenda: Y=C ou T; R=A ou G.

A separação dos fragmentos foi visualizada recorrendo a um gel de agarose a 3 %, corado previamente com brometo de etídio (10 mg/mL) (Bio-Rad), num sistema de eletroforese horizontal (Bio-Rad), sujeito a uma voltagem de 100V. A solução tampão utilizada foi o TBE 1x (Tris-base 89 mM, ácido bórico 89 mM, Na₂EDTA.2H₂O 2 mM). De forma a dar densidade às amostras, adicionou-se uma solução corante de azul de bromofenol a 0,05 m/v e 30% v/v. Para se poderem comparar os tamanhos dos fragmentos de DNA, foi adicionado ao gel um marcador de peso molecular (Gene Ruler 100pb DNA ladder, MBI Fermentas). A visualização dos fragmentos de digestão do DNA foi efetuada no Gel Doc (Bio-Rad).

2.5. Análise estatística

A análise estatística foi efetuada com o *Primer of Biostatistics program* (versão 3.01) (Glantz, 1992). Neste estudo, procederam-se a diferentes análises comparando uma amostra total de ambos os sexos de doentes dependentes de álcool/controlos sem historial de doenças psiquiátricas ou dependência de drogas lícitas e ilícitas; amostra de ambos os sexos de doentes dependentes de álcool com historial de consumo de tabaco/doentes dependentes de álcool sem historial do consumo de tabaco; amostra do sexo masculino de doentes dependentes de álcool com historial de consumo de drogas

ilícitas/doentes dependentes de álcool sem historial de consumo de drogas ilícitas; amostra do sexo masculino de doentes dependentes de álcool com historial de violência doméstica/doentes dependentes de álcool sem historial de violência doméstica. A análise da distribuição genotípica e alélica foi efetuada recorrendo a tabelas de contingência utilizando o Qui-quadrado e para valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.



Resultados e Discussão

3. Resultados e discussão

3.1. Gene candidato *BDNF*

A nível mundial, o modelo neurotrófico tem sido implicado na dependência de drogas (Davis, 2008). Entre as neurotrofinas, o gene *BDNF* é considerado um candidato altamente promissor para a etiologia da dependência de drogas lícitas e das drogas ilícitas. Como já referido anteriormente, o polimorfismo Val66Met consiste na alteração de um nucleótido G por um A na posição 196 do gene *BDNF*, levando a uma alteração do aminoácido Val para Met, na posição 66 da proteína. Assim, para o desenvolvimento do projeto de investigação, procedeu-se à amplificação do DNA e o fragmento amplificado resultante do PCR, realizado conforme descrito no ponto 2.4.2.1 é constituído por 113 pb (Figura 14).

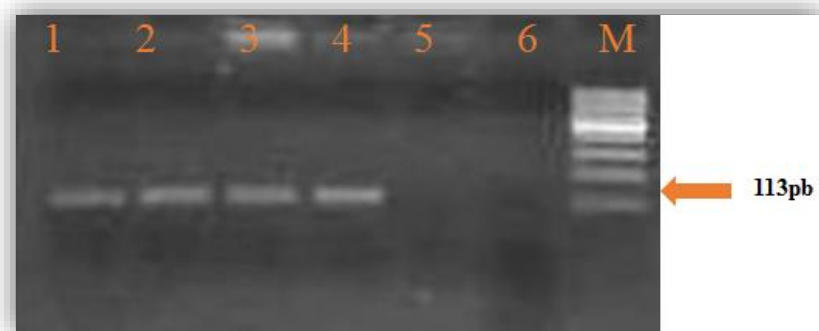


Figura 14 – Eletroforese em gel de agarose a 3,5 % relativa ao produto amplificado do polimorfismo Val66Met do gene *BDNF*. Legenda da figura: 1 a 4 representam as bandas de produto amplificado do referido polimorfismo; 5 representa uma amostra não amplificada; 6 representa o controlo negativo. M representa o marcador de peso molecular de 100 pb.

Procedeu-se à digestão enzimática com a enzima *Eco72I* resultando dois fragmentos, um com 78 pb e outro com 35 pb, correspondentes ao alelo Val. Os fragmentos de 113 pb correspondem ao alelo Met (figura 15).

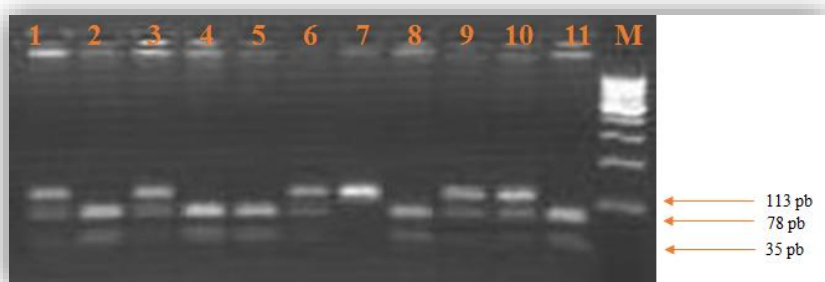


Figura 15 – Separação dos fragmentos de DNA do polimorfismo Val66Met do gene *BDNF*, em gel de agarose a 3,5%, resultantes da digestão com a enzima Eco72I. Legenda da figura: 1, 3, 6, 9 e 10 representam indivíduos heterozigóticos (Val/Met); 7 representa um indivíduo homozigótico para o alelo Met (Met/Met); 2, 4, 5, 8 e 11 representam homozigóticos para o alelo Val (Val/Val). M representa o marcador de peso molecular de 100 pb.

3.1.1. Polimorfismo Val66Met e a dependência de álcool

Para a dependência de álcool têm sido efetuados alguns estudos de associação com o polimorfismo Val66Met do gene *BDNF*, em diferentes populações mundiais. No entanto, os resultados obtidos são inconsistentes. Contudo não existem estudos genéticos na população portuguesa. No sentido de se investigar o polimorfismo Val66Met do gene *BDNF* na etiologia da dependência de álcool utilizou-se a estratégia de associação e as distribuições genotípicas e alélicas da amostra total de doentes dependentes de álcool e amostra controlo estão representadas na tabela 1.

Tabela 1 - Polimorfismo Val66Met do gene *BDNF* na amostra total de doentes dependentes de álcool e controlos: distribuição genotípica e alélica

	Genótipos			Alelos	
	Met/Met (%)	Val/Met (%)	Val/Val (%)	Met (%)	Val (%)
Dependentes de álcool n=534	24 (4,5)	183 (34,3)	327 (61,2)	231 (21,6)	837 (78,4)
Controlos n=275	14 (5,1)	85 (30,9)	176 (64,0)	113 (20,5)	437 (79,5)
$\chi^2=0,979$; df=2; p=0,613			$\chi^2= 0,194$; df=1; p=0,660		

Como pode ser verificado na tabela 1 não há associação entre o Val66Met do gene *BDNF* e a dependência alcoólica em relação aos genótipos ($\chi^2=0,979$; df=2; p=0,613) ou aos alelos ($\chi^2= 0,194$; df=1; p=0,660). Estes resultados estão de acordo com os estudos realizados, utilizando a estratégia de associação case-control em amostras com descendência europeia-americana (Zhang *et al.*, 2006), japonesa (Matsushita *et al.*, 2004) e chinesa (Tsai *et al.*, 2005), nos quais também não foi detetada associação entre a dependência de álcool e o polimorfismo Val66Met do gene *BDNF*. Um outro estudo de associação realizado por Grzywacz e colaboradores (2010) numa amostra de famílias de origem caucasiana da população da Polónia também não revelou associação entre o polimorfismo Val66Met do gene *BDNF* e a dependência de álcool.

Mais recentemente, foi realizada uma investigação onde se pretendia avaliar a associação entre o polimorfismo Val66Met do gene *BDNF* e a dependência de álcool, numa população de 675 doentes alcoólicos caucasianos da Croácia, subdivididos de acordo com a presença/ausência de depressão relacionada com o álcool, agressão, tentativa ou comportamento suicida, síndrome de abstinência, início prematuro ou tardio do abuso de álcool, dependência de álcool moderada ou acentuada. Não foi detetada qualquer associação entre o polimorfismo estudado e os fenótipos mencionados (Nedic *et al.*, 2013). No entanto, o polimorfismo estudado foi associado à dependência de álcool numa amostra de 68 indivíduos do sexo masculino da população coreana, com idades iguais ou superiores a 65 anos (Shin *et al.*, 2010). Neste estudo foi

obtida uma maior frequência do alelo Met nos doentes dependentes de álcool quando comparados com o grupo controlo (genótipo Met/Met=27,9% e alelo Met=58,1%). Curiosamente, numa amostra de 154 doentes com dependência de álcool da população da Polónia, o alelo Val e o genótipo Val/Val está associado a recaída após tratamento da dependência de álcool (Wojnar *et al.*, 2009). Esta diferença de resultados pode estar relacionada com a idade, ancestralidade dos indivíduos da amostra e o tamanho da amostra estudada.

Os resultados obtidos na amostra da população portuguesa parecem sugerir que o polimorfismo Val66Met do gene *BDNF* não desempenha um papel *major* na etiologia da dependência de álcool. Contudo, é importante o estudo de outros polimorfismos no gene *BDNF* no sentido de se efetuar a análise de haplotipos que é mais poderosa, comparativamente a uma análise de marcadores individuais e desta forma esclarecer o envolvimento do gene mencionado, na etiologia da dependência de álcool. De facto, observaram-se níveis alterados de BDNF no plasma de indivíduos dependentes de álcool (Joe *et al.*, 2007), bem como em indivíduos em abstinência de álcool (Hilburn *et al.*, 2011). Estudos recentes mostram também que o genótipo Val/Val pode estar relacionado com a recuperação de volume de substância cerebral cinzenta em doentes dependentes de álcool em abstinência, bem como o genótipo Val/Met relativamente substância cerebral branca (Mon *et al.*, 2013).

3.1.2. Polimorfismo Val66Met e consumo de tabaco

No sentido de se avaliar o polimorfismo Val66Met do gene *BDNF* no consumo de tabaco procedeu-se à análise estatística e na tabela 2 estão representados os resultados das frequências genóticas e alélicas. Relativamente aos genótipos e alelos, os resultados obtidos não revelaram diferenças estatisticamente significativas entre a amostra de doentes dependentes de álcool e consumidores de tabaco versus doentes dependentes de álcool não consumidores de tabaco, para o polimorfismo Val66Met do gene *BDNF*.

Tabela 2 – Polimorfismo Val66Met do gene *BDNF* na amostra de doentes dependentes de álcool e com historial de consumo de tabaco: distribuição genotípica e alélica

	Genótipos			Alelos	
	Met/Met (%)	Val/Met (%)	Val/Val (%)	Met (%)	Val (%)
Dependência de álcool com consumo de tabaco n=203	12 (5,9)	67 (33,0)	124 (61,1)	91 (22,4)	315 (77,6)
Dependência de álcool sem consumo de tabaco n=181	6 (3,3)	63 (34,8)	112 (61,9)	75 (20,7)	287 (79,3)
$\chi^2=1,478$; df=2; p=0,478			$\chi^2= 0,232$; df=1; p=0,630		

Os resultados obtidos sugerem que o polimorfismo Val66Met do gene *BDNF* não desempenha um papel direto na etiologia do consumo de tabaco na amostra estudada da população portuguesa. Em relação ao polimorfismo Val66Met do gene *BDNF*, até ao momento os resultados de estudos genéticos efetuados a nível mundial são contraditórios (Tobacco and Genetics Consortium, 2010). Um estudo realizado com indivíduos caucasianos de descendência alemã obteve associação entre o alelo Met do polimorfismo Val66Met do gene *BDNF* e o consumo de tabaco (Lang *et al.*, 2007). No entanto, um segundo estudo efetuado numa amostra maior da mesma população não replicou a associação entre o polimorfismo Val66Met do gene *BDNF* e o consumo de tabaco (Montag *et al.*, 2008).

Mais recentemente, num estudo realizado com indivíduos da população Chinesa não foi encontrada associação entre o polimorfismo estudado e o consumo de tabaco (Zhang *et al.*, 2012). No entanto, os fumadores portadores do alelo Met mostraram uma tendência para iniciar o consumo de tabaco mais cedo (Zhang *et al.*, 2012).

Um outro estudo que pretendia comparar a concentração de BDNF no plasma de consumidores de tabaco com o polimorfismo Val66Met do gene *BDNF* concluiu que de facto a concentração da proteína BDNF é maior em fumadores, mas o polimorfismo estudado parece não ter qualquer relação com este aumento (Suriyaprom *et al.*, 2013). O esclarecimento destes resultados pode passar por estudar outros polimorfismos do gene *BDNF*, uma vez que estudos recentes detetaram uma associação entre o polimorfismo

rs4923461 e consumidores de tabaco (Halldén *et al.*, 2013). As diferenças entre os resultados obtidos nos distintos estudos podem ser explicadas por diferenças populacionais, pois as frequências alélicas variam de população para população (The 1000 Genomes Project Consortium, 2012), pelo tamanho da amostra e pelos diferentes critérios de diagnóstico que possam ter sido usados nos diferentes estudos.

3.1.3. Polimorfismo Val66Met e consumo de drogas ilícitas

O BDNF tem sido também implicado na etiologia da dependência de drogas ilícitas. Assim, investigámos o polimorfismo Val66Met do gene *BDNF* numa amostra do sexo masculino de doentes dependentes de álcool, com historial de consumo de drogas ilícitas e os resultados estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3 - Polimorfismo Val66Met do gene *BDNF* na amostra de doentes dependentes de álcool e com historial de consumo de drogas ilícitas: distribuição genotípica e alélica

	Genótipos			Alelos	
	Met/Met (%)	Val/Met (%)	Val/Val (%)	Met (%)	Val (%)
Dependência de álcool com consumo de drogas ilícitas n=73	3 (4,1)	29 (39,7)	41 (56,2)	35 (24,0)	111 (76,0)
Dependência de álcool sem consumo de drogas ilícitas n=64	2 (3,1)	25 (39,1)	37 (57,8)	29 (22,7)	99 (77,3)
$\chi^2=0,111$; df=2; p=0,946			$\chi^2=0,013$; df=1; p=0,909		

Como pode ser observado não se verificou associação entre o polimorfismo Val66Met do gene *BDNF* e a dependência de drogas ilícitas quer em relação aos

genótipos ($\chi^2=0,111$; $df=2$; $p=0,946$), quer em relação aos alelos ($\chi^2=0,013$; $df=1$; $p=0,909$). Os resultados obtidos estão de acordo com os estudos realizados, utilizando a estratégia de associação *case-control* em amostras com descendência europeia-americana (Zhang *et al.*, 2006). Recentemente, foi efetuado um estudo na população polaca, numa amostra de dependentes de agentes psicoativos (anfetaminas, canábis e opiáceos) e resultados negativos foram igualmente obtidos para o polimorfismo Val66Met do gene *BDNF* (Biskupska *et al.*, 2013).

Apesar dos nossos resultados serem negativos a hipótese neurotrófica é altamente promissora para a dependência de drogas ilícitas. Assim é importante continuar este estudo numa amostra maior, bem como estudar outros polimorfismos no gene *BDNF*, uma vez que foram detetados níveis alterados de *BDNF* no plasma de indivíduos em abstinência de álcool e drogas ilícitas como a cocaína e as metamfetaminas (Hilburn *et al.*, 2011). Além disso, o consumo de drogas ilícitas como a cocaína leva a alterações nos elementos promotores CREB e MeCP2 da expressão de *BDNF* (McCarthy *et al.*, 2012). Face ao exposto, seria importante também estudar alterações nos genes que codificam as proteínas CREB e MeCP2 e que poderão explicar as alterações na expressão do *BDNF*.

3.1.4. Polimorfismo Val66Met e violência doméstica

Do que se sabe até ao momento, não existe qualquer estudo genético a nível mundial realizado na violência doméstica. Deste modo, propusemos investigar o polimorfismo Val66Met do gene *BDNF* na etiologia da violência doméstica, numa amostra de indivíduos dependentes de álcool com historial de violência doméstica. No presente estudo não foi encontrada associação entre o polimorfismo Val66Met do gene *BDNF* e a violência doméstica, nem para o distribuição genotípica ($\chi^2=0,110$; $df=2$; $p=0,946$) nem para a distribuição alélica ($\chi^2=0,039$; $df=1$; $p=0,843$) (Tabela 4), sugerindo que este polimorfismo não se encontra envolvido na etiologia da violência doméstica na amostra estudada da população portuguesa.

Tabela 4 - Polimorfismo Val66Met do gene *BDNF* na amostra de doentes dependentes de álcool com historial de violência doméstica: distribuição genotípica e alélica

	Genótipos			Alelos	
	Met/Met (%)	Val/Met (%)	Val/Val (%)	Met (%)	Val (%)
Dependência de álcool com violência doméstica n=99	4 (4,0)	37 (37,4)	58 (58,6)	45 (22,7)	153 (77,3)
Dependência de álcool sem violência doméstica n=87	4 (4,6)	34 (39,1)	49 (56,3)	42 (24,1)	132 (75,9)
$\chi^2=0,110$; df=2; p=0,946			$\chi^2=0,039$; df=1; p=0,843		

Apesar de não existirem estudos de associação entre o polimorfismo Val66Met do gene *BDNF* e a violência doméstica, existem outros estudos realizados em dependentes de álcool de uma população chinesa (Tsai *et al.*, 2005) e caucasianos (Nedic *et al.*, 2013), com historial de violência onde também não foi encontrada associação entre o polimorfismo estudado e a agressividade. Por outro lado, num estudo de uma amostra da população japonesa, de indivíduos dependentes de álcool e com comportamento violento foi observado uma maior frequência quer do genótipo Met/Met quer do alelo Met nestes indivíduos (Mutsushita *et al.*, 2004). Mais recentemente, o polimorfismo Val66Met do gene *BDNF* foi também associado ao método violento de consumir o suicídio (Pregelj *et al.*, 2011). Apesar dos nossos resultados serem negativos é importante continuar este estudo na população portuguesa, bem como efetuar o mesmo noutras populações mundiais, no sentido de desenvolver medidas preventivas de forma a identificar indivíduos em risco e diminuir este grave problema de saúde pública a nível global.

3.2. Gene candidato $p75^{NTR}$

Outro dos genes candidatos do sistema neurotrófico proposto para o estudo da dependência de drogas lícitas e ilícitas foi o gene $p75^{NTR}$, uma vez que se encontra envolvido em processos de sobrevivência e morte a nível das células cerebrais em regiões envolvidas no sistema de recompensa (Barker, 2004), tendo sido este sistema pioneiro da investigação genética da dependência de álcool. Para o estudo do polimorfismo S205L localizado no exão 4 do gene $p75^{NTR}$, o tamanho do fragmento amplificado de DNA de 386pb está representado na figura 16.

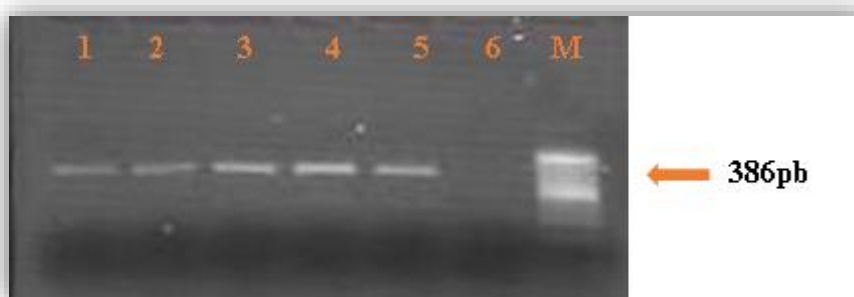


Figura 16 – Eletroforese em gel de agarose a 3% com o produto de amplificação do polimorfismo S205L do gene $p75^{NTR}$. Legenda da figura: 1 a 5 representam as bandas de produto amplificado do referido polimorfismo; 6 representa o controlo negativo; M representa o marcador de peso molecular de 100pb.

O DNA amplificado foi sujeito a digestão com a enzima BanII e os fragmentos resultantes estão apresentados na figura 13, estando o alelo S representado pelos fragmentos de 289 pb e 97 pb e o alelo L pelo fragmento de 386 pb.



Figura 17 - Separação dos fragmentos de DNA do polimorfismo S205L do gene $p75^{NTR}$, em gel de agarose a 3%, resultantes da digestão com a enzima BanII. Legenda da figura: 1 e 8 representam indivíduos heterozigóticos (S/L); 3 representa um indivíduo homozigótico para o alelo L (L/L); 2, 4, 5, 6, 7 e 9 representam homozigóticos para o alelo S (S/S); M representa o marcador de peso molecular de 100pb.

3.2.1. Polimorfismo S205L e a dependência de álcool

Estudos efetuados demonstram que a ingestão de etanol aumenta a expressão de recetor $p75^{NTR}$ (Do *et al.*, 2013). Assim propusemos investigar uma eventual associação entre o polimorfismo S205L do gene $p75^{NTR}$ e a dependência de álcool, numa amostra da população portuguesa. A tabela 5 apresenta os resultados referentes à dependência de álcool da amostra total, mostrando as frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo S205L do gene $p75^{NTR}$.

Tabela 5 – Polimorfismo S205L do gene $p75^{NTR}$ na amostra total de doentes dependentes de álcool e controlos: distribuição genotípica e alélica

	Genótipos			Alelos	
	L/L	S/L	S/S	L	S
Dependência	1,1	1,2	2,2	(%)	(%)
alcoólica	9	118	581	136	1280
n=708	(1,3)	(16,7)	(82,1)	(9,6)	(90,4)
Controlos	10	40	211	60	462
n=261	(3,8)	(15,3)	(80,8)	(11,5)	(88,5)
$\chi^2=6,620$; $df=2$; $p=0,037$				$\chi^2=1,298$; $df=1$; $p=0,255$	

Relativamente ao genótipo, a análise dos resultados do polimorfismo S205L do gene *p75^{NTR}*, utilizando uma estratégia de associação revelou diferenças estatisticamente significativas comparando a amostra total de dependentes de álcool e a amostra controlo ($\chi^2=6,620$; $df=2$; $p=0,037$). Resultados negativos foram obtidos para a análise dos alelos. Deste modo, na população portuguesa, os resultados sugerem que o polimorfismo S205L do gene *p75^{NTR}* desempenha um papel direto na dependência de álcool, apesar de carecem de replicação noutras populações mundiais. À luz do nosso conhecimento podemos afirmar que, até à data, este é o primeiro estudo de associação realizado a nível mundial entre o polimorfismo S205L do gene *p75^{NTR}* e a dependência de drogas, em particular a dependência de álcool. O polimorfismo S205L do gene *p75^{NTR}* conduz a uma alteração de uma serina por uma leucina na região rica em serinas/treoninas intracelular do recetor. Apesar do mecanismo envolvido não estar completamente esclarecido, esta alteração pode estar envolvida no correto enrolamento da proteína na localização celular, na interação proteína proteína e na dimerização dos recetores. De facto, é crucial realizar mais estudos quer genéticos com variantes genéticas na população portuguesa e noutras populações mundiais, quer estudos funcionais de forma a clarificar a repercussão que desempenha o polimorfismo S205L do gene *p75^{NTR}* ao nível da função do recetor.

3.2.2. Polimorfismo S205L e o consumo de tabaco

À semelhança dos estudos anteriores procedeu-se também à análise dos resultados dos estudos de associação entre o polimorfismo S205L do gene *p75^{NTR}* e o consumo de tabaco. A distribuição genotípica e alélica do polimorfismo S205L do gene *p75^{NTR}* da amostra de doentes dependentes de álcool com e sem historial de consumo de tabaco estão representadas na tabela 6.

Tabela 6 - Polimorfismo S205L do gene $p75^{NTR}$ na amostra de doentes dependentes de álcool e com historial de consumo de tabaco: distribuição genotípica e alélica

	Genótipos			Alelos	
	L/L (%)	S/L (%)	S/S (%)	L (%)	S (%)
Dependência de álcool com consumo de tabaco n=258	6 (2,3)	55 (21,3)	197 (76,4)	67 (13,0)	449 (87,0)
Dependência de álcool sem consumo de tabaco n=276	2 (0,7)	36 (13,0)	238 (86,2)	40 (7,2)	512 (92,8)
$\chi^2=9,235$; df=2; p=0,010			$\chi^2=9,115$; df=1; p=0,003		

Utilizando a estratégia do gene candidato, a análise estatística revelou associação entre o polimorfismo S205L do gene $p75^{NTR}$ e a dependência de tabaco para o genótipo ($\chi^2=9,235$; df=2; p=0,010). Similarmente também foi obtida associação para a distribuição alélica ($\chi^2=9,115$; df=1; p=0,003). Assim, parece haver uma predisposição para o consumo de tabaco nos indivíduos que apresentam os genótipos L/L (2,3% vs 0,7%) e S/L (21,3% vs 13,0%), bem como o alelo L (13,0% vs 7,2%). Com base nos resultados obtidos podemos inferir que o polimorfismo S205L do gene $p75^{NTR}$ é um fator de risco para a dependência do tabaco na população portuguesa. Salienta-se que este é o primeiro estudo genético efetuado a nível mundial e neste contexto impulsionará a investigação do polimorfismo S205L do gene $p75^{NTR}$ noutras populações mundiais. De facto, é importante continuar os estudos genéticos com diferentes variantes genéticas no gene $p75^{NTR}$ que permitirá efetuar a análise de haplotipos e por outro lado estudar genes de outros sistemas, nomeadamente o sistema colinérgico que interage com o $p75^{NTR}$ (Martinowich *et al.*, 2012).

3.2.3. Polimorfismo S205L e consumo de drogas ilícitas

No sentido de se avaliar também a hipótese do polimorfismo S205L do gene $p75^{NTR}$ na etiologia da dependência de drogas ilícitas, efetuou-se a análise de associação numa amostra da população portuguesa, de indivíduos dependentes de álcool com e sem

historial de dependência de drogas ilícitas. Na tabela 7 observa-se uma percentagem maior dos genótipos S/L na amostra de dependentes de álcool com historial de consumo de drogas ilícitas (18,1%) comparativamente à amostra controlo de indivíduos dependentes de álcool sem historial de consumo de drogas ilícitas (15,9%).

Tabela 7 - Polimorfismo S205L do gene $p75^{NTR}$ na amostra de doentes dependentes de álcool e com historial de consumo de drogas ilícitas: distribuição genotípica e alélica

	Genótipos			Alelos	
	L/L (%)	S/L (%)	S/S (%)	L (%)	S (%)
Dependência de álcool com consumo de drogas ilícitas n=83	0 (0,0)	15 (18,1)	68 (81,9)	15 (9,0)	151 (91,0)
Dependência de álcool sem consumo de drogas ilícitas n=82	2 (2,4)	13 (15,9)	67 (81,7)	17 (10,4)	147 (89,9)
$\chi^2=2,144$; df=2; p=0,342			$\chi^2=0,049$; df=1; p=0,824		

Os resultados obtidos parecem sugerir que o polimorfismo S205L do gene $p75^{NTR}$ não está diretamente envolvido na etiologia da dependência de drogas ilícitas. Contudo, é importante realizar estudos adicionais do polimorfismo S205L do gene $p75^{NTR}$ numa amostra maior da população portuguesa, de forma a esclarecer o papel do gene $p75^{NTR}$ na etiologia da dependência de drogas ilícitas na nossa população. É igualmente importante aprofundar o conhecimento sobre o sistema neurotrófico, com o intuito de colmatar a lacuna existente na investigação nesta área, face ao envolvimento do mesmo ao nível do SNC, sendo imprescindível para combater a grave problemática que é a dependência de drogas ilícitas a nível mundial.

3.2.4. Polimorfismo S205L e violência doméstica

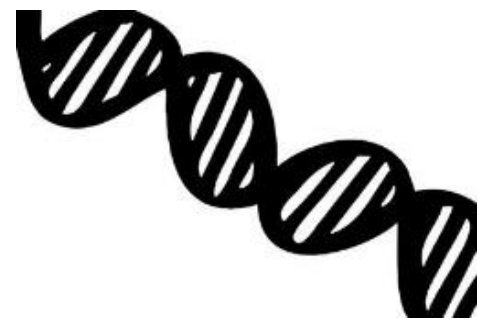
A violência doméstica como mencionado anteriormente é um grave problema de saúde pública que urge combater. Assim, face ao papel crucial que desempenha o sistema neurotrófico no SNC colocámos também a hipótese do polimorfismo S205L do gene $p75^{NTR}$ poder estar eventualmente associado à violência doméstica. Neste contexto, recorrendo a uma análise estatística, procedeu-se ao estudo do polimorfismo S205L do gene $p75^{NTR}$ comparando uma amostra de indivíduos dependentes de álcool com e sem historial de violência doméstica. As frequências genótípicas e alélicas estão representadas na tabela 8. Para os genótipos e alelos, a análise dos resultados não revelou diferenças estatisticamente significativas comparando indivíduos dependentes de álcool com e sem historial de violência doméstica.

Tabela 8 – Polimorfismo S205L do gene $p75^{NTR}$ na amostra de doentes dependentes de álcool com historial de violência doméstica: distribuição genotípica e alélica

	Genótipos			Alelos	
	L/L (%)	S/L (%)	S/S (%)	L (%)	S (%)
Dependência de álcool com violência doméstica n=91	1 (1,1)	12 (13,2)	78 (85,7)	14 (7,7)	168 (92,3)
Dependência de álcool sem violência doméstica n=96	1 (1,0)	18 (18,8)	77 (80,2)	20 (10,4)	172 (89,6)
$\chi^2=1,074$; $df=2$; $p=0,585$			$\chi^2=0,542$; $df=1$; $p=0,462$		

Os resultados parecem sugerir que o polimorfismo S205L do gene $p75^{NTR}$ não tem um papel relevante na perpetuação de violência doméstica (distribuição genotípica: $\chi^2=1,074$; $df=2$; $p=0,585$; distribuição alélica $\chi^2=0,542$; $df=1$; $p=0,462$). É importante mencionar, que tenhamos conhecimento, não existem outros estudos genéticos a nível mundial que investiguem o envolvimento do polimorfismo S205L do gene $p75^{NTR}$ com

a violência doméstica. Face ao tamanho da amostra estudada pretende-se dar continuidade ao estudo do polimorfismo mencionado, bem como investigar novas variantes genéticas que possam ser relevantes para a etiologia da violência doméstica. A identificação de fatores de risco genético é essencial para que possamos identificar indivíduos em risco e desenvolver estratégias de prevenção e combate à violência doméstica.



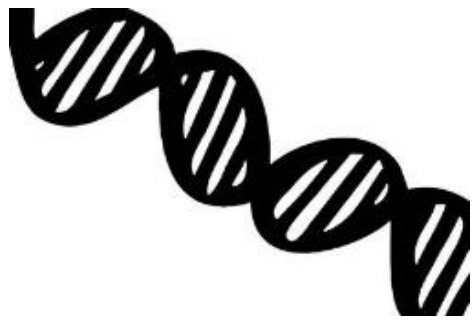
Conclusões

4. Conclusões

Neste estudo foi utilizada a estratégia do gene candidato e relativamente ao polimorfismo Val66Met do gene *BDNF* não se observou associação entre o polimorfismo Val66Met do gene *BDNF* e a dependência de álcool. Também não se verificou associação quando a amostra de dependentes de álcool foi estratificada em indivíduos com historial de consumo de tabaco e de drogas ilícitas, bem como com historial de violência doméstica.

No que se refere ao gene *p75^{NTR}*, verificou-se associação entre o polimorfismo S205L e a dependência de álcool relativamente aos genótipos, mas não aos alelos. Tal como foi efetuado para o gene *BDNF*, a amostra foi estratificada em dependentes de álcool com historial de consumo de tabaco e drogas ilícitas, e violência doméstica. Após esta análise, detetou-se associação entre a dependência de tabaco e o polimorfismo S205L do gene *p75^{NTR}*, tanto em relação à distribuição genotípica, como em relação à distribuição alélica. No entanto, não se verificou associação do polimorfismo estudado com a dependência de drogas ilícitas nem com a violência doméstica.

Assim, pode concluir-se deste estudo, que o gene *BDNF*, apesar de todas as evidências demonstradas, parece não estar diretamente envolvido na etiologia da dependência de drogas lícitas e ilícitas, bem como na etiologia da violência doméstica. Por outro lado, o polimorfismo S205L do gene *p75^{NTR}* parece ser um fator de risco na dependência de álcool e de tabaco, mas não na dependência de drogas ilícitas nem na violência doméstica. Desta forma, este estudo é importante, pois deixa-nos um passo mais perto de entendermos os mecanismos inerentes à dependência de drogas e poderá fomentar a investigação noutras populações mundiais.



Perspetivas Futuras

5. Perspetivas futuras

Conjugando os resultados obtidos no trabalho desenvolvido e as evidências do envolvimento das neurotrofinas no sistema de recompensa, como por exemplo, o aumento de níveis de BDNF na fenda sináptica quando há o consumo de cocaína (figura 18) (McCarthy *et al.*,2012), seria de extrema importância estudar, por um lado genes candidatos do sistema de recompensa, que inclui o sistema dopaminérgico, serotoninérgico, GABAérgico e glutamatérgico, analisando tagSNPs, e por outro lado estudar variantes genéticas dos recetores TrKB, os quais são específicos para o BDNF. Seria igualmente importante estudar a interação gene-gene, isto é a interação do gene BDNF com os genes dos outros sistemas mencionados, bem como a interação gene-ambiente.

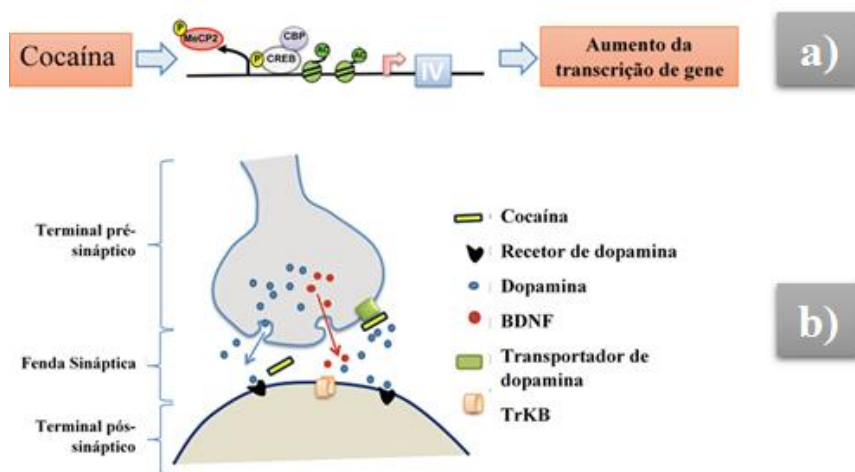
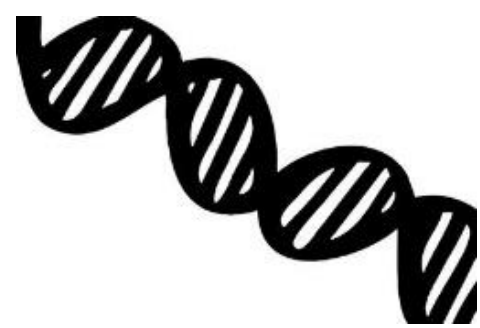


Figura 18 - alterações induzidas pela cocaína na expressão de BDNF na via mesolímbica. a) a cocaína interage com o CREB e com MeCP2 (promotores da expressão de BDNF, no exão IV) aumentando a transcrição do gene *BDNF*. b) a cocaína liga-se aos recetores de dopamina no terminal pré-sináptico da célula neuronal, bloqueando a recaptação de dopamina e aumentando os níveis deste neurotransmissor na fenda sináptica.

Tendo em conta os resultados obtidos em relação ao gene *p75^{NTR}*, é importante proceder a estudos funcionais de forma a investigar as alterações que o polimorfismo S205L pode ter nos mecanismos inerentes à dependência de drogas. Seria também crucial proceder a estudos de farmacogenética.

Face ao exposto, no seu conjunto permitirá abordar a problemática da dependência de drogas lícitas, ilícitas e violência doméstica, de uma forma mais abrangente, permitindo utilizar a farmacogenética com o intuito de providenciar estratégias de tratamento específicas para cada indivíduo e combater precocemente a dependência e a violência associada à mesma.



Referências Bibliográficas

6. Referências bibliográficas

- Allen, SJ & Dawbarn, D (2006). Clinical relevance of the neurotrophins and their receptors. *Clinical Science* 110: 175–191.
- American Psychiatric Association (1994). Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition. Washington, DC, *American Psychiatric Association*.
- American Psychiatric Association (2013). Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, fifth Edition. Washington, DC, *American Psychiatric Association*.
- Anderson, P & Baumberg, B (2006). Alcohol in Europe – A public health perspective. A report for the European Commission. England: *Institute of Alcohol Studies*.
- Barde, Y-A, Edgar, D, & Thoenen, H (1982). Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *The EMBO J* 1: 549-553.
- Benzerouk, F, Gierski, F, Gorwood, P, Ramoz, N, Stefaniak, N, Hübsch, B, Kaladjian, A & Limosin, F (2013). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) Val66Met polymorphism and its implication in executive functions in adult offspring of alcohol-dependent probands. *Alcohol* 47: 271-274.
- Bierut, L (2011). Genetic vulnerability and susceptibility to substance dependence. *Neuron* 69:618-627.
- Bierut, LJ, Dinwiddie, SH, Begleiter, H, Crowe, RR, Hesselbrock, V, Nurnberger Jr, JI, Porjesz, B, Schuckit, MA & Reich, T (1998). Familial transmission of substance dependence: alcohol, marijuana, cocaine, and habitual smoking: a report from the Collaborative Study on the Genetics of Alcoholism. *Arch Gen Psychiatry* 55: 982–988.
- Binder, DK & Scharfman, HE (2004). Brain-derived Neurotrophic Factor. *Growth Factors* 22: 123–131.
- Botstein, D, White, RL, Skolnick, M & Davis, RW (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32: 314–331.
- Brook, DW, Brook, JS, Richter, L, Whiteman, M, Arencibia-Mireles, O & Masci, JR (2002). Marijuana use among the adolescent children of high-risk drug-abusing fathers. *Am J Addict* 11: 95–110.
- Brown, TA (2008). Gene Cloning & DNA analysis: An introduction. Fifth edition. *Blackwell publishing*.

- Cadet, JL, Bisagno, V & Milroy, CM (2014). Neuropathology of substance use disorders. *Acta Neuropathol* 127: 91-107.
- Carpi, FM, Di Pietro, F, Vincenzetti, S, Mignini, F & Napolioni, V (2011). Human DNA extraction methods: patents and applications. *Recent Pat DNA Gene Seq* 5: 1-7.
- Carter, BD, Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Offenhäuser, N, Böhm-Matthaei, R, Baeuerle, PA & Barde, YA (1996). Selective activation of NF-kappa B by nerve growth factor through the neurotrophin receptor p75. *Science* 272: 542–545.
- Chao, M.V., Rajagopal, R. & Lee, F.S. (2006). Neurotrophin signaling in health and disease. *Clin Sci* 110: 167–173.
- Chao, MV (2003). Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat. Rev Neurosci* 4: 299–309.
- Chen, Y, Zeng, J, Chen, Y, Wang, X, Yao, G, Wang, W, Qi, W & Kong, K (2009). Multiple roles of the p75 neurotrophin receptor in the nervous system. *J Int Med Res* 37: 281 – 288.
- Cloninger, CR, Bohman, M & Sigvardsson, S (1981). Inheritance of alcohol abuse. Cross-fostering analysis of adopted men. *Arch Gen Psychiatry* 38: 861–868.
- Collins, F, Green, E, Guttmacher, A & Guyer, M (2003). A vision for the future of genomics research: A blueprint for the genomic era. *Nature* 422: 1-13.
- Dahm, R. (2005). Friedrich Miescher and the discovery of DNA. *Dev Biol* 278: 274-288.
- Davis, MI (2008). Ethanol-BDNF interactions: Still more questions than answers. *Pharmacology and Therapeutics* 118: 36–57.
- De Biasi, M & Dani, JA (2011). Reward, addiction, withdrawal to nicotine. *Annu Rev Neurosci* 34: 105–130.
- 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.
- Dennis, C & Gallanger, R (2001). The Human Genome. *Nature Publishing Group*.
- DGS (Direção-Geral da Saúde) (2013). Portugal: Saúde mental em números. Programa Nacional para a Saúde Mental. *Direção de Serviços de Informação e Análise*.
- Dincheva, I, Glatt, CE & Lee, FS (2012). Impact of the BDNF Val66Met polymorphism on cognition: implications for behavioral genetics. *Neuroscientist* 18: 439–451.

- Do, H, Park, H-J, Sohn, E-H, Kim, B-O, Um, SH, Kwak, J-H, Moon, E-Y, Rhee, D-K & Pyo, S (2013). Ethanol induces cell cycle arrest and triggers apoptosis via Sp1-dependent p75NTR expression in human neuroblastoma cells. *Cell Biol Toxicol* 29: 365–380.
- EMCDDA (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction) (2014). European Drug Report - Trends and developments. Luxembourg: *Publications Office of the European Union*.
- Enoch, MA (2012). The influence of gene-environment interactions on the development of alcoholism and drug dependence. *Current Psychiatry Reports* 14:150-158.
- Ernfors, P, Henschen, A, Olson, L & Persson, H (1989). Expression of nerve growth factor receptor mRNA is developmentally regulated and increased after axotomy in rat spinal cord motoneurons. *Neuron* 2: 1605–1613.
- European Commission (2012). Attitudes of Europeans towards tobacco: Report. Special Eurobarometer 385. Brussels: *TNS Opinion & Social*.
- Foran, H & O’Leary, K (2008). Alcohol and intimate partner violence: a meta-analytic review. *Clin Psychol Rev* 28: 1222-1234.
- Frazer, KA, Murray, SS, Schork, NJ & Topol, EJ (2009). Human genetic variation and its contribution to complex traits. *Nat Rev Genet* 10: 241-251.
- Friedman, WJ, Olson, L & Persson, H (1991). Temporal and spatial expression of NGF receptor mRNA during postnatal rat brain development analyzed by insitu hybridization. *Brain Res Dev Brain Res* 63: 43–51.
- Gawin, FH & Kleber, HD (1986). Abstinence symptomatology and psychiatric diagnosis in cocaine abusers: Clinical observations. *Arch Gen Psychiatry* 43: 107–113.
- Grueter, BA, Rothwell, PE, & Malenka, RC (2012). Integrating synaptic plasticity and striatal circuit function in addiction. *Curr Opin Neurobiol* 22: 545–551.
- Grzywacz, A, Samochowiec, A, Ciechanowicz, A & Samochowiec, J (2010). Family-based study of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene polymorphism in alcohol dependence. *Pharmacol rep* 62: 938-941.
- Haga, H, Yamada, R, Ohnishi, Y, Nakamura, Y & Tanaka, T (2002). Gene-based SNP discovery as part of the Japanese Millennium Genome Project: Identification of 190,562 genetic variations in the human genome. Single-nucleotide polymorphism. *J Hum Genet* 47: 605–610.

- Hanson, GR, Venturelli, PJ & Fleckenstein, AE (2009). *Drugs and Society*. Tenth Edition. *Jones and Bartlett Publishers*.
- Harrington, AW, Kim, JY & Yoon, SO (2002). Activation of Rac GTPase by p75 is necessary for c junNterminal kinase-mediated apoptosis. *J Neurosci* 22: 156–166.
- He, X L & Garcia, K C (2004). Structure of nerve growth factor complexed with the shared neurotrophin receptor p75. *Science* 304: 870–875.
- Hensler, JG, Ladenheim, EE & Lyons, WE (2003). Ethanol consumption and serotonin-1^a (5-HT1A) receptor function in heterozygous BDNF (+/-) mice. *J Neurochem* 85: 1139-1147.
- Hilburn, C, Nejtek, VA, Underwood, WA, Singh, M, Patel, G, Gangwani, P & Forster, MJ (2011). Is serum brain-derived neurotrophic factor related to craving for or use of alcohol, cocaine, or methamphetamine? *Neuropsychiatr Dis Treat* 7: 357-64.
- Huang E & Reichardt LF (2001). Neurotrophins: Roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 24: 677–736.
- Huebner, K, Isobe, M, Chao, M, Bothwell, M, Ross, AH, Finan, J, Hoxie, JA, Sehgal, A, Buck, CR, Lanahan, A, Nowell, PC, Koprowski, H & Croce, CM. (1986). The nerve growth factor receptor gene is at human chromosome region 17q12-17q22, distal to the chromosome 17 breakpoint in acute leukemias. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 1403–1407.
- IDT (2011). Relatório anual 2010 - A situação do país em termos de drogas e toxicodependências. Instituto da Droga e da Toxicodependência, I.P., Portugal.
- Jiang, X, Zhou, J, Mash, DC, Marini, AM & Lipsky, RH (2009). Human BDNF isoforms are differentially expressed in cocaine addicts and are sorted to the regulated secretory pathway independent of the Met66 Substitution. *Neuromol Med* 11: 1–12.
- Joe, K-H, Kim, Y-K, Kim, T-S, Roh, S-W, Choi, S-W, Kim, Y-B, Lee, H-J & Kim, D-J (2007). Decreased plasma brain-derived neurotrophic factor levels in patients with alcohol dependence. *Alcohol Clin Exp Res* 31: 11: 1833–1838.
- 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 Sci Int* 173:57-63.

- Kunugi, H, Hashimoto, R, Yoshida, M, Tatsumi, M & Kamijima, K (2004). A Missense Polymorphism (S205L) of the low-affinity neurotrophin receptor p75NTR gene is associated with depressive disorder and attempted suicide. *Am J Med Genet* 129B: 44–46.
- Lang, UE, Sander, T, Lohoff, FW, Hellweg, R, Bajbouj, M, Winterer, G & Gallinat, J (2007). Association of the met66 allele of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) with smoking. *Psychopharmacology* 190: 433-439.
- Lang, UE, Sander, T, Lohoff, FW, Hellweg, R, Bajbouj, M, Winterer, G & Gallinat, J (2007). Association of the met66 allele of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) with smoking. *Psychopharmacology* 190: 433-439.
- Levi-Montalcini, R (1987). The Nerve Growth Factor: thirty-five years later. *The EMBO J* 6: 1145-1154.
- Levy, S, Sutton, G, Ng, PC, Feuk, L, Halpern, AL, Walenz, BP, Axelrod, N, Huang, J, Kirkness, EF, Denisov, G, Lin, Y, MacDonald, JR, Pang, AWC, Sago, M, Stockwell, TB, Tsimouri, A, Bafna, V, Bansal, V, Kravitz, SA, Busam, DA, Beeson, KY, McIntosh, TC, Remington, KA, Abril, JF, Gill, J, Borman, J, Rogers, Y-H, Frazier, ME, Scherer, SW, Strausberg, RL & Venter, JC (2007). The diploid genome sequence of an individual human. *PLoS Biol* 5: e254.
- Li, C-Y, Mao, X & Wei, L (2008). Genes and (common) pathways underlying addiction. *PLoS Comput Biol* 4: e2.
- Liepinsh, E, Ilab, LL, Otting, G & Ibáñez, CF (1997). NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor. *EMBO J* 16: 4999–5005.
- Loenen, WAM, Dryden, TF, Raleigh, EA, Wilson, GG & Murray, NE (2013). Highlights of the DNA cutters: a short history of the restriction enzymes. *Nucleic Acids Res* 42: 3-19.
- Lu, B, Pang, PT & Woo, NH (2005). The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci* 6: 603–614.
- Lyons, WE, Mamounas, LA, Ricaurte, GA, Coppola, V, Reid, SW, Bora, SH, Wihler, C, Koliatsos, VE & Tessarollo, L (1999). Brain-derived neurotrophic factor mice develop aggressiveness and hyperphagia in conjunction with brain serotonergic abnormalities. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 15239-15244.
- Maisonpierre, PC, Le Beau, MM, Espinosa, R, Ip, NY, Belluscio, L, de la Monte, SM, Squinto, S, Furth, ME & Yancopoulos, GD (1991). Human and rat brain-derived

- neurotrophic factor and neurotrophin-3: gene structures, distributions, and chromosomal localizations. *Genomics* 10: 558–568.
- Martinowich, K, Schloesser, RJ, Lu, Y, Jimenez, DV, Paredes, D, Greene, JS, Greig, NH, Manji, HK & Lu, B (2012). Roles of p75NTR, long-term depression and cholinergic transmission in anxiety and acute stress coping. *Biol Psychiatry* 71: 75–83.
- Matsushita, S, Kimura, M, Miyakawa, T, Yoshino, A, Murayama, M, Masaki, T & Higuchi, S (2004). Association study of brain-derived neurotrophic factor gene polymorphism and alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res* 28: 1609–1612.
- McAllister, AK; Katz, LC & Lo, DC (1999). Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci.* 22:295–318.
- McCarthy, DM, Brown, NA & Bhide, PG (2012). Regulation of BDNF expression by cocaine. *Yale J Biol Med* 85: 437-446.
- Mellstrom, B, Torres, B, Link, WA & Naranjo, JR (2004). The BDNF gene: Exemplifying complexity in Ca²⁺-dependent gene expression. *Crit Rev Neurobiol* 16: 43–49.
- Mobley, WC, Woo, JE, Edwards, RH, Riopelle, RJ, Longo, FM, Weskamp, G, Often, U, Valletta, JS & Johnston, MV (1989). Developmental regulation of nerve growth factor and its receptor in the rat caudate-putamen. *Neuron* 3: 655–664.
- Montag, C, Basten, U, Stelzel, C, Fiebach, CJ & Reuter, M (2008). The BDNF Val66Met polymorphism and smoking. *Neurosci Lett* 442: 30–33
- Moonat, S, Starkman, BG, Sakharkar, A & Pandey, SC (2010). Neuroscience of alcoholism: molecular and cellular mechanisms. *Cell Mol Life Sci* 67: 73-88.
- Mullis, KB (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* 262: 56-65.
- Nakamura Y. (2009). DNA variations in human and medical genetics: 25 years of my experience. *Am J Hum Genet* 54: 1-8.
- Nedic, G, Perkovic, MN, Sziglin, KN, Muck-Seler, D, Borovecki, F & Pivac, N (2013). Brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism and alcohol-related phenotypes. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 40: 193–198.
- Neves-Pereira, M., Mundo, E., Muglia, P., King, N., Macciardi, F. & Kennedy, J.L. (2002). The Brain-derived neurotrophic factor gene confers susceptibility to bipolar disorder: evidence from a family-based association study. *Am J Genet* 71: 651-655.

- Nicklas, JA & Buel, E (2003). Quantification of DNA in forensic samples. *Anal Bioanal Chem* 376: 1160-1167.
- Novak, G, LeBlanc, M, Zai, C, Shaikh, S, Renou, J, DeLuca, V, Bulgin, N, Kennedy, JL & Le Foll, B (2010). Association of polymorphisms in the BDNF, DRD1 and DRD3 genes with tobacco smoking in schizophrenia. *Ann ICRP* 74: 291–298.
- O'Brien, CP, Childress, AR, Ehrman, R & Robbins, SJ (1998). Conditioning factors in drug abuse: Can they explain compulsion? *J Psychopharmacol* 12: 15–22.
- Pasternak, JJ (2005). Introduction to human molecular genetics – Mechanisms of inherited diseases. Second Edition. *John Wiley & Sons, Inc. Publications*.
- Pruunsild, P, Kazantseva, A, Aid, T, Palm, K & Timmusk, T (2007). Dissecting the human BDNF locus: Bidirectional transcription, complex splicing, and multiple promoters. *Genomics* 90: 397–406.
- 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.
- Reichardt, LF (2006). Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Phil Trans R Soc* 361: 1545-1564.
- Rietschel, M & Treutlein, J (2013). The genetics of alcohol dependence. *Ann NY Acad Sci* 1282: 39–70
- Sambrook, J, Fritsch, EF & Maniatis, T (1989). Molecular Cloning, A laboratory manual. Second Edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Sehgal, A, Patil, N & Chao, M (1988). A constitutive promoter directs expression of the nerve growth factor receptor gene. *Mol Cell Biol* 8: 3160-3167.
- Shin, S, Stewart, R, Ferri, CP, Kim, J-M, Shin, I-S, Kim, S-W, Yang, S-J & Yoon, J-S (2010). An investigation of associations between alcohol use disorder and polymorphisms on ALDH2, BDNF, 5-HTTLPR, and MTHFR genes in older Korean men. *Int J Geriatr Psychiatry* 25: 441–448.
- Skog, OJ (2001). Alcohol consumption and mortality rates from traffic accidents, accidental falls, and other accidents in 14 European countries. *Addiction* 96 Suppl 1: S49-58.
- Su, N, Zhang, L, Fei, F, Hu, H, Wang, K, Hui, H, Jiang, XF, Li, X, Zhen, HN, Li, J, Cao, BP, Dang, W, Qu, Y & Zhou, F (2011). The brain-derived neurotrophic factor is associated with alcohol dependence-related depression and antidepressant response. *Brain Res* 1415: 119–126.

- Suriyaprom, K, Tungtrongchitr, R, Thawnashom, K & Pimainog, Y (2013). BDNFVal66Met polymorphism and serum concentrations of BDNF with smoking in Thai males. *Genet Mol Res* 12: 4925-4933.
- 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. *Subst Use Misuse* 47:963-971.
- Teng, KK, Felice, S, Kim & T Hempstead, BL (2010). Understanding proneurotrophin actions: recent advances and challenges. *Dev Neurobiol* 70: 350–359.
- The 1000 Genomes Project Consortium (2012). An integrated map of genetic variation from 1,092 human genome. *Nature* 491: 56-65.
- The 1000 Genomes Project Consortium (2010). A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* 467: 1061-1073.
- The International HapMap 3 Consortium (2010). Integrating common and rare genetic variation in diverse human populations. *Nature* 467: 52-58.
- The International HapMap Consortium (2007). A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature* 449: 851-861.
- The International HapMap Consortium. (2003). The International HapMap Project. *Nature* 426: 789-796.
- The Tobacco and Genetics Consortium (2010). Genome-wide meta-analyses identify multiple loci associated with smoking behavior. *Nat Genet* 42: 441–447.
- Thoenen, H (2000). Neurotrophins and activity-dependent plasticity *Prog Brain Res*. 128:183–191.
- Thompson, PM, Hayashi, KM, Simon SL, Geaga, JÁ, Hong, MS, Sui, Y, Lee, JY, Toga, AW, Ling, W & London, ED (2004). Structural abnormalities in the brains of human subjects who use methamphetamine. *J Neurosci* 24: 6028–6036.
- Tsai, SJ, Liao, DL, Yu, YW, Chen, TJ, Wu, HC, Lin, CH, Cheng, CY & Hong, CJ (2005). A study of the association of (Val66Met) polymorphism in the brain-derived neurotrophic factor gene with alcohol dependence and extreme violence in Chinese males. *Neurosci Lett* 24: 381: 340-343.
- UNODC (United Nations Office on Drugs and Crime) (2013). World Drugs Report. *United Nations Publication*.
- US Department of Health and Human Services, US DOE (1990). Understanding Our Genetic Inheritance. The United States Human Genome Project The First Five Years. *NIH Publication* 90: 1580.

- Verge, VM, Merlio, J-P, Grondin, J, Ernforq, P, Persson, H, Riopelle RJ, HGKfelt, T & Richardson, PM (1992). Colocalization of NGF binding sites, trk mRNA, and low-affinity NGF receptor mRNA in primary sensory neurons: responses to injury and infusion of NGF. *J Neurosci* 12: 4011–4022.
- Vink, JM, Willemsen, G & Boomsma, DI (2005). Heritability of smoking initiation and nicotine dependence. *Behav genet* 35: 397-406.
- Watson, JD & Crick, FH (1953). The structure of DNA. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 18: 123-31.
- Watson, JD, Baker, TA, Bell, SP, Gann, A, Levine, M & Losick, R (2007). Molecular Biology of the gene. Sixth Edition. *Pearson International Edition*.
- Weber, JL & May, PE (1989). Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet* 44: 388–396.
- WHO (World Health Organization) (2008). Report on the global tobacco epidemic. The MPOWER package. Geneva: *World Health Organization*.
- WHO (World Health Organization) (2014a). Global status report on alcohol and health. Luxembourg, *World Health Organization*.
- WHO (World Health Organization) (2014b). www.who.int/mediacentre/factsheets/fs339/en, acedido em Junho 2014.
- WHO (World Health Organization) (2012). Global Report: Mortality attributable to tobacco, Fact Sheet Mortality Report. Geneva. *World Health Organization*.
- WHO (World Health Organization) (2013). Global and regional estimates of violence against women: prevalence and health effects of intimate partner violence and non-partner sexual violence. Geneva. *World Health Organization*.
- Wojnar, M, Brower, KJ, Strobbe, S, Ilgen, M, Matsumoto, H, Nowosad, I, Sliwerska, E & Burmeister, M (2009). Association between Val66Met brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene polymorphism and post-treatment relapse in alcohol dependence. *Alcohol Clin Exp Res* 33: 693–702.
- Wyatt, S, Shooter, EM & Davies, AM (1990). Expression of the NGF receptor gene in sensory neurons and their cutaneous targets prior to and during innervation. *Neuron* 4: 421–427.
- Yamashita, T & Tohyama, M (2003). The p75 receptor acts as a displacement factor that releases Rho from Rho–GDI. *Nat Neurosci* 6: 461–467.

- Yücel, M, Solowij, N, Respondek, C, Whittle, S, Fornito, A, Pantelis, C & Lubman, DI (2008). Regional brain abnormalities associated with long-term heavy cannabis use. *Arch Gen Psychiatry* 65: 694–701.
- Zhang, H, Ozbay, F, Lappalainen, J, Kranzler, HR, van Dyck, CH, Charney, DS, Price, LH, Southwick, S, Yang, B-Z, Rasmussen, A & Gelernter, J (2006). Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) gene variants and alzheimer's disease, affective disorders, posttraumatic stress disorder, schizophrenia, and substance dependence. *Am J Med Genet* 141B: 387–393.
- Zhang, XY, Chen, DC, Xiu, MH, Luo, X, Zuo, L, Haile, CN, Kosten, TA & Kosten, TR (2012). BDNF Val66Met variant and smoking in a chinese population. *Plos one* 7: e53295.