

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

**ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO DE VNTR DO
ÍNTRON 8 DO GENE *DAT1* COM O ABUSO/DEPENDÊNCIA DE
CRACK.**

Diana Müller
Orientador(a): Tatiana Roman

**Trabalho de Conclusão de Curso a ser Apresentado ao
Instituto de Biociências – UFRGS, como requisito parcial
para obtenção do título de bacharel do curso de Ciências
Biológicas.**

Porto Alegre, Dezembro de 2013

Artigo Científico

Em preparação para submissão na *Drug and Alcohol Dependence* (FI = 3,141)

ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO DE VNTR DO ÍNTRON 8 DO GENE *DAT1* E O ABUSO/ DEPENDÊNCIA DE *CRACK*.

Müller, D.¹, Stolf, A.R.², Akutagava-Martins, G.C.¹, Guimaraes, L.S.P.², Szobot, C.M.², Halpern, R.², Kessler, F.H.P.², Pechansky, F.², Roman, T.¹

¹ Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500 - Caixa Postal 15053 – Bairro Agronomia. CEP 91501-970 - Porto Alegre, RS, Brasil.

² Centro de Pesquisa em Álcool e Drogas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre – Unidade Álvaro Alvim. Rua Álvaro Alvim, 400 – Bairro Rio Branco. CEP 90420-020 - Porto Alegre, RS, Brasil.

***Corresponding author:**

Prof Tatiana Roman

Department of Genetics, Federal University of Rio Grande do Sul,
Caixa Postal 15053 - 91501-970 - Porto Alegre, RS, Brazil.

tatiana.roman@ufrgs.br

troman29@yahoo.com.br

Phone: +55 51 3308 9795

Contagem de palavras: 3.686

Resumo:

Introdução: Raros são os trabalhos que abordam a dependência de *crack*, especialmente os que investigam mecanismos genéticos possivelmente envolvidos, apesar da relevância social de seu consumo. Seguindo o modelo proposto para cocaína, a neurotransmissão dopaminérgica parece ser fundamental na dependência de *crack*, principalmente devido ao transportador de dopamina (DAT). O objetivo do presente trabalho foi investigar a associação desta dependência com o polimorfismo de VNTR de 30pb presente no íntron 8 do gene codificador do DAT, o *DAT1*. **Métodos:** A amostra incluiu 239 casos (definidos por critérios do DSM-IV) e 211 controles provenientes da região metropolitana de Porto Alegre (RS, Brasil). A avaliação clínica em ambos os grupos contou com a aplicação de diferentes escalas e questionários semi-estruturados, além da estimativa de QI. O DNA dos probandos foi obtido a partir de sangue total, seguindo-se a genotipagem do polimorfismo em estudo. A hipótese de associação foi testada por qui-quadrado e regressão logística. **Resultados:** A análise pareada detectou associação tanto com o alelo de 6 repetições (6R) como com o genótipo 6R6R (McNemar $p < 0,001$ e $p = 0,014$, respectivamente). Associações semelhantes foram verificadas nas análises não pareadas (OR = 1,535, $p = 0,042$ para o alelo 6R, e OR = 1,844, $p = 0,020$ para o genótipo 6R6R), além de um efeito protetor do alelo de 5 repetições (OR = 0,656, $p = 0,042$). **Conclusões:** Os dados sugerem um efeito do gene *DAT1* na dependência de *crack*, através do VNTR do íntron 8, concordando com o único estudo semelhante publicado previamente.

Palavras – chave: *crack*, dependência, *DAT1*, VNTR, íntron 8.

Introdução

A dependência de substâncias é um transtorno com amplas consequências físicas, psicológicas e sociais, sendo diagnosticada quando do preenchimento de pelo menos 3 dos 7 sintomas elencados no DSM-IV (*American Psychiatric Association*, 1994). A dependência de *crack* no Brasil vem sendo motivo de preocupação (Dunn J. et al, 1996), devido ao aumento significativo de seu consumo ao longo dos anos. Este aumento pode ser observado comparando-se os dados do I Levantamento Domiciliar sobre o Uso de Drogas Psicotrópicas no Brasil, realizado em 2001, com o II Levantamento, realizado em 2005: as prevalências para uso na vida de cocaína e *crack* em 2001 (2,3% e 0,4%, respectivamente) (Carlini et al, 2001) são inferiores às observadas em 2005 (2,9% e 0,7%, respectivamente) (Carlini, Galduróz et al, 2007). Os usuários são primordialmente homens na faixa etária dos 30 anos, desempregados, com baixo nível sócio econômico e baixa escolaridade, e que apresentam risco aumentado de envolvimento em atividades ilícitas e prostituição (Duailibi et al, 2008). Dentre as drogas psicoativas, os dependentes de *crack* mostram as maiores taxas de abandono de tratamento, apresentando também altos índices de recaída. Além disso, podemos destacar a maior incidência de infecção pelos vírus da AIDS e da hepatite C, o que torna o consumo de *crack* ainda mais preocupante do ponto de vista de saúde pública.

O *crack* resulta de uma combinação de pasta base de cocaína acrescida de bicarbonato de sódio, sendo, portanto, um meio de consumo diferente da cocaína e não uma droga diferente (Gossop et al, 1994). A grande preocupação quanto ao uso do *crack* se deve ao fato desta droga apresentar um potencial de dependência maior em relação às outras formas de administração da cocaína. Tal diferença possivelmente se deve à velocidade maior com que a cocaína, pela via fumada, chega ao seu alvo no cérebro, representando um menor período de tempo entre o consumo e a percepção de efeito. Quanto mais rápido ocorrem os efeitos fisiológicos relacionados ao consumo da droga possivelmente maior será a intenção de repetição do uso da droga (Volkow et al, 2000).

A cocaína tem como principal alvo no cérebro a proteína transportadora de dopamina, ou DAT (Giros et al, 1993). Esse transportador é o principal regulador da função dopaminérgica: atuando na recaptção da dopamina da fenda sináptica para o neurônio pré-sináptico, ele regula tanto a intensidade como a duração da sinalização dopaminérgica (Lohoff et al, 2010). Uma vez que a cocaína atua bloqueando a proteína DAT, a função de recaptção exercida por esta é comprometida, aumentando a concentração extracelular da dopamina. Isto resulta em estímulo neural aumentado, principalmente em regiões cerebrais envolvidas na recompensa e reforço comportamental (Wise, 2002; Fowler et al, 2007) gerando a sensação de prazer obtida com o uso da droga e levando à repetição deste (Koob, 2009). O uso continuado de cocaína associa-se a uma

depleção de receptores pós-sinápticos, de forma que haverá necessidade de maiores níveis de dopamina para manter o impulso sináptico responsável pelo efeito clínico desejado (Lambert et al, 2008). Em virtude da escassez de estudos específicos para o *crack*, e dadas as semelhanças entre as duas drogas, o modelo neurobiológico da cocaína é aplicado também para a dependência de *crack*.

A dependência de substâncias pode ser considerada uma patologia complexa, cuja manifestação resulta da interação entre fatores ambientais e genéticos. Alguns estudos já estimaram a herdabilidade, por intermédio de estudo de gêmeos, para as diferentes substâncias ilícitas em geral (Agrawal et al, 2008). Também estão disponíveis dados específicos para o uso de cocaína. Em homens, a herdabilidade pode ser considerada moderada a alta, variando de 60% a 80% (Kendler et al, 2000). Já em mulheres, a herdabilidade para uso de cocaína foi estimada em 39%, e para abuso em 79% (Kendler et al, 1998). É bastante provável que a suscetibilidade genética à dependência de substâncias seja representada por diversos genes de pequeno efeito. No contexto de estudo de genes candidatos, o gene que codifica o transportador de dopamina (*DAT1* ou *SLC6A3*; 5p15.32), com seus diferentes polimorfismos tem sido o foco principal dos estudos de associação com a dependência de cocaína e *crack*.

Um dos únicos estudos de associação com *crack* publicado até o momento investigou no gene *DAT1* o polimorfismo de número variável de repetições em tandem (VNTR) de 40 pb localizado na região 3' UTR, não tendo sido encontrada diferença entre casos e controles (Ballon et al, 2007). Os genes que codificam os receptores D2, D3 e D4 de dopamina (genes *DRD2*, *DRD3* e *DRD4*, respectivamente) também foram analisados, tendo sido observados resultados positivos para o *DRD2* e para o *DRD4*. Em relação à cocaína, a maioria das investigações também tentou relacionar o VNTR de 40 pb com a manifestação do comportamento de dependência, obtendo tanto resultados positivos, que mostram mudanças aparentes nos níveis subcorticais de DAT tanto na presença do alelo de 9 repetições como de 10 repetições (Gelernter et al, 1994; Brousse et al, 2010), como negativos (Fernández-Castillo et al, 2010; Lohoff et al, 2010). Os efeitos funcionais deste polimorfismo, assim como do gene *DAT1*, são então ainda incertos em relação à dependência tanto de cocaína como de *crack*, o que justifica o estudo de outras variantes neste loco. Entre estas, destaca-se o polimorfismo de VNTR localizado no íntron 8, que ocorre devido à repetição de uma sequência de 30 pb; são possíveis sete alelos, sendo os alelos de 5 (alelo 5R) e de 6 (alelo 6R) repetições os mais comuns.

Um estudo brasileiro detectou uma expressão gênica diferenciada para os alelos mais comumente encontrados, o 5R (nomeado alelo 2 pelos autores) e o 6R (nomeado alelo 3 pelos autores), sendo a expressão do 6R 40% menor em relação ao 5R na presença de cocaína em meio de cultura celular (Guindalini et al, 2006). Embora os resultados com o VNTR em 3' tenham sido negativos, estes mesmos autores observaram associação do alelo 3 (ou 6R) do VNTR do íntron 8

com abuso de cocaína. Recentemente, um possível efeito do alelo 6R também foi verificado em uma amostra de dependentes de cocaína, *crack* e heroína da Colômbia, não havendo diferença nos resultados quando as dependências de cocaína/*crack* e heroína foram analisadas separadamente (Isaza et al, 2013). Assim, é possível que esta variante tenha um efeito real na dependência de *crack*, sendo um bom candidato a estudos mais aprofundados.

Em conjunto, esses dados, sugerem uma relação do gene *DAT1* com a dependência de cocaína e, provavelmente, *crack*. Considerando a escassez de estudos, especialmente em relação ao *crack*, e que dentre os estudos realizados muitos se mostram inconclusivos, fica evidenciada a necessidade de novas investigações, com diferentes variantes. O presente trabalho focou-se, então, na tentativa de maiores esclarecimentos sobre a possibilidade de associação do polimorfismo de VNTR de 30pb do íntron 8 do gene *DAT1* com a manifestação clínica de abuso/dependência de *crack*.

Métodos

No presente estudo foi testada a hipótese de associação do polimorfismo de VNTR do íntron 8 do gene *DAT1* a partir da abordagem caso-controle. Tanto os casos quanto os controles foram obtidos na região metropolitana de Porto Alegre, RS, e todos apresentavam idade mínima de 18 anos. O projeto foi submetido e aprovado pelos Comitês de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e das demais instituições envolvidas (aprovado sob o número 100201)

Amostra

Para o estudo contamos com a participação de 239 abusadores ou dependentes de *crack*, que estavam internados ou em tratamento ambulatorial em diferentes unidades do sistema público de saúde. O diagnóstico foi feito de acordo com os critérios do DSM-IV (*American Psychiatric Association*, 1994) e determinado pelas próprias equipes das instituições participantes. Os indivíduos identificados como potenciais casos foram convidados a participar do estudo; os objetivos e procedimentos foram então explicados e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi assinado após ser completamente elucidado. A avaliação clínica foi conduzida em muitas etapas por diferentes profissionais da saúde. Inicialmente, os sujeitos tiveram sua urina testada para a confirmação de uso prévio da substância (kits Bioeasy - Alere™). O diagnóstico foi confirmado pelo questionário semi-estruturado *Mini Neuropsychiatric Interview* – versão curta. A avaliação incluiu ainda o *Addiction Severity Index* – 6 (ASI-6) para avaliar a gravidade da dependência; os subtestes cubos e vocabulário da *Wechsler Intelligence Scale* (WAIS) para uma

estimativa do QI; e a *Adult ADHD Self-Report Scale* (ASRS) para triagem do TDAH. A caracterização demográfica foi obtida utilizando-se o ASI-6. As referências bibliográficas de cada instrumento e escala, assim como dados sobre a validação dos mesmos, podem ser encontradas em (Mattos et al, 2006; von Diemen et al, 2007; 2008; Szobot et al 2007; Kessler et al, 2007).

Os controles foram coletados em uma comunidade que já havia colaborado com outro estudo do grupo (Szobot et al, 2007). A escolha das ruas e residências a serem abordadas foi feita a partir da maior proximidade para a menor proximidade com o Posto de Saúde da Família existente na comunidade. As casas foram visitadas consecutivamente para busca ativa de possíveis indivíduos controle, visando um pareamento com cada caso obtido de acordo com etnia e sexo, além da idade (+/-5 anos). Dos 211 controles coletados, 191 puderam ser pareados aos casos. Os sujeitos responderam ao *Alcohol, Smoking and Substance Involvement Screening Test* (ASSIST) (Henrique et al, 2004; WHO, 2002), para triagem de uso de drogas. A avaliação toxicológica da urina para confirmação do auto-relato foi feita com o mesmo kit usado para reconhecimento de possíveis casos. Com resultados negativos para o uso de cocaína-*crack* tanto pelo ASSIST como pela triagem toxicológica, os sujeitos foram convidados a participar do estudo, lendo e assinando o TCLE após os objetivos e procedimentos terem sido explicados. A avaliação foi completada com a aplicação do MINI (versão curta), ASRS, WAIS (cubos e vocabulário) e ASI-6 (apenas as questões referentes a dados demográficos).

Os critérios de exclusão para ambos casos e controles foram a presença, baseada em impressão clínica, de comorbidades como esquizofrenia, outros transtornos psicóticos graves, retardo mental grave e estados confusionais, além de presença de cirrose descompensada.

Genotipagem

O DNA dos indivíduos foi extraído a partir de sangue total por método de precipitação por alta concentração de sal (Lahiri e Nurnberger, 1991). O polimorfismo de VNTR do íntron 8 do gene *DAT1* foi genotipado pela técnica de PCR convencional e posterior leitura em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídio (adaptado de Sano et al, 1993).

Análises estatísticas

As frequências gênicas e genótípicas foram obtidas para cada grupo por contagem direta. O Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi calculado utilizando-se o programa Genepop 4.0 (Rousset, 2008). Variáveis quantitativas são apresentadas com a média e desvio padrão, enquanto as qualitativas pelas frequências absolutas e relativas. A hipótese de associação foi inicialmente testada usando-se a amostra pareada. As comparações entre casos e controles foram feitas usando-se teste t ou de Wilcoxon para variáveis quantitativas (tendo sido a normalidade testada por Shapiro-Wilk), e teste

de McNemar para variáveis categóricas, incluindo as frequências gênicas e genótípicas. Para a investigação da hipótese de associação na amostra total, não pareada, as variáveis quantitativas foram comparadas entre casos e controles pelo teste t de Student ou teste de Mann-Whitney, dependendo da sua distribuição, enquanto que as categóricas foram comparadas por teste de Chi-quadrado ou teste exato de Fischer. A comparação das frequências gênicas e genótípicas entre casos e controles foi realizada por análise de regressão logística, com definição de co-variáveis de acordo com critérios estatísticos e biológicos. O nível de significância bicaudal aceito para as análises foi de 5%.

Resultados:

Um total de 239 casos e 211 controles foi avaliado neste trabalho. As principais características clínicas e demográficas de ambos os grupos estão descritas na Tabela 1. A grande maioria dos casos é do sexo masculino, com idade aproximada de 30 anos e apresenta significativamente mais comorbidades psiquiátricas, concordando com o perfil para usuários de crack descrito na literatura.

As frequências gênicas e genótípicas em casos e em controles foram calculadas independentemente para as diferentes etnias listadas na Tabela 1, sendo os alelos 6R e o 5R os mais frequentes em ambos os grupos, em todas as etnias. Para Euro-descendentes, estas frequências foram, respectivamente, 77,8% e 20,9% nos casos e 71% e 27,4% nos controles. Neste último grupo, as frequências alélicas são similares às observadas nas outras etnias (dados não apresentados). Porém, entre os casos houve uma diferença significativa, em que Afro-descendentes tiveram uma menor ocorrência do alelo 6R e maior do alelo 5R, quando comparados aos Euro-descendentes (63,45% x 33,75%, respectivamente; $p = 0,016$). Em relação aos genótipos, 6R6R, seguido de 5R6R foram os mais frequentes tanto em casos (62,1% e 30,1%, respectivamente) como em controles (49,6% e 40,7%, respectivamente) Euro-descendentes. As frequências genótípicas em controles de diferentes etnias são similares às descritas para Euro-descendentes (dados não apresentados). Entretanto, uma diferença foi novamente detectada entre casos desta etnia e casos Afro-descendentes, grupo em que o genótipo 6R6R foi menos frequente do que o genótipo 5R6R (38,5% x 44,2%, respectivamente; $p = 0,012$). As frequências gênicas e genótípicas estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg em todos os grupos étnicos avaliados, tanto em casos como em controles.

Para verificar a hipótese de associação, tanto alelos como genótipos foram comparados entre casos e controles, a partir de análises pareadas e não pareadas. Em relação aos alelos, procedeu-se

inicialmente a análise pareada, onde 191 pares de casos e controles foram incluídos. Comparando os alelos 5R, 6R e outros (demais alelos observados) foi verificada uma associação, em que o alelo 6R foi significativamente mais frequente nos casos (McNemar $p < 0,001$). Devido ao tamanho amostral reduzido em algumas caselas, foi realizada uma análise de regressão logística, incluindo todos os indivíduos amostrados, e controlando-se para sexo, idade, etnia, nível educacional e comorbidades de interesse clínico (transtorno de ansiedade generalizada, risco de suicídio, episódio depressivo maior e transtorno de déficit de atenção e hiperatividade). Os resultados sugerem um efeito de risco para o alelo 6R (OR = 1,535, IC = 1,015 – 2,290) e um efeito protetor para o alelo 5R (OR = 0,656, IC = 0,437 – 0,985) ($p = 0,042$), como pode ser observado na Tabela 2.

O possível efeito do genótipo 6R6R como de risco para o comportamento de dependência de crack foi investigado também por análise pareada. Contrastando este genótipo contra os demais em 191 pares de casos e controles obtivemos um resultado positivo, em que o genótipo 6R6R apareceu significativamente mais nos casos (McNemar $p = 0,014$). Com o intuito de incluir toda a amostra, foi realizada uma análise de regressão logística, controlando-se para as mesmas variáveis citadas acima. Esta análise demonstrou que o genótipo 6R6R apresenta mais chances em relação ao conjunto de outros genótipos, de ser encontrado em casos do que em controles (OR = 1,844, IC = 1,101 - 3,089; $p = 0,020$), o que pode ser visto em detalhe na Tabela 3.

Discussão

O presente trabalho observou uma associação do alelo 6R e do genótipo 6R6R gerados pelo polimorfismo de VNTR de 30pb do íntron 8 do gene *DAT1* com a manifestação do comportamento de dependência de cocaína na forma de *crack*. Em contrapartida, o alelo 5R parece estar exercendo um efeito de proteção, mesmo que bastante sutil. Até o momento, este é o terceiro estudo a investigar a suscetibilidade genética à dependência de *crack*, sendo também o terceiro a investigar o gene *DAT1* e o segundo a analisar essa variante. No único estudo prévio que avaliou esse polimorfismo em usuários de *crack*, realizado na Colômbia por Isaza et al (2013), uma associação com o alelo 6R também foi verificada. Embora não tenha mantido a significância após correção estatística, a frequência do genótipo 5R5R foi maior nos controles, observação que poderia indicar um efeito protetor para o mesmo. Desta forma nosso estudo se soma a esses achados positivos, sendo, no entanto, o único a avaliar esta hipótese exclusivamente em usuários de *crack*, já que os sujeitos investigados no estudo de Isaza et al (2013) tinham dependência de cocaína/*crack*, muitas vezes comórbida com dependência de opióides. Um estudo brasileiro anterior, com indivíduos de São Paulo, detectou associação semelhante deste polimorfismo em usuários de cocaína (Guindalini

et al, 2006), logo o nosso estudo reforça a importância do VNTR do íntron 8 do gene *DAT1* na dependência desse grupo de drogas psicoativas na população brasileira.

O polimorfismo mais estudado no *DAT1* em relação à dependência de substâncias, incluindo cocaína e *crack*, é o VNTR de 40 pb localizado na região 3' UTR. Entretanto, os poucos achados positivos são inconclusivos. Além disso, o íntron 8 já mostrou ter importância na manifestação da associação, pois em análises haplotípicas que incluíram este VNTR e o da região 3' realizadas por Guindalini et al (2006) o resultado de associação se perdia quando o íntron 8 era excluído dos haplótipos e aparecia quando este era considerado, o que reforça sua importância no efeito supostamente exercido pelo *DAT1*. Além disso, a escolha do alelo 6R e do genótipo 6R6R como condições de risco nas análises do presente trabalho, além de tentar replicar as hipóteses já vistas na literatura, demonstrou ter bases bem fundamentadas em relação ao seu provável significado funcional. Como já mencionado, o estudo de expressão realizado por aquele grupo mostrou que o vetor contendo o alelo 6R apresentou uma expressão 40% menor em comparação ao que continha o alelo 5R, quando células em meio de cultura foram expostas à cocaína. Além disso, em relação à taxa de expressão basal (células em cultura sem exposição a qualquer outro agente) apenas o alelo 6R exibiu uma resposta diferencial na presença de cocaína; a expressão condicionada pelo alelo 5R foi semelhante à basal. Um papel da cocaína como modulador de vários genes expressos no cérebro tem sido sugerido, o que parece se dever em parte à ativação de fatores de transcrição específicos, ainda não bem identificados. Assim, os resultados de Guindalini et al (2006) sugerem que, via tais fatores, a cocaína poderia alterar a expressão do *DAT1*, mas apenas quando o alelo de 6 repetições estivesse presente, não tendo este efeito na presença do alelo 5R. Obviamente a regulação endógena deste loco depende de todo um contexto gênico e genômico, mas estes dados evidenciam propriedades regulatórias para o VNTR do íntron 8 claramente associadas à cocaína. Embora não estejam claras as consequências de tais efeitos na neurobiologia da dependência, um cenário semelhante em relação ao *crack* é bastante provável.

Mesmo com o resultado obtido, a análise de haplótipos feita por Guindalini et al (2006) sugere que outras regiões do gene *DAT1* podem ser importantes na manifestação clínica da dependência. Nosso grupo, em uma investigação paralela ao presente trabalho, verificou na mesma amostra uma associação com o VNTR em 3' (Stolf, A.R., em submissão), reforçando a ideia de que o gene *DAT1* influencia a etiologia da dependência de *crack* na nossa população, e que isso possivelmente envolve o efeito de diferentes variantes, isoladamente ou em conjunto. A perspectiva de investigar essa hipótese integrando as análises do presente trabalho e do de Stolf, A.R. (em submissão), assim como análises de outros polimorfismos do gene *DAT1*, abre caminho para um melhor entendimento sobre a possível influência deste loco como um todo no fenótipo dependência de *crack*, assim como sobre os efeitos de cada uma das regiões gênicas envolvidas.

Apesar do resultado empolgante, nossas conclusões ficam um pouco restritas devido à escassez de estudos moleculares com *crack*, mais ainda em relação a essa variante específica. Além disso, algumas limitações podem ser destacadas. Embora praticamente o dobro que os outros dois estudos com genes candidatos (200 probandos em Ballon et al, 2007; 220 em Isaza et al, 2013), nosso tamanho amostral pode não ser suficiente para detecção dos pequenos efeitos genéticos típicos das doenças multifatoriais, o que pode ter contribuído para a obtenção de resultados espúrios. A caracterização clínica dos controles, assim como parte desta nos casos foi feita com base em instrumentos. Isso pode ter sub ou superestimado o diagnóstico das comorbidades, o que por sua vez também pode ter influenciado os resultados. A existência de heterogeneidade clínica dentro do grupo de pacientes pode não ter sido detectada, contribuindo para a realização de análises não totalmente adequadas. Por fim, devemos considerar a diferença na composição étnica de casos e controles. A proporção de indivíduos Afro-descendentes nos casos (21, 8%, em comparação a 13,4% nos controles) não concorda com o esperado de acordo com a composição étnica da nossa população. Pelo censo demográfico realizado em 2010, 83,22% dos gaúchos se definiram como brancos e 16,13% como negros (IBGE, 2010), proporção tipicamente observada em estudos moleculares realizados em nosso estado com outros transtornos psiquiátricos (Bohrer et al, 2013, submetido; Salatino-Oliveira et al, 2012). Este perfil na nossa amostra pode ser explicado pelos dados compilados no Plano Estadual de Saúde, onde fica claro que Afro-descendentes ainda estão mais expostos às situações de vulnerabilidade social como menor renda e mais risco de morrer devido à violência, principalmente na faixa etária característica dos dependentes (Plano Estadual de Saúde: 2012/2015), fatores estes compatíveis com o perfil dos usuários (Duailibi et al, 2008). Tanto a variabilidade genética que frequentemente existe para um mesmo marcador em etnias diferentes, quanto as interações gene-ambiente que provavelmente ocorrem com tais fatores, podem ter influenciado os resultados (Chang et al, 1996; Min et al, 1999). Fica, portanto, a sugestão de que essas questões sejam abordadas mais profundamente em estudos futuros.

Pulcherio (2010) destacou a ausência de estudos específicos para o *crack*, até aquela data, no tocante aos aspectos genéticos relacionados ao sistema dopaminérgico, salientando a importância de sua realização. O estudo do gene *DAT1* e do VNTR de 30pb do íntron 8 aqui apresentado preenche em parte esta lacuna. Entretanto, estes resultados devem ser replicados, assim como outras regiões gênicas deste loco devem ser estudadas, para se esclarecer seu efeito na dependência de *crack*. Tendo em vista ainda o caráter complexo, multifatorial deste fenótipo, não podemos esquecer que o estudo de outros genes, de fatores ambientais e de suas interações é de suma importância para se ter uma compreensão mais ampla da etiologia desta característica, que visa principalmente a aplicação deste conhecimento na determinação de estratégias mais eficazes de tratamento e prevenção, e a melhora na qualidade de vida dos pacientes e suas famílias.

Declarações autorais

Participação de Agências de Fomento

Os recursos foram providos pelos seguintes agentes financiadores: Secretaria Nacional de Álcool e Drogas (SENAD), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado Rio Grande do Sul (FAPERGS), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Programa do Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (ProDAH), e Centro de Pesquisas em Álcool e Drogas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CPAD). Apenas o CPAD teve envolvimento com o estudo em si, seja em relação ao desenho experimental, coleta, análise e interpretação de dados, na redação do manuscrito e com a decisão sobre a submissão do artigo para publicação.

Colaboradores

Müller, D. e Akutagava-Martins, G.C. executaram a extração de DNA das amostras. A primeira realizou ainda a genotipagem do polimorfismo em estudo, tabulação, análise e interpretação dos dados, e redação do manuscrito. Stolf, A.R. coordenou a coleta do grupo controle, e participou da análise estatística e interpretação dos dados. Guimaraes, L.S.P. foi o consultor e supervisor das análises estatísticas. Szobot, C.M. e Halpern, R. auxiliaram no desenho da coleta dos controles e na efetivação da mesma junto à comunidade amostrada. A primeira colaborou ainda na escolha dos instrumentos de avaliação, no treinamento dos entrevistadores e verificação da confiabilidade dos mesmos. Kessler, F.H.P. e Pechansky, F. coordenaram o projeto junto ao CPAD, fazendo a contratação e gerenciamento dos recursos humanos que realizaram coleta de casos e controles (aplicação das entrevistas, coleta de material biológico), elaboração do banco de dados-base e tabulação de dados, também supervisionando estas etapas. Estes co-autores atuaram ainda na obtenção de fomento. Roman, T. foi a coordenadora do projeto junto ao Departamento de Genética, tendo colaborado na supervisão da seleção de casos e controles e supervisionado a coleta de material biológico, as análises laboratoriais e estatísticas, tabulação e interpretação dos dados, e redação do manuscrito. Todos os autores contribuíram para a revisão e estudo da literatura, revisaram o manuscrito e aprovaram sua versão final.

Conflitos de interesse

Não há nenhum conflito de interesse a ser declarado.

Agradecimentos

Agradecemos aos órgãos financiadores (SENAD, FAPERGS, CNPq, CAPES, PRODAH e CPAD); aos diferentes membros da equipe do CPAD que de alguma maneira colaboraram com a realização deste trabalho; a todas as Unidade de Saúde de onde os casos foram obtidos, assim como às suas equipes; à comunidade Matias Velho, de onde foram obtidos os controles; e a todos os indivíduos que se disponibilizaram a participar do estudo.

Referências

Agrawal, A., Lynskey, M.T., 2008. Are there genetic influences on addiction: evidence from family, adoption and twin studies. *Addiction*. 103(7), 1069 - 1081.

American Psychiatric Association. 1994. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 4. ed. (DSM-IV). American Psychiatric Association, Washington D. C.

Ballon, N., Leroy, S., Roy, C., Bourdel, M.C., Olie, J.P., Charles-Nicolas, A., 2007. Polymorphisms *TaqIA* of the *DRD2*, *Ball* of the *DRD3*, exon III repeat of the *DRD4*, and 30 UTR VNTR of the *DAT*: association with childhood ADHD in male African-Caribbean cocaine dependents? *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 144B, 1034 - 1041.

Bohrer, J.S., Muller, D., Giuliani, R.E., Bosa, C.A., Longo, D., Schuler-Faccini, L., Ranzan, J., Michelin, M.B., Riesgo, R.S., Roman, T. Submetido à *Journal of Autism and Devel Dis*.

Brousse, G., Vorspan, F., Ksouda, K., Bloch, V., Peoc'h, K., Laplanche, J.L., Mouly, S., Schimidt, J., Llorca, P.M., Lepine, J.P., 2010. Could the inter-individual variability in cocaine-induced psychotic effects influence the development of cocaine addiction? Towards a new pharmacogenetic approach to addictions. *Med Hypotheses*. 75(6), 600 - 604.

Carlini, E.A., Galduróz, J.C., Noto, A.R., Carlini, C.M., Oliveira, L.G., Nappo, S.A., 2005. II levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país: [CEBRID] Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas, Universidade Federal de São Paulo.

Carlini, E.A., Galduróz, J.C.F., Noto, A.R., Nappo, S.A., 2001. I Levantamento Domiciliar sobre o Uso de Drogas Psicotrópicas no Brasil: Estudo Envolvendo as 107 Maiores Cidades do País: [CEBRID] Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas, Universidade Federal de São Paulo.

Chang, F.M., Kidd, J.R., Livak, K.J., Pakstis, A.J., Kidd, K.K., 1996. The world-wide distribution of allele frequencies at the human dopamine D4 receptor locus. *Hum Genet*. 98, 91-101.

Chutuape, M.A., Katz, E.C., Stitzer, M.L., 2001. Methods for enhancing transition of substance dependent patients from inpatient to outpatient treatment. *Drug Alcohol Depend*. 61, 137-143.

Dunn, J., Laranjeira, R.R., Silveira, D.X., Formigoni, M.L., Ferri, C.P., 1996. Crack cocaine: an increase in the use among patient attending clinics in São Paulo 1990-1993. *Subst use Misuse*. 31(4), 519 - 27.

Fernández-Castillo, N., Ribasés, M., Roncero, C., Casas, M., Gonzalvo, B., Cormand, B., 2010. Association study between the *DAT1*, *DBH* and *DRD2* genes and cocaine dependence in a Spanish sample. *Psychiatr Genet*. 20(6), 317 - 320.

Fowler, J.S., Volkow, N.D., Kassed, C.A., Chang, L., 2007. Imaging the addicted human brain. *Sci Pract Perspect*. 3(2), 4 - 16.

Gelernter, J., Kranzler, H.R., Satel, S.L., Rao, P.A., 1994. Genetic association between dopamine transporter protein alleles and cocaine-induced paranoia. *Neuropsychopharmacology*. 11, 195 - 200.

- Giros, B., Caron, M.G., 1993. Molecular characterization of the dopamine transporter. *Trends Pharmacol. Sci.* 14, 43 - 49.
- Gossop, M., Griffiths, P., Powis, B., Strang, J., 1994. Cocaine: patterns of use, route of administration, and severity of dependence. *Br J Psychiatry.* 164(5), 660 - 664.
- Guindalini, C., Howard, M., Haddley, K., Laranjeira, R., Collier, D., Ammar, N., Craig, I., O'Gara, C., Bubb, V.J., Greenwood, T., Kelsoe, J., Asherson, P., Murray, R.M., Castelo, A., Quinn, J.P., Vallada, H., Breen, G., 2006. A dopamine transporter gene functional variant associated with cocaine abuse in a Brazilian sample. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(12), 4552 - 4557.
- Henrique, I., De Micheli, D., Lacerda, R., Lacerda, L., Formigoni, M., 2004. Validation of the Brazilian version of Alcohol, Smoking and Substance Involvement Screening Test (ASSIST): *Rev Assoc Med Bras.* 50, 199 - 206.
- Isaza, C., Henao, J., Beltrán, L., Porras, L., Gonzalez, M., Cruz, R., Carracedo, A., 2013. Variantes genéticas asociadas con conducta adictiva en colombianos adictos y no adictos a heroína o cocaína. *Colombia médica.* 44(1), 19 - 24.
- Kendler, K.S., Prescott, C.A., 1998. Cocaine use, abuse and dependence in a population-based sample of female twins. *Br J Psychiatry.* 173, 345 - 350.
- Kendler, K.S., Karkowski, L.M., Neale, M.C., Prescott, C.A., 2000. Illicit psychoactive substance use, heavy use, abuse, and dependence in a US population-based sample of male twins. *Aech Gen Psychiatry.* 57(3), 261 - 269.
- Kessler, F., Cacciola, J., Faller, S., Souza-Formigoni, Cruz, M., Brasiliano, S., Pechansky, F., 2007. Adaptação transcultural multicêntrica da sexta versão da Escala de Gravidade de Dependência (ASI6) para o Brasil. *Rev. psiquiatr. Rio Gd. Sul.* 29 (3).
- Koob, G.F., 2009. Dynamics of neuronal circuits in addiction: reward, antireward, and emotional memory. *Pharmacopsychiatry.* 42 Suppl 1, 32 - 41.
- Lahiri, D.K., Nurnberger, J.I., 1991. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nuclei Acids Res.* 19, 5444.
- Lambert, G., Karila, L., Lowenstein, W., 2008. Neuroimaging and cocaine: mapping dependence?: *Presse Med.* 37, 679 - 88.
- Lohoff, F.W., Bloch, P.J., Hodge, R., Nall, A.H., Ferraro, T.N., Kampman, K.M., Dackis, C.A., O'Brien, C.P., Pettinati, H.M., Oslin, D.W., 2010. Association analysis between polymorphisms in the dopamine D2 receptor (*DRD2*) and dopamine transporter (*DAT1*) genes with cocaine dependence. *Neurosci Lett.* 473(2), 87 - 91.
- Mattos, P., Segenreich, D., Saboya, E., Louzã, M., Dias, G., Romano, M., 2006. Transcultural adaptation of the Adult Self-Report Scale into portuguese for evaluation of adult attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD): *Rev. psiquiatr. Clín.* 33, 188 -194.
- Min, K.A., Palmatier, M.A., Kidd, K.K., 1999. Global variation of a 40-bp VNTR in the 3'-untranslated region of the dopamine transporter gene (*SLC6A3*). *Biol Psychiatry.* 46, 151 - 160.
- Rousset, F., 2008. Genepop'007: a complete reimplementaion of the Genepop software for

Windows and Linux. *Mol. Ecol. Resources.* 8, 103-106.

Salatino-Oliveira A, Genro, J.P., Chazan, R., Zeni, C., Schmitz, M., Polanczyk, G., Roman, T., Rohde, L.A., Hutz, M.H., 2012. Association study of GIT1 gene with attention-deficit hyperactivity disorder in Brazilian children and adolescents. *Genes Brain Behav.* 11(7), 864 - 868.

Sano, A., Kondoh, K., Kakimoto, Y., Kondo, I., 1993. A 40-nucleotide repeat polymorphism in the human dopamine transporter gene.: *Hum Genet.* 91, 405-6.

Stolf, A.R., em submissão. *Drug Alcohol Depend.*

Szobot, C., Rohde, L., Bukstein, O., Molina, B., Martins, C., Ruaro, P., Pechansky, F., 2007. Is attention-deficit/hyperactivity disorder associated with illicit substance use disorders in male adolescents? A community-based case-control study. *Addiction.* 102, 1122 - 1130.

Volkow, N.D., Wang, G.J., Fischman, M.W., Foltin, R., Fowler, J.S., Franceschi, D., Franceschi, M., Logan, J., Gatley, S.J., Wong, C., Ding, Y.S., Hitzemann, R., 2000. Effects of route of administration on cocaine induced dopamine transporter blockade in the human brain. *Life Sci.* 67(12), 1507 - 15.

von Diemen, L. , Szobot, C. M., Kessler, F., Pechansky, F., 2007. Adaptation and construct validation of the Barratt Impulsiveness Scale (BIS 11) to Brazilian Portuguese for use in adolescents 2: *Rev Bras Psiquiatr.* 29, 153 - 156.

von Diemen, L., Bassani, D., Fuchs, S., Szobot, C., Pechansky, F., 2008. Impulsivity, age of first alcohol use and substance use disorders among male adolescents: a population based case-control study. *Addiction.* 103, 1198 - 1205.

WHO, 2002. The Alcohol, Smoking and Substance Involvement Screening Test (ASSIST): development, reliability and feasibility. *Addiction* 97(9)1183-1194.

Wise, R.A., 2002. Brain reward circuitry: insights from unsensed incentives. *Neuron.* 36, 229 - 240.

Tabela 1. Características clínicas e demográficas da amostra.

	Casos (n = 239)	Controles (n = 211)	p
Idade	30,38 (8,360)	29,15 (7,89)	0,109
Sexo masculino	218 (91,2%)	207 (98,1%)	<0,001
Afro-descendentes	52 (21,8%)	28 (13,4%)	0,011
Euro-descendentes	153 (64%)	135 (64,6%)	0,011
Pardos	31 (13%)	35 (16,7%)	0,011
Escolaridade (\geq 8 anos)	123 (52,6%)	145 (69,7%)	<0,001
Episódio depressivo maior	115 (50,7%)	27 (13,2%)	<0,001
Risco de suicídio	143 (60,3%)	38 (18%)	<0,001
Transtorno de ansiedade generalizado	50 (23,4%)	10 (5,1%)	<0,001
TDAH	108 (45,2%)	33 (15,6%)	<0,001
QI estimado	82,11 (11,06)	87,58 (12,86)	<0,001

Médias (desvio padrão) são apresentadas para variáveis quantitativas; frequências em número absoluto (frequências em porcentagem) são apresentadas para variáveis qualitativas. Na comparação entre as etnias de casos e controles, a diferença estatística refere-se a Afro-descendentes. A classificação étnica seguiu os critérios do IBGE. TDAH: Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade. QI: coeficiente de inteligência.

Tabela 2. Modelo de regressão logística para comparação de frequências alélicas entre casos e controles.

	OR	IC 95%	p
Alelo 6R ¹	1,525	1,015 – 2,290	0,042
Alelo 5R ²	0,656	0,437 – 0,985	0,042
Transtorno de ansiedade generalizado	2,485	1,312 – 4,704	0,005
Risco de suicídio	5,486	3,549 – 8,482	<0,001
Episódio depressivo maior	3,823	1,921 – 7,611	<0,001
TDAH	3,426	2,196 – 5,343	<0,001

As comorbidades listadas acima foram incluídas como co-variáveis no modelo. A análise também foi ajustada para sexo, idade, etnia e nível educacional. ¹Usando o alelo 5R como referência contra 6R e outros alelos; ² Usando o alelo 6R como referência contra 5R e outros alelos. OR: *odds ratio*. IC: intervalo de confiança. TDAH: Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade.

Tabela 3. Modelo de regressão logística para comparação de frequências genótípicas entre casos e controles.

	OR	IC 95%	p
Íntron 8 (6R6R) ¹	1,844	1,101 – 3,089	0,020
Transtorno de ansiedade generalizado	2,552	1,024 – 6,361	0,044
Risco de suicídio	5,519	2,965 – 10,271	<0,001
Episódio depressivo maior	3,527	1,328 – 9,365	0,011
TDAH	3,563	1,885 – 6,735	<0,001

As comorbidades listadas acima foram incluídas como co-variáveis no modelo. A análise também foi ajustada para sexo, idade, etnia e nível educacional. ¹ Usando o conjunto de todos os outros genótipos como genótipo referência. OR: *odds ratio*. IC: intervalo de confiança. TDAH: Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade.