



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA
Trabalho de Dissertação**

**IDENTIFICAÇÃO DE MECANISMOS GENÉTICOS E
IMUNOLÓGICOS ASSOCIADOS AO USO NOCIVO DE
ÁLCOOL EM UMA POPULAÇÃO LATINO-AMERICANA
MISCIGENADA**

EDSON HENRIQUE BISPO AMARAL

Salvador, BA

2023

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

IDENTIFICAÇÃO DE MECANISMOS GENÉTICOS E IMUNOLÓGICOS ASSOCIADOS AO USO NOCIVO DE ÁLCOOL EM UMA POPULAÇÃO LATINO- AMERICANA MISCIGENADA

EDSON HENRIQUE BISPO AMARAL

Dissertação de mestrado apresentada à comissão de avaliação e ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia, da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. Pablo Rafael Silveira Oliveira.

Co-orientadora: Prof. Gabriela de Sales Guerreiro Britto

Salvador, BA

2023

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA),
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

A485 Amaral, Edson Henrique Bispo
Identificação de mecanismos genéticos e imunológicos associados ao
uso nocivo de álcool em uma população latino-americana miscigenada/
Edson Henrique Bispo Amaral. – Salvador, 2023.
85 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Pablo Rafael Silveira Oliveira; Coorientadora:
Profª. Drª Gabriela de Sales Guerreiro Britto.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto de
Ciências da Saúde/Programa de Pós-Graduação em Imunologia, 2023.
Inclui referências.

1. GWAS. 2. Comportamento. 3. Alcoolemia. 4. Imunologia.
I. Oliveira, Pablo Rafael Silveira. II. Britto, Gabriela de Sales Guerreiro.
III. Universidade Federal da Bahia. IV. Título.

CDU 351.761: 577.27



Nº17M/2023,

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DO COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA PARA JULGAMENTO DO TRABALHO DE DISSERTAÇÃO INTITULADO “**IDENTIFICAÇÃO DE MECANISMOS GENÉTICOS E IMUNOLÓGICOS ASSOCIADOS AO USO NOCIVO DE ÁLCOOL EM UMA POPULAÇÃO LATINO-AMERICANA MISCIGENADA**” DO MESTRANDO **EDSON HENRIQUE BISPO AMARAL**.

Ao terceiro dia do mês de agosto do ano de dois mil e vinte e três, na sala de reunião virtual vinculada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia da Universidade Federal da Bahia (PPGIm-UFBA), a Banca Examinadora composta pelos Professores: **Dr. Pablo Rafael Silveira Oliveira (orientador)**, **Dr. Thiago Magalhães da Silva** e **Drª. Caroline Alves Feitosa** se reuniu com a finalidade de discutir, avaliar e julgar o trabalho de dissertação intitulado: “**Identificação de mecanismos genéticos e imunológicos associados ao uso nocivo de álcool em uma população latino-americana miscigenada**” do mestrando **Edson Henrique Bispo Amaral**. Após a apresentação, arguição e comentários dos membros da Banca Examinadora ficam determinados que as sugestões discutidas sejam implementadas na versão final da dissertação. Havendo cumprido as exigências do Programa quanto à defesa do trabalho final, a Banca Examinadora conclui que mediante a entrega do exemplar final pelo aluno com as devidas modificações no prazo de 60 dias, o Pós-Graduando está habilitado à obtenção do título de Mestre em Imunologia. Adicionalmente, os pareceres individuais dos membros da Banca Examinadora serão anexados à ata. Nada mais havendo a tratar se encerra a sessão da qual é lavrada a presente ata que após lida e aprovada vai assinada pelos componentes da Banca examinadora, pelo mestrando e pela Coordenadora do Programa de Pós-Graduação. Salvador, três de agosto do ano de dois mil e vinte e três.

Dr. Pablo Rafael Silveira Oliveira
Orientador

Dr. Thiago Magalhães da Silva
Banca Examinadora

Drª. Caroline Alves Feitosa
Banca Examinadora

Edson Henrique Bispo Amaral
Mestrando

Drª. Silvia Lima Costa
Coordenadora do PPGIm
ICS-UFBA

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelas bênçãos concedidas durante toda caminhada até o presente momento.

Aos meus pais, Marilucia e Edimilson por terem sonhado comigo mais este sonho e incentivado a cada minuto os meus planos e apoiado cada uma das minhas decisões.

Aos meus professores que de forma direta ou indireta contribuíram para o meu crescimento, de modo especial ao professor Pablo, meu orientador, por todo incentivo, companheirismo e colaboração na construção desse trabalho e formação como pessoa e profissional.

Agradeço aos meus colegas de pesquisa, Gabriela, Uenderson, Raquel, Thais, Quersia e Mirela, pelo companheirismo durante nossa caminhada, meu muito obrigado a cada um pelos momentos de compartilhamento de conhecimento e diversão dentro e fora do ambiente de ensino e pesquisa.

Por fim agradeço ao meu companheiro, Patrick, e aos meus amigos, aos que ganhei durante a pós-graduação e àqueles que Deus colocou em minha vida como bênçãos. A estes agradeço por trazerem calma, dar-me conselhos e palavras de paz nos momentos em que mais precisei.

“A vida é uma série de mudanças naturais e espontâneas. Não resista a elas - Isso só gera tristeza. Deixe a realidade ser realidade. Deixe as coisas fluírem naturalmente pelo caminho que elas seguirem.”

Lao Tzu

RESUMO

Introdução: O uso nocivo do álcool (UNA) é um problema de saúde pública que impõe custos consideráveis aos sistemas de saúde em todo o mundo. O consumo de etanol afeta a qualidade de vida dos usuários, levando a uma série de problemas de saúde mental e física. Os transtornos associados ao uso de álcool são condições complexas influenciadas por diversos fatores, como: alterações nos sistemas de neurotransmissão, mediadores imunes/inflamatórios e variantes genéticas. Tais distúrbios apresentam herdabilidade estimada entre 50% e 60%. Estudos de associação genômica ampla revelaram diversas variantes genéticas associadas aos fenótipos relacionados ao uso de álcool, em particular em genes envolvidos no metabolismo da droga. No entanto, a maioria desses estudos se concentrou em populações de ascendência europeia ou asiática, limitando possíveis extrapolações para outros grupos étnicos. **Objetivo:** Investigar mecanismos genéticos/imunogenéticos associados ao UNA em indivíduos latino-americanos miscigenados. **Metodologia:** O Teste de Identificação de Transtorno por Uso de Álcool (AUDIT) foi usado para avaliar o risco de UNA em 2.840 indivíduos da cidade de Pelotas (Brasil), em um desenho de estudo transversal. Os indivíduos foram genotipados para 2,3 milhões de Variantes de Nucleotídeo Único (SNVs) utilizando a plataforma Illumina HumanOmni 2.5-8v1 BeadChip, seguido por processo de imputação de genótipos. Os padrões de ancestralidade dos participantes foram investigados através de análise de Componentes Principais e pelo método ADMIXTURE. Análises de associação genética foram realizadas através de regressão logística multivariada. Os potenciais funcionais das variantes associadas ao UNA foram avaliados através de análises *in silico*. Além disso, foram realizadas análises de enriquecimento e interação de vias para identificar mecanismos potencialmente envolvidos no desenvolvimento de UNA. **Resultados:** As análises de ancestralidade evidenciaram o padrão miscigenado da população de Pelotas. Os indivíduos com alto risco de UNA apresentaram mediana de ancestralidade europeia significativamente maior do que os participantes com risco baixo/moderado [0.84 e 0.82, respectivamente; $p = 2.13 \times 10^{-2}$]. Notavelmente, foi identificada associação significativa do fenótipo de UNA com uma variante intrônica no gene Citocromo P450 Família 4 Subfamília B Membro 1 (*CYP4B1*) (rs1097611; [$p = 4.88 \times 10^{-8}$, *odds ratio* (OR) = 1.8, intervalo de confiança (IC) = 1.46-2.23]. Diversas variantes em desequilíbrio de ligação com rs1097611 podem ter implicações funcionais no *locus* e são associadas à expressão diferencial do gene *CYPB1* em múltiplos tecidos em humanos. Também foi observada associação sugestiva ($5 \times 10^{-8} < p < 10^{-5}$) com SNV situada no gene Fator de Troca de Nucleotídeo Guanina Vav 1 (*VAV1*) ($p = 6.33 \times 10^{-6}$, OR = 3.16, IC = 1.92-5.20), que codifica produto com função imune. Por fim, foi possível evidenciar diversas vias relacionadas aos sistemas nervoso e imunológico potencialmente implicadas no UNA. **Conclusão:** Em conjunto, esses dados suportam a natureza multifatorial do UNA, apoiando a hipótese da participação do sistema imune e de vias de neurotransmissão nos comportamentos de consumo da droga. Estudos como este, com indivíduos de grupos étnicos subrepresentados, são fundamentais para identificar novas variantes associadas ao UNA.

Palavras-chave: GWAS; Comportamento; Álcool; Imunologia.

ABSTRACT

Introduction: Harmful use of alcohol (HUA) is a public health problem that imposes considerable costs on healthcare systems worldwide. Ethanol consumption affects the quality of life of users, leading to a range of mental and physical health issues. Alcohol-related disorders are complex conditions influenced by various factors, such as alterations in neurotransmission systems, immune/inflammatory mediators, and genetic variants. These disorders have an estimated heritability of 50% to 60%. Genome-wide association studies have revealed numerous genetic variants associated with alcohol-related phenotypes, particularly in drug metabolism-related genes. However, most of these studies have focused on populations of European or Asian ancestries, limiting potential extrapolations to other ethnic groups. **Objective:** To investigate genetic/immunogenetic mechanisms associated with HUA in admixed Latin American individuals. **Methods:** The Alcohol Use Disorder Identification Test (AUDIT) was used to assess the risk of HUA in 2,840 individuals from the city of Pelotas (Brazil), in a cross-sectional study design. The participants were genotyped for 2.3 million Single Nucleotide Variants (SNVs) using the Illumina HumanOmni 2.5-8v1 BeadChip platform, followed by genotype imputation. Ancestry patterns were investigated through Principal Component Analysis and ADMIXTURE method. Genetic association analyses were conducted using multivariate logistic regression. The potential functional implications of variants associated with HUA were evaluated through *in silico* analyses. Additionally, pathway enrichment and interaction analyses were performed to identify mechanisms potentially involved in HUA. **Results:** Ancestry analyses revealed the admixed pattern of the Pelotas population. Individuals with high risk of HUA exhibited significantly higher median European ancestry compared to low/moderate-risk participants (0.84 and 0.82, respectively; $p = 2.13 \times 10^{-2}$). Notably, a significant association of the HUA phenotype was identified with an intronic variant in the Cytochrome P450 Family 4 Subfamily B Member 1 (*CYP4B1*) gene (rs1097611; [$p = 4.88 \times 10^{-8}$, odds ratio (OR) = 1.8, confidence interval (CI) = 1.46-2.23]. Several variants in linkage disequilibrium with rs1097611 may have functional implications at the *locus* and are associated with differential *CYP4B1* gene expression in multiple human tissues. A suggestive association ($5 \times 10^{-8} < p < 10^{-5}$) was also observed with an SNV located in the Vav Guanine Nucleotide Exchange Factor 1 (*VAV1*) gene ($p = 6.33 \times 10^{-6}$, OR = 3.16, CI = 1.92-5.20), which encodes a product with immune function. Finally, multiple pathways related to nervous and immune systems are involved in HUA. **Conclusion:** Taken together, these findings support the multifactorial nature of HUA, suggesting the involvement of the immune system and neurotransmission pathways on drug consumption behaviors. Studies like this, with individuals from underrepresented ethnic groups, are essential to identify new variants associated with HUA.

Keywords: GWAS; Behavior; Alcohol; Immunology.

LISTA DE FIGURAS

		página
Referencial teórico		
Figura 1	Alteração de permeabilidade intestinal e a degeneração neuronal.	20
Figura 2	Ancestralidade de participantes em estudos de associação do genoma (GWAS).	35
Manuscrito		
<i>Figure 1</i>	<i>Ancestry analyzes of the Pelotas (Brazil) cohort.</i>	49
<i>Figure 2</i>	<i>Genome-Wide Association Study (GWAS) for Harmful Use of Alcohol (HUA) in the population of Pelotas, Brazil.</i>	51
<i>Figure 3</i>	<i>Regional association plot of the CYP4B1 locus.</i>	54
<i>Figure 4</i>	<i>Genome-based pathway enrichment analysis for harmful use of alcohol in the population of Pelotas, Brazil.</i>	58
<i>Figure 5</i>	<i>Network analysis of the pathways potentially implicated in harmful use of alcohol</i>	59
Supplementary figure 1	eQTL (quantitative trait locus) signals considering the three genotypes of the SNP rs1097611 and the normalized expressions (NES) of the CYP4B1 gene in different human tissues.	74

LISTA DE TABELAS E QUADROS

		página
Table 1	<i>Characteristics of the studied sample (after quality control)</i>	47
Table 2	<i>List of the top SNVs at loci showing significant or suggestive association signals with harmful use of alcohol in Pelotas, Brazil.</i>	52
Table 3	<i>Functional annotation of variants in strong linkage disequilibrium ($r^2 \geq 0.8$) with rs1097611 in the population of Pelotas, Brazil.</i>	56

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

ADH	Álcool desidrogenase
AFR	Africanos
ALDH	Aldeído desidrogenase
AMR	Americanos
AUDIT	Teste de Identificação de Transtorno por Uso de Álcool (em inglês, <i>Alcohol use disorder identification test</i>)
CAGE	Cut down, annoyed, guilty, eye-opener
CHR	Cromossomo
CI	Intervalo de confiança (em inglês, <i>confidence interval</i>)
CID-11	Classificação internacional de doenças 11 (em inglês, <i>International classification of diseases 11</i>)
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CYP2E1	Citocromo p450 2e1
CYP450	Citocromo p450
DL / LD	Desequilíbrio de ligação (em inglês, <i>linkage disequilibrium</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (em inglês, <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DSM-5	Manual diagnóstico e estatístico de doenças mentais, quinta edição (em inglês, <i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th edition</i>).
EAS	Asiáticos do leste
eQTL	<i>Loc</i> i de traço quantitativo de expressão (em inglês, <i>expression quantitative trait loci</i>)
ERO / ROS	Espécies reativas de oxigênio (em inglês, <i>reactive oxygen species</i>)
EUR	Europeus
FDR	Taxa de falsos positivos (em inglês, <i>false discovery rate</i>)
GABA	Ácido gama-aminobutírico" (em inglês, <i>gamma-aminobutyric acid</i>).
GWAS	Estudo de associação genômica ampla (em inglês, <i>genome-wide association study</i>)
HMGB1	Proteína do grupo 1 de alta mobilidade
HPA	Hipotálamo-hipófise-adrenal
IL-	Interleucina-
IQR	Intervalo interquartil (em inglês, <i>interquartile range</i>)
KEGG	Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto (em inglês, <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>)
LPS	Lipopolissacarídeos
MAF	Frequência do alelo menor (em inglês, <i>minor allele frequency</i>)
MAST	Teste de triagem de alcoolismo de Michigan
NAT	Nativos americanos
NFκB	Fator nuclear κb
NMDAR	Glutamato n-metil-d-aspartato
OMS	Organização mundial da saúde
OR	Razão de chances (em inglês, <i>odds ratio</i>)

PCA	Análise de componentes principais (em inglês, <i>principal component analysis</i>)
QC	Controle de qualidade (em inglês, <i>quality control</i>)
QQ	Quantil-quantil (em inglês, <i>quantile-quantile</i>)
SAS	Asiático do sul
SNV	Variante de nucleotídeo único (em inglês, <i>single nucleotide variant</i>)
TLR	Receptor do tipo <i>toll</i>
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TUA	Transtorno por uso de álcool
UNA/HUA	Uso nocivo de álcool (em inglês, <i>harmful use of alcohol</i>)
VIF	Fator de inflação da variância (em inglês, <i>variance inflation factor</i>)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1. EPIDEMIOLOGIA DOS TRANSTORNOS DE USO NOCIVO DO ÁLCOOL	14
2.1.1. Perfis do consumo de álcool.....	15
2.2. FERRAMENTAS E MANUAIS DIAGNÓSTICOS	16
2.3. O IMPACTO DO ÁLCOOL NA SAÚDE	18
2.3.1. Consumo de álcool e saúde intestinal	19
2.3.2. Consumo de álcool e saúde do fígado e do pâncreas.....	22
2.3.3. Doenças cardiovasculares.....	24
2.4. MECANISMOS ENVOLVIDOS NOS TRANSTORNOS DE USO NOCIVO DO ÁLCOOL.....	26
2.4.1. Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal	26
2.5. CONSUMO DO ETANOL E O SISTEMA IMUNE	29
2.6. ESTUDOS GENÉTICOS.....	30
2.6.1. Estudos iniciais	30
2.6.2. Estudos GWAS.....	32
3. OBJETIVOS	37
3.1. OBJETIVO GERAL	37
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4. MANUSCRIPT: UNCOVERING GENETIC AND IMMUNOLOGIC MECHANISMS ASSOCIATED WITH HARMFUL USE OF ALCOHOL IN ADMIXED LATIN AMERICANS.....	38
4.1. INTRODUCTION.....	39
4.2. METHODS	41
4.2.1. Sample and ethical considerations	41
4.2.2. Definition of harmful use of alcohol (HUA).....	41

4.2.3.	Genotyping and quality control	42
4.2.4.	Genotype imputation.....	43
4.2.5.	Population genetic structure and linkage disequilibrium	43
4.2.6.	Selection of variants in immune genes	44
4.2.7.	Functional and pathway enrichment analyzes	45
4.2.8.	Statistical analysis	45
4.2.9.	Data availability.....	46
4.3.	RESULTS.....	47
4.3.1.	Ancestry analyzes reveal the admixture structure of the studied individuals	47
4.3.2.	<i>CYP4B1</i> gene variant is significantly associated with HUA	50
4.3.3.	Functional analysis revealed potential effects of the <i>CYP4B1</i> variants associated with HUA.....	53
4.3.4.	Pathway enrichment analysis uncovers mechanisms potentially implicated in HUA.....	57
4.4.	DISCUSSION.....	60
4.5.	CONCLUSIONS	65
4.6.	ACKNOWLEDGMENTS.....	66
4.7.	REFERENCES.....	67
4.8.	Supplementary Materials.....	74
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	75
6.	REFERÊNCIAS DO REFERENCIAL TEÓRICO	76

1. INTRODUÇÃO

O álcool é considerado a droga mais consumida no mundo, tendo diferentes perfis de consumo (OPAS, 2020). O Uso nocivo do álcool (UNA) é considerado um importante, e comum, problema de saúde pública, uma vez que carrega consigo o risco para diversas questões de saúde e de problemas sociais (LAI et. al, 2022). Considerado um dos principais fatores de risco para a saúde, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 2005), estima-se que o consumo de etanol é fator causal de cerca de 5,3% de todas as mortes no mundo (ZILLICH et al., 2022).

Os indivíduos que fazem uso crônico de etanol podem apresentar diferentes padrões clínicos, destacando-se a dependência à droga (condição frequentemente associada ao desejo incontrolável do consumo de bebidas alcoólicas), tolerância ao álcool e sintomas de abstinência (RUNDIO, 2013). A dependência ao álcool é uma condição complexa influenciada por fatores extrínsecos e intrínsecos (LAI et al., 2022). Quanto aos fatores extrínsecos podem ser citados: volume de álcool consumido, frequência de consumo, idade, estado de saúde do indivíduo, histórico de consumo familiar, bem como contextos socioculturais e econômicos mais amplos (RUNDIO, 2013; SAMOCHOWIEC *et al.*, 2014). Quanto aos fatores intrínsecos podem-se destacar: alterações permanentes no sistema de neurotransmissão decorrentes do uso de álcool, fatores imunológicos [como os Receptores do Tipo *Toll* (TLRs), a proteína do grupo 1 de alta mobilidade (HMGB1) e o Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α)], além de fatores genéticos hereditários (CREWS; VETRENO, 2015; EŞEL; DINÇ, 2017).

Dentre os fatores genéticos, variantes nos genes relacionados à síntese das álcool desidrogenases (ADH) e das aldeído desidrogenases (ALDH) são as mais frequentemente relacionadas ao UNA (DICK; BIERUT, 2006; KENDLER *et al.*, 2011; MEDA *et al.*, 2019). Outras variantes genéticas têm sido relacionadas ao UNA através de estudos de Estudo de associação genômica ampla (GWAS) (MEDA *et al.*, 2019), incluindo variantes em genes que codificam moléculas com função imune, como: *CRHR1* (GELERNTER *et al.*, 2019) e *TRAF* (SCHUMANN *et al.*, 2016). Além disso, uma variante do gene *IL10* (-592C>A) já foi associada ao fenótipo de UNA (MARCOS *et al.*, 2008). Nesse último estudo, foi observado que tal polimorfismo reduz a expressão de IL-10, permitindo a elevação nos níveis de TNF- α no cérebro dos indivíduos avaliados, promovendo desta forma neurotoxicidade.

Tendo em vista os aspectos acima citados, somada à necessidade de elucidar a arquitetura genética de transtornos por uso de álcool em populações latinas e miscigenadas, o presente estudo tem por objetivo investigar a influência de fatores genéticos e imunogenéticos no desenvolvimento do fenótipo de UNA em uma população miscigenada do Brasil.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. EPIDEMIOLOGIA DOS TRANSTORNOS DE USO NOCIVO DO ÁLCOOL

O UNA é um problema de saúde pública que traz altos custos aos sistemas de saúde (ALVES; DE OLIVEIRA SANTOS; BARBOSA, 2021). De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 43% da população mundial consumiu álcool em 2016, com maiores prevalências nas Américas, Europa e região do mediterrâneo oriental (CENTRO DE INFORMAÇÃO SOBRE SAÚDE E ÁLCOOL, 2018). O consumo de etanol impacta a qualidade de vida dos usuários (DAWSON *et al.*, 2009) e está relacionado a problemas de saúde mental altamente incapacitantes (GRANT *et al.*, 2015). Além disso, o etanol é considerado um dos principais fatores de risco para a saúde; estima-se que 5,3% das mortes no mundo em 2018 ocorreram em decorrência do uso do álcool (ZILLICH *et al.*, 2021). O uso de álcool também foi associado a cerca de 50% dos casos de acidentes de trânsito fatais, 50% dos casos de homicídio e 30% dos casos de suicídio no mundo (GALLASSI *et al.*, 2008). O UNA é mais prevalente em indivíduos do sexo masculino (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2018), tendo sido fator causal de aproximadamente 8% das mortes de homens no ano de 2016 (WHITE, 2020). Segundo a OMS (2020), outros fatores também podem contribuir para o nível de consumo do álcool do indivíduo, como: disponibilidade da droga no país, orientação religiosa, estado de saúde e contexto socioeconômico individual.

No Brasil, o consumo de etanol é amplamente difundido (BARROS; COSTA, 2019). O Brasil ocupa a 15ª posição na região das américas em relação ao consumo de etanol por habitante/ano (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2020). Nesse mesmo relatório, foi mostrado que o consumo

médio dos brasileiros acompanhou padrão similar à média de consumo mundial em 2016, com de cerca de 7,5 litros de álcool por habitante no período de 12 meses. Notavelmente, cerca de 79% dos brasileiros com idades entre 18 e 24 anos relataram já ter consumido álcool ao menos uma vez na vida, no ano de 2005 (CEBRID, 2006). Segundo o Centro de Informações sobre Saúde e Álcool (CISA, 2019), o perfil geral de consumo de álcool e o perfil de consumo entre homens se mantiveram estáveis entre 2010 e 2019 no Brasil. Contudo, tal estabilidade não foi observada entre as mulheres, já que se observou, nesse mesmo período, aumento significativo no número de mulheres que fazem consumo abusivo dessa droga.

2.1.1. Perfis do consumo de álcool

O consumo de álcool pode apresentar diferentes perfis, desde o uso esporádico até o uso descompensado, que podem culminar em dependência (CISA, 2019). De igual forma, o UNA representam um leque de apresentações clínicas distintas (MÜLLER *et al.*, 2020). Segundo o Manual Diagnóstico e Estatístico De Transtornos Mentais 5ª edição (PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013), o UNA pode ser classificado quanto à presença e intensidade de sintomas em leves, moderados e graves. Schuckit (2009), apoiado pela Classificação Internacional de Doenças-10 (ICD-10) da OMS (1992), afirma que existem dois tipos principais de UNA: o Uso problemático do álcool e a síndrome de dependência. Em sua versão mais atual, o ICD-11, o UNA é classificados em Episódio de Uso Nocivo de Álcool, Padrão Nocivo de Uso de Álcool e Dependência de Álcool, podendo existir outros padrões associados. O conceito de uso nocivo de álcool é complexo e abrange distintos aspectos de saúde e aspectos sociais para o usuário e para as pessoas com quem ele convive

(WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). O UNA está fortemente ligado a eventos de violência social e intrafamiliar (MELONI; LARANJEIRA, 2004).

A dependência ao álcool, síndrome crônica caracterizada pelo consumo compulsivo e falta de controle no uso da droga, carrega consigo as mesmas características observadas no uso problemático do álcool quando nos referimos ao contexto de saúde e ao contexto social, entretanto apresenta sintomatologia específica, tais como dependência fisiológica e sintomas de abstinência (NIH; NIAAA, 2021). Apesar destas características de consumo e episódios de UNA precederem a dependência, nem todos os indivíduos estão propensos ao desenvolvimento da mesma. Tal síndrome requer do indivíduo redes complexas de fatores de risco, como biológicos, psicológicos, sociais e ambientais (HECKMANN; SILVEIRA, 2009).

2.2. FERRAMENTAS E MANUAIS DIAGNÓSTICOS

No contexto de estudos populacionais sobre UNA faz-se necessária a utilização de ferramenta de triagem rápida, flexível e eficiente para a identificação de transtornos já instalados ou do risco de desenvolvê-los (HABTAMU; MADORO, 2022). Existem pelo menos 115 diferentes ferramentas através das quais é possível identificar indivíduos que fazem UMA (STEWART et. al., 2022), algumas visando diagnosticar, outras predizendo risco. Dentre estas, podem ser destacados: o teste de identificação de transtornos por uso de álcool (AUDIT, do inglês *Alcohol Use Disorder Identification Test*) (BABOR et al., 2001) e sua versão mais curta, o AUDIT-Consumption; o questionário Cortado, irritado, culpado, abridor de olhos (CAGE, do inglês *Cut down, Annoyed, Guilty, Eye-opener*) (EWING, 1984); e o teste de triagem de alcoolismo de Michigan (MAST) (SELZER, 1971) devidas suas propriedades psicométricas excelentes

(STEWART et. al., 2022); além dos manuais *Classificação Internacional de Doenças 11* (CID-11) (OPAS, 2022) e o manual diagnóstico e estatístico de doenças Mentais (DSM-5) (PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

O CAGE consiste em uma ferramenta de triagem simples e eficaz com quatro perguntas acerca do consumo de álcool: (1) Já sentiu a necessidade de reduzir o consumo de álcool; (2) Já sentiu-se incomodado com críticas em relação ao seu hábito de beber; (3) Já se sentiu culpado por beber? e (4) consome álcool ao acordar? Entretanto, o CAGE não fornece informações relevantes sobre quantidade, frequência e padrão de consumo do álcool (O'BRIEN, 2008). Como citado, outra ferramenta utilizada no contexto de triagens acerca do consumo de álcool é o MAST, ferramenta constituída de 25 perguntas que visam quantificar e detectar transtornos associados ao uso da droga (SELZER, 1971).

O AUDIT, uma das ferramentas mais difundidas para a triagem de uso problemático e nocivo de álcool, foi desenvolvido a partir de um projeto colaborativo entre a OMS e seis países (SAUNDERS *et al.*, 1993). A ferramenta desenvolvida, diferente das ferramentas que apresentam cunho diagnóstico, não tinha por objetivo principal identificar indivíduos cujo transtorno já estivesse instalado, mas sim aqueles indivíduos em risco antes que o transtorno se instalasse (HIGGINS-BIDDLE; BABOR, 2018). A três primeiras perguntas do AUDIT, que é munido de 10 questões acerca de uso, abuso e problemas relacionados ao uso de álcool, mensuram a frequência e a quantidade de álcool consumida pelo indivíduo. As três perguntas seguintes fazem referência aos sintomas de dependência dos respondedores. Por fim, as quatro últimas questões fazem referência a experiências negativas relacionadas ao uso da

droga, sendo todas pontuadas de 0 a 4, totalizando um conjunto máximo de 40 pontos (BABOR *et al.*, 2001; HIGGINS-BIDDLE; BABOR, 2018).

O ponto de corte no escore do AUDIT para a classificação quanto ao risco de apresentar UNA varia de população para população, principalmente em decorrência de diferenças socioculturais. Estudos realizados em populações africanas utilizando o AUDIT têm utilizado ponto de corte de 7 para categorizar indivíduos com diferentes riscos (baixo risco ou elevado risco) de UNA (ANI; NGWU; ANI, 2022; ATKINS *et al.*, 2021; ROCHAT *et al.*, 2019). Estudos realizados em populações asiáticas e europeias têm utilizado ponto de corte 8 no AUDIT para caracterizar seus voluntários quanto ao risco de UNA (CHOPRA; TIWARI, 2012; SELIN, 2003, 2009; SKOGEN *et al.*, 2019). Moretti-Pires e Corradi-Webster (2011) definiram que a ponto de corte de 8 no AUDIT é adequado para avaliar risco de UNA na população brasileira. Babor e colaboradores (2001) através do *The Alcohol Use Disorders Identification Test Guidelines for Use in Primary Care* também sugerem *cutoff* em 8 pontos no escore do AUDIT para avaliar o mesmo traço.

2.3. O IMPACTO DO ÁLCOOL NA SAÚDE

O consumo do álcool está usualmente associado a consequências como a desinibição, relaxamento, alívio de quadros de dor, sensações de prazer e euforia (KRYSTAL *et al.*, 2003; MITCHELL; BERRIDGE; MAHLER, 2018, NIH; NIAAA, 2021). Entretanto, são conhecidos os efeitos adversos decorrentes do uso crônico da droga, considerada um importante fator para morbimortalidade (OPAS, 2021). O álcool consegue permear o organismo de forma ubíqua, levando a danos teciduais e disfunções orgânicas (RACHDAOUI; SARKAR, 2017). Dentre o grande número de patologias associadas ao consumo dessa

droga estão: cirrose alcoólica, pancreatite alcoólica, câncer, doenças cardiovasculares, diabetes, doenças neuropsiquiátricas, síndrome de Wernicke-Korsakoff e síndrome alcoólica fetal (CAMPOLLO R., 2019; REHM, 2011; NIAAA, 2022).

2.3.1. Consumo de álcool e saúde intestinal

É no fígado que o álcool é, primordialmente, metabolizado. Nesse órgão o álcool é convertido, principalmente pela álcool desidrogenase (ADH), em acetaldeído e posteriormente em acetato pela aldeído desidrogenase (ALDH), por fim em água e dióxido de carbono nos tecidos periféricos, que podem assim ser excretados (POHL; MOODLEY; DHANDA, 2021). Uma outra via de degradação do álcool no organismo se dá através da interação da molécula com enzimas da família do citocromo P450, essa degradação, além de oxidar o álcool, resulta na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (POHL, MOODLEY E DHANDA, 2021). Além das duas vias já citadas, uma pequena parcela do álcool ingerido é metabolizada por via não oxidativa, ainda no intestino, através de interações entre o composto com fosfolipídios de membrana e ácidos graxos livres (BISHEHSARI *et al.*, 2017).

O etanol e seus metabólitos são capazes de desencadear respostas imunes por diferentes vias no intestino, culminando em dano tecidual (BISHEHSARI *et al.* 2017). Além disso, o álcool altera a estrutura e fisiologia intestinal, afetando a microbiota e a integridade do epitélio intestinal, podendo modular a permeabilidade do órgão (POHL; MOODLEY; DHANDA, 2021; WANG *et al.*, 2020) (Figura 1). Alterações da microbiota intestinal estão relacionadas a modificações de comportamento em humanos. Estudos já relataram relações diretas entre composição da microbiota e doenças psiquiátricas, como

depressão e ansiedade (GALLAND, 2014; WANG *et al.*, 2020). O intestino humano pode abrigar mais de 500 espécies de bactérias, fungos e vírus, sem causar prejuízos desde que mantido o equilíbrio entre organismos comensais e com potencial patogênico (BISHEHSARI *et al.*, 2017; ENGEN *et al.*, 2015; POHL; MOODLEY; DHANDA, 2021).

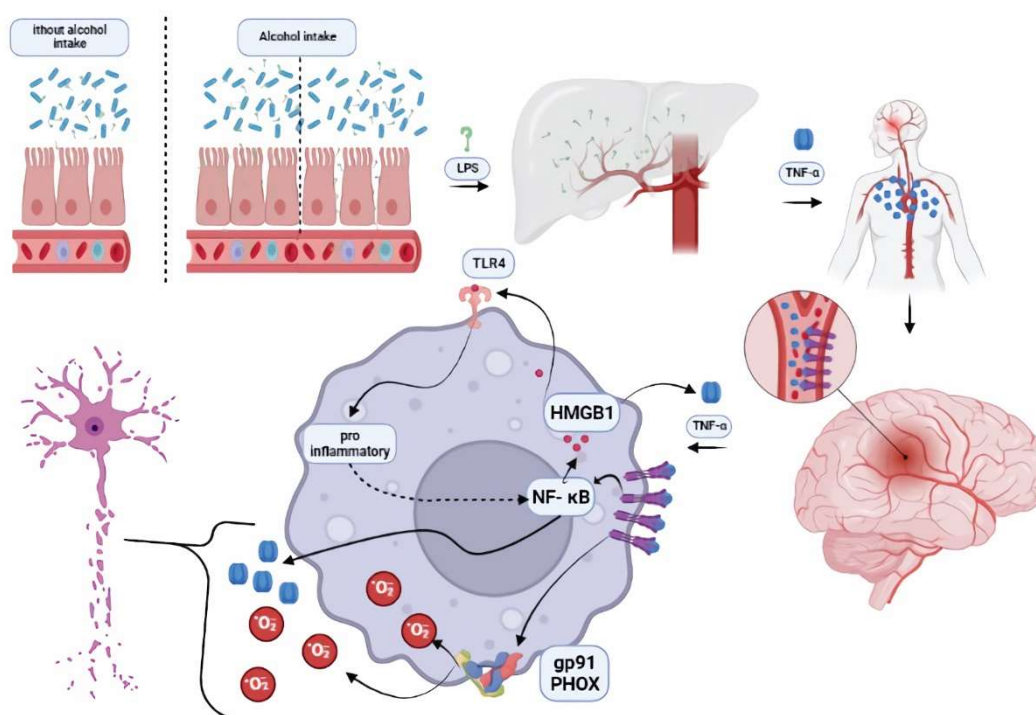


Figura 1. Alteração de permeabilidade intestinal e a degeneração neuronal. Ao ser consumido o álcool propicia a passagem de compostos bacterianos para a circulação sanguínea de duas maneiras. 1-Via intracelular, onde tais compostos ultrapassam a membrana celular e atingem a corrente sanguínea. 2-Via intercelular, onde o álcool propicia redução da adesão intercelular, favorecendo a passagem de tais compostos. Uma vez na corrente sanguínea, tais compostos, de modo especial o LPS, estimulam a ativação e produção de citocinas pró inflamatórias tais como TNF- α e HMGB1. Tal ativação culmina em maior ativação células inflamatórias em distintos tecidos, incluindo o tecido nervoso. A ativação de tais linhagens celulares propiciam a produção de EROs que auxiliam na morte celular neuronal. **Fonte:** elaborado pelo autor no software BioRender®.

O consumo de álcool pode levar à disbiose, resultando em alteração na composição bacteriana intestinal (LITWINOWICZ; CHOROSZY; WASZCZUK, 2020). Além da capacidade de induzir disbiose, o consumo de álcool pode proporcionar crescimento de bactérias patogênicas por pelo menos 3 vias: i. devido à menor absorção de nutrientes no lúmen intestinal; ii. através da interação do álcool com ácidos biliares, que afetam a composição bacteriana do intestino; e iii. pela ação direta do álcool sobre a imunidade de mucosa, inibindo a resposta imune inata e propiciando a proliferação de microrganismos patogênicos (BISHEHSARI *et al.*, 2017).

O etanol também interage diretamente com a estrutura celular do tecido intestinal causando instabilidades nas junções oclusivas, aumentando a superfície de contato do órgão e aumentando a permeabilidade intestinal a compostos bacterianos como lipopolissacarídeos (LPS) (BISHEHSARI *et al.*, 2017; PIJLS *et al.*, 2013). O aumento da concentração de LPS circulante causado pelo consumo do álcool eleva as concentrações plasmáticas de Interleucina (IL-6), IL-10, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e antagonista do receptor de IL-1 (IL-1RA), além de cortisol e norepinefrina. De modo geral, tais alterações são acompanhadas por redução de humor e aumento nos níveis de ansiedade (GRIGOLEIT *et al.*, 2011).

As alterações na estrutura intestinal causadas pelo consumo de álcool também afetam a absorção de nutrientes, contribuindo desta maneira para a desnutrição (POHL; MOODLEY; DHANDA, 2021; ROCCO *et al.*, 2014). Como consequência dessa alteração, os indivíduos podem apresentar déficits em vitaminas, coenzimas e minerais, como: A, B1, B2, B6, C, D, E, K, folato, cálcio, magnésio, fosfato, ferro, zinco e selênio (BISHEHSARI *et al.*, 2017). A deficiência

de tais nutrientes reflete diretamente na integridade do organismo, alterando o epitélio pulmonar e a visão (TIMONEDA *et al.*, 2018), estrutura e fisiologia cerebral (PRAHARAJ *et al.*, 2021), regulação gênica e resposta imunológica (CARR; MAGGINI, 2017).

2.3.2. Consumo de álcool e saúde do fígado e do pâncreas

Como já discutido, o álcool é metabolizado por três possíveis vias no fígado e no intestino, produzindo acetaldeído acetato e EROs como seus principais metabólitos (POHL; MOODLEY; DHANDA, 2021). A patogênese da lesão hepática alcoólica se dá a partir das interações das EROs e do acetaldeído com componentes celulares (CEDERBAUM; LU; WU, 2009; MELLO *et al.*, 2008). As EROs são naturalmente produzidas em nosso organismo em baixas quantidades, contudo o contato com grandes quantidades de álcool de forma crônica eleva a produção de EROs, que por sua vez pode danificar outras moléculas complexas, como DNA, lipídios e proteínas (CEDERBAUM; LU; WU, 2009).

O consumo crônico de etanol leva à inibição na atividade da ALDH, diminuindo a capacidade de metabolização do etanol, gerando um acúmulo de acetaldeído no plasma e em diferentes tecidos (MELLO *et al.*, 2008). O acetaldeído, assim como as EROs, pode interagir com proteínas, lipídeos e DNA, gerando dessa forma compostos imunogênicos que culminam em inflamação e danos hepatocelulares (LIU; TSAI; HSU, 2021). Essa interação pode resultar em esteatose, esteato-hepatite, cirrose e carcinoma hepatocelular (NIAAA, 2022; LIU; TSAI; HSU, 2021), que representam etapas gradativas de um grupo de patologias conhecidas como doenças hepáticas relacionadas ao álcool (LIU; TSAI; HSU, 2021).

Como referido anteriormente, o consumo de álcool induz a ativação de duas vias de degradação da droga: a via clássica, mediada por ADH e ALDH; e a via alternativa, mediada pela enzima Citocromo P450 2E1 (CYP2E1). Contudo, o consumo crônico da droga inibe a ação da ALDH e propicia a maior degradação do álcool via CYP2E1, resultando em maior produção de EROs e acúmulo de acetaldeído no tecido hepático (POHL, MOODLEY E DHANDA, 2021). O acúmulo dessas moléculas nos hepatócitos leva ao dano de estruturas intracelulares, como as mitocôndrias e microtúbulos, regula negativamente a adiponectina e reduz a atividade de peroxissomos, levando ao acúmulo de ácidos graxos no tecido hepático, resultando em esteatose (LIU, TSAI e HSU, 2021). Sugere-se que a esteatose seja um fator que eleva o risco da inflamação hepática (esteato-hepatite) devido ao aumento da peroxidação lipídica e do estresse oxidativo. Células danificadas liberam sinais moleculares que ativam receptores da imunidade inata em monócitos, macrófagos e células do parênquima hepático. Tal ativação culmina na transcrição de fatores pró-inflamatórios, levando à instalação de estado inflamatório hepático e lesão tecidual decorrente da inflamação (POHL, MOODLEY E DHANDA, 2021).

O acetaldeído acumulado no tecido hepático leva a ativação de células hepáticas estreladas, essas células então diminuem a suas capacidades de armazenamento de gordura e passam a expressar maiores títulos de citocinas e componentes do matiz extracelular, de modo especial o colágeno, levando o tecido ao estado de fibrose (CENI; MELLO; GALLI, 2014). As células estreladas ativadas perpetuam o processo inflamatório através da secreção de quimiocinas, levando a maiores danos teciduais, se instalando assim o estado de cirrose (POHL, MOODLEY E DHANDA, 2021). O estado cirrótico e a lesão celular em

células de Kupffer leva à produção de EROs, já que tais células são responsáveis pela síntese de hepcidina (CENI, MELLO e GALLI, 2014), molécula que auxilia no controle da absorção intestinal de ferro, elevando sua concentração sérica e tecidual (ANTUNES; CANZIANI, 2016; TANIAI, 2020). A produção de EROs é, também, um mecanismo fundamental para a carcinogênese hepática, já que essas moléculas promovem alterações estruturais, inclusive no DNA, podendo propiciar perda da programação celular (TANIAI, 2020).

Assim como ocorre no fígado, o consumo crônico de álcool é um importante fator de risco para lesões pancreáticas. Sugere-se que a principal via de ativação da inflamação pancreática decorrente do consumo de álcool ocorre por meio da ação do LPS, que atinge o órgão por meio da circulação portal (VONLAUFEN *et al.*, 2014). Ou seja, o aumento na permeabilidade intestinal a compostos bacterianos culmina no surgimento de padrões de lesão tecidual no pâncreas.

2.3.3. Doenças cardiovasculares

Sugere-se que o consumo moderado de bebidas alcoólicas fermentadas podem trazer benefícios à saúde, de modo especial à saúde cardiovascular e proteção contra algumas neoplasias (ARRANZ *et al.*, 2012). Tais atributos têm sido associados à quantidade elevada de compostos antioxidantes nessas bebidas, que induzem alterações em perfis lipídicos e que têm efeitos anti-inflamatórias (ARRANZ *et al.*, 2012). Entretanto, apesar de existirem indícios mostrando que os compostos fenólicos em bebidas alcoólicas fermentadas podem ser benéficos para a saúde, outras evidências apontam para o risco do consumo abusivo de produtos alcoólicos para a saúde cardiovascular, podendo

gerar cardiomiopatia, arritmia, derrame, hipertensão arterial, sendo os riscos para a saúde superiores aos benefícios (DAY & RUDD, 2019).

Em adultos saudáveis, o uso crônico de álcool em quantidades elevadas leva a alterações na pressão arterial que varia entre 4 e 7 milímetros de mercúrio (PIANO, 2017). Dentre os possíveis mecanismos causadores de tal alteração, podem-se destacar alterações nos níveis de cálcio intracelular, controle barorreflexo, elevação da frequência cardíaca e ativação de outros sistemas neuro-hormonais (MARCHI; MUNIZ; TIRAPELLI, 2014). Paino (2017) reúne resultados de estudos que apontam que o consumo de etanol além de propiciar estresse oxidativo vascular, diminui a expressão de óxido nítrico pelo endotélio vascular e eleva a expressão de fatores vasoconstritores, evidenciando também a função endotelial prejudicada entre indivíduos que fazem uso da droga.

O consumo de etanol é responsável por 21 a 36% de todos os casos de cardiomiopatia no mundo (LAONIGRO *et al.*, 2009). Como já discutido anteriormente, o consumo de álcool eleva os níveis de EROs circulantes no organismo. Segundo Day e Rudd (2019), os cardiomiócitos são extremamente sensíveis aos EROs, respondendo negativamente de forma que a homeostase do cálcio se mostra alterada e as funções de mitocôndrias e de proteínas contráteis apresentam-se deficientes.

2.4. MECANISMOS ENVOLVIDOS NOS TRANSTORNOS DE USO NOCIVO DO ÁLCOOL

2.4.1. Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal

Como anteriormente discutido, o consumo do álcool é impactado por diferentes fatores. O estresse se mostra como um fator ambiental que impacta diretamente tanto no início quanto na continuidade do consumo da droga (GIANOULAKIS, 1998; SZABO, 2021). Diferentes fatores estressantes, tais como econômicos, estresses familiares e no ambiente de trabalho, estão diretamente relacionados a uma maior busca por álcool (STEPHENS; WAND, 2012). Tais estados de estresse são responsáveis pela ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) devido a liberação endógena de hormônio liberador de corticotrofina no núcleo paraventricular do hipotálamo, estimulando o hormônio adrenocorticotrofina na hipófise anterior, resultando assim na secreção de cortisol pela glândula adrenal (GIANOULAKIS, 1998; BLAINE; SINHA, 2017).

O cortisol é um hormônio que participa de vias imunológicas, anti-inflamatórias, do metabolismo de proteínas, carboidratos e lipídios, mantendo a homeostase do organismo (KATSU; BAKER, 2021). Além do estresse, outros fatores podem estar associados ao aumento da produção de cortisol pela mesma via anteriormente citada, dentre eles o consumo de etanol (LOVALLO, 2006). Nesse sentido, estudos têm associado a desregulação do eixo HPA e alterações na produção de cortisol a uma maior busca pelo álcool e, por conseguinte, dependência à droga (LOVALLO, 2006; STEPHENS; WAND, 2012).

Rose e colaboradores (2010) sugerem que os glicocorticoides podem estar envolvidos tanto na consequência quanto nas causas do uso nocivo de

álcool. Quanto às causas, estudos observaram que existe uma dinâmica de hiper e hipoativação no eixo HPA durante a evolução dos estágios de UNA (ROSE *et al.*, 2010; STEPHENS; WAND, 2012). O consumo de álcool, como supracitado, desencadeia uma resposta aguda do eixo HPA ativando-o por via farmacológica (LOVALLO, 2006). A ativação de tal eixo interage com a via dopaminérgica, modulando dessa forma a sensação de recompensa (OSWALD *et al.*, 2005; WAND *et al.*, 2007). A busca recorrente pelo álcool em altas concentrações desregula o eixo HPA, o que culmina em uma redução na responsividade e expressão de cortisol diurna (LOVALLO, 2006), resultando em maior busca pelo álcool em situações de estresse físico e/ou emocional (MILIVOJEVIC *et al.*, 2020).

Além da ação da corticotrofina sobre o núcleo paraventricular do hipotálamo, pode-se citar também a sua influência sobre as regiões extra-hipotalâmicas e nas vias corticostriatalímbicas modulando os níveis de catecolaminas, tais como a norepinefrina e a dopamina (BLAINE; SINHA, 2017). A dopamina é um neurotransmissor que aumenta sua atividade durante a exposição a situações prazerosas (RODRIGUES, 2015), desempenhando papel no prazer associado à recompensa (WISE, 2008). Tal molécula tem seus níveis aumentados a partir do contato com toda droga que apresenta um risco potencial à dependência, drogas de abuso, através de sua interação com outras moléculas endógenas e com neurônios dopaminérgicos situados na região do tegmento mesencefálico (VOLKOW; MICHAELIDES; BALER, 2019). Além de sua ação sobre a liberação de dopamina, as drogas de abuso, incluindo o álcool, modulam o seu próprio consumo e, por consequência, a dependência através do seu efeito de reforço. O efeito de reforço estimula a liberação de canabinoides e opioides

endógenos, o que pode levar a uma supressão da dor, além da inibição da percepção de estados afetivos negativos (MITCHELL; BERRIDGE; MAHLER, 2018; VOLKOW; MICHAELIDES; BALER, 2019).

O consumo do álcool por si só pode modular a quantidade consumida e a busca pela droga através da ativação dos neurônios GABAérgicos. A referida ativação é secundária a alterações observadas nas vias dopaminérgicas. A sinalização álcool induzida, mediada pela dopamina, resulta na excitação dos neurônios GABA da região do tegmento mesencefálico a partir da ativação de receptores GABA- α , envolvendo a regulação negativa funcional induzida por estresse do K^+ e o co-transfetado de Cl^- (OSTROUMOV *et al.*, 2016; VOLKOW; MICHAELIDES; BALER, 2019).

Além das vias já discutidas, existem estudos sugerindo a participação do receptor de glutamato N-Metil-D-Aspartato (NMDAR) na dependência ao álcool (HO *et al.*, 2022). O NMDAR é um importante componente na fisiologia cerebral, participando efetivamente da plasticidade sináptica, cognição e aprendizagem (RON e WANG, 2009; CHANG *et al.*, 2019). Através de tal receptor, supõe-se que o álcool module as funções glutamatérgicas desempenhando papel nas reações de euforia e dissonância decorrentes do consumo da droga (KRYSTAL *et al.*, 2003). Estudos demonstram que o consumo do etanol reduz quase imediatamente a resposta de NMDAR em distintas regiões do cérebro (HENDRICKSON; SIBBALD; MORRISETT, 2004; RON; WANG, 2009).

A exposição crônica ao etanol seguida da retirada da droga culmina em uma hiperresponsividade do NMDAR, tal condição aumenta o influxo de Ca^+ nos neurônios, culminando em neurotoxicidade e morte celular (RON; WANG, 2009). A morte celular leva à liberação de HMGB1, molécula pró-inflamatória que

propicia um estado inflamatório neurotóxico, associado a um estado de estresse oxidativo decorrente da produção de EROs (CREWS; VETRENO, 2015). Tal estado induz a morte neuronal e por conseguinte menor percepção na sensação de recompensa ao consumir o álcool (CREWS; VETRENO, 2015).

2.5. CONSUMO DO ETANOL E O SISTEMA IMUNE

Sabe-se que o consumo de álcool leva a alterações no sistema imune (BARR *et al*, 2016), podendo, como anteriormente citado, induzir inflamação em distintos órgãos. Tal processo é decorrente de duas principais vias, sendo a primeira em decorrência direta do metabolismo da droga, o que eleva a produção de EROs e por consequência uma maior transcrição de fator nuclear κ B (NF κ B) (POHL; MOODLEY; DHANDA, 2021). O segundo evento decorre da capacidade do álcool elevar a permeabilidade intestinal à compostos bacterianos (WANG, ZAKHARI e JANG, 2010). Entretanto, o processo inverso, ou seja, o impacto do sistema imune e da resposta inflamatória na progressão do UNA, é alvo de raros estudos.

Dentre os estudos que objetivaram investigar tal impacto do uso de álcool no sistema imune está o publicado por Mulligan e colaboradores (2006), que evidenciam que o comportamento de beber álcool está associado a níveis elevados de atividade de NF κ B e suas proteínas reguladoras, bem como múltiplos fatores imunológicos. Blednov e colaboradores (2005), após testes em modelo animal, afirmam, em conformidade com Mulligan e colaboradores (2006), que níveis de expressão de produtos imunes pró-inflamatórios e o consumo de etanol são diretamente proporcionais, ou seja, a maior expressão de componentes imunológicos induz um maior consumo da droga. De igual maneira

a redução na expressão destes mesmos produtos reduz também o consumo do álcool.

2.6. ESTUDOS GENÉTICOS

2.6.1. Estudos iniciais

Além de fatores intrínsecos fisiológicos e moleculares, estudos sugerem a existência de componentes genéticos que modulam o UNA tendo, de acordo com estudos familiares, de gêmeos e de adoção, um potencial de herdabilidade de 50 a 60% (EDENBERG; FOROUD, 2013; REILLY *et al.*, 2017). Tais dados, associadas a estudo com modelos animais, evidenciam a participação de fatores genéticos no uso de etanol e em doenças secundárias ao consumo dessa droga (EDENBERG; FOROUD, 2013; FOROUD; EDENBERG; CRABBE, 2010). Notavelmente, filhos de pais com UNA apresentam risco até quatro vezes maior de desenvolver a mesma condição (SCHUCKIT, 1986).

Outras abordagens, como estudos de ligação, identificaram contribuição genética no desenvolvimento do UNA (TAWA; HALL; LOHOFF, 2016). Em estudo realizado por Reich e colaboradores (1998), foi identificada ligação entre UNA e os *loci* nos cromossomos 1 e 7. Em outro estudo, Long e colaboradores (1998), utilizando indivíduos nativo-americanos, evidenciaram ligação entre UNA e *loci* nos cromossomos 11 e 4. Entretanto, tais estudos não identificaram variantes com efeitos substanciais, sugerindo que a interação entre diversas variantes genéticas e fatores ambientais culminam em tal desfecho, assim como ocorre em outros traços complexos (EDENBERG; FOROUD, 2013; TAWA; HALL; LOHOFF, 2016).

Estudos de genes candidatos evidenciaram os clusters de *ADH* e *ALDH* como associados ao UNA (TAWA; HALL; LOHOFF, 2016) além de variantes no gene *LRRK2* (OLIVEIRA et. al., 2021). De modo especial, são identificadas associações com as variantes *ALDH2*504K* (EDENBERG; FOROUD, 2013) e *ADH1B*2* (MOROZOVA; MACKAY; ANHOLT, 2014). Essas variantes são mais frequentes em populações asiáticas e desempenham papel protetor em relação ao desenvolvimento do UNA (TAWA; HALL; LOHOFF, 2016). A variante *ALDH2*504K* leva à substituição de um aminoácido glutamato por uma lisina na posição 504 da proteína ALDH2, o que diminui a ação da enzima, levando ao acúmulo de acetaldeído, molécula responsável pelos efeitos característicos da veisalgia (ressaca) (HURLEY; EDENBERG, 2012; LARSON; WEINER; HURLEY, 2005). A variante *ADH1B*2*, por sua vez, produz uma alteração significativa na subunidade beta2 da proteína ADH1B, que aumenta a capacidade de oxidação do etanol em até 80x nos portadores da variante (EDENBERG, 2007).

Tratando-se de fatores imunogenéticos, os estudos são ainda mais raros. Dentre os estudos que evidenciam relação entre variantes genéticas que codificam produtos do sistema imunológico e UNA encontram-se associações com variantes nos genes *CRHR1* (GELERENTER et al., 2019), *TRAF* e *IL10* (-592C>A) (MARCOS et al., 2008), *CYP2E1* (WEBB et al. 2010), *TNFA* (PASTOR et al.2005) e componentes do complexo proteico NFκB (EDENBERG et al. 2008) além de IL-1 (Saiz et al. 2009). Estando estes polimorfismos majoritariamente relacionados a processos pró-inflamatórios (CREWS, 2012).

2.6.2. Estudos GWAS

Os estudos como os realizados para descoberta de variantes nos clusters *ADH* e *ALDH* avaliam um gene por vez e apenas detectam sinais de variantes que tenham efeitos pronunciados. Em contrapartida, outros estudos estruturados visam correlacionar redes gênicas, que em conjunto estão associadas a um determinado fenótipo (PARK *et al.*, 2017). Nesse contexto, é realizada uma varredura de todo genoma (GWAS) em busca de variantes cujos efeitos têm magnitudes variadas (TAWA; HALL; LOHOFF, 2016).

Os GWAS têm reforçado achados observados, por exemplo, em modelos experimentais, como a associação entre UNA e variantes nos genes que codificam proteínas responsáveis pelo metabolismo do álcool, como *ADH* e *ALDH* (FRANK *et al.*, 2012; SANCHEZ-ROIGE *et al.*, 2019; ZUO *et al.*, 2012). Outros achados importantes observados nestes estudos são as associações de variantes nos genes *ADH* e *ALDH* também em populações não asiáticas (FRANK *et al.*, 2012; SANCHEZ-ROIGE *et al.*, 2019; ZUO *et al.*, 2012). Além disso, estudos de GWAS têm identificado associações significativas de variantes em outros *loci* do genoma humano com o UNA (TAWA, HALL E LOHOFF, 2016). Tais variantes estão localizadas em genes cujos produtos são implicados nas mais variadas vias e sistemas, como vias de sinalização no sistema nervoso central (HO *et al.*, 2022), transporte de lipídeos (LUO *et al.*, 2020) e transdução de sinal (HEATH *et al.*, 2011).

Ho e colaboradores (2022) identificaram variantes no gene *SNHG16* (do inglês, *Small Nucleolar RNA Host Gene 16*) que inibem a sua própria expressão e estão associadas ao UNA. Tal inibição foi associada a uma redução na expressão e ação do gene catecol-O-metiltransferase (*COMT*), envolvido no

metabolismo de catecolaminas, reforçando a hipótese da participação do sistema de recompensa e das dopaminas, um dos subtipos de catecolaminas, na dependência ao álcool. Luo e colaboradores (2020) evidenciaram a possível participação do gene *APOL2* no envelhecimento epigenético precoce, evento associado ao UNA. A variante rs916264 encontrada nesse estudo modula a expressão do gene *APOL2* no tecido nervoso central. O gene *APOL2* codifica uma proteína citoplasmática que pode propiciar movimento e interação entre lipídios e organelas celulares. Variantes neste gene já foram anteriormente associadas a outras doenças psiquiátricas (TAKAHASHI *et al.*, 2008).

Heath e colaboradores (2011) evidenciaram variantes sugestivamente associadas ao UNA no gene *TMEM108*, que por sua vez está relacionado ao desenvolvimento do sistema nervoso e à transdução de sinal. Os autores também reafirmam a possível participação de centenas de variantes interagindo entre si para dar origem aos fenótipos UNA (HEATH *et al.* 2011). Em estudo realizado por Baik (2011) foram encontradas variantes em diversos genes associados ao UNA, dando destaque para variantes no gene *C12orf51*, que se mostraram em forte desequilíbrio de ligação com variantes no gene *ALDH2*.

Bierut e colaboradores (2010) reforçaram em seu estudo a hipótese de participação da via GABAérgica na dependência ao álcool ao identificarem 5 variantes no gene *GABRA2* significativamente associadas ao desfecho em questão. Além disso, estudos independentes identificaram variantes no gene *TPH1*, responsável pela expressão de triptofano hidroxilase (envolvida na síntese de serotonina), implicadas no desenvolvimento de UNA (CHEN *et al.*, 2012; SONG *et al.*, 2019). Tal molécula já foi associada a outros comportamentos, tais como impulsividade (SONG *et al.*, 2019) e comportamento

suicida (NIELSEN *et al.*, 2020). Zuo e colaboradores (2012) relataram relação entre o gene codificador de proteínas de membrana *KIAA0040* com UNA.

Apesar da vasta gama de estudos genômicos visando explicar a arquitetura genética de traços complexos, tais estudos são centrados em populações de ancestralidade europeia (BUSTAMANTE, BURCHARD, LA VEJA 2011; MARTIN ET AL, 2017). Um estudo publicado em 2016 por Petrovskiautor e Goldsteinautor afirma que os grandes estudos colaborativos voltados para estudos genômicos, incluindo o projeto 1000 genomas, são compostos majoritariamente por indivíduos de ancestralidade europeia, sub-representando, portanto, as demais populações, tais como latinos e afro-americanos. Estudos mais recentes (POPEJOY, FULLERTON, 2016; MARTIN ET AL, 2017) afirmam que apesar da proporção de indivíduos não europeus ter crescido em 20%, esse número reflete proporção majoritária de indivíduos com ancestralidade asiática, mantendo quase que inalterada as taxas de participação de africanos, latinos e hispânicos (Figura 2).

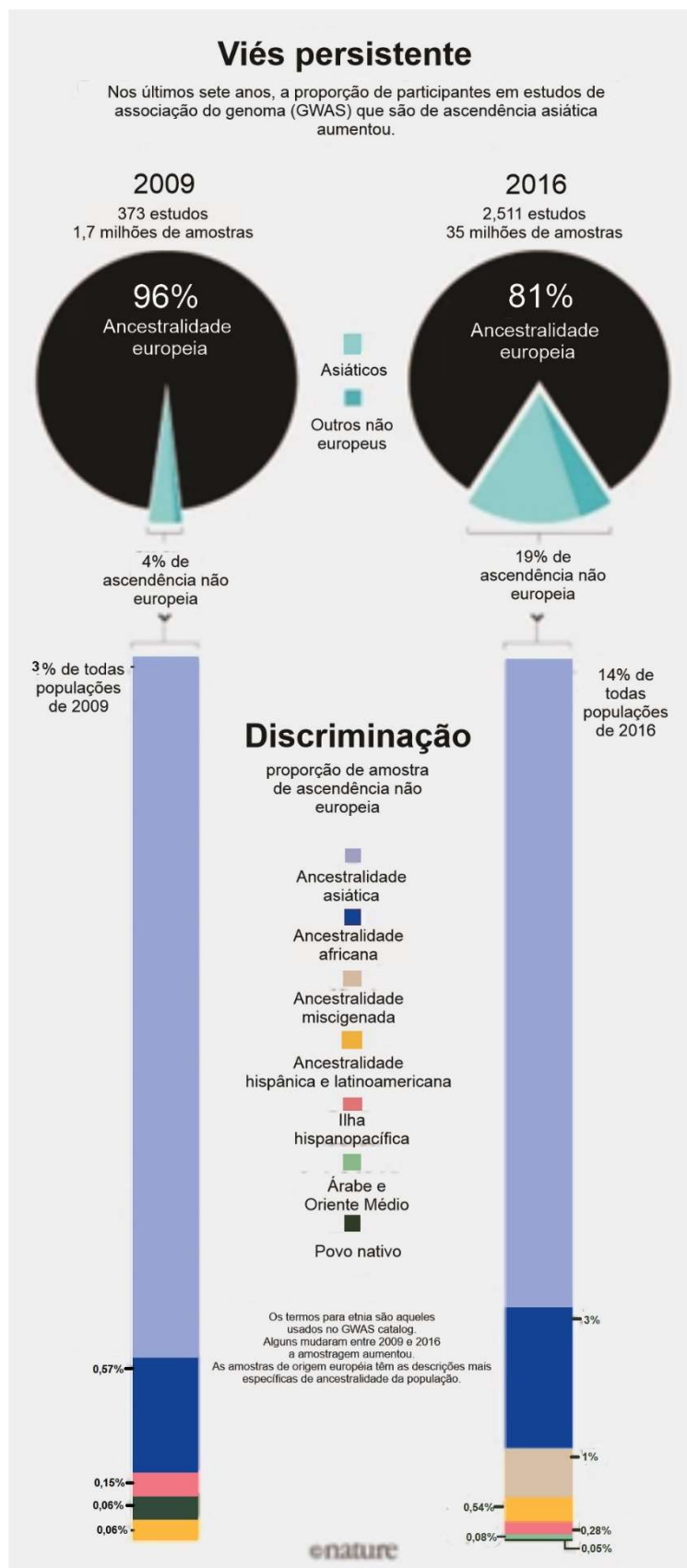


Figura 2. Ancestralidade de participantes em estudos de associação do genoma (GWAS) (modificado de POPJOY, FULLERTON, 2016).

Tal sub-representação impossibilita a extrapolação dos achados para populações não europeias em decorrência das diferenças alélicas e estruturas de desequilíbrio de ligação (DL) distintas, inerentes às diferentes populações ancestrais (MARTIN ET AL, 2017). A variabilidade observada nos achados descritos acima pode estar sob influência das referidas características de DL inerentes às populações estudadas. Nesse sentido, o presente estudo tem por objetivo identificar novos fatores genéticos e mecanismos imunogenéticos associadas ao UNA em uma população latino-americana miscigenada.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Investigar mecanismos genéticos e imunogenéticos associados ao comportamento de Uso Nocivo de Álcool (UNA) em indivíduos latino americanos miscigenados..

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar amostra populacional da cidade de Pelotas (Rio Grande do Sul, Brasil) quanto à ocorrência de UNA;
- Identificar, através de análise genômica em larga escala (GWAS), variantes genéticas/imunogenéticas associadas ao comportamento de UNA;
- Avaliar, *in silico*, os potenciais funcionais de variantes associadas com comportamento de UNA;
- Identificar vias canônicas potencialmente envolvidas no UNA.

4. MANUSCRIPT: UNCOVERING GENETIC AND IMMUNOLOGIC MECHANISMS ASSOCIATED WITH HARMFUL USE OF ALCOHOL IN ADMIXED LATIN AMERICANS

Short title: Genetics/Immunogenetics of Harmful Use of Alcohol

Edson H. B. Amaral^{1,*}, Gabriela de S. G. Britto¹, Thaís M. M. de Barreto^{1,2}, Raquel B. de São Pedro¹, Uenderson C. Rocha¹, Quersia V. Sampaio¹, Mirela R. C. Barros¹, Daniel E. Santos¹, Alberto O. M. Santos¹, Bernardo L. Horta³, Maurício L. Barreto⁴, Ana L. B. Godard⁵, Pablo R. S. Oliveira¹

¹Institute of Biology, Federal University of Bahia, Salvador, Brazil

²Couto Maia Institute, Salvador, Brazil

³Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil

⁴Center for Data Integration and Knowledge for Health, Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, Brazil

⁵Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

*Corresponding author:

E-mail: edsonamaral@ufba.br

4.1. INTRODUCTION

Harmful Use of Alcohol (HUA) is a public health issue that imposes substantial costs on healthcare systems worldwide¹. Ethanol consumption affects the users' quality of life², leading to a range of mental and physical health problems³. According to the World Health Organization (WHO), 43% of the global population consumed alcohol in 2016, with higher prevalence rates in the Americas, Europe, and the Eastern Mediterranean region⁴. In this context, Brazil ranks 15th in the Americas region in terms of per capita ethanol consumption⁵. Furthermore, ethanol is considered one of the leading risk factors for global mortality, accounting for 5.3% of deaths in 2018⁶.

Identifying individual risk for HUA is essential for early intervention, with the Alcohol Use Disorder Identification Test (AUDIT)⁷ being one of the most widely used screening tools for problematic and harmful alcohol use. HUA is a complex condition influenced by extrinsic and intrinsic factors⁸. Extrinsic factors include, for example, volume and frequency of alcohol consumption, age, individual health status, family history of alcohol consumption, as well as broader socio-cultural and economic contexts^{9,10}. Intrinsic factors include permanent disturbances in neurotransmission systems resulting from alcohol use, immune/inflammatory mediators, and genetic variants^{11,12}.

Alcohol abuse leads to alterations in the immune system¹³, with alcohol-induced alterations leading to inflammation in various organs. This process is primarily driven by the direct effects of ethanol metabolism, which increases the production of reactive oxygen species (ROS) and subsequently triggers enhanced transcription of nuclear factor-kappa B (NFκB)¹⁴. Alcohol can also inhibit gut mucosal immunity¹⁵ and disrupt intestinal barrier function, allowing

bacterial compounds such as lipopolysaccharides (LPS) to enter the bloodstream¹⁶. On the other hand, despite diverse lines of evidence suggesting an influence of the immune response on HUA, such as HMGB1 release in neuronal death¹¹ and the impact of IL-10 on the GABAergic response¹⁷, the precise role of immune factors on the progression of this condition remains largely unknown.

Alcohol use disorders, like other complex traits, can be influenced by multiple genetic factors, with estimated heritability ranging from 50% to 60%^{18,19}. Indeed, previous Genome-Wide Association Studies (GWAS) revealed numerous genetic variants associated with alcohol-related phenotypes, particularly in genes involved in alcohol metabolism, such as the alcohol dehydrogenase (*ADH*) and aldehyde dehydrogenase (*ALDH*) gene families^{20,21,22,23,24}. Moreover, GWAS revealed significant associations with variants in other genes involved in various biological pathways, including central nervous system signaling, lipid transport, signal transduction and pleiotropic genes with immune functions^{25,26,27,28,29}. However, most of these studies have focused on populations of European or Asian ancestries, limiting possible extrapolations to other ethnic groups.

Therefore, the aim of the present study was to investigate genetic/immunogenetic mechanisms associated with HAU in admixed Latin American individuals, since these populations are still vastly underrepresented in genomic studies. Understanding the genetic architecture of HAU in diverse populations is crucial for the development of targeted interventions and personalized treatment strategies.

4.2. METHODS

4.2.1. Sample and ethical considerations

The study, with a cross-sectional design, was carried out in a population sample in Brazil. The cohort was recruited in the city of Pelotas, located in Rio Grande do Sul, Brazil. Detailed information regarding the Pelotas cohort was previously published by Victora and Barros³⁰. In 1982, daily visits were made to the three maternity hospitals in the city to register births, which accounted for 99.2% of all births in the period. The 5,914 live births, whose families lived in the urban area, constitute the original cohort. From this cohort, 3,736 individuals were randomly selected for genotyping. In 2012, when they reached 30 years of age, 2,840 volunteers completed the Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT)⁷ to assess individual risk for developing alcohol use disorders.

The Pelotas cohort is part of the EPIGEN-Brazil consortium (<https://epigen.grude.ufmg.br/>), whose study protocol was approved by the National Research Ethics Committee (CONEP, resolution: 15895/2011). Informed consent was collected from all participants for all interviews (initial and follow-up), blood collection and genotyping. All methods and protocols were performed in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki.

4.2.2. Definition of harmful use of alcohol (HUA)

Phenotyping of the Pelotas cohort was performed using the AUDIT, a widely utilized tool for identifying high-risk drinking. The AUDIT consists of three questions on alcohol consumption (consumption score), three questions on drinking behavior and dependence (dependence score), and four additional questions on alcohol-related problems (alcohol-related problems score).

Previous studies have reported the AUDIT questionnaire to have a sensitivity of 92% and specificity of 94% in detecting problematic and harmful use of alcohol³¹. The AUDIT total score was used to determine individual risk levels for HUA. The threshold for the AUDIT total score was defined based on recommended values from previous publications^{32,33}. Individuals with an AUDIT total score ≥ 8 were classified as presenting a high risk of HUA, while those with an AUDIT total score < 8 were included in the low/moderate risk group. A total of 719 individuals who did not respond to the AUDIT questionnaire and 109 individuals who reported no prior alcohol exposure were excluded from the study.

4.2.3. Genotyping and quality control

As part of the EPIGEN-Brazil consortium, individuals from the Pelotas cohort were randomly selected and genotyped for approximately 2.3 million Single Nucleotide Variants (SNVs) using the Illumina HumanOmni 2.5-8v1 BeadChip platform (Illumina, San Diego, CA). Extensive quality control (QC) procedures were conducted in the present study to exclude SNVs and samples of low quality. The Relatedness Estimation in Admixed Populations (REAP) software³⁴ was utilized to calculate the kinship coefficient for each pair of individuals based on genomic data, identifying and excluding close pairs with an estimated kinship coefficient of ≥ 0.1 . Other QC measures were implemented using PLINK software (version 1.9)³⁵. The genotyping rates per sample were evaluated using the "--mind" command with a 2% tolerance. Variants with a genotyping rate below 98% were removed using the "--geno" command. Markers exhibiting significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium ($p < 10^{-5}$) were eliminated using the "--hwe" command. Additionally, variants with a Minor Allele

Frequency (MAF) < 1% were excluded from further analyses. Following the application of QC, a total of 2,840 individuals remained in the study.

4.2.4. Genotype imputation

Genotype imputation in the Pelotas cohort was previously described by Magalhães and colleagues³⁶. In summary, imputation was conducted using the EPIGEN-5M+1KGP reference panel, which is a combination of the 1000 Genomes Project (phase 3) haplotypes panel, version 20130502, and our unpublished EPIGEN-5M panel consisting of 4,102,271 SNVs from 265 Brazilians. To ensure consistency between the target data and the reference panels, SHAPEIT2 software³⁷ was employed to verify the SNV strand orientation, and PLINK was utilized to correct strand inconsistencies (--flip). The target dataset was phased using the EPIGEN-5M dataset as the phasing reference. Genotype imputation was performed using IMPUTE2 v2.3.2 software³⁸. The IMPUTE2 *info score* was employed as a measure of imputation quality. Only imputed variants with an *info score* ≥ 0.8 and a MAF $\geq 1\%$ were considered. A total of 9,768,598 genotyped or imputed autosomal variants were retained for further analyzes.

4.2.5. Population genetic structure and linkage disequilibrium

The individual ancestry patterns of the participants in the Pelotas cohort were investigated using the ADMIXTURE software (version 1.3.0)³⁹. The analysis was conducted under unsupervised mode, using the European (EUR), African (AFR) reference populations from the 1000 Genomes Project (phase 3)⁴⁰ and Native American (AMR) composed by: Peruvian (from 1000 Genomes), Surui and

Karitiana in Brazil, and Maya and Pima in Mexico (from the Human Genome Diversity Project)]. The value of $K = 3$ was assumed considering that the main continental parental groups that contributed to the formation of the Brazilian population are Europeans, Africans and Native Americans⁴¹.

To conduct principal component analysis (PCA), the full dataset of unrelated individuals of the 1000 Genomes Project (phase 3), which comprises subjects with European (EUR), African (AFR), East Asia (EAS), South Asian (SAS) and Native American (AMR) ancestries, was used as a reference. This 1000 Genomes panel was merged with the genetic data of Pelotas, using autosomal variants with a minor allele frequency (MAF) > 0.1 that were common to both datasets. Then, the merged data was pruned (`--prune`) using PLINK software with a window size of 50 markers, a step size of 5 and a variance inflation factor (VIF) threshold of 1.5, leaving 208,633 markers to calculate principal components with PLINK. Linkage disequilibrium (LD, r^2) analysis was performed using the HAPLOVIEW software (v4.2)⁴².

4.2.6. Selection of variants in immune genes

A list containing 2,459 human protein-coding genes related to the immune system was obtained from the Reactome platform (R-HAS-168256)⁴³. The gene locations (RefSeq: GRCh38) were obtained using the BioMart-Ensembl tool (<http://www.ensembl.org/info/data/biomart>). A 5kb segment was added to both 5' and 3' flanking regions of each gene. The VCFtool software⁴⁴ was used to extract SNVs, already present in the studied variants panel, within the regions of interest.

4.2.7. Functional and pathway enrichment analyzes

SNVs with potential regulatory effects were identified through *in silico* analysis of the human genome (RefSeq: GRCh38). Comparative genomics and epigenomics data were accessed via the Ensembl platform. SNV positions were cross-referenced with DNA sequence annotations, including introns and exons locations, CpG sites, conserved elements in placental mammals⁴⁵, evidence of promoter/enhancer/silencer regions, DNase I hypersensitivity, and eQTL (expression quantitative trait *loci* - from the GTEx platform)⁴⁶. The elements detected in at least two distinct cell lineages/tissues were considered valid.

Pathway enrichment analysis was performed on all markers with association signals with HUA at $p < 0.01$. Genes (from Ensembl Variation data) were mapped from a list of SNV rs-codes using the g:SNPense tool (g:Profiler toolset; <https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/>)⁴⁷. A total of 1,917 gene IDs were identified and analyzed through the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathways. Over-representation analysis was conducted using the web-based toolkits: WebGestalt (www.webgestalt.org/) and ShinyGO 0.77 (<http://bioinformatics.sdstate.edu/go>), with default parameters. The False Discovery Rate (FDR, Benjamini-Hochberg) method was applied to control for false-positive results, with a significance level of $p\text{FDR} < 0.05$. In the network analysis, pairs of enriched pathways were considered connected if they shared 20% or more genes.

4.2.8. Statistical analysis

Normality tests were performed for all quantitative variables, and associations between quantitative or qualitative variables and HAU were investigated using the Mann-Whitney or χ^2 tests, respectively. Quantitative

variables are described by their median and interquartile range (IQR). Genome-wide association was conducted through multivariate logistic regression analysis, utilizing an additive model and adjusting for sex and European ancestry. The threshold of statistical significance in this study was set at $p < 5 \times 10^{-8}$, based on the Bonferroni correction estimate for all common independent SNVs in the human genome³⁸. Variants were considered suggestively associated with HUA when $5 \times 10^{-8} < p < 10^{-5}$. Additionally, PLINK's --clump function was used to identify markers with the lowest p -value at each *loci* with significant or suggestive association signals. These SNVs were clustered considering a maximum physical distance of 250kb and a LD (r^2) threshold of 0.5. Results are reported as estimates of *odds ratios* (OR) and confidence intervals (CI).

4.2.9. Data availability

The EPIGEN data are deposited in the European Nucleotide Archive [PRJEB9080 (ERP010139) Genomic Epidemiology of Complex Diseases in Population-Based Brazilian Cohorts], accession number EGAS00001001245.

4.3. RESULTS

4.3.1. Ancestry analyzes reveal the admixture structure of the studied individuals

The risk of Harmful Use of Alcohol (HUA) in individuals from the Pelotas (Rio Grande do Sul, Brazil) cohort was evaluated using the AUDIT questionnaire, adapted to the Brazilian Portuguese. The total AUDIT score was used to classify individuals as either high risk (AUDIT \geq 8) or low/moderate risk (AUDIT < 8) for HUA. After applying exclusion criteria and conducting quality control ('Methods' section), 2,840 individuals were included in the study. Among them, 654 were classified as high risk, while 2,186 were classified as low/moderate risk for HUA (Table 1). Notably, the proportion of women was significantly higher ($p = 1.54 \times 10^{-58}$) in the group of individuals with low/moderate risk (60%) for HUA compared to those with high risk (24.5%) for this condition. Furthermore, the individual European ancestry, as determined by the ADMIXTURE tool, was significantly associated with the risk for HUA ($p = 2.13 \times 10^{-2}$).

Table 1: Characteristics of the studied sample (after quality control)

	AUDIT < 8	AUDIT \geq 8	<i>p</i>
General characteristics			
Number of individuals (%)	2,186 (77)	654 (23)	-
Sex, female (%)	1,310 (60)	160 (24.5)	>0.05
Population genetic structure			
European ancestry, Median (IQR)	0.84 (0.72-0.89)	0.82 (0.65-0.89)	>0.05

Abbreviations, AUDIT: Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT < 8 or \geq 8 represent low/moderate or high risk for harmful use of alcohol, respectively); IQR, interquartile range (first-third quartiles); *p*: *p*-value for association tests (Mann-Whitney or χ^2 for quantitative or qualitative variables, respectively).

The global ancestry for the entire set of individuals in the Pelotas cohort is shown in Figure 1A. The average global ancestries for the group classified as

low/moderate risk for HUA are 0.84 (IQR: 0.72-0.89) European, 0.07 (IQR: 0.04-0.16) African, and 0.07 (IQR: 0.04-0.10) Native American (Figure 1B). Conversely, individuals with a high risk for HUA exhibit average ancestries of 0.82 (IQR: 0.65-0.89) European, 0.08 (IQR: 0.04-0.24) African, and 0.07 (IQR: 0.04-0.10) Native American (Figure 1B). Principal component analysis confirmed the admixed patterns of the studied population (Figure 1C).

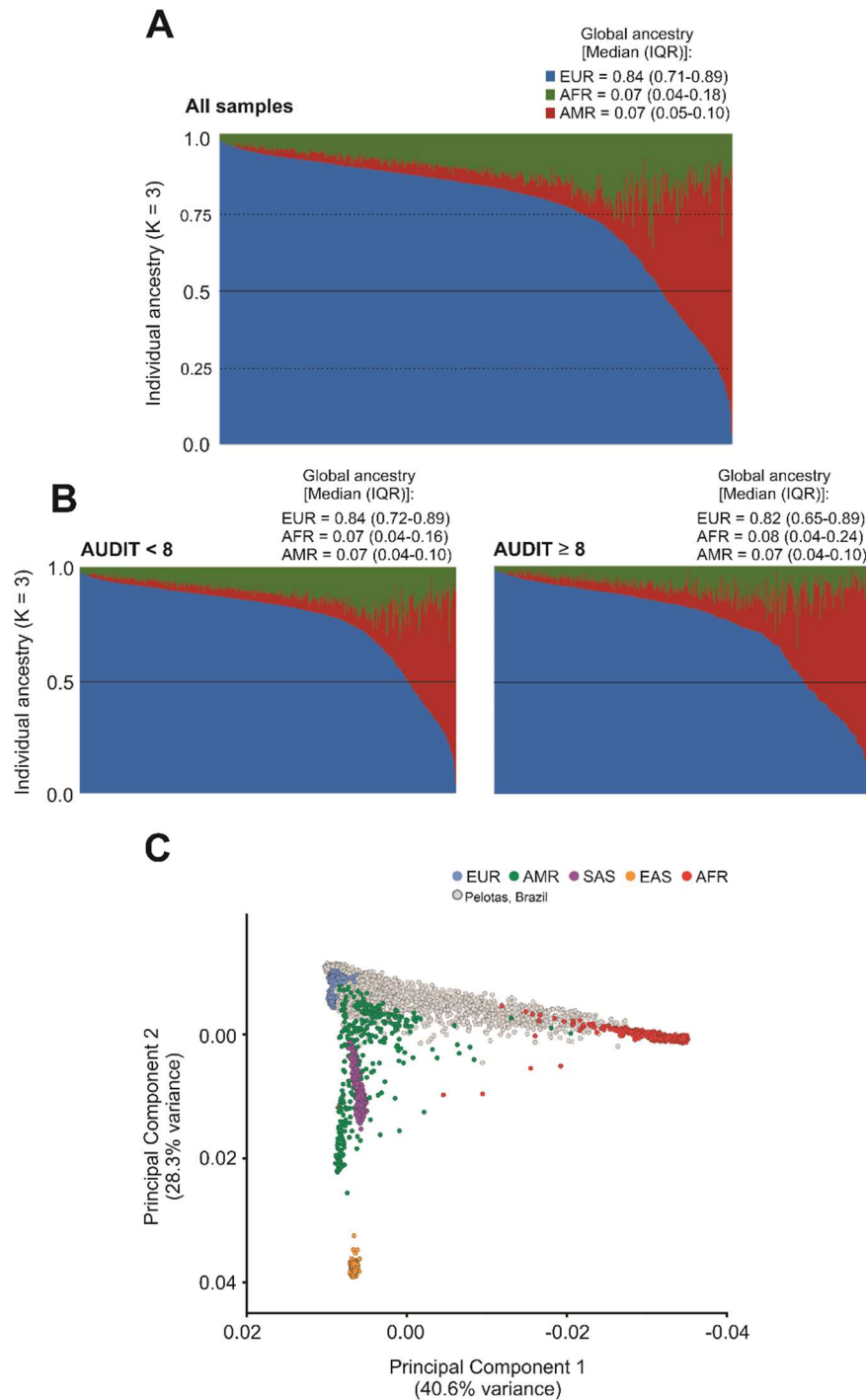


Figure 1. Ancestry analyzes of the Pelotas (Brazil) cohort. A) Bar plot showing the individual ancestries of all participants using unsupervised ADMIXTURE method. **B)** Individual ancestry bar plots of participants with low/moderate (AUDIT <8) or high (AUDIT ≥ 8) risk for harmful use of alcohol. **C)** Principal component analysis (PCA) on the entire set of individuals in the Pelotas cohort and samples from the reference populations of the 1000 Genomes Project. Abbreviations, Europeans: EUR. Native Americans: AMR. South Asians: SAS. East Asians: EAS. Africans: AFR. IQR: interquartile range (first-third quartiles).

4.3.2. *CYP4B1* gene variant is significantly associated with HUA

The association of polymorphisms with HUA was investigated using multivariate logistic regression (additive model), with sex and European ancestry included as covariates. As shown in the Quantile-Quantile plot (Figure 2A), there is no early deviation of the observed p -values from the expected values. Furthermore, the estimated genomic inflation factor (λ) was 1.0014, indicating that the population genomic structure did not have a significant impact on the association results. This genome-wide association approach revealed that SNV rs1097611 (C), located in an intronic region of the Cytochrome P450 Family 4 Subfamily B Member 1 (*CYP4B1*) gene (*locus* 1p33), is significantly associated [$p = 4.88 \times 10^{-8}$, *odds ratio* (OR) = 1.8, confidence interval (CI) = 1.46-2.23] with HUA in the Pelotas cohort (Figure 2B). The *CYP4B1* enzyme is a member of the cytochrome P450 superfamily, which plays crucial roles in the metabolism of endogenous and exogenous compounds⁴⁸. Additionally, suggestive associations ($5 \times 10^{-8} < p < 10^{-5}$) were observed between several variants at different *loci* and HUA (Figure 2B).

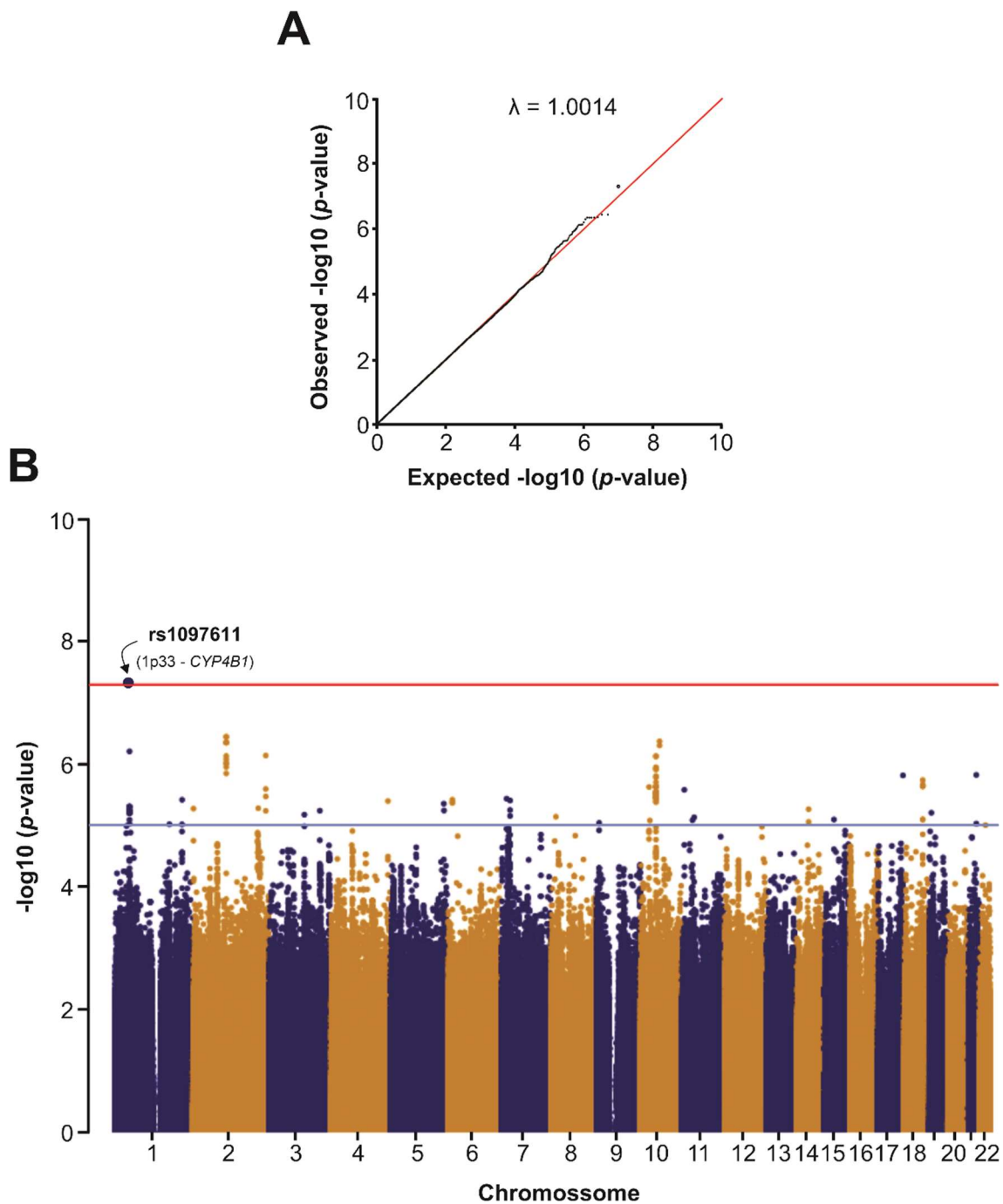


Figure 2. Genome-Wide Association Study (GWAS) for Harmful Use of Alcohol (HUA) in the population of Pelotas, Brazil. A) Quantile-Quantile (QQ) plot for observed and expected p -values. **B)** Manhattan plot showing association statistics. Results were obtained by multivariate logistic regression (additive model), including sex and European ancestry as covariates. The red line in the Manhattan plot indicates the genome-wide significance threshold of a p -value less than 5×10^{-8} . The blue line represents the threshold for suggestive associations ($p < 1 \times 10^{-5}$). The marker rs1097611 shows significant association ($p = 4.88 \times 10^{-8}$) with HUA.

Table 2 shows a list of the index SNVs with the lowest p -value at *loci* with significant or suggestive association signals (linkage disequilibrium-based clumping).

Table 2. List of the top SNVs at *loci* showing significant or suggestive association signals with harmful use of alcohol in Pelotas, Brazil.

SNP	Coordinate ^a	Mapped Gene	A1	MAF	OR	95% CI	p
rs1097611	1:46794818	<i>CYP4B1</i>	C	0.10	1.80	1.46-2.23	4.88×10^{-8}
rs56249801	2:106010153		C	0.07	1.86	1.47-2.36	3.67×10^{-7}
rs10994972	10:61934996	<i>ARID5B</i>	C	0.02	3.05	1.98-4.70	4.33×10^{-7}
rs115044616	10:28477417	<i>LINC02652</i>	T	0.01	3.72	2.15-6.42	5.07×10^{-7}
rs3098610	2:231853332	<i>NCL</i>	C	0.29	0.68	0.58-0.79	7.38×10^{-7}
rs4312019	10:50396917	<i>SGMS1</i>	C	0.27	1.44	1.25-1.66	7.57×10^{-7}
rs2835941	21:37758556	<i>KCNJ6</i>	G	0.07	1.82	1.42-2.31	1.53×10^{-6}
rs2085350	17:79374716	<i>RBFOX3</i>	T	0.48	0.72	0.63-0.82	1.56×10^{-6}
rs1373525	18:59351001	<i>LMAN1</i>	A	0.23	1.45	1.24-1.69	1.85×10^{-6}
rs9734084	11:7424861	<i>SYT9</i>	A	0.06	1.86	1.44-2.41	2.68×10^{-6}
rs4973022	2:231880808		G	0.27	0.70	0.60-0.81	3.44×10^{-6}
rs80179868	7:16971304	<i>AHR</i>	A	0.03	2.24	1.59-3.16	3.73×10^{-6}
rs2472800	6:14765458	<i>ENSG00000234261</i>	T	0.10	1.62	1.32-1.98	3.87×10^{-6}
rs72649997	1:214280940	<i>SMYD2</i>	A	0.03	2.26	1.60-3.20	3.89×10^{-6}
rs4722752	7:28030692	<i>JAZF1</i>	C	0.27	1.42	1.22-1.64	3.99×10^{-6}
rs3095894	4:180788439	<i>ENSG00000225356</i>	A	0.05	1.85	1.42-2.40	4.07×10^{-6}
rs6884130	5:168756698	<i>SLIT3</i>	T	0.40	0.72	0.63-0.83	4.51×10^{-6}
rs13391113	2:208032875	<i>PIKFYVE</i>	A	0.02	2.97	1.86-4.75	5.34×10^{-6}
rs144572112	2:1704618	<i>PXDN</i>	G	0.02	2.52	1.69-3.75	5.42×10^{-6}
rs8008656	14:57665834	<i>SLC35F4</i>	C	0.18	1.46	1.24-1.71	5.54×10^{-6}
rs10273399	7:28049428	<i>JAZF1</i>	T	0.41	1.37	1.19-1.56	5.71×10^{-6}
rs11743120	5:169421792	<i>SPDL1</i>	A	0.03	2.18	1.56-3.05	5.81×10^{-6}
rs77769953	3:161969126		A	0.15	0.63	0.51-0.77	5.86×10^{-6}
rs559172334	19:6771461	<i>VAV1</i>	G	0.01	3.16	1.92-5.20	6.33×10^{-6}
rs6686412	1:46754794		A	0.07	1.71	1.35-2.16	6.50×10^{-6}
rs56322623	3:112825591	<i>CD200R1L</i>	C	0.05	0.42	0.29-0.62	6.79×10^{-6}
rs28404894	8:14913483	<i>SGCZ</i>	T	0.16	0.63	0.52-0.77	7.34×10^{-6}
rs7125068	11:38767959		C	0.01	3.55	2.04-6.18	7.51×10^{-6}
rs141732230	15:51344356	<i>GLDN</i>	A	0.01	3.34	1.97-5.67	8.15×10^{-6}
rs1565121400	11:33402817	<i>KIAA1549L</i>	-	0.03	2.31	1.60-3.35	8.36×10^{-6}
rs2797912	10:31154301		C	0.04	2.04	1.49-2.80	8.47×10^{-6}
rs79983790	9:7687063		A	0.02	2.36	1.61-3.45	9.26×10^{-6}
rs12059716	1:173697023	<i>ANKRD45</i>	C	0.29	1.40	1.21-1.63	9.73×10^{-6}
rs17021804	1:214015210	<i>PROX1</i>	C	0.02	2.68	1.73-4.15	9.78×10^{-6}

Abbreviations, SNV: Single Nucleotide Variant; A1: reference allele; MAF: Minor Allele Frequency; OR: odds ratio; 95% CI: 95% confidence interval; p : p -value (association test).

^aCoordinate: Chromosome:base pair (RefSeq: GRCh38).

Considering the hypothesis that immune factors may influence the development of alcohol use disorders, we also investigated the occurrence of immunogenetic variants associated with HUA in our cohort. This analysis identified a variant (rs559172334) located 2kb upstream of the Vav Guanine Nucleotide Exchange Factor 1 (*VAV1*) gene, which showed suggestive association ($p = 6.33 \times 10^{-6}$, OR = 3.16, CI = 1.92-5.20) with this trait. The *VAV1* protein is important in hematopoiesis, as it plays a crucial role in the development and activation of T and B cells⁴⁹. Notably, all other variants within immune-related *loci* exhibited only nominal associations ($p < 0.05$) with HUA.

4.3.3. Functional analysis revealed potential effects of the *CYP4B1* variants associated with HUA

It is important to note that SNVs associated with a trait in a GWAS may not necessarily be causally linked to functional effects. Instead, they could be in linkage disequilibrium (LD) with another functional variant. In this manner, we focused on evaluating the LD structure at the *locus* where the SNV rs1097611 (*CYP4B1*) exhibited a significant association with HUA. Figure 3 shows the pairwise correlations (r^2) between rs1097611 and other variants within a 1 Mb window (1:4,179,481-5,179,481 - RefSeq: GRCh38). Closer examination of this region reveals that the SNVs strongly ($r^2 \geq 0.8$) correlated with rs1097611 are directly positioned over non-coding sequences of the *CYP4B1* gene, with all of these variants reaching the suggestive association threshold.

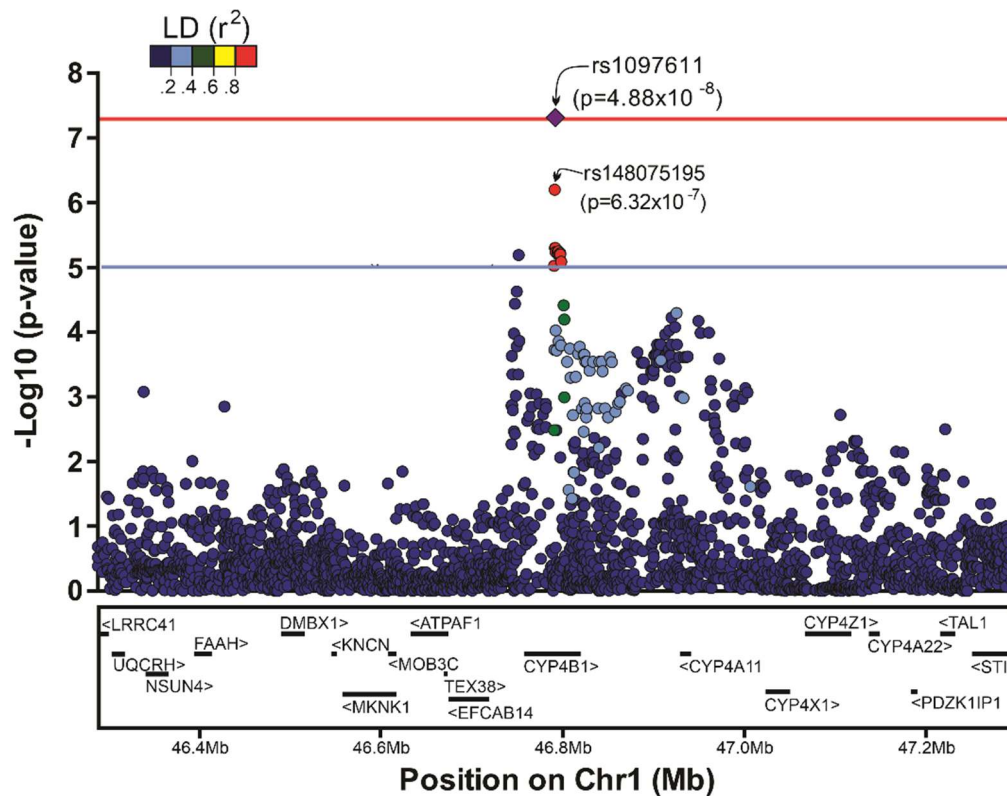


Figure 3. Regional association plot of the *CYP4B1* locus. The plot shows the Linkage Disequilibrium (LD) values (r^2) between rs1097611 (purple diamond) and each variant (represented as circles) within the region 1:4,179,481-5,179,481 (RefSeq: GRCh38). The red line indicates the genome-wide significance threshold ($p < 5 \times 10^{-8}$), while the blue line represents the threshold for suggestive associations ($p < 1 \times 10^{-5}$). The positions of the genes in the studied region are indicated at the bottom of the figure.

Next, we assessed functional annotations for the set of SNVs in strong LD with rs1097611, which included chromatin state segmentation, DNase I hypersensitivity, mammalian sequence conservation, and Expression Quantitative Trait *Loci* (eQTL) analysis. This analysis unveiled the potential functional implications of most of these variants at this *locus*. As shown in Table 3, six SNVs in this LD block are located within H3K4me1/H3K27ac and/or H3K4me3/H3K9ac elements, which are histone modifications commonly found in enhancers or promoters, respectively. These regulatory elements have been observed in various human tissues⁵⁰, supplementary figure 1. Moreover, as

evidenced by the Genotype-Tissue Expression (GTEx) platform⁴⁶, except for rs148075195, all other evaluated SNVs have been significantly associated with differential *CYP4B1* gene expression across multiple tissues (GTEx Multi-tissue meta-analysis).

Table 3: Functional annotation of the variants in strong linkage disequilibrium ($r^2 \geq 0.8$) with rs1097611 in the population of Pelotas, Brazil.

(TagSNV) rs1097611								GERP Promoter Enhancer DNase I eQTL (GTEx)
Captured SNV	Coordinate ^a	LD (r^2)	A1	MAF	OR	95% CI	p	2.8x10 ⁻⁷⁹
rs148075195	1:46794172	0.92	C	0.09	1.75	1.40-2.17	6.3x10 ⁻⁷	
rs150210323	1:46794476	0.82	T	0.12	1.58	1.30-1.93	5.0x10 ⁻⁶	2.2x10 ⁻⁶⁴
rs183014517	1:46794480	0.82	T	0.12	1.58	1.30-1.93	5.0x10 ⁻⁶	7.8x10 ⁻⁶
rs837405	1:46794549	0.82	C	0.12	1.58	1.30-1.93	5.0x10 ⁻⁶	2.2x10 ⁻⁶⁴
rs863915	1:46793466	0.82	T	0.12	1.56	1.28-1.90	9.5x10 ⁻⁶	2.2x10 ⁻⁶⁴
rs1097610	1:46794887	0.81	C	0.12	1.57	1.29-1.91	5.8x10 ⁻⁶	3.7x10 ⁻⁶⁹
rs649562	1:46796995	0.81	T	0.12	1.57	1.29-1.91	5.8x10 ⁻⁶	3.7x10 ⁻⁶⁹
rs837403	1:46797762	0.81	T	0.12	1.57	1.29-1.91	6.4x10 ⁻⁶	3.7x10 ⁻⁶⁹
rs632133	1:46798823	0.81	C	0.12	1.57	1.29-1.91	6.4x10 ⁻⁶	3.7x10 ⁻⁶⁹
rs837401	1:46800005	0.81	C	0.12	1.57	1.29-1.91	6.4x10 ⁻⁶	6.8x10 ⁻⁶⁸
rs837402	1:46799993	0.80	T	0.12	1.57	1.29-1.91	6.0x10 ⁻⁶	6.8x10 ⁻⁶⁸
rs634431	1:46798019	0.80	A	0.12	1.57	1.29-1.91	5.7x10 ⁻⁶	3.7x10 ⁻⁶⁹
rs590582	1:46800957	0.80	G	0.12	1.56	1.28-1.90	8.2x10 ⁻⁶	6.8x10 ⁻⁶⁸

Abbreviations, SNV: Single Nucleotide Variant; A1: reference allele; MAF: Minor Allele Frequency; OR: *odds ratio*; 95% CI: 95% confidence interval; p : p -value (association test). GERP: genomic evolutionary rate profiling (evolutionary constraint in mammals); Promoter: promoter histone marks (red) - H3K4me3 or H3K9ac; Enhancer: enhancer histone marks (yellow) - H3K4me1 or H3K27ac; DNase I: hypersensitivity to DNase I; eQTL (GTEx): Expression Quantitative Trait *Loci* analysis (GTEx v8, multi-tissue meta-analysis p -value). The elements detected in at least two distinct cell lineages/tissues were considered valid.

^aCoordinate: Chromosome:base pair (RefSeq: GRCh38).

4.3.4. Pathway enrichment analysis uncovers mechanisms potentially implicated in HUA

Pathway enrichment analysis was conducted to uncover mechanisms potentially implicated in HUA. To map genes, we utilized the position of all SNVs with p -value < 0.01 in the GWAS analysis. This p -value threshold was selected to assess the broad contribution of the genome to the investigated phenotype, with regard to the polygenic nature of alcohol use disorders. The 1,917 mapped genes were matched to curated canonical pathways from the KEGG database. This analysis resulted in 65 significantly enriched pathways ($pFDR < 0.05$) (Figure 4A). Among these, several pathways related to the nervous system are in the top 10 ranking (Figure 4B), such as: Glutamatergic synapse (Rank = 1, $pFDR = 2.8 \times 10^{-10}$); Axon guidance (Rank = 2, $pFDR = 3.4 \times 10^{-7}$); cAMP signaling (Rank = 3, $pFDR = 3.4 \times 10^{-5}$); Oxytocin signaling (Rank = 4, $pFDR = 3.4 \times 10^{-5}$); and Cholinergic synapse (Rank = 9, $pFDR = 1.3 \times 10^{-4}$). Notably, our findings support the hypothesis of a causal relationship between immune mechanisms and alcohol use disorders, as we observed enrichment of immune-related pathways in our dataset (Figure 4C), including: Inflammatory mediator regulation of TRP channels (Rank = 18, $pFDR = 1.5 \times 10^{-3}$); and Fc gamma R-mediated phagocytosis (Rank = 37, $pFDR = 9.9 \times 10^{-3}$). Additionally, a network analysis revealed a cluster with interactions among multiple nervous system-related pathways (Figure 5). Taken together, these data support the biological plausibility of our findings.

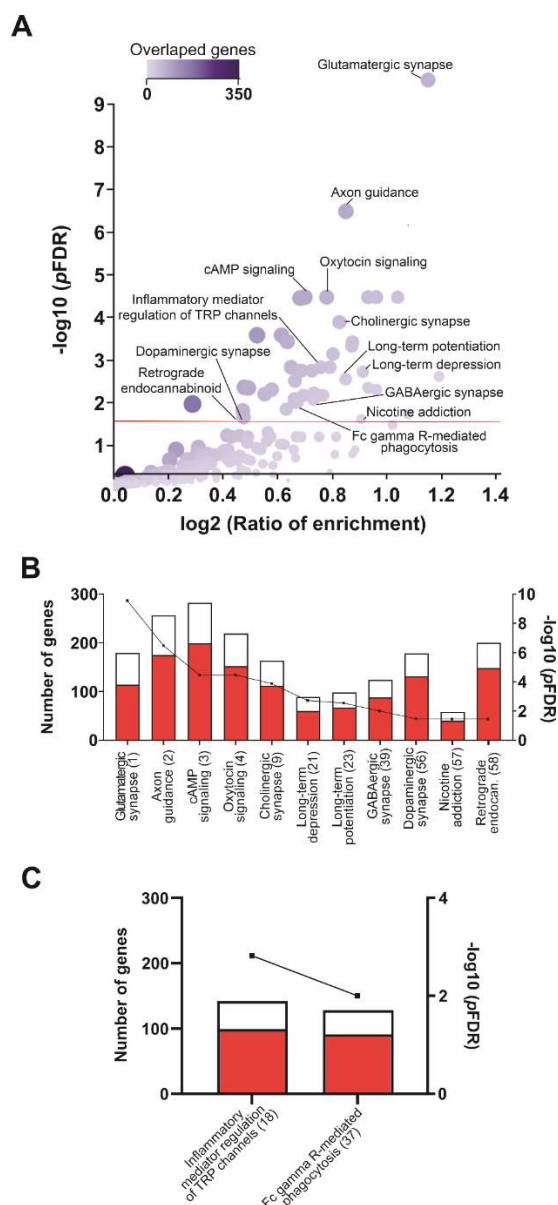


Figure 4. Genome-based pathway enrichment analysis for harmful use of alcohol in the population of Pelotas, Brazil. Over-representation analysis was conducted on 1,917 mapped genes, which were matched with the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) canonical pathways. **A)** Volcano plot showing the significantly enriched pathways. The red line indicates the assumed significance threshold [p -value from False Discovery Ratio ($pFDR$) < 0.05]. The size of the dots correspond to the pathway's gene set size. Ratio of enrichment is the number of observed genes divided by the number of expected genes from KEGG (according to the WebGestalt toolkit). **B)** Enriched pathways related to the nervous systems. **C)** Enriched pathways related to the immune system. White columns represent the gene set sizes of the pathways. Red columns symbolize the number of overlapped genes regarding our 1,917-gene list. Squares represent $pFDR$ values. Numbers between parentheses denote the positions of each pathway in the ranking of 65 significantly enriched pathways.

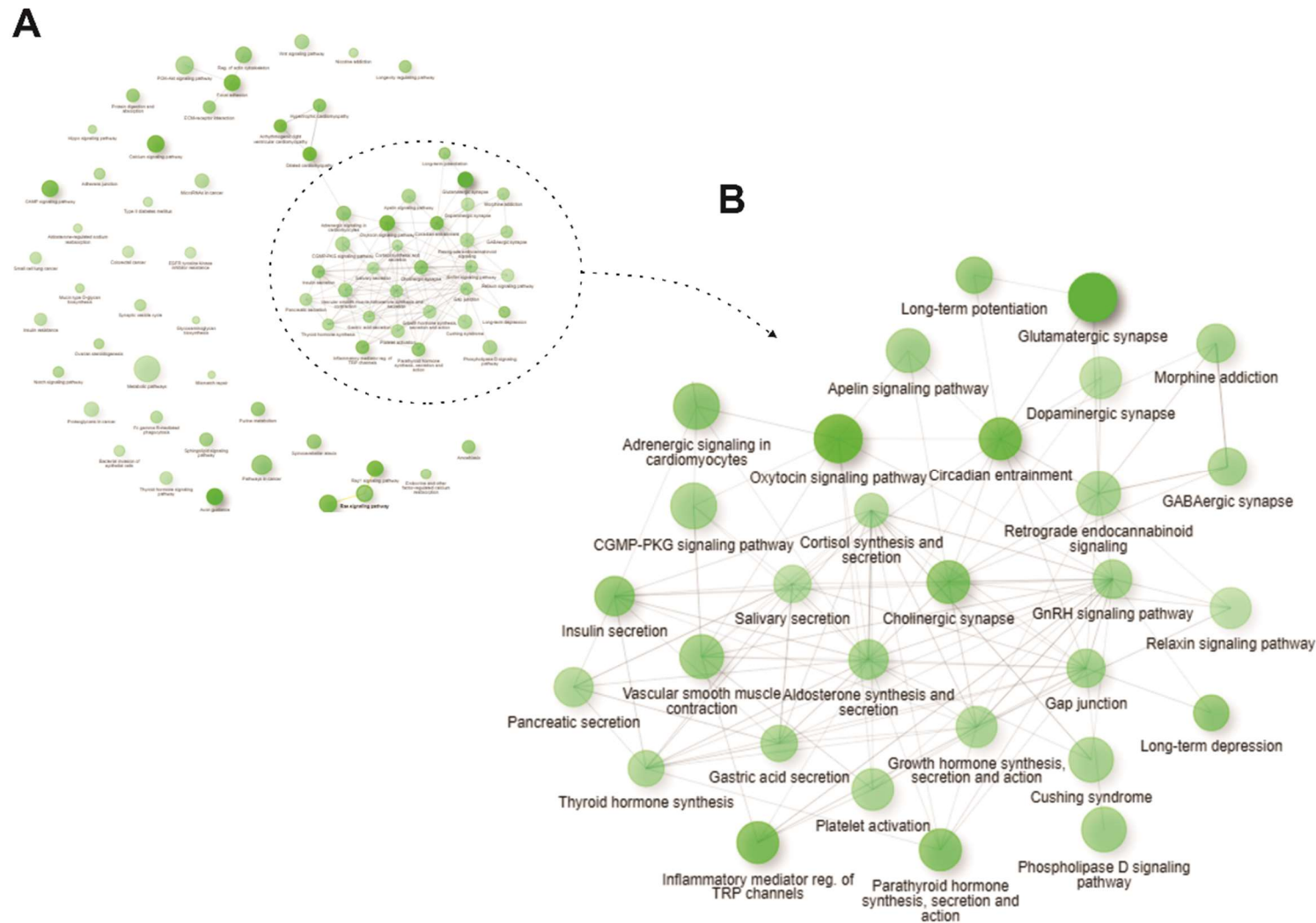


Figure 5. Network analysis of the pathways potentially implicated in harmful use of alcohol. A) Overview of the interactions among all enriched pathways. **B)** Detailed view of the main cluster found in the network analysis. Two pathways (nodes) are connected if they share 20% (default) or more genes. Darker nodes are more significantly enriched gene sets. Bigger nodes represent larger gene sets. Thicker edges represent more overlapped genes. Data obtained from the ShinyGO 0.77 toolkit.

4.4. DISCUSSION

Our study aimed to identify immunogenetic mechanisms and canonical pathways potentially implicated in harmful alcohol use disorder. This research yielded 103 variants significantly and suggestively associated with the harmful use of alcohol phenotype distributed along the 22 autosomal chromosomes being associated with different genes. Associated with this, 65 pathways were enriched and significantly associated with the phenotype in question. Particularly noteworthy are the GABAergic, glutamatergic, dopaminergic synapse pathways and pathways related to inflammatory events such as Inflammatory mediator regulation of TRP channels and Fc gamma R-mediated phagocytosis. Another important finding reflects the profile of harmful alcohol consumption in the Brazilian population.

A study carried out by Silva and colleagues⁵¹ shows that approximately 17.1% of the Brazilian population had consumed alcohol in 2013. The same authors report that in 2019, alcohol consumption in Brazil affected approximately 13.1% of the population. According to data from the II National Survey on Alcohol and Drugs⁵², in the year 2012, year of application of the AUDIT questionnaire in the Pelotas sample, 55% of the population investigated in the south region of Brazil regularly consumed alcoholic beverages, with around 17% (11.7 million) of individuals making problematic use of the drug. In our sample, rates of harmful use of alcohol (HUA) are slightly higher, with 23% of the individuals included in the risk group for the development of HUA.

Previously, studies were able to identify genetic variants associated with alcohol use disorders, especially in genes responsible for drug metabolism^{20,21,22}. In the present study, although no variants in *ADH* and *ALDH* genes were related to HUA, we found that one variant at *CYP4B1* (rs1097611, $p= 4,88 \times 10^{-8}$) and 102 other variants were significantly or suggestively associated with HUA phenotype, respectively.

The AUDIT is a tool widely used in the clinical setting and validated in different populations^{31,53,54}. Because it is a questionnaire that has no diagnostic value, difficulties were observed in the characterization of the phenotype studied. Added to this factor, the restricted sample size may have been a contributing factor to the statistical power of the study. However, the variants found may be playing a key role

in the neurobiochemistry of HUA. It is also important to highlight that usually GWAs studies related to drinking behavior are carried out in European and Asian populations, with few studies with mixed race and Latin American populations. This makes this study pioneer in this type of research.

The HUA-associated variants identified here are distributed along several human chromosomes. With special emphasis, as mentioned above, on the rs1097611 variant, located in an intronic region of the *CYP4B1* gene on chromosome 1, affecting gene expression in different human tissues⁴⁶. Comparatively, the minor allele frequency (MAF) of this variant in our cohort matches with that observed in the literature. In the 1000 genomes project³⁷, such a variant is more prevalent in populations of African ancestry, showing an MAF = 0.21. For Latino and admixed populations the MAF is about 0.07. For our population sample, this polymorphism presented a MAF = 0.098.

In our cohort, it was observed that 6, out of 13 variants, in strong linkage disequilibrium (LD, $r^2 \geq 0.8$) with rs1097611, are located in promoter and/or enhancer regions in multiple tissues. Variants present in such regions may control the transcriptional profile of genes⁵⁵, as observed in our results showing that the presence of the mentioned variants modulates *CYP4B1* gene expression in several tissues.

The *CYP4B1* gene is a component of the cytochrome P450 (CYP450) superfamily of enzymes, involved in the metabolism of a wide variety of endogenous and exogenous compounds, making them more soluble in water and facilitating their excretion⁴⁸. The enzymes of the CYP450 family are involved in diverse biological functions, such as: inflammatory process, fatty acid metabolism, metabolization of drugs and signaling molecules such as eicosanoids, leukotrienes and prostanoids^{48,56}.

Although there are no previous studies associating the rs1097611 variant or other variants in the *CYP4B1* gene with alcohol use disorders, there are two aspects to note. The first one is the fact that the variant in question has been observed to be associated with differential *CYP4B1* gene expression in intestinal tissue (small intestine and colon)⁴⁶. Seta and colleagues⁵⁷ and Nakano and colleagues⁵⁸ suggest an inflammatory action of this enzyme, due to its ability to stimulate the production of eicosanoids and ROS. High levels of ROS have a deleterious effect on various tissues.

In the intestine, the presence of ROS causes epithelial damage, leading to increased permeability to bacterial compounds⁵⁹. These compounds reach the portal circulation and induce the expression of TNF- α , which reaches the bloodstream and subsequently the brain via cytokine receptors, inducing inflammation in central nervous tissue¹¹. This state induces neuronal death and can lead to less perception of the sensation of reward when consuming alcohol. It was also observed that the rs1097611 modulates *CYP4B1* gene expression in central nervous tissue, and thus may have a direct action on this tissue. The second factor is the previously reported association of another component of the cytochrome P450 family with problematic alcohol use. In the study of Webb and collaborators⁶⁰ it was shown that multiple variants in the *CYP2E1* gene, known to be associated with alcohol metabolism, may be an important predictor for alcoholism, as well as for other pathologies associated with alcohol use due to increased production of reactive oxygen species.

Other variants suggestively associated with HUA in our cohort are located in genes previously associated with problematic use of alcohol, other substances, and psychiatric disorders. Among these genes are *ARID5B* (associated with alcohol⁶¹ and tobacco consumption^{62,63}), *SLIT3*⁶⁴ and, especially, *SGMS1* (associated with smoking initiation⁶¹ and schizophrenia⁶⁵).

A total of 30 variants suggestively associated with HUA in our study are located in the chromosome 10 (next to the *SGMS1* gene). This gene is expressed at high titers in nervous tissue, and several of these variants found here, with special emphasis on the variant rs4312019 ($p = 7.6 \times 10^{-7}$), are able to modulate *SGMS1* expression in different regions of the brain, including the hypothalamus⁴⁶ (data not shown). The product of *SGMS1* is responsible for the expression of the sphingomyelin synthases, a group of molecules present in the cell membrane that acts in cell proliferation and death⁶⁶. In animal models of epilepsy, Kunduri and colaboradores⁶⁷ evidenced that the absence of sphingomyelins in neural cells disables the envelopment of the neuronal cell body. Mühle, Bilbao and Kornhuber⁶⁸ reported the participation of sphingomyelin in signal transduction in the hippocampus, increasing drug access to the brain, may make the individual more resistant to multiple drugs⁶⁹.

Although no previous publications found rs559172334 or the other variants at *VAV1* gene as associated with HUA, such gene, as previously mentioned, plays a fundamental role in the development of cells of the immune system, especially in lymphocytes⁶³. These cells, in turn, suffer the direct impact of alcohol consumption on their functionality⁷⁰. Andrade and colleagues⁷¹ show the participation of ethanol in the maintenance of the inflammatory state in murines. In their study, it was shown that exposure to ethanol positively regulates the function of antigen presentation by B lymphocytes associated with greater activation of T CD4⁺ lymphocytes. Such findings corroborate our hypotheses on the causal relationship between inflammatory events and alcohol use disorders.

Consistent with the literature, our findings on pathway enrichment suggest a possible role for GABAergic neurotransmission on HUA. Ethanol consumption can activate GABAergic neurons^{72,73}. Data suggesting participation of the glutamatergic pathway were also found. Ho and collaborators⁷⁴, suggest the participation of the N-methyl-D-Aspartate glutamate receptor (NMDAR) in ethanol consumption. This compound is a molecule of great importance in synaptic plasticity, cognition and learning^{75,76}.

Ethanol consumption apparently reduces the NMDAR response in different brain regions^{75,77}. Exposure to ethanol followed by its withdrawal leads to greater NMDAR responsiveness resulting in cell death⁷⁵. Such an event induces the release of HMGB1, a pro-inflammatory molecule, which potentiates the cycle of cell injury, inducing neuronal death and, therefore, a lesser sense of reward as a result of ethanol consumption⁷⁸. Despite the strong association found in immunological pathways, no studies were found in the literature that suggest the same association. However, a possible relationship between the analgesic effect of alcohol and the sensory inhibition perceived through TRP channels is possible. These channels are widely known for their function of pain perception through the peripheral nervous system⁷⁹.

Despite the variety of results observed in our study, there are some that need to be addressed in further studies. Like the ancestral composition of our population, which despite being more heterogeneous than those used in large collaborative

studies, still distances itself from what is observed for the Brazilian population, which is on average 68.1% European⁸⁰.

4.5. CONCLUSIONS

The *CYP4B1* locus is significantly associated with harmful use of alcohol (HUA) in an admixed Latin-American population. Furthermore, pathway enrichment analysis revealed several mechanisms related to the nervous and immune systems that are potentially implicated in HUA. Thus, future studies with individuals from diverse ethnic groups are fundamental to identify new variants associated with HUA, a step that is essential for appropriate management of this condition.

4.6. ACKNOWLEDGMENTS

We thank our collaborators at the Federal University of Pelotas and the Federal University of Minas Gerais for their contributions and comments. Edson Amaral received a fellowship from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES, Ministério da Educação, Brazil).

4.7. REFERENCES

- 1- Alves RM, Santos EGO, Barbosa IR. Abuse of alcohol among farmers: Prevalence and associated factors. *PLoS One*. 2021 Aug 5;16(8):e0254904. doi: 10.1371/journal.pone.0254904.
- 2- DAWSON, Deborah A. et al. Transitions In and Out of Alcohol Use Disorders: Their Associations with Conditional Changes in Quality of Life Over a 3-Year Follow-Up Interval. *Alcohol and Alcoholism (Oxford, Oxfordshire)*, v. 44, n. 1, p. 84, 2009. Disponível em: </pmc/articles/PMC2605522/>. Acesso em: 12 set. 2022.
- 3- GRANT, Bridget F. et al. Epidemiology of DSM-5 Alcohol Use Disorder: Results From the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions III. *JAMA Psychiatry*, v. 72, n.
- 4- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global status report on alcohol and health 2018. [S.l.]: WHO, 2018.
- 5- PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION+. Regional status report on alcohol and health in the Americas 2020. [S.l: s.n.], [S.d.].
- 6- ZILLICH, Lea et al. Epigenome-wide association study of alcohol use disorder in five brain regions. *Neuropsychopharmacology* 2021 47:4, v. 47, n. 4, p. 832–839, 13 nov. 2021. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41386-021-01228-7>. Acesso em: 13 set. 2022.
- 7- SAUNDERS, JOHN B. et al. Development of the Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT): WHO Collaborative Project on Early Detection of Persons with Harmful Alcohol Consumption-II. *Addiction*, v. 88, n. 6, p. 791–804, 1 jun. 1993. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1360-0443.1993.tb02093.x>. Acesso em: 22 out. 2022.
- 8- Lai, D., Schwantes-An, TH., Abreu, M. et al. Gene-based polygenic risk scores analysis of alcohol use disorder in African Americans. *Transl Psychiatry* 12, 266 (2022).
- 9- RUNDIO, Albert. Understanding alcoholism. *The Nursing clinics of North America*, v. 48, n. 3, p. 385–390, set. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23998765/>. Acesso em: 17 set. 2022.
- 10- SAMOCHOWIEC, Jerzy et al. Genetics of Alcohol Dependence: A Review of Clinical Studies. *Neuropsychobiology*, v. 70, n. 2, p. 77–94, 2014. Disponível em: <https://www.karger.com/Article/FullText/364826>.

- 11- CREWS, Fulton T.; VETRENO, Ryan P. Mechanisms of neuroimmune gene induction in alcoholism. *Psychopharmacology* 2015 233:9, v. 233, n. 9, p. 1543–1557, 20 mar. 2015. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00213-015-3906-1>>. Acesso em: 11 out. 2022.
- 12- EŞEL, Ertuğrul; DINÇ, Köksal. [Neurobiology of Alcohol Dependence and Implications on Treatment]. *Türk psikiyatri dergisi = Turkish journal of psychiatry*, v. 28, n. 1, p. 51–60, 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28291298>
- 13- Barr T, Helms C, Grant K, Messaoudi I. Opposing effects of alcohol on the immune system. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2016 Feb 4;65:242-51.
- 14- Mulligan, M. K.; Ponomarev, I.; Hitzemann, R. J.; Belknap, J. K.; Tabakoff, B.; Harris, R. A.; Crabbe, J. C.; Blednov, Y. A.; Grahame, N. J.; Phillips, T. J.; Finn, D. A.; Hoffman, P. L.; Iyer, V. R.; Koob, G. F.; Bergeson, S. E. (2006). Toward understanding the genetics of alcohol drinking through transcriptome meta-analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(16), 6368–6373.
- 15- Bishehsari F, Magno E, Swanson G, Desai V, Voigt RM, Forsyth CB, Keshavarzian A. Alcohol and Gut-Derived Inflammation. *Alcohol Res*. 2017;38(2):163-171.
- 16- Wang HJ, Zakhari S, Jung MK. Alcohol, inflammation, and gut-liver-brain interactions in tissue damage and disease development. *World J Gastroenterol*. 2010 Mar 21;16(11):1304-13. doi: 10.3748/wjg.v16.i11.1304
- 17- Suryanarayanan, A.; Carter, J.M.; Landin, J.D.; Morrow, A.L.; Werner, D.F.; Spigelman, I. (2016). Role of interleukin-10 (IL-10) in regulation of GABAergic transmission and acute response to ethanol. *Neuropharmacology*, 107(), 181–188.
- 18- EDENBERG, Howard J.; FOROUD, Tatiana. Genetics and alcoholism. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, v. 10, n. 8, p. 487, ago. 2013. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC4056340/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28118990/)>. Acesso em: 14 out. 2022.
- 19- REILLY, Matthew T. et al. Genetic studies of alcohol dependence in the context of the addiction cycle. *Neuropharmacology*, v. 122, p. 3–21, 1 ago. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28118990/>>. Acesso em: 14 out. 2022.
- 20- FRANK, Josef et al. Genome-wide significant association between alcohol dependence and a variant in the ADH gene cluster. *Addiction Biology*, v. 17, n. 1, p. 171–180, jan. 2012. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1369-1600.2011.00395.x>>.
- 21- ZUO, Lingjun et al. Genome-Wide Association Study of Alcohol Dependence Implicates KIAA0040 on Chromosome 1q. *Neuropsychopharmacology*, v. 37, n. 2, p. 557, 2012. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC3242317/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28118990/)>. Acesso em: 17 out. 2022.

- 22- SANCHEZ-ROIGE, Sandra et al. Genome-wide association study of Alcohol Use Disorder Identification Test (AUDIT) scores in 20,328 research participants of European ancestry. *Addiction biology*, v. 24, n. 1, p. 121, 1 jan. 2019. Disponível em: [</pmc/articles/PMC6988186/>](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31111111/). Acesso em: 16 out. 2022.
- 23- Zhou H, Kalayasiri R, Sun Y, Nuñez YZ, Deng HW, Chen XD, Justice AC, Kranzler HR, Chang S, Lu L, Shi J, Sanichwankul K, Mutirangura A, Malison RT, Gelernter J. Genome-wide meta-analysis of alcohol use disorder in East Asians. *Neuropsychopharmacology*. 2022 Sep;47(10):1791-1797.
- 24- Deak JD, Levey DF, Wendt FR, et al. Genome-Wide Investigation of Maximum Habitual Alcohol Intake in US Veterans in Relation to Alcohol Consumption Traits and Alcohol Use Disorder. *JAMA Network Open*. 2022 Oct;5(10):e2238880.
- 25- HEATH, Andrew C. et al. A quantitative-trait genome-wide association study of alcoholism risk in the community: findings and implications. *Biological psychiatry*, v. 70, n. 6, p. 513, 9 set. 2011. Disponível em: [</pmc/articles/PMC3210694/>](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21111111/). Acesso em: 16 out. 2022.
- 26- Song S, Marcum CS, Wilkinson AV, Shete S, Koehly LM. Genetic, Psychological, and Personal Network Factors Associated With Changes in Binge Drinking Over 2 Years Among Mexican Heritage Adolescents in the USA. *Ann Behav Med*. 2019 Feb 1;53(2):126-137.
- 27- LUO, Audrey et al. Epigenetic aging is accelerated in alcohol use disorder and regulated by genetic variation in APOL2. *Neuropsychopharmacology*, v. 45, n. 2, p. 327, 1 jan. 2020. Disponível em: [</pmc/articles/PMC6901591/>](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32111111/). Acesso em: 16 out. 2022
- 28- Peng Q, Wilhelmsen KC, Ehlers CL. Common genetic substrates of alcohol and substance use disorder severity revealed by pleiotropy detection against GWAS catalog in two populations. *Addict Biol*. 2021 Jan;26(1):e12877.
- 29- HO, Ming Fen et al. Genome-wide association study for circulating FGF21 in patients with alcohol use disorder: Molecular links between the SNHG16 locus and catecholamine metabolism. *Molecular Metabolism*, v. 63, p. 101534, 1 set. 2022. Disponível em: [</pmc/articles/PMC9270258/>](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36111111/). Acesso em: 16 out. 2022.
- 30- VICTORA, Cesar G; BARROS, Fernando C. Cohort Profile: The 1982 Pelotas (Brazil) Birth Cohort Study. *International Journal of Epidemiology*, v. 35, n. 2, p. 237–242, 1 abr. 2006. Disponível em: <http://academic.oup.com/ije/article/35/2/237/694731/Cohort-Profile-The-1982-Pelotas-Brazil-Birth>.
- 31- ATKINS, Dana L. et al. Validity and item response theory properties of the Alcohol Use Disorders Identification Test for primary care alcohol use screening in Mozambique (AUDIT-MZ). *Journal of Substance Abuse Treatment*, v. 127, 1 ago. 2021. Disponível em: <http://www.journalofsubstanceabusetreatment.com/article/S0740547221001677/fulltext>. Acesso em: 22 out. 2022.

- 32- KUTEESA, Monica O. et al. Comparing Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT) with Timeline Follow Back (TLFB), DSM-5 and Phosphatidylethanol (PEth) for the assessment of alcohol misuse among young people in Ugandan fishing communities. *Addictive Behaviors Reports*, v. 10, p. 100233, dez. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352853219301294>>
- 33- BABOR, Thomas F et al. *The Alcohol Use Disorders Identification Test Guidelines for Use in Primary Care*. [S.l.: s.n.], 2001.
- 34- Thornton T, Tang H, Hoffmann TJ, Ochs-Balcom HM, Caan BJ, Risch N. Estimating kinship in admixed populations. *Am J Hum Genet*. 2012 Jul 13;91(1):122-38.
- 35- Chang CC, Chow CC, Tellier LC, Vattikuti S, Purcell SM, Lee JJ. Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets. *Gigascience*. 2015 Feb 25;4:7.
- 36- Magalhães WCS, Araujo NM, Leal TP, Araujo GS, Viriato PJS, Kehdy FS, Costa GN, Barreto ML, Horta BL, Lima-Costa MF, Pereira AC, Tarazona-Santos E, Rodrigues MR; Brazilian EPIGEN Consortium. EPIGEN-Brazil Initiative resources: a Latin American imputation panel and the Scientific Workflow. *Genome Res*. 2018 Jul;28(7):1090-1095.
- 37- Delaneau O., Marchini J., Zagury J.-F. A linear complexity phasing method for thousands of genomes. *Nat. Methods*. 2012;9:179–181.
- 38- Howie BN, Donnelly P, Marchini J. A flexible and accurate genotype imputation method for the next generation of genome-wide association studies. *PLoS Genet*. 2009 Jun;5(6):e1000529.
- 39- Alexander DH, Novembre J, Lange K. Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. *Genome Res*. 2009 Sep;19(9):1655-64.
- 40- 1000 Genomes Project Consortium, Auton A, Brooks LD, et al. A global reference for human genetic variation. *Nature*. 2015;526(7571):68-74.
- 41- KEHDY, Fernanda S. G. et al. Origin and dynamics of admixture in Brazilians and its effect on the pattern of deleterious mutations. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, [S.L.], v. 112, n. 28, p. 8696-8701, 29 jun. 2015. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- 42- BARRETT, J. C. et al. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*, Oxford, v. 21, n. 2, p. 263-265, 15 Jan. 2005.
- 43- Wu G, Haw R. Functional Interaction Network Construction and Analysis for Disease Discovery. *Methods Mol Biol*. 2017;1558:235-253.
- 44- Danecek P, Auton A, Abecasis G, Albers CA, Banks E, DePristo MA, Handsaker RE, Lunter G, Marth GT, Sherry ST, McVean G, Durbin R; 1000 Genomes Project Analysis Group. The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics*. 2011 Aug 1;27(15):2156-8.
- 45- Cooper GM, Stone EA, Asimenos G; NISC Comparative Sequencing Program; Green ED, Batzoglou S, Sidow A. Distribution and intensity of constraint in mammalian genomic sequence. *Genome Res*. 2005 Jul;15(7):901-13.
- 46- The Genotype-Tissue Expression (GTEx) Project was supported by the Common Fund of the Office of the Director of the National Institutes of Health, and by NCI, NHGRI, NHLBI, NIDA, NIMH, and NINDS. The data used for the analyses described in this manuscript were obtained from: <<https://www.gtexportal.org/home/>> the GTEx Portal on 06/05/23.
- 47- Uku Raudvere and others, g:Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update), *Nucleic Acids Research*, Volume 47, Issue W1, 02 July 2019, Pages W191–W198.

- 48- YU, Shuyong et al. Case-control study on CYP4B1 gene polymorphism and susceptibility to gastric cancer in the chinese Han population. *BMC Medical Genomics*, v. 15, n. 1, 1 dez. 2022.
- 49- Fujikawa K, Miletic AV, Alt FW, Faccio R, Brown T, Hoog J, Fredericks J, Nishi S, Mildiner S, Moores SL, Brugge J, Rosen FS, Swat W. Vav1/2/3-null mice define an essential role for Vav family proteins in lymphocyte development and activation but a differential requirement in MAPK signaling in T and B cells. *J Exp Med*. 2003 Nov 17;198(10):1595-608. doi: 10.1084/jem.20030874. PMID: 14623913; PMCID: PMC2194126.
- 50- Roteiro Epigenomics Consortium., Kundaje, A., Meuleman, W. et al. Análise integrativa de 111 epigenomas humanos de referência. *Natureza* 518 , 317–330 (2015).
- 51- SÁ DA SILVA, Luiza Eunice et al. Prevalence of heavy episodic drinking in the Brazilian adult population: National Health Survey 2013 and 2019. *Epidemiologia e Serviços de Saude*, v. 31, n. Special Issue 1, 2022.
- 52- Laranjeira R, Madruga CS, Pinsky I, Caetano R, Ribeiro M, Mitsuhiro S. II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas – Consumo de Álcool no Brasil: Tendências entre 2006/2012. São Paulo: INPAD; 2013. Disponível em: http://inpad.org.br/wp-content/uploads/2013/04/LLENAD_ALCOOL_Resultados-Preliminares.pdf. Acesso em 18 de agosto de 2023.
- 53- HABTAMU, Endashaw; MADORO, Derebe. Psychometric properties of Alcohol Use Disorder Identification Tests screening tool among medical outpatients in Dilla University Referral Hospital, southern Ethiopia, 2020. *SAGE Open Medicine*, v. 10, p. 205031212210775, jan. 2022. Disponível em: <https://pmc/articles/PMC8855433/>. Acesso em: 22 out. 2022.
- 54- SO, Kyungseop; SUNG, Eunju. A Validation Study of the Brief Alcohol Use Disorder Identification Test (AUDIT): A Brief Screening Tool Derived from the AUDIT. *Korean journal of family medicine*, v. 34, n. 1, p. 11–18, jan. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23372901/>. Acesso em: 22 out. 2022.
- 55- LAFLEUR, Travis L. et al. Automated model-predictive design of synthetic promoters to control transcriptional profiles in bacteria. *Nature Communications*, [S.L.], v. 13, n. 1, 2 set. 2022. Springer Science and Business Media LLC.
- 56- JARRAR, Yazun Bashir; LEE, Su Jun. Molecular Functionality of Cytochrome P450 4 (CYP4) Genetic Polymorphisms and Their Clinical Implications. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 17, 1 set. 2019. Disponível em: <https://pmc/articles/PMC6747359/>. Acesso em: 18 nov. 2022.
- 57- SETA, Francesca et al. Inhibition of VEGF Expression and Corneal Neovascularization by siRNA Targeting Cytochrome P450 4B1. . [S.l.: s.n.], [S.d.].
- 58- NAKANO, Mariko et al. Ocular cytochrome P450s and transporters: Roles in disease and endobiotic and xenobiotic disposition. *Drug Metabolism Reviews*. [S.l.]: Informa Healthcare. , 2014.
- 59- CEDERBAUM, Arthur I.; LU, Yongke; WU, Defeng. Role of oxidative stress in alcohol-induced liver injury. *Archives of toxicology*, v. 83, n. 6, p. 519–548, jun. 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19448996/>. Acesso em: 18 out. 2022.
- 60- WEBB, Amy et al. The Investigation into CYP2E1 in Relation to the Level of Response to Alcohol Through a Combination of Linkage and Association Analysis. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, [S.L.], v. 35, n. 1, p. 10-18, 19 out. 2010. Wiley.
- 61- SAUNDERS, Gretchen R. B. et al. Genetic diversity fuels gene discovery for tobacco and alcohol use. *Nature*, [S.L.], v. 612, n. 7941, p. 720-724, 7 dez. 2022. Springer Science and Business Media LLC.

- 62- BRAZEL, David M. et al. Exome Chip Meta-analysis Fine Maps Causal Variants and Elucidates the Genetic Architecture of Rare Coding Variants in Smoking and Alcohol Use. *Biological Psychiatry*, [S.L.], v. 85, n. 11, p. 946-955, jun. 2019. Elsevier BV
- 63- Pasman JA, Demange PA, Guloksuz S, Willemsen AHM, Abdellaoui A, Ten Have M, Hottenga JJ, Boomsma DI, de Geus E, Bartels M, de Graaf R, Verweij KJH, Smit DJ, Nivard M, Vink JM. Genetic Risk for Smoking: Disentangling Interplay Between Genes and Socioeconomic Status. *Behav Genet*. 2022 Mar;52(2):92-107.
- 64- CHEN, Gang et al. An association study revealed substantial effects of dominance, epistasis and substance dependence co-morbidity on alcohol dependence symptom count. *Addiction Biology*, [S.L.], v. 22, n. 6, p. 1475-1485, 5 maio 2016. Wiley.
- 65- BLOKLAND, Gabriëlla A.M. et al. Sex-Dependent Shared and Nonshared Genetic Architecture Across Mood and Psychotic Disorders. *Biological Psychiatry*, [S.L.], v. 91, n. 1, p. 102-117, jan. 2022. Elsevier BV.
- 66- BILAL, Fatima et al. Sphingomyelin synthase 1 (SMS1) downregulation is associated with sphingolipid reprogramming and a worse prognosis in melanoma. *Frontiers in Pharmacology*, v. 10, n. APR, 2019. Disponível em: </pmc/articles/PMC6503817/>. Acesso em: 26 nov. 2022.
- 67- KUNDURI, Govind et al. Defective cortex glia plasma membrane structure underlies light-induced epilepsy in cpep mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 115, n. 38, p. E8919–E8928, 18 set. 2018.
- 68- MÜHLE, Christiane; BILBAO CANALEJAS, Roberto Damián; KORNHUBER, Johannes. Sphingomyelin Synthases in Neuropsychiatric Health and Disease. *Neuro-Signals*. [S.I.]: NLM (Medline). , 2019.
- 69- ZHANG, Yu et al. The effect of sphingomyelin synthase 2 (SMS2) deficiency on the expression of drug transporters in mouse brain. *Biochemical Pharmacology*, v. 82, n. 3, p. 287–294, 1 ago. 2011.
- 70- Ruiz-Cortes K, Villageliu DN, Samuelson DR. Innate lymphocytes: Role in alcohol-induced immune dysfunction. *Front Immunol*. 2022 Aug 29;13:934617.
- 71- Andrade MC, Albernaz MJ, Araújo MS, Santos BP, Teixeira-Carvalho A, Faria AM, Martins-Filho OA. Short-term administration of ethanol in mice deviates antigen presentation activity towards B cells. *Scand J Immunol*. 2009 Sep;70(3):226-37.
- 72- OSTROUMOV, Alexey et al. Stress Increases Ethanol Self-administration via a Shift towards Excitatory GABA Signaling in the Ventral Tegmental Area. *Neuron*, v. 92, n. 2, p. 493, 10 out. 2016. Disponível em: </pmc/articles/PMC5091663/>. Acesso em: 10 out. 2022
- 73- VOLKOW, Nora D.; MICHAELIDES, Michael; BALER, Ruben. The Neuroscience of Drug Reward and Addiction. *Physiological Reviews*, v. 99, n. 4, p. 2115, 10 out. 2019. Disponível em: </pmc/articles/PMC6890985/>. Acesso em: 5 out. 2022.
- 74- HO, Ming Fen et al. Genome-wide association study for circulating FGF21 in patients with alcohol use disorder: Molecular links between the SNHG16 locus and catecholamine metabolism. *Molecular Metabolism*, v. 63, p. 101534, 1 set. 2022. Disponível em: </pmc/articles/PMC9270258/>. Acesso em: 16 out. 2022.
- 75- RON, Dorit; WANG, Jun. The NMDA Receptor and Alcohol Addiction. *Biology of the NMDA Receptor*, p. 59–77, 1 jan. 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5284/>. Acesso em: 11 out. 2022.
- 76- Chang CH, Lane HY, Tseng PT, Chen SJ, Liu CY, Lin CH. Effect of N-methyl-D-aspartate-receptor-enhancing agents on cognition in patients with schizophrenia: A systematic review and meta-analysis of double-blind randomised controlled trials. *J Psychopharmacol*. 2019 Apr;33(4):436-448.

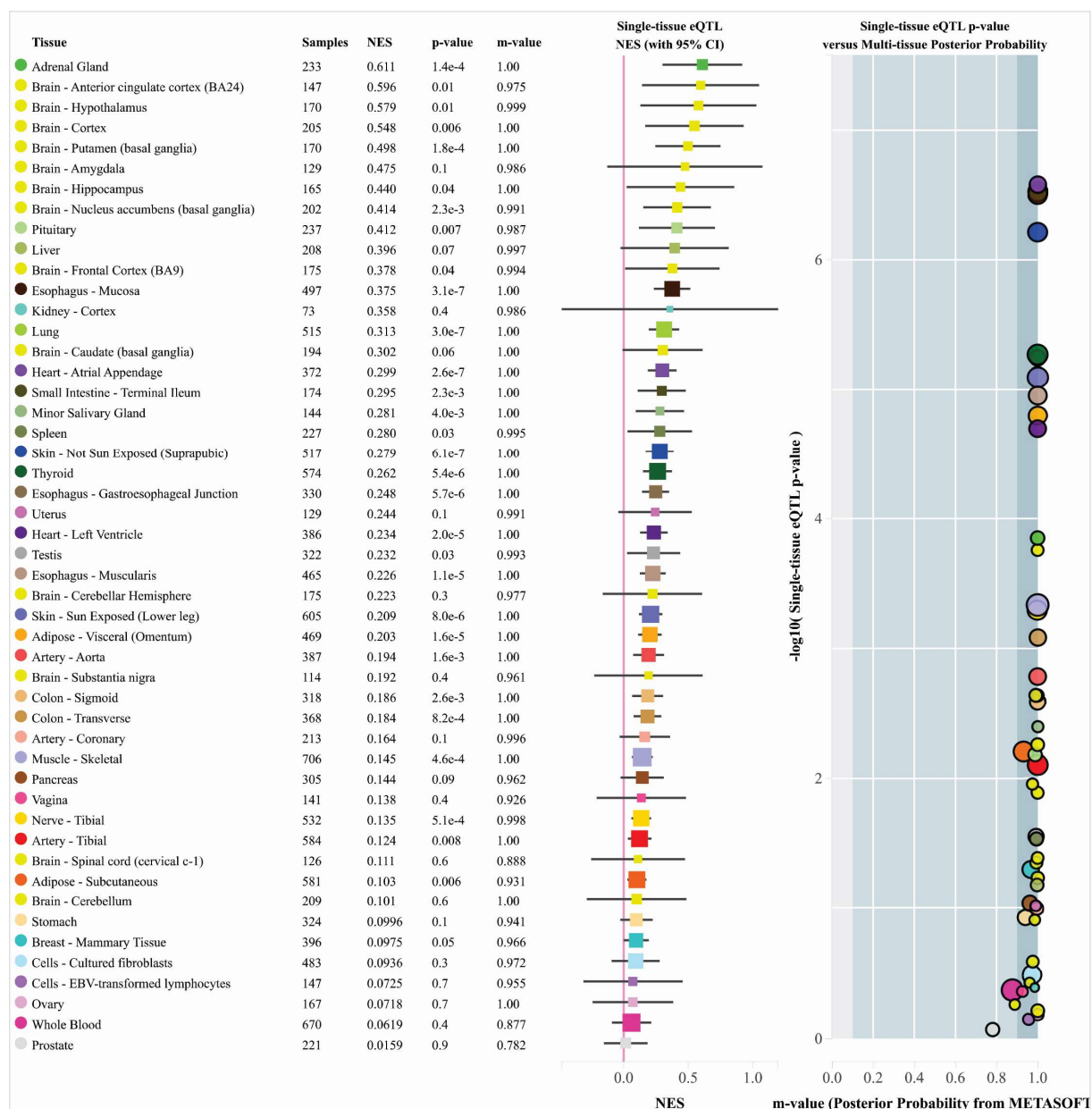
77- HENDRICSON, Adam W.; SIBBALD, John R.; MORRISETT, Richard A. Ethanol alters the frequency, amplitude, and decay kinetics of Sr²⁺-supported, asynchronous NMDAR mEPSCs in rat hippocampal slices. *Journal of neurophysiology*, v. 91, n. 6, p. 2568–2577, jun. 2004. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14749312/>>. Acesso em: 11 out. 2022.

78- CREWS, Fulton T.; VETRENO, Ryan P. Mechanisms of neuroimmune gene induction in alcoholism. *Psychopharmacology* 2015 233:9, v. 233, n. 9, p. 1543–1557, 20 mar. 2015. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00213-015-3906-1>>. Acesso em: 11 out. 2022

79- Moran, Magdalene M. (2018). TRP Channels as Potential Drug Targets. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 58(1), annurev-pharmtox-010617-052832–.

80- SOUZA, Aracele Maria de; RESENDE, Sarah Stela; SOUSA, Taís Nóbrega de; BRITO, Cristiana Ferreira Alves de. A systematic scoping review of the genetic ancestry of the Brazilian population. *Genetics And Molecular Biology*, [S.L.], v. 42, n. 3, p. 495-508, set. 2019.

4.8. Supplementary Materials



Supplementary figure 1. eQTL (quantitative trait locus) signals considering the three genotypes of the SNP rs1097611 and the normalized expressions (NES) of the CYP4B1 gene in different human tissues. m-value: posterior probability that an eQTL exists in each tissue, considering the multi-tissue meta-analysis results. The m-value scale ranges from 0 to 1. The data presented were obtained from the GTEx V8 portal (www.gtexportal.org).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar dos vastos achados observados em nosso estudo, alguns aspectos observados carecem de investigações se utilizando de novas abordagens. Por tratar-se de uma amostra populacional sulista, dados de ancestralidade individual refletem uma característica menos heterogênea que para a população brasileira em geral. Tendo isso em vista abre-se a possibilidade de se realizar novos estudos se utilizando populações mais representativas do perfil de miscigenação brasileiro. Ademais espera-se também realizar novos estudos visando replicação dos achados em populações distintas bem como avaliar associação entre o painel de variantes encontrado e fenótipos distintos.

6. REFERÊNCIAS DO REFERENCIAL TEÓRICO

- ALVES, Roberta Machado; DE OLIVEIRA SANTOS, Emelyne Gabrielly; BARBOSA, Isabelle Ribeiro. Abuse of alcohol among farmers: Prevalence and associated factors. *PLoS ONE*, v. 16, n. 8 August, 1 ago. 2021.
- American Psychiatric Association. (2013). Substance-Related Disorders and Addictive Disorders. In *Diagnostic and statistical manual of mental disorders* (5th ed.).
- ANI, Peace Nwanneka; NGWU, Elizabeth Kanayo; ANI, Bernard Uchenna. Alcohol use disorders and associated factors among adults in rural communities in Enugu State, Nigeria: A cross-sectional survey. *Journal of Ethnicity in Substance Abuse*, v. 21, n. 3, p. 1043–1062, 1 ago. 2022. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15332640.2020.1824841>>.
- ANTUNES, Sandra Azevedo; CANZIANI, Maria Eugênia Fernandes. Hepcidin: an important iron metabolism regulator in chronic kidney disease. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, v. 38, n. 3, 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-28002016000300351>.
- ARRANZ, Sara et al. Wine, Beer, Alcohol and Polyphenols on Cardiovascular Disease and Cancer. *Nutrients*, v. 4, n. 7, p. 759, 2012. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC3407993/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21270382/)>. Acesso em: 19 out. 2022.
- ATKINS, Dana L. et al. Validity and item response theory properties of the Alcohol Use Disorders Identification Test for primary care alcohol use screening in Mozambique (AUDIT-MZ). *Journal of Substance Abuse Treatment*, v. 127, 1 ago. 2021. Disponível em: <<http://www.journalofsubstanceabusetreatment.com/article/S0740547221001677/fulltext>>. Acesso em: 22 out. 2022.
- BABOR, Thomas F et al. *The Alcohol Use Disorders Identification Test Guidelines for Use in Primary Care*. [S.l.: s.n.], 2001.
- BAIK, Inkyung et al. Genome-wide association studies identify genetic loci related to alcohol consumption in Korean men. *The American journal of clinical nutrition*, v. 93, n. 4, p. 809–816, 1 abr. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21270382/>>. Acesso em: 16 out. 2022.
- Barr T, Helms C, Grant K, Messaoudi I. Opposing effects of alcohol on the immune system. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2016 Feb 4;65:242-51.
- BARROS, Mariana Salles Motta Rodrigues De; COSTA, Luciana Scarlazzari. Perfil do consumo de álcool entre estudantes universitários. *SMAD Revista Eletrônica Saúde Mental Álcool e Drogas (Edição em Português)*, v. 15, n. 1, p. 4–13, 27 ago. 2019.
- BIERUT, Laura J. et al. A genome-wide association study of alcohol dependence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 107, n. 11, p. 5082, 3 mar. 2010. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC2841942/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21270382/)>. Acesso em: 16 out. 2022.
- BISHEHSARI, Faraz et al. Alcohol and Gut-Derived Inflammation. *Alcohol Research : Current Reviews*, v. 38, n. 2, p. 163, 2017. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC5513683/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21270382/)>. Acesso em: 21 out. 2022.
- Blaine SK, Sinha R. Alcohol, stress, and glucocorticoids: From risk to dependence and relapse in alcohol use disorders. *Neuropharmacology*. 2017 Aug 1;122:136-147. doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.01.037. Epub 2017 Feb 1
- Blednov YA, Bergeson SE, Walker D, Ferreira VM, Kuziel WA, Harris RA. Perturbation of chemokine networks by gene deletion alters the reinforcing actions of ethanol. *Behav Brain Res*. 2005 Nov 30;165(1):110-25

- Bustamante CD, Burchard EG, De la Vega FM. Genomics for the world. *Nature*. 2011 Jul 13;475(7355):163-5.
- CAMPOLLO R., Octavio. Alcohol and the Liver: The Return of the Prodigal Son. *Annals of Hepatology*, v. 18, n. 1, p. 6–10, 1 jan. 2019.
- CARR, Anitra C.; MAGGINI, Silvia. Vitamin C and Immune Function. *Nutrients*, v. 9, n. 11, 1 nov. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29099763/>>. Acesso em: 22 out. 2022.
- CEBRID. II-Levantamento-Domiciliar-sobre-o-Uso-de-Drogas-Psicotrópicas-no-Brasil. [S.d.].
- CEDERBAUM, Arthur I.; LU, Yongke; WU, Defeng. Role of oxidative stress in alcohol-induced liver injury. *Archives of toxicology*, v. 83, n. 6, p. 519–548, jun. 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19448996/>>. Acesso em: 18 out. 2022.
- CENI, Elisabetta; MELLO, Tommaso; GALLI, Andrea. Pathogenesis of alcoholic liver disease: Role of oxidative metabolism. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, v. 20, n. 47, p. 17756, 12 dez. 2014. Disponível em: <</pmc/articles/PMC4273126/>>. Acesso em: 19 out. 2022
- CENTRO DE INFORMAÇÕES SOBRE SAÚDE E ÁLCOOL (Brasil). **Álcool e a saúde dos brasileiros: Panorama 2019**. Brasil: CISA, 2019. 104 p. ISBN 978-65-80243-00-6
- Chang CH, Lane HY, Tseng PT, Chen SJ, Liu CY, Lin CH. Effect of N-methyl-D-aspartate-receptor-enhancing agents on cognition in patients with schizophrenia: A systematic review and meta-analysis of double-blind randomised controlled trials. *J Psychopharmacol*. 2019 Apr;33(4):436-448.
- CHEN, Dingyan et al. Association between the TPH1 A218C polymorphism and risk of mood disorders and alcohol dependence: evidence from the current studies. *Journal of affective disorders*, v. 138, n. 1–2, p. 27–33, abr. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21601290/>>. Acesso em: 17 out. 2022.
- CHOPRA, Kanwaljit; TIWARI, Vinod. Alcoholic neuropathy: possible mechanisms and future treatment possibilities. *British Journal of Clinical Pharmacology*, v. 73, n. 3, p. 348, mar. 2012. Disponível em: <</pmc/articles/PMC3370340/>>. Acesso em: 19 out. 2022.
- Crews FT. Immune function genes, genetics, and the neurobiology of addiction. *Alcohol Res*. 2012;34(3):355-61.
- CREWS, Fulton T.; VETRENO, Ryan P. Mechanisms of neuroimmune gene induction in alcoholism. *Psychopharmacology* 2015 233:9, v. 233, n. 9, p. 1543–1557, 20 mar. 2015. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00213-015-3906-1>>. Acesso em: 11 out. 2022.
- DAWSON, Deborah A. et al. Transitions In and Out of Alcohol Use Disorders: Their Associations with Conditional Changes in Quality of Life Over a 3-Year Follow-Up Interval. *Alcohol and Alcoholism (Oxford, Oxfordshire)*, v. 44, n. 1, p. 84, 2009. Disponível em: <</pmc/articles/PMC2605522/>>. Acesso em: 12 set. 2022.
- DAY, Ed; RUDD, James H.F. Alcohol use disorders and the heart. *Addiction (Abingdon, England)*, v. 114, n. 9, p. 1670, 2019. Disponível em: <</pmc/articles/PMC6771559/>>. Acesso em: 19 out. 2022.
- DICK, Danielle M.; BIERUT, Laura J. The genetics of alcohol dependence. *Current Psychiatry Reports*, v. 8, n. 2, p. 151–157, mar. 2006. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11920-006-0015-1>>.
- Edenberg HJ, Foroud T. Genetics and alcoholism. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013 Aug;10(8):487-94.
- Edenberg HJ. The genetics of alcohol metabolism: role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase variants. *Alcohol Res Health*. 2007;30(1):5-13

- EDENBERG, Howard J. The Genetics of Alcohol Metabolism: Role of Alcohol Dehydrogenase and Aldehyde Dehydrogenase Variants. *Alcohol Research & Health*, v. 30, n. 1, p. 5, 2007. Disponível em: </pmc/articles/PMC3860432/>. Acesso em: 14 out. 2022.
- EDENBERG, Howard J.; FOROUD, Tatiana. Genetics and alcoholism. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, v. 10, n. 8, p. 487, ago. 2013. Disponível em: </pmc/articles/PMC4056340/>. Acesso em: 14 out. 2022.
- Efeitos do álcool no corpo | Instituto Nacional de Abuso de Álcool e Alcoolismo (NIAAA). Disponível em: <https://www.niaaa.nih.gov/alcohols-effects-health/alcohols-effects-body>. Acesso em: 18 out. 2022 NIELSEN *et al.*, 2020).
- ENGEN, Phillip A. et al. The Gastrointestinal Microbiome: Alcohol Effects on the Composition of Intestinal Microbiota. *Alcohol Research: Current Reviews*, v. 37, n. 2, p. 223, 27 jun. 2015. Disponível em: </pmc/articles/PMC4590619/>. Acesso em: 21 out. 2022.
- Entra em vigor a nova Classificação Internacional de Doenças (CID-11) da OMS - OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde. Disponível em: <https://www.paho.org/en/news/11-2-2022-whos-new-international-classification-diseases-icd-11-comes-effect>. Acesso em: 22 out. 2022.
- EŞEL, Ertuğrul; DINÇ, Köksal. [Neurobiology of Alcohol Dependence and Implications on Treatment]. *Türk psikiyatri dergisi = Turkish journal of psychiatry*, v. 28, n. 1, p. 51–60, 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28291298>.
- EWING, J. A. Detecting alcoholism. The CAGE questionnaire. *JAMA*, v. 252, n. 14, p. 1905–1907, 12 out. 1984. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6471323/>. Acesso em: 8 nov. 2022
- FOROUD, Tatiana; EDENBERG, Howard J.; CRABBE, John C. Genetic Research: Who Is At Risk for Alcoholism? *Alcohol Research & Health*, v. 33, n. 1–2, p. 64, 2010. Disponível em: </pmc/articles/PMC3887503/>. Acesso em: 14 out. 2022.
- FRANK, Josef et al. Genome-wide significant association between alcohol dependence and a variant in the ADH gene cluster. *Addiction Biology*, v. 17, n. 1, p. 171–180, jan. 2012. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1369-1600.2011.00395.x>.
- GALLAND, Leo. The Gut Microbiome and the Brain. *Journal of Medicinal Food*, v. 17, n. 12, p. 1261, 12 dez. 2014. Disponível em: </pmc/articles/PMC4259177/>. Acesso em: 21 out. 2022;
- GALLASSI, Andrea Donatti et al. Custos dos problemas causados pelo abuso do álcool. [S.l.: s.n.], 2008.
- GELERENTER, Joel et al. Genome-wide Association Study of Maximum Habitual Alcohol Intake in >140,000 U.S. European and African American Veterans Yields Novel Risk Loci. *Biological Psychiatry*, v. 86, n. 5, p. 365–376, set. 2019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006322319311564>.
- Gianoulakis C. Alcohol-seeking behavior: the roles of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the endogenous opioid system. *Alcohol Health Res World*. 1998;22(3):202-10.
- GRANT, Bridget F. et al. Epidemiology of DSM-5 Alcohol Use Disorder: Results From the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions III. *JAMA Psychiatry*, v. 72, n. 8, p. 757–766, 1 ago. 2015. Disponível em: <https://jamanetwork.com/journals/jamapsychiatry/fullarticle/2300494>. Acesso em: 12 set. 2022.
- GRIGOLEIT, Jan Sebastian et al. Dose-Dependent Effects of Endotoxin on Neurobehavioral Functions in Humans. *PLoS ONE*, v. 6, n. 12, p. 28330, 2 dez. 2011. Disponível em: </pmc/articles/PMC3229570/>. Acesso em: 21 out. 2022.

- HABTAMU, Endashaw; MADORO, Derebe. Psychometric properties of Alcohol Use Disorder Identification Testscreening tool among medical outpatients in Dilla University Referral Hospital,southern Ethiopia, 2020. SAGE Open Medicine, v. 10, p. 205031212210775, jan. 2022. Disponível em: </pmc/articles/PMC8855433/>. Acesso em: 22 out. 2022.
- Heath AC, Whitfield JB, Martin NG, Pergadia ML, Goate AM, Lind PA, McEvoy BP, Schrage AJ, Grant JD, Chou YL, Zhu R, Henders AK, Medland SE, Gordon SD, Nelson EC, Agrawal A, Nyholt DR, Bucholz KK, Madden PA, Montgomery GW. A quantitative-trait genome-wide association study of alcoholism risk in the community: findings and implications. *Biol Psychiatry*. 2011 Sep 15;70(6):513-8
- HEATH, Andrew C. et al. A quantitative-trait genome-wide association study of alcoholism risk in the community: findings and implications. *Biological psychiatry*, v. 70, n. 6, p. 513, 9 set. 2011. Disponível em: </pmc/articles/PMC3210694/>. Acesso em: 16 out. 2022.
- HECKMANN, Wolfgang; SILVEIRA, Camila Magalhães. Dependência do álcool : aspectos clínicos e diagnósticos. *Alcool E Suas Consequências: Uma Abordagem Multiconceitual.*, p. 67- 87., 2009.
- HENDRICSON, Adam W.; SIBBALD, John R.; MORRISETT, Richard A. Ethanol alters the frequency, amplitude, and decay kinetics of Sr²⁺-supported, asynchronous NMDAR mEPSCs in rat hippocampal slices. *Journal of neurophysiology*, v. 91, n. 6, p. 2568–2577, jun. 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14749312/>. Acesso em: 11 out. 2022.
- HIGGINS-BIDDLE, John C.; BABOR, Thomas F. A Review of the Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT), AUDIT-C, and USAUDIT for Screening in the United States: Past Issues and Future Directions. *The American journal of drug and alcohol abuse*, v. 44, n. 6, p. 578, 2 nov. 2018. Disponível em: </pmc/articles/PMC6217805/>. Acesso em: 22 out. 2022.
- HO, Ming Fen et al. Genome-wide association study for circulating FGF21 in patients with alcohol use disorder: Molecular links between the SNHG16 locus and catecholamine metabolism. *Molecular Metabolism*, v. 63, p. 101534, 1 set. 2022. Disponível em: </pmc/articles/PMC9270258/>. Acesso em: 16 out. 2022.
- HURLEY, Thomas D.; EDENBERG, Howard J. Genes Encoding Enzymes Involved in Ethanol Metabolism. *Alcohol Research: Current Reviews*, v. 34, n. 3, p. 339, 2012. Disponível em: </pmc/articles/PMC3756590/>. Acesso em: 14 out. 2022.
- KATSU, Yoshinao; BAKER, Michael E. Cortisol. *Handbook of Hormones: Comparative Endocrinology for Basic and Clinical Research*, p. 947–949, 1 jan. 2021
- KENDLER, Kenneth S. et al. Genomewide Association Analysis of Symptoms of Alcohol Dependence in the Molecular Genetics of Schizophrenia (MGS2) Control Sample. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, v. 35, n. 5, p. 963–975, maio 2011. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1530-0277.2010.01427.x>.
- Krystal JH, Petrakis IL, Mason G, Trevisan L, D'Souza DC. N-methyl-D-aspartate glutamate receptors and alcoholism: reward, dependence, treatment, and vulnerability. *Pharmacol Ther*. 2003 Jul;99(1):79-94.
- Lai, D., Schwantes-An, TH., Abreu, M. et al. Gene-based polygenic risk scores analysis of alcohol use disorder in African Americans. *Transl Psychiatry* 12, 266 (2022).
- LAONIGRO, Irma et al. Alcohol abuse and heart failure. *European journal of heart failure*, v. 11, n. 5, p. 453–462, maio 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19336433/>. Acesso em: 19 out. 2022.
- LARSON, Heather N.; WEINER, Henry; HURLEY, Thomas D. Disruption of the coenzyme binding site and dimer interface revealed in the crystal structure of mitochondrial aldehyde dehydrogenase

- 'Asian' variant. *The Journal of biological chemistry*, v. 280, n. 34, p. 30550, 8 ago. 2005. Disponível em: </pmc/articles/PMC1262676/>. Acesso em: 14 out. 2022.
- LITWINOWICZ, Kamil; CHOROSZY, Marcin; WASZCZUK, Ewa. Changes in the composition of the human intestinal microbiome in alcohol use disorder: a systematic review. *The American Journal of Drug and Alcohol Abuse*, v. 46, n. 1, p. 4–12, 2 jan. 2020. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00952990.2019.1669629>.
- LIU, Szu Yi; TSAI, I. Ting; HSU, Yin Chou. Alcohol-Related Liver Disease: Basic Mechanisms and Clinical Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 10, 2 maio 2021. Disponível em: </pmc/articles/PMC8153142/>. Acesso em: 18 out. 2022.
- LONG, Jeffrey C. et al. Evidence for genetic linkage to alcohol dependence on chromosomes 4 and 11 from an autosome-wide scan in an american indian population. *American Journal of Medical Genetics*, v. 81, n. 3, p. 216–221, 8 maio 1998. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1096-8628(19980508)81:3%3C216::AID-AJMG2%3E3.0.CO;2-U>.
- LOVALLO, William R. Cortisol secretion patterns in addiction and addiction risk. *International journal of psychophysiology : official journal of the International Organization of Psychophysiology*, v. 59, n. 3, p. 195, 2006. Disponível em: </pmc/articles/PMC2257874/>. Acesso em: 4 out. 2022.
- LUO, Audrey et al. Epigenetic aging is accelerated in alcohol use disorder and regulated by genetic variation in APOL2. *Neuropsychopharmacology*, v. 45, n. 2, p. 327, 1 jan. 2020. Disponível em: </pmc/articles/PMC6901591/>. Acesso em: 16 out. 2022.
- MARCHI, Katia Colombo; MUNIZ, Jaqueline Joice; TIRAPELLI, Carlos Renato. Hypertension and chronic ethanol consumption: What do we know after a century of study? *World Journal of Cardiology*, v. 6, n. 5, p. 283, 5 maio 2014. Disponível em: </pmc/articles/PMC4062120/>. Acesso em: 19 out. 2022.
- MARCOS, M. et al. Interleukin-10 Gene Polymorphism is Associated with Alcoholism but not With Alcoholic Liver Disease. *Alcohol and Alcoholism*, v. 43, n. 5, p. 523–528, 9 maio 2008. Disponível em: <https://academic.oup.com/alcalc/article-lookup/doi/10.1093/alcalc/agn026>.
- Martin, Alicia R.; Gignoux, Christopher R.; Walters, Raymond K.; Wojcik, Genevieve L.; Neale, Benjamin M.; Gravel, Simon; Daly, Mark J.; Bustamante, Carlos D.; Kenny, Eimear E. (2017). Human Demographic History Impacts Genetic Risk Prediction across Diverse Populations. *The American Journal of Human Genetics*, 100(4), 635–649.
- MEDA, Shashwath A. et al. Multivariate Analyses Reveal Biological Components Related to Neuronal Signaling and Immunity Mediating Electroencephalograms Abnormalities in Alcohol-Dependent Individuals from the Collaborative Study on the Genetics of Alcoholism Cohort. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, v. 43, n. 7, p. 1462–1477, 21 jul. 2019. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/acer.14063>.
- MELLO, Tommaso et al. Alcohol induced hepatic fibrosis: role of acetaldehyde. *Molecular aspects of medicine*, v. 29, n. 1–2, p. 17–21, fev. 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18164754/>. Acesso em: 18 out. 2022.
- MELONI, José Nino; LARANJEIRA, Ronaldo. The Social and Health burden of alcohol abuse. [S.l.: s.n.], 2004.
- MILIVOJEVIC, Verica et al. Effects of Prazosin on Provoked Alcohol Craving and Autonomic and Neuroendocrine Response to Stress in Alcohol Use Disorder. *Alcoholism, clinical and experimental research*, v. 44, n. 7, p. 1488, 1 jul. 2020. Disponível em: </pmc/articles/PMC7572699/>. Acesso em: 5 out. 2022.

- MITCHELL, Marci R.; BERRIDGE, Kent C.; MAHLER, Stephen V. Endocannabinoid-Enhanced “Liking” in Nucleus Accumbens Shell Hedonic Hotspot Requires Endogenous Opioid Signals. *Cannabis and Cannabinoid Research*, v. 3, n. 1, p. 166, 1 jul. 2018. Disponível em: </pmc/articles/PMC6069591/>. Acesso em: 10 out. 2022.
- MORETTI-PIRES, Rodrigo Otávio; CORRADI-WEBSTER, Clarissa Mendonça. Adaptação e validação do Alcohol Use Disorder Identification Test (AUDIT) para população ribeirinha do interior da Amazônia, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 27, n. 3, p. 497–509, mar. 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/j/csp/a/H8h9w4M3JySdHphxmDXcTbb/?lang=pt>. Acesso em: 22 out. 2022.
- MOROZOVA, Tatiana V.; MACKAY, Trudy F.C.; ANHOLT, Robert R.H. Genetics and genomics of alcohol sensitivity. *Molecular Genetics and Genomics*, v. 289, n. 3, p. 253, 2014. Disponível em: </pmc/articles/PMC4037586/>. Acesso em: 14 out. 2022.
- MÜLLER, Mario et al. Subtypes of alcohol use disorder in the general population: A latent class analysis. *Psychiatry Research*, v. 285, p. 112712, 1 mar. 2020.
- Mulligan MK, Ponomarev I, Hitzemann RJ, Belknap JK, Tabakoff B, Harris RA, Crabbe JC, Blednov YA, Grahame NJ, Phillips TJ, Finn DA, Hoffman PL, Iyer VR, Koob GF, Bergeson SE. Toward understanding the genetics of alcohol drinking through transcriptome meta-analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Apr 18;103(16):6368-73.
- NIAAA. Entendendo o transtorno do uso de álcool Transtorno. 2021.
- NIH; NIAAA. The Cycle of Alcohol Addiction. . [S.l: s.n.], 2021. Disponível em: <https://addiction.surgeongeneral.gov/sites/default/files/surgeon-generals-report.pdf.>.
- O'BRIEN, Charles p. The CAGE Questionnaire for Detection of Alcoholism: A remarkably useful but simple tool. . [S.l: s.n.], 2008. Disponível em: <https://jamanetwork.com/>.
- Oliveira PRS, de Matos LO, Araujo NM, Sant Anna HP, da Silva E Silva DA, Damasceno AKA, Martins de Carvalho L, Horta BL, Lima-Costa MF, Barreto ML, Wiers CE, Volkow ND, Brunialti Godard AL. LRRK2 Gene Variants Associated With a Higher Risk for Alcohol Dependence in Multiethnic Populations. Front Psychiatry. 2021 May 31;12:665257*
- OMS. Álcool. In: Folha informativa. [S. l.], 15 jul. 2023. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/alcool#:~:text=Os%20fatores%20ambientais%20incluem%20desenvolvimento,execu%C3%A7%C3%A3o%20das%20pol%C3%ADticas%20sobre%20%C3%A1lcool>. Acesso em: 15 jul. 2023.
- opejoy, A., Fullerton, S. Genomics is failing on diversity. *Nature* **538**, 161–164 (2016).
- OSTROUMOV, Alexey et al. Stress Increases Ethanol Self-administration via a Shift towards Excitatory GABA Signaling in the Ventral Tegmental Area. *Neuron*, v. 92, n. 2, p. 493, 10 out. 2016. Disponível em: </pmc/articles/PMC5091663/>. Acesso em: 10 out. 2022
- OSWALD, Lynn M. et al. Relationships among ventral striatal dopamine release, cortisol secretion, and subjective responses to amphetamine. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, v. 30, n. 4, p. 821–832, abr. 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15702139/>. Acesso em: 4 out. 2022.
- P A N O R A M A 2 0 2 1 Álcool e a Saúde dos Brasileiros. . [S.l: s.n.], [S.d.]. Disponível em: <www.cisa.org.br>.
- PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Regional status report on alcohol and health in the Americas 2020. [S.l: s.n.], [S.d.].
- PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. *Regional status report on alcohol and health in the Americas 2020*. [S.l: s.n.], 2020.

- PARK, Annie et al. Genetics and Genomics of Alcohol Responses in Drosophila. *Neuropharmacology*, v. 122, p. 22, 8 ago. 2017. Disponível em: </pmc/articles/PMC5479727/>. Acesso em: 14 out. 2022.
- Pastor IJ, Laso FJ, Romero A, González-Sarmiento R. -238 G>A polymorphism of tumor necrosis factor alpha gene (TNFA) is associated with alcoholic liver cirrhosis in alcoholic Spanish men. *Alcohol Clin Exp Res*. 2005 Nov;29(11):1928-31.
- Petrovski S, Goldstein DB. Unequal representation of genetic variation across ancestry groups creates healthcare inequality in the application of precision medicine. *Genome Biol*. 2016 Jul 14;17(1):157.
- PIANO, Mariann R. Alcohol's Effects on the Cardiovascular System. *Alcohol Research : Current Reviews*, v. 38, n. 2, p. 219, 2017. Disponível em: </pmc/articles/PMC5513687/>. Acesso em: 19 out. 2022.
- PIJLS, Kirsten E. et al. Intestinal epithelial barrier function in liver cirrhosis: an extensive review of the literature. *Liver International*, v. 33, n. 10, p. 1457–1469, 1 nov. 2013. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/liv.12271>. Acesso em: 22 out. 2022.
- POHL, Keith; MOODLEY, Prebhashan; DHANDA, Ashwin D. Alcohol's Impact on the Gut and Liver. *Nutrients*, v. 13, n. 9, 1 set. 2021. Disponível em: </pmc/articles/PMC8472839/>. Acesso em: 22 out. 2022.
- PRAHARAJ, Samir et al. High-dose thiamine strategy in Wernicke–Korsakoff syndrome and related thiamine deficiency conditions associated with alcohol use disorder. *Indian Journal of Psychiatry*, v. 63, n. 2, p. 121, 1 mar. 2021. Disponível em: </pmc/articles/PMC8214134/>. Acesso em: 19 out. 2022.
- PSYCHIATRIC ASSOCIATION, American. Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais: DSM-5 - 5a Edição. [S.l.: s.n.], 2014.
- RACHDAOUI, Nadia; SARKAR, Dipak K. Pathophysiology of the Effects of Alcohol Abuse on the Endocrine System. *Alcohol Research : Current Reviews*, v. 38, n. 2, p. 255, 2017. Disponível em: </pmc/articles/PMC5513689/>. Acesso em: 29 nov. 2022.
- REHM, Jürgen. The Risks Associated With Alcohol Use and Alcoholism. *Alcohol Research & Health*, v. 34, n. 2, p. 135, 2011. Disponível em: </pmc/articles/PMC3307043/>. Acesso em: 18 out. 2022.
- REICH, Theodore et al. Genome-Wide Search for Genes Affecting the Risk for Alcohol Dependence. *Am. J. Med. Genet. (Neuropsychiatr. Genet.)*, v. 81, p. 207–215, 1998. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions>. Acesso em: 15 out. 2022.
- REILLY, Matthew T. et al. Genetic studies of alcohol dependence in the context of the addiction cycle. *Neuropharmacology*, v. 122, p. 3–21, 1 ago. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28118990/>. Acesso em: 14 out. 2022.
- RELATÓRIO Global sobre Álcool e Saúde - 2018. São Paulo: CISA, 15 jul. 2023. Disponível em: <https://cisa.org.br/pesquisa/dados-oficiais/artigo/item/71-relatorio-global-sobre-alcool-e-saude-2018>. Acesso em: 15 jul. 2023.
- ROCCO, Alba et al. Alcoholic disease: Liver and beyond. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, v. 20, n. 40, p. 14652, 10 out. 2014. Disponível em: </pmc/articles/PMC4209531/>. Acesso em: 22 out. 2022.
- ROCHAT, T J et al. Maternal alcohol use and children's emotional and cognitive outcomes in rural South Africa. *South African Medical Journal*, v. 109, n. 7, p. 526–534, 28 jun. 2019. Disponível em: <http://www.samj.org.za/index.php/samj/article/view/12638>. Acesso em: 22 out. 2022.
- RODRIGUES, Fernando. PROGRAMA DE NEUROEDUCAÇÃO PARA A FELICIDADE: uma revisão teórica da neurobiologia da felicidade. **Unpublished**, [S.L.], v. 1, p. 92-104, 2014.

- RON, Dorit; WANG, Jun. The NMDA Receptor and Alcohol Addiction. *Biology of the NMDA Receptor*, p. 59–77, 1 jan. 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5284/>>. Acesso em: 11 out. 2022.
- ROSE, A. K. et al. The Importance of Glucocorticoids in Alcohol Dependence and Neurotoxicity. *Alcoholism, clinical and experimental research*, v. 34, n. 12, p. 2011, dez. 2010. Disponível em: <</pmc/articles/PMC3058879/>>. Acesso em: 4 out. 2022.
- RUNDIO, Albert. Understanding alcoholism. *The Nursing clinics of North America*, v. 48, n. 3, p. 385–390, set. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23998765/>>. Acesso em: 17 set. 2022.
- Saiz PA, Garcia-Portilla MP, Florez G, Corcoran P, Arango C, Morales B, Leza JC, Alvarez S, Díaz EM, Alvarez V, Coto E, Nogueiras L, Bobes J. Polymorphisms of the IL-1 gene complex are associated with alcohol dependence in Spanish Caucasians: data from an association study. *Alcohol Clin Exp Res*. 2009 Dec;33(12):2147-53.
- Saiz PA, Garcia-Portilla MP, Florez G, Corcoran P, Arango C, Morales B, Leza JC, Alvarez S, Díaz EM, Alvarez V, Coto E, Nogueiras L, Bobes J. Polymorphisms of the IL-1 gene complex are associated with alcohol dependence in Spanish Caucasians: data from an association study. *Alcohol Clin Exp Res*. 2009 Dec;33(12):2147-53.
- SAMOCHOWIEC, Jerzy et al. Genetics of Alcohol Dependence: A Review of Clinical Studies. *Neuropsychobiology*, v. 70, n. 2, p. 77–94, 2014. Disponível em: <<https://www.karger.com/Article/FullText/364826>>.
- SANCHEZ-ROIGE, Sandra et al. Genome-wide association study of Alcohol Use Disorder Identification Test (AUDIT) scores in 20,328 research participants of European ancestry. *Addiction biology*, v. 24, n. 1, p. 121, 1 jan. 2019. Disponível em: <</pmc/articles/PMC6988186/>>. Acesso em: 16 out. 2022.
- SAUNDERS, JOHN B. et al. Development of the Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT): WHO Collaborative Project on Early Detection of Persons with Harmful Alcohol Consumption-II. *Addiction*, v. 88, n. 6, p. 791–804, 1 jun. 1993. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1360-0443.1993.tb02093.x>>. Acesso em: 22 out. 2022.
- SCHUCKIT, Marc A. Alcohol-use disorders. *The Lancet*, v. 373, n. 9662, p. 492–501, 2009.
- SCHUCKIT, Marc A. Genetic aspects of alcoholism. *Annals of emergency medicine*, v. 15, n. 9, p. 991–996, 1986. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3526997/>>. Acesso em: 14 out. 2022.
- SCHUMANN, Gunter et al. KLB is associated with alcohol drinking, and its gene product β -Klotho is necessary for FGF21 regulation of alcohol preference. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 113, n. 50, p. 14372–14377, 13 dez. 2016. Disponível em: <<https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1611243113>>.
- SELIN, Klara Hradilova. Alcohol Use Disorder Identification Test (AUDIT): What Does It Screen? Performance of the AUDIT against Four Different Criteria in a Swedish Population Sample. <http://dx.doi.org/10.1080/10826080601025532>, v. 41, n. 14, p. 1881–1899, 1 jul. 2009. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10826080601025532>>. Acesso em: 22 out. 2022.
- SELZER, MELVIN L. The Michigan Alcoholism Screening Test: The Quest for a New Diagnostic Instrument. *American Journal of Psychiatry*, v. 127, n. 12, p. 1653–1658, jun. 1971. Disponível em: <<http://psychiatryonline.org/doi/abs/10.1176/ajp.127.12.1653>>.
- SKOGEN, Jens Christoffer et al. Effort-Reward Imbalance Is Associated With Alcohol-Related Problems. WIRUS-Screening Study. *Frontiers in Psychology*, v. 10, p. 2079, 13 set. 2019.

- SONG, Sunmi et al. Genetic, Psychological, and Personal Network Factors Associated With Changes in Binge Drinking Over 2 Years Among Mexican Heritage Adolescents in the USA. *Annals of Behavioral Medicine: A Publication of the Society of Behavioral Medicine*, v. 53, n. 2, p. 126, 1 fev. 2019. Disponível em: </pmc/articles/PMC6200652/>. Acesso em: 17 out. 2022.
- STEPHENS, Mary Ann C.; WAND, Gary. Stress and the HPA Axis: Role of Glucocorticoids in Alcohol Dependence. *Alcohol Research: Current Reviews*, v. 34, n. 4, p. 468, 2012. Disponível em: </pmc/articles/PMC3860380/>. Acesso em: 27 set. 2022.
- STEWART, Rebecca E.; CARDAMONE, Nicholas C.; SCHACHTER, Allison; BECKER, Chloe; MCKAY, James R.; BECKER-HAIMES, Emily M.. A systematic review of brief, freely accessible, and valid self-report measures for substance use disorders and treatment. *Drug And Alcohol Dependence*, [S.L.], v. 243, p. 109729, fev. 2023.
- Szabo G, Mandrekar P. Ethanol-mediated regulation of transcription factors in immunocompetent cells. *Front Biosci*. 2002 May 1;7:a80-9. doi: 10.2741/A742.
- TAKAHASHI, Sakae et al. Association of SNPs and haplotypes in APOL1, 2 and 4 with schizophrenia. *Schizophrenia research*, v. 104, n. 1–3, p. 153–164, set. 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18632255/>. Acesso em: 16 out. 2022.
- TANIAI, Makiko. Alcohol and hepatocarcinogenesis. *Clinical and Molecular Hepatology*, v. 26, n. 4, p. 736, 1 out. 2020. Disponível em: </pmc/articles/PMC7641552/>. Acesso em: 19 out. 2022.
- TAWA, Elisabeth A.; HALL, Samuel D.; LOHOFF, Falk W. Overview of the Genetics of Alcohol Use Disorder. *Alcohol and Alcoholism (Oxford, Oxfordshire)*, v. 51, n. 5, p. 507, 1 set. 2016. Disponível em: </pmc/articles/PMC5004749/>. Acesso em: 15 out. 2022.
- TIMONEDA, Joaquín et al. Vitamin A Deficiency and the Lung. *Nutrients*, v. 10, n. 9, 1 set. 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30134568/>. Acesso em: 22 out. 2022.
- VOLKOW, Nora D.; MICHAELIDES, Michael; BALER, Ruben. The Neuroscience of Drug Reward and Addiction. *Physiological Reviews*, v. 99, n. 4, p. 2115, 10 out. 2019. Disponível em: </pmc/articles/PMC6890985/>. Acesso em: 5 out. 2022.
- VONLAUFEN, Alain et al. Alcoholic pancreatitis: A tale of spirits and bacteria. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*, v. 5, n. 2, p. 82, 5 maio 2014. Disponível em: </pmc/articles/PMC4025076/>. Acesso em: 19 out. 2022.
- WAND, Gary S. et al. Association of amphetamine-induced striatal dopamine release and cortisol responses to psychological stress. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, v. 32, n. 11, p. 2310–2320, nov. 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17342167/>. Acesso em: 4 out. 2022.
- WANG, Shao Cheng et al. Alcohol Addiction, Gut Microbiota, and Alcoholism Treatment: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 17, p. 1–11, 1 set. 2020. Disponível em: </pmc/articles/PMC7504034/>. Acesso em: 21 out. 2022.
- Webb A, Lind PA, Kalmijn J, Feiler HS, Smith TL, Schuckit MA, Wilhelmsen K. The investigation into CYP2E1 in relation to the level of response to alcohol through a combination of linkage and association analysis. *Alcohol Clin Exp Res*. 2011 Jan;35(1):10-8.
- WISE, Roy A. Dopamine and Reward: The Anhedonia Hypothesis 30 years on. *Neurotoxicity research*, v. 14, n. 2–3, p. 169, jun. 2008. Disponível em: </pmc/articles/PMC3155128/>. Acesso em: 10 out. 2022.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global strategy to reduce the harmful use of alcohol. [S.l.]: World Health Organization, 2010

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The ICD-10 classification of mental and behavioural disorders : clinical descriptions and diagnostic guidelines. [S.l.]: World Health Organization, 1992

ZILLICH, Lea et al. Epigenome-wide association study of alcohol use disorder in five brain regions. *Neuropsychopharmacology* 2021 47:4, v. 47, n. 4, p. 832–839, 13 nov. 2021. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41386-021-01228-7>>. Acesso em: 13 set. 2022.

ZUO, Lingjun et al. Genome-Wide Association Study of Alcohol Dependence Implicates KIAA0040 on Chromosome 1q. *Neuropsychopharmacology*, v. 37, n. 2, p. 557, 2012. Disponível em: <[pmc/articles/PMC3242317/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2242317/)>. Acesso em: 17 out. 2022.