

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**Efeitos dos genes *CRHRI* e *AVPR1B* sobre o Transtorno Depressivo Maior em amostras clínicas de transtornos psiquiátricos e na população geral**

**BRUNA SANTOS DA SILVA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Claiton Henrique Dotto Bau  
Co-orientadora: Prof. Dra. Luciana Tovo Rodrigues

Porto Alegre  
2015

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética Humana Molecular do Departamento de Genética do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A aluna recebeu bolsa de estudos concedida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

**Instituições Financiadoras:**

CNPq

CAPES

FAPERGS-DECIT-PPSUS

## AGRADECIMENTOS

À minha família pela preocupação e compreensão durante os períodos que deixei de dar a atenção merecida por falta de tempo e pelo apoio e incentivo em momentos de decisões difíceis.

A todos amigos da sala 109, que me receberam de braços abertos e que estiveram sempre prontamente dispostos a me ajudar a alcançar os objetivos, oferecendo inclusive o tão importante apoio psicológico durante todas as fases do mestrado. Além disso, e não menos importante, agradeço por compartilharem todos os momentos de alegria na comemoração de cada objetivo alcançado pelo grupo e pelos *happy hours* apenas para descontrair e rir com bons petiscos e chopp. Esses momentos, com certeza, deixarão boas recordações.

Ao meu amigo de longa data Diego, que desde o início das minhas participações na pesquisa científica não mediu esforços para me ajudar sempre que precisei e foi fundamental para a conclusão de todas as etapas percorridas na minha trajetória. Sem esquecer dos momentos agradáveis de estatística no Parcão.

Ao meu namorado, parceiro e amigo, pela paciência, carinho, apoio e compreensão em momentos que nem eu mesma suportava meu humor. Por se preocupar quando percebia que às 4h da madrugada eu estava “dissertando” durante o carnaval em Florianópolis, por entender quando eu precisei recusar alguns programas, mas também por me tirar de casa para relaxar quando julgava necessário e por tentar me ensinar a surfar para descarregar as energias negativas, tornando meus dias mais leves e agradáveis.

Ao meu orientador, pela confiança ao me receber no grupo, pelo esforço que faz para estar praticamente sempre disponível mesmo tendo muitos outros compromissos, por todo o aprendizado que me ajudou a construir e, principalmente, por me apoiar e incentivar a dar continuidade na carreira acadêmica.

**MUITO OBRIGADA!**

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	4
RESUMO .....	5
ABSTRACT .....	6
Capítulo I INTRODUÇÃO GERAL .....	7
1.1.    Transtorno Depressivo Maior .....	8
1.2.    TDM em amostras clínicas de TDAH e TUS .....	10
1.2.1.    Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade.....	10
1.2.2.    Transtorno por Uso de Substâncias .....	12
1.3.    Sistema de estresse.....	13
1.3.1.    Hormônio Liberador de Corticotropina (CRH).....	15
1.3.2.    Arginina Vasopressina (AVP).....	16
1.4.    Genes envolvidos no sistema de resposta ao estresse .....	17
1.4.1.    Gene <i>CRHRI</i> .....	17
1.4.2.    Gene <i>AVPR1B</i> .....	19
1.5.    Interações gene-gene.....	20
1.6.    Mecanismos envolvidos na formação de heterodímeros.....	21
Capítulo II JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS .....	24
2.1    Justificativa.....	25
2.2    Objetivo Geral.....	27
2.3    Objetivos Específicos.....	27
Capítulo III ARTIGO .....	28
Capítulo IV DISCUSSÃO GERAL.....	57
4.1    TDM na População Geral.....	59
4.2    TDM em pacientes com TDAH .....	60
4.3    TDM em dependentes de álcool.....	61
4.4    TDM em dependentes de crack/cocaína.....	61
4.5    Considerações gerais .....	62
4.6    Conclusão.....	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	65
ANEXOS.....	76
Anexo 1 – Produção científica adicional no período de mestrado .....	76
Anexo 2 – Aprovação Comissão de Ética em Pesquisa do HCPA.....	77
Anexo 3 – Aprovação Comissão de Ética em Pesquisa da PUCRS .....	78
Anexo 4 – Aprovação Comissão de Ética em Pesquisa do HCPA.....	79

**LISTA DE ABREVIATURAS**

ACTH	Adrenocorticotropina
APOE	Apolipoproteína E
AVP	Arginina vasopressina
AVPR1A	Receptor de arginina vasopressina do subtipo 1A
AVPR1B	Receptor de arginina vasopressina do subtipo 1B
AVPR2	Receptor de arginina vasopressina 2
BDI-II	Inventário de depressão de Beck-II
COMT	Catechol-O-metiltransferase
CRH	Hormônio liberador de corticotropina
CRHR1	Receptor do hormônio liberador de corticotropina 1
CRHR2	Receptor do hormônio liberador de corticotropina 2
CRHBP	Proteína de ligação do CRH
DBH	Dopamina beta hidroxilase
DRD4	Receptor de dopamina do tipo 4
DSM-IV	Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais 4º Ed
GCPR	Receptores ligados à proteína G
GNB3	Proteína de ligação do nucleotídeo guanina
GWAS	Estudo de associação por varredura genômica
HPA	Hipotálamo-hipófise-adrenal
HTR1A	Receptor de serotonina do tipo 1ª
MAOA	Monoamino oxidase
MC2R	Receptor de melanocortina 2
MTHFR	Metilenotetrahidrofolato redutase
NR3C1	Receptor de glicocorticoide
NR3C2	Receptor de mineralocorticoide
POMC	Proiomelanocortina
PVN	Núcleo hipotalâmico paraventricular
SLC6A3/DAT1	Transportador de dopamina – membro 3
SLC6A4/5HTT	Transportador de serotonina – membro 4
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
SNC	Sistema nervoso central
TDAH	Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade
TDM	Transtorno depressivo maior
TUS	Transtorno por uso de substâncias

**RESUMO**

A principal hipótese etiológica para o Transtorno Depressivo Maior (TDM) é a hiperatividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). Dentre os componentes desse eixo, os sistemas que envolvem as ações do hormônio liberador de corticotropina (CRH) e da arginina vasopressina (AVP) têm demonstrado exercer funções cruciais na fisiopatologia dos transtornos depressivos e de ansiedade. Os principais receptores desses peptídeos na hipófise, o CRHR1 e o AVPR1B, respectivamente, bem como suas interações, parecem exercer efeitos importantes sobre tais transtornos. Assim, genes que codificam esses componentes são candidatos naturais para o estudo de variantes genéticas com potencial influência sobre a etiologia do TDM. No presente estudo, avaliamos os efeitos dos SNPs rs12944712, rs110402 e rs878886 no gene *CRHR1* e do rs28632197 no *AVPR1B* sobre o TDM em amostras clínicas de transtornos psiquiátricos e na população geral, levando em consideração o gênero dos indivíduos. A amostra é composta por 1462 indivíduos adultos, sendo 555 com Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) (301 homens); 629 indivíduos da população geral (312 homens), 136 homens dependentes de álcool e 142 mulheres dependentes de crack/cocaína. O diagnóstico de depressão foi avaliado seguindo os critérios da Entrevista Clínica Estruturada do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais 4ª Edição (DSM-IV), exceto para a amostra de dependentes de crack/cocaína que foi avaliada de acordo com o Inventário de Depressão de Beck-II (BDI-II). O resultado mais consistente do nosso estudo envolve a associação dos polimorfismos rs110402 e rs878886 do gene *CRHR1* com o TDM na população geral. Nessa amostra observamos uma tendência de associação desses SNPs com TDM nas análises incluindo ambos os gêneros ( $P=0,057$  e  $P=0,047$ , respectivamente) e uma associação nominal do rs110402 em mulheres ( $P=0,029$ ) e do rs878886 em homens ( $P=0,016$ ) sobre o TDM. A análise de haplótipos formados por esses SNPs também demonstrou efeito significativo sobre o TDM em homens da população geral ( $P = 0,018$ ). Adicionalmente, encontramos associação do rs28632197 no gene *AVPR1B* com o TDM em dependentes de álcool ( $P = 0,012$ ). O termo de interação incluindo o rs28632197 e o rs878886 foi associado com TDM em homens da população geral ( $P = 0,011$ ). De maneira geral, nossos resultados sugerem que os efeitos dos genes *CRHR1* e *AVPR1B* sobre o TDM parecem ser influenciados pelo perfil psiquiátrico e gênero dos indivíduos. Assim, evidenciamos a necessidade de considerar essas variáveis em estudos genéticos futuros envolvendo o sistema de estresse e o TDM.

**ABSTRACT**

The main hypothesis about the pathogenesis of MDD involves the hyperactivity of the hypothalamus–pituitary–adrenal (HPA) axis. Components of this axis, the corticotropin-releasing hormone (CRH) and the arginine vasopressin (AVP) systems have shown to exert key functions in the pathophysiology of depressive and anxiety disorders. More specifically, their major receptors in the pituitary gland, *CRHR1* and *AVPR1B*, respectively, as well as their interactions seem to play a crucial impact on such disorders. Thus, the genes encoding these components are natural candidates for the study of variants that potentially influence the etiology of MDD. In the present study, we aim to evaluate the effects of *CRHR1* rs12944712, rs110402 and rs878886 and *AVPR1B* rs28632197 polymorphisms on MDD in clinical samples of psychiatric disorders and in the general population, taking into account the gender of individuals. This investigation included 1462 unrelated Brazilian adult subjects: 555 patients with ADHD (301 males), 629 individuals recruited from general population (312 males), 136 alcohol dependent males and 142 crack/cocaine addicted females. MDD was evaluated using the Structured Clinical Interviews for Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV) for all samples except crack/cocaine addicts that were evaluated with the Beck Depression Inventory-II (BDI-II). The most consistent finding of our study involves the effects of *CRHR1* rs110402 and rs878886 on MDD in the general population. In this sample, we observed a trend association of these SNPs with MDD in the analysis including both genders ( $P = 0.057$  and  $P = 0.047$ , respectively) and nominal association of rs110402 in females ( $P = 0.029$ ) and of rs878886 in males ( $P = 0.016$ ) on MDD. Moreover, the haplotypes formed by these SNPs demonstrated significant association with MDD in males from the same sample ( $P = 0.018$ ). Another men-specific significant result was the association of *AVPR1B* rs28632197 with MDD in the alcohol dependent sample ( $P = 0.012$ ). Additionally the rs28632197-rs878886 interaction term showed significant effect on MDD among males from the general population ( $P = 0.011$ ). In conclusion, our results support an involvement of *CRHR1* and *AVPR1B* genes on MDD that seems to be modulated by the effects of psychiatric profile and gender. Our findings suggest that further studies on the genetics of the stress system and MDD should consider these variables.

**CAPÍTULO I**  
**INTRODUÇÃO GERAL**

---



### 1.1. Transtorno Depressivo Maior

O Transtorno Depressivo Maior (TDM) é uma doença psiquiátrica muito comum associada a altos níveis de morbidade e mortalidade e com prevalência estimada em 7-11% (Kessler et al., 2007). Sabe-se que o TDM é duas vezes mais frequente em mulheres do que em homens e estas costumam apresentar mais sintomas e com maior gravidade (Kornstein et al., 2000).

Segundo Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais 4ª Edição (DSM-IV) o diagnóstico do TDM exige a presença de pelo menos 5 dos seguintes sintomas com duração de no mínimo 2 semanas: anedonia, estado/humor deprimido, mudança de peso/apetite, alterações no sono, alterações psicomotoras, perda de energia, sentimento de culpa, dificuldade de concentração/indecisão e pensamentos de morte/suicídio, sendo que a presença de ao menos um dos dois primeiros sintomas supracitados é um critério obrigatório para o fechamento do diagnóstico.

O TDM é frequentemente acompanhado de outros transtornos psiquiátricos. Os transtornos de ansiedade e Transtorno por Uso de Substâncias (TUS) estão entre as comorbidades mais comuns, chegando a atingir aproximadamente 59% e 24% dos indivíduos com TDM, respectivamente (Kessler et al., 2003). Os transtornos de ansiedade costumam afetar mais mulheres com TDM do que homens (Silverstein, 2014). Por outro lado, os homens costumam apresentar TUS em comorbidade com maior frequência do que as mulheres (Najt et al., 2011).

A patogênese do TDM ainda não está completamente elucidada, no entanto, estudos sugerem o envolvimento do hipocampo, uma região altamente sensível ao estresse. Indivíduos com TDM demonstram menor volume dessa região quando comparados com indivíduos saudáveis (Tae et al., 2008). Muitas estruturas límbicas e pré-frontais e seus circuitos interconectados também têm se mostrado alterados em indivíduos com TDM, sugerindo uma origem para a sintomatologia desse transtorno (Maletic et al., 2007). Mais especificamente, alterações em redes de sinalização complexas têm demonstrado envolvimento com a fisiopatologia do TDM, como o alterações do funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise (HPA), produção deficiente de neurotrofinas, anormalidades na expressão de miRNAs, desregulação de citocinas pró-inflamatórias e distribuição anormal de peptídeos de sinalização gastrointestinais. Qualquer uma dessas mudanças parece promover um fenótipo similar caracterizado por alterações de humor. Além disso, todos esses sistemas estão conectados de

maneira que uma alteração inicial em um deles pode resultar em anormalidades nos outros (Villanueva et al., 2013).

A susceptibilidade a esse transtorno é resultado da influência de diversos fatores de risco ainda não completamente elucidados. Os fatores genéticos assumem grande importância, conforme mostram estudos com famílias e gêmeos que indicam herdabilidade aproximada de 37% (Sullivan et al., 2000). Da mesma forma, os fatores ambientais, como eventos traumáticos na infância, exercem um importante papel na etiologia desse transtorno (Heim et al., 2009).

Uma revisão recente sobre a genética do TDM apresenta os principais genes candidatos avaliados em metanálises apontando 7 genes com resultados significativos: transportador de serotonina (*5HTT/SLC6A4*), apolipoproteína E (*APOE*), receptor de dopamina do tipo 4 (*DRD4*), proteína de ligação do nucleotídeo guanina (*GNB3*), receptor de serotonina do tipo 1A (*HTR1A*), metilenotetrahidrofolato redutase (*MTHFR*) e transportador de dopamina (*DAT1/SLC6A3*). Esses genes, de maneira geral, codificam componentes envolvidos com a neurotransmissão. No entanto, os autores destacam a falta de concordância entre os resultados dos mais de 1500 estudos testando associações de aproximadamente 200 genes com depressão (Flint and Kendler, 2014). Além disso, os estudos de associação por varredura genômica (*genome-wide association scans* ou GWAS) realizados até o momento envolvendo fenótipos relacionados a transtornos depressivos alcançam resultados aquém do esperado, embora associações nominais em alguns genes tenham sido encontradas. A maior e mais recente mega-análise de genes candidatos sobre o TDM não foi capaz de identificar resultados robustos e replicáveis (Ripke et al., 2013). No entanto, para outros transtornos psiquiátricos há exemplos de sucesso dessa abordagem, como um estudo que foi capaz de identificar 108 *loci* associados com esquizofrenia (Ripke, 2014).

Embora os genes que codificam os componentes do sistema de resposta ao estresse não tenham alcançado ainda associações robustas, esse sistema tem sido considerado uma hipótese etiológica importante sobre a patogênese do TDM. Nesse contexto, o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (*hypothalamic-pituitary-adrenal* ou HPA), o principal sistema de controle da resposta ao estresse, parece exercer funções críticas na fisiopatologia do TDM e encontra-se desregulado nessa condição (Wardenaar et al., 2011). Dentre os componentes do eixo HPA destacam-se os sistemas que envolvem as ações do hormônio liberador de corticotropina (*corticotropin-releasing hormone* ou CRH) e da arginina vasopressina

(*arginine vasopressin* ou AVP). Evidências consistentes demonstram que esses sistemas exercem funções cruciais na fisiopatologia dos transtornos depressivos e de ansiedade (Bao and Swaab, 2010). Consistentemente com essa hipótese, altos níveis basais de CRH e AVP são encontrados em pacientes com TDM (Banki et al., 1992; van Londen et al., 1997), potencialmente levando à dessensibilização e/ou diminuição da quantidade dos seus principais receptores na hipófise, o receptor do CRH do tipo 1 (CRHR1) e o receptor de AVP do subtipo 1B ou V3 (AVPR1B). Para o CRHR1, isso já foi demonstrado em estudos post-mortem que observaram ligação diminuída do CRH ao seu receptor e baixos níveis do mRNA do CRHR1 em vítimas de suicídio com histórico de depressão (Merali et al., 2004). Além disso, estudos em modelo animal demonstraram que altos níveis de CRH levam ao aumento da ansiedade (Jones et al., 1998; Zorrilla et al., 2002) e que a concentração de AVP está envolvida com mudanças comportamentais (Yang et al., 2012). Adicionalmente, modelos de ratos *knockout* para o CRHR1 a AVPR1B demonstram alterações na resposta ao estresse (Lolait et al., 2007; Timpl et al., 1998).

## **1.2. TDM em amostras clínicas de TDAH e TUS**

### *1.2.1. Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade*

O Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH), de acordo com o DSM-IV, é caracterizado por sintomas persistentes de desatenção, hiperatividade e impulsividade (APA, 1994), o que prejudica o aprendizado, as funções cognitivas e o desempenho de diversas outras funções. É uma condição neuropsiquiátrica altamente comum em crianças, com prevalência mundial estimada na faixa de 5,29% a 7,1% em indivíduos com idade menor que 18 anos (Polanczyk et al., 2007; Willcutt, 2012). Estudos recentes mostram que os sintomas do TDAH podem continuar na vida adulta e estima-se prevalência entre 1,2% e 7,3% entre esses indivíduos (Fayyad et al., 2007; Simon et al., 2009).

O TDAH está presente em comorbidade com vários outros transtornos neuropsiquiátricos, incluindo os transtornos de humor, do pânico, bipolar, depressivos e de ansiedade, bem como abuso e dependência de álcool, nicotina, e outras drogas (Kessler et al., 2006; Matthies et al., 2013). Adultos com TDAH tem duas vezes mais chances de desenvolver transtornos de humor do que a população geral (Rucklidge et al., 2014). Uma comorbidade importante é o TDM, cuja prevalência em indivíduos com TDAH é

significativamente maior do que na população geral, afetando aproximadamente 39% desses indivíduos (Kessler et al., 2005).

Em relação à neurobiologia do TDAH, múltiplos sistemas parecem estar envolvidos com sua etiologia e progressão. Estudos demonstraram que o eixo HPA encontra-se desregulado nessa condição, apresentando níveis de cortisol mais baixos (Isaksson et al., 2012; Ma et al., 2011). O envolvimento dos sistemas dopaminérgico, adrenérgico, serotoninérgico e colinérgico foi demonstrado por evidências de estudos psicofarmacológicos. Modelos animais também sugerem que os sistemas dopaminérgico e adrenérgico estão envolvidos na fisiopatologia do transtorno. Porém, pesquisas com esses modelos devem ser interpretadas com cautela, visto que, não reproduzem perfeitamente a situação clínica do TDAH, mas imitam suas características e podem ser usados para confirmar construções teóricas (van der Kooij and Glennon, 2007). Em conclusão, sugere-se que alterações em um único sistema neurotransmissor não explica a complexidade da neurobiologia do TDAH, mas o que provavelmente ocorre é a consequência da interação entre vários sistemas de neurotransmissores disfuncionais (Cortese, 2012).

Estudos abordando a presença do TDAH e TDM em comorbidade, demonstram que esses pacientes apresentam menor volume do hipocampo em comparação a pacientes apenas com TDAH, o que é consistente com alterações neurobiológicas observadas no TDM (Onnink et al., 2014). No entanto, alguns sistemas, como o eixo HPA, parecem estar desregulados em ambos os transtornos. Considerando que o TDM e o TDAH possam compartilhar rotas etiológicas, o alto índice da comorbidade entre esses transtornos não é surpreendente. E assim, é plausível que os fatores genéticos envolvidos na patogênese desses transtornos se sobreponham.

A susceptibilidade ao TDAH apresenta um forte componente genético, com herdabilidade estimada em 75% (Freitag et al., 2010). Devido a essa forte influência genética, há grande interesse em identificar regiões e genes que possam estar envolvidos com esse transtorno. Entre os principais genes candidatos para a susceptibilidade ao TDAH que têm sido amplamente investigados estão o *DRD4*, *5HTT/SLC6A4*, *DAT1/SLC6A3*, catechol-O-metiltransferase (*COMT*), monoamino oxidase A (*MAOA*) e dopamina beta hidroxilase (*DBH*). Embora existam meta-análises sustentando resultados significativos, há relativa heterogeneidade entre os achados de diferentes estudos (Gizer et al., 2009). Além disso, muitos fatores ambientais, como os pré-natais, podem estar envolvidos na etiologia do

TDAH, incluindo condição psicológica, tabagismo e consumo de álcool e cafeína materno durante a gravidez (Linnet et al., 2003). Também deve ser considerada a correlação gene-ambiente, onde genes podem indiretamente aumentar o risco de desenvolvimento de TDAH através da exposição a fatores de risco ou de proteção (Stergiakouli and Thapar, 2010).

Mais recentemente, vários GWAS têm sido realizados e têm apresentado alguns resultados importantes em relação a possíveis regiões do genoma relacionadas ao TDAH. No entanto, embora existam regiões cromossômicas com resultados promissores, nenhum polimorfismo individual sobreviveu à rigorosa correção por múltiplos testes que é necessária em tais estudos em larga escala (Neale et al., 2010).

### *1.2.2. Transtorno por Uso de Substâncias*

Frequentemente, o TDM é acompanhado do TUS, que inclui desde dependência/abuso de álcool até o uso de substâncias ilícitas como crack/cocaína. A prevalência do TDM em indivíduos que sofrem de TUS é de aproximadamente 24% (Kessler et al., 2007).

Um importante fator de risco para transtornos depressivos e de ansiedade é a dependência/abuso de álcool, assim como o contrário também é sugerido (Burns and Teesson, 2002). Alcoolistas apresentam risco 2,5 vezes maior de desenvolver TDM do que indivíduos não alcoolistas (Grant et al., 2004). O álcool age no Sistema Nervoso Central (SNC), ativando o sistema de recompensa, e está associado a mudanças na neurotransmissão do sistema mesocorticolímbico e outros sistemas, podendo modificar o funcionamento do eixo HPA (Gianoulakis et al., 2003; Hillemecher, 2011). No Brasil, estima-se que a prevalência da dependência de álcool seja de 9% (Laranjeira et al., 2010).

Outra substância cuja dependência é frequentemente acompanhada de transtornos depressivos e de ansiedade é a cocaína. A prevalência do uso de cocaína na população geral é estimada em 1,7% (UNODC, 2013) e estima-se que quase 50% dos dependentes apresentam sintomas de TDM (Wild et al., 2005). Além disso, o TDM nestes pacientes já foi relacionado com o aumento de recaída ao uso da droga e diminuição da eficácia do tratamento (Johnson et al., 2011). A cocaína pode ser usada na forma de cloridrato de cocaína, que é um pó fino, branco e cristalino, solúvel em água, podendo ser aspirado ou injetado; e na forma de base, a qual é processada com bicarbonato de sódio e água, gerando uma pedra que pode ser fumada, popularmente conhecida como *crack* (NIDA, 2010). Sob qualquer uma das formas, a cocaína entra na corrente sanguínea e atinge rapidamente o cérebro, agindo na inibição da receptação

de dopamina e no estímulo a sua liberação (Kreek et al., 2012). Atua também, inibindo transportadores de outros neurotransmissores como norepinefrina e serotonina (Nestler, 2005). Essas ações levam ao aumento da concentração desses neurotransmissores, em especial, da dopamina, produzindo efeitos como euforia, prazer, perda de controle, entre outros (Nestler, 2005). A ativação do sistema mesocorticolímbico parece ser uma consequência neurobiológica comum de exposição a drogas de abuso, exercendo uma função crítica sobre a gravidade da dependência. Também foi demonstrado que o estresse aumenta o *craving*, que é o desejo incontrolável de utilização da droga, e que essa indução associada às respostas do eixo HPA pode modular a propensão a recaídas (Sinha et al., 2006).

Considerando que o TUS possui etiologia complexa, sendo influenciado por fatores ambientais e genéticos, vários estudos têm sido realizados a fim de investigar possíveis influências de variantes genéticas isoladas, de interações gene-gene e de interações gene-ambiente sobre o uso, abuso e dependência de tais substâncias (Fernández-Castillo et al., 2013; Guindalini et al., 2006; Lohoff et al., 2008; Yan et al., 2013; Young-Wolff et al., 2011). Da mesma forma que ocorre no TDAH, a alta frequência de TDM observada em indivíduos com TUS, pode ser reflexo da sobreposição de fatores associados à etiologia desses transtornos ou ainda da existência de variáveis que tenham influência especificamente sobre a comorbidade, e não sobre os transtornos isolados.

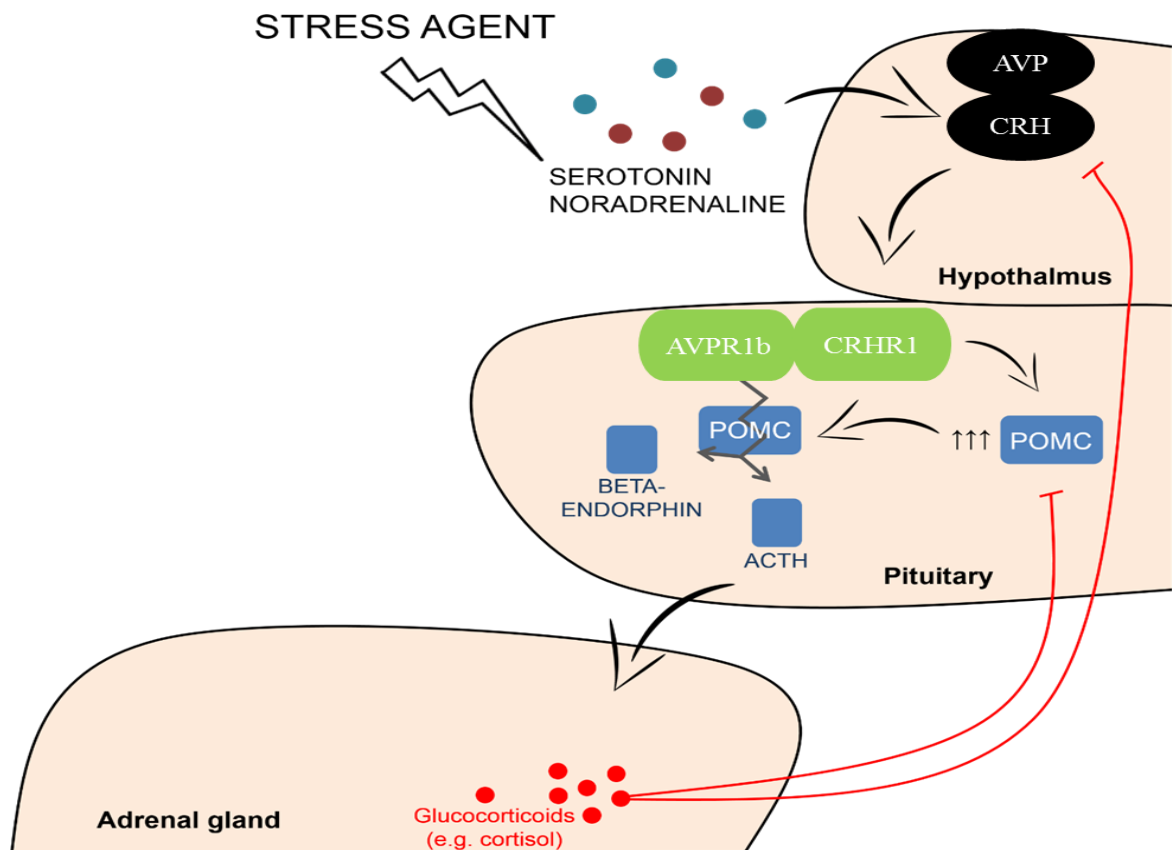
### **1.3. Sistema de estresse**

O estresse é um estado no qual o equilíbrio (ou homeostase) do organismo está alterado. Tal desequilíbrio é causado por fatores físicos e/ou emocionais, chamados de agentes estressores. Essas situações desencadeiam a ativação do sistema de estresse, que promove alterações tanto no SNC quanto em órgãos e tecidos periféricos, para proteger o organismo nessas circunstâncias (Chrousos, 2009). Uma resposta inadequada ao estresse pode contribuir para o desenvolvimento de diversas doenças, incluindo endócrinas, metabólicas, autoimunes e transtornos psiquiátricos. O desenvolvimento e a gravidade dessas condições dependem de fatores genéticos e ambientais. O momento em que os eventos estressores ocorrem também é um fator crítico, considerando que o período pré-natal, a infância e a adolescência são caracterizados pelo aumento da vulnerabilidade a agentes estressores (Charmandari et al., 2005).

Um dos sistemas de resposta ao estresse mais estudado é o eixo HPA, que consiste em um conjunto complexo de interações entre hipotálamo, hipófise e córtex adrenal e exerce sua função principalmente através das ações dos glicocorticoides (Xiong and Zhang, 2012).

O eixo HPA é ativado em resposta ao estresse, uso de substâncias, ou outras condições físicas e psicológicas através de circuitos neuronais. Basicamente, essa ativação se inicia com a liberação de noradrenalina e serotonina, que estimulam os neurônios do núcleo hipotalâmico paraventricular (*hypothalamic paraventricular nucleus* ou PVN) a produzirem e liberarem CRH e AVP. Esses peptídeos entram na circulação hipofisária e agem de forma sinérgica para estimular a síntese e secreção de adrenocorticotropina (ACTH) na circulação periférica, que por sua vez, inicia a produção e liberação de glicocorticoides (cortisol, em humanos) a partir do córtex adrenal. (Bonfiglio et al., 2011). O cortisol redireciona o metabolismo para atender as demandas de energia necessárias em resposta ao estresse e restringe as reações de defesa ao estresse para proteger o corpo de danos adicionais. Esse sistema é controlado por retroalimentação negativa via ativação de receptores cerebrais pelo cortisol (Stephens and Wand, 2012) (Figura 1).

Há vários estudos demonstrando que o eixo HPA encontra-se desregulado em vários transtornos psiquiátricos, incluindo transtornos depressivos e de ansiedade (Wardenaar et al., 2011), dependência de álcool (Boschloo et al., 2011), nicotina (Richards et al., 2011), cocaína (Sinha et al., 2006) e TDAH (Isaksson et al., 2012).



**Figura 1 - Funcionamento do eixo HPA na resposta ao estresse.** Em resposta a agentes estressores, o aumento nos níveis de neurotransmissores como serotonina e noradrenalina estimula a liberação de CRH e AVP no hipotálamo. Esses hormônios agem através dos seus receptores, CRHR1 e AVPR1B respectivamente, e estimulam a liberação de ACTH e de beta-endorfinas a partir do hormônio precursor de proopiomelanocortina (POMC) na glândula hipofisária. Uma vez na circulação periférica, o ACTH, induz a produção e liberação do cortisol a partir do córtex adrenal, os quais regulam o eixo HPA por retroalimentação negativa (adaptado de Rovaris et. al., 2015 *in press*)

### 1.3.1. Hormônio Liberador de Corticotropina (CRH)

O principal estímulo hipotalâmico do eixo HPA é o CRH, um peptídeo com 41 aminoácidos, caracterizado em 1981 por Wylie Vale (Vale et al., 1981), presente nos corpos de células nervosas próximo à divisão parvocelular do PVN, no hipotálamo, e em muitas outras partes do SNC, como córtex cerebral, amígdala, sistema límbico, cerebelo, locus ceruleus e neurônios da raiz dorsal da medula espinhal. Esses neurônios também projetam axônios para a eminência mediana e tronco cerebral (Majzoub, 2006). Assim, o CRH está



envolvido nas respostas hormonais, autonômicas e comportamentais ao estresse. O envolvimento do CRH na resposta comportamental ao estresse pode ser corroborado por estudos que avaliaram os níveis basais desse hormônio em pacientes com transtornos psiquiátricos e encontraram, por exemplo, altas concentrações de CRH no líquido cefalorraquidiano de pacientes com depressão (Banki et al., 1992).

O CRH exerce suas funções através da ativação de dois receptores ligados à proteína G (*G-protein-coupled receptors* ou GPCRs) denominados CRHR1 e CRHR2, os quais são codificados por diferentes genes, mas compartilham cerca de 70% de aminoácidos, diferindo nos seus domínios de ligação N-terminal (Bale and Vale, 2004; Grammatopoulos and Chrousos, 2002). Esses receptores possuem diferentes localizações, e assim, exercem funções distintas. O receptor CRHR2 possui maior expressão em tecidos periféricos e, no cérebro, é encontrado principalmente no núcleo supraóptico, hipotálamo ventral-medial, amígdala e plexo coroide. Já o CRHR1 é expresso no hipotálamo, córtex, cerebelo, hipófise, amígdala e núcleo accumbens (Laryea et al., 2012) e possui variantes resultantes de *splicing* alternativo (isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$ , c-n) que podem ocasionar diferenças nas ligações ou nas propriedades de sinalização desse receptor (Zmijewski and Slominski, 2010). CRHR1 $\alpha$ , que em humanos é a isoforma predominantemente expressa, é composta por 415 aminoácidos ao qual o CRH se liga com alta afinidade (Suda et al., 2004).

A ativação do CRHR1 exerce função importante ao mediar a resposta ao estresse e o comportamento relacionado à ansiedade (Müller et al., 2003; Timpl et al., 1998), enquanto que a ativação do CRHR2 tem demonstrado exercer efeitos contrários àqueles induzidos pelo estresse, como diminuição da pressão sanguínea, vasodilatação, entre outros (Suda et al., 2004).

### 1.3.2. Arginina Vasopressina (AVP)

O AVP, também conhecido como hormônio antidiurético, é um peptídeo com 9 aminoácidos, sintetizado no PVN e no núcleo supraóptico. Esse hormônio age potencializando o CRH no controle da liberação de ACTH, estando também envolvido em outros processos fisiológicos regulatórios, incluindo absorção renal de água, homeostase cardiovascular e modulação do comportamento social (Holsboer and Ising, 2010; Koshimizu et al., 2012).

Além de o AVP, assim como o CRH, ter suas concentrações elevadas em situações de estresse agudo, já foi demonstrado aumento nos níveis plasmáticos basais desse hormônio em pacientes com depressão em comparação com indivíduos saudáveis (van Londen et al., 1997).

Os efeitos do AVP são mediados por três receptores pertencentes à família dos GPCRs: receptor de AVP do subtipo 1A (AVPR1A), AVPR1B e receptor de AVP 2 (AVPR2) (Birnbaumer, 2000). Em relação ao seu papel regulatório sobre eixo HPA, o AVP age através da ativação do AVPR1B, regulando a liberação de ACTH. Já a ativação do AVPR1A influencia o sistema cardiovascular através da regulação do tônus dos vasos sanguíneos e através do AVPR2, o AVP exerce atividades antidiuréticas e controla a permeabilidade da água nos rins (Pisipati and Hashim, 2011).

O AVPR1B é uma proteína composta por 424 aminoácidos pertencente à classe dos GPCRs. Esse receptor é expresso na medula adrenal (Grazzini et al., 1996), na maioria das células corticotróficas pituitárias e outras regiões do cérebro (Lolait et al., 1995).

#### **1.4. Genes envolvidos no sistema de resposta ao estresse**

Estudos que avaliam a possível associação de polimorfismos em genes que codificam componentes do eixo HPA com transtornos psiquiátricos têm sido bastante frequentes na literatura, como por exemplo, investigações envolvendo transtorno do pânico (Ishitobi et al., 2012; Smoller et al., 2005), TDAH (Fortier et al., 2013; Van West et al., 2009), depressão (Papiol et al., 2007; Van West et al., 2004) e alcoolismo (Ribbe et al., 2011; Treutlein et al., 2006). Por exercerem funções críticas no funcionamento do eixo HPA, os principais genes estudados envolvem aqueles que codificam proteínas relacionadas à produção e ação do CRH: *CRH*, *CRHR1*, *CRHR2* e proteína de ligação do CRH (*CRHBP*); do ACTH: propiomielocortina (*POMC*) e receptor de melanocortina 2 (*MC2R*); e na ação do cortisol: receptor de glicocorticoide (*NR3C1*) e receptor de mineralocorticoide (*NR3C2*). Os genes que codificam proteínas envolvidas com o AVP: *AVP*, *AVPR1A*, *AVPR1B*, *AVPR2*, também têm sido muito estudados e podem possuir papel importante durante a resposta ao estresse (Beurel and Nemeroff, 2014).

##### *1.4.1. Gene CRHR1*

O gene que codifica a proteína CRHR1 está localizado no cromossomo 17q21.31 e contém 13 exons. Polimorfismos no gene *CRHR1* já foram associados a mudanças nos níveis

de componentes do eixo HPA, como por exemplo, do cortisol (Sheikh et al., 2013), sendo sugerido que a resposta ao estresse e o comportamento relacionado à ansiedade são mediados por esse receptor (Timpl et al., 1998). Estudos com variantes nesse gene também apoiam seu possível envolvimento na vulnerabilidade genética da depressão (Liu et al., 2006). Bradley *et al.* (2008), demonstraram associação de polimorfismos de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphisms* ou SNPs) individuais e de haplótipos no *CRHR1* com modificações na gravidade dos sintomas de depressão em adultos que sofreram abuso sexual, físico ou emocional moderados a severos quando crianças (Bradley et al., 2008). Além disso, polimorfismos nesse gene já foram associados com vários outros transtornos psiquiátricos, como por exemplo transtorno bipolar (Leszczynska-Rodziewicz et al., 2012), tentativa de suicídio (Ben-Efraim et al., 2011) e consumo de álcool (Treutlein et al., 2006; Blomeyer et al., 2008).

O SNP rs110402, localizado no íntron 2, é um dos mais estudados nesse gene e resulta na troca do nucleotídeo guanina por adenina, com funcionalidade desconhecida. Através da avaliação dos níveis de cortisol no teste de resposta a dexametasona, foi demonstrado que esse polimorfismo está relacionado com alterações na resposta ao estresse (Heim et al., 2009; Tyrka et al., 2009). Esse polimorfismo também já foi associado com modificações na vulnerabilidade à depressão (Hsu et al., 2012; Papiol et al., 2007) e ao desenvolvimento de alcoolismo em comorbidade com esquizofrenia (Ribbe et al., 2011).

Outro polimorfismo a ser destacado é o rs12944712, localizado no intron 1, que consiste na troca de uma guanina por uma adenina. Também não há estudos de funcionalidade para esse polimorfismo. No entanto, esse SNP tem sido relacionado com a variabilidade da resposta à agentes estressores, visto que parece contribuir para a modulação dos níveis de cortisol em resposta ao estresse (Sheikh et al., 2013). Também já foram relatados possíveis efeitos desse SNP no início e curso de transtorno de estresse pós-traumático em crianças (Amstadter et al., 2011) e em implicações negativas na saúde em longo prazo relacionadas com o abuso na infância e também com o estresse na vida adulta (Lessard and Holman, 2014).

O polimorfismo rs878886, caracterizado pela troca de uma citosina por uma guanina, apesar de não possuir estudos de funcionalidade, tem potencial relevância funcional por estar localizado na região 3' do gene *CRHR1*, tendo assim, possível capacidade de alterar a eficiência da tradução. Já foram relatados efeitos significativos desse SNP sobre o transtorno

do pânico (Keck et al., 2008) e na regulação da aquisição do medo, medido por um teste que avalia respostas condicionadas ao medo (Heitland et al., 2013).

De maneira geral, as variantes do gene *CRHRI* parecem exercer funções importantes sobre fenótipos que envolvem a ativação do eixo HPA, como transtornos depressivos e de ansiedade (Binder and Nemeroff, 2010). No entanto, variantes genéticas específicas envolvidas na etiologia desses transtornos não são conhecidas e estudos de gene candidatos têm encontrado resultados inconsistentes (Ben-Efraim et al., 2013; Leszczyńska-Rodziewicz et al., 2013a; Treutlein et al., 2006; Zai et al., 2012).

#### 1.4.2. Gene *AVPR1B*

O gene que codifica o *AVPR1B* está localizado no cromossomo 1q32 e consiste de 2 exons. Esse receptor já foi relatado por influenciar as respostas pituitária e adrenal a alguns estímulos estressores, sendo essencial para uma resposta normal do ACTH durante o estresse crônico (Lolait et al., 2007). Assim, polimorfismos no gene *AVPR1B* podem influenciar as respostas do eixo HPA a diversos estímulos. Já foram reportadas associações significativas de variantes nesse gene em estudos envolvendo TDAH (Van West et al., 2009), transtorno do pânico (Keck et al., 2008), tentativa de suicídio caracterizada por sintomas depressivos (Ben-Efraim et al., 2013), TDM e transtorno bipolar (Dempster et al., 2007).

Uma peculiaridade interessante envolvendo o gene *AVPR1B*, é a possibilidade de que ele venha sofrendo seleção balanceadora em populações africanas e europeias (inferência obtida a partir da análise do exon 2 deste gene, onde localiza-se o rs28632197). Além disso, dentre os possíveis alvos de seleção neste exon, SNPs localizados na região 3'UTR representam possíveis candidatos, embora variantes adicionais como o rs28632197 podem ter sofrido alguma pressão seletiva também (Cagliani et al., 2009). Essa observação pode oferecer suporte à hipótese frequentemente debatida na literatura científica de que fenótipos relacionados com a depressão tenham exercido um papel adaptativo durante a evolução humana (Nesse, 2000).

O polimorfismo rs28632197, localizado no exon 2, consiste na substituição de uma guanina por uma adenina, resultando na troca do aminoácido arginina para histidina na posição 364 da proteína. Esse SNP possui potencial relevância funcional, pois a troca de aminoácidos ocorre no domínio intracelular C-terminal do receptor, uma região possivelmente envolvida no acoplamento da proteína G. Apesar de possuir um provável papel funcional este

polimorfismo foi previamente associado somente com transtorno do pânico (Keck et al., 2008).

### 1.5. Interações gene-gene

Considerando a natureza multifatorial dos transtornos psiquiátricos e o pequeno tamanho de efeito das variantes genéticas, a identificação dos efeitos de cada fator isoladamente sobre determinado fenótipo torna-se difícil. Por isso, cada vez mais, estudos que abrangem interações gene-gene e gene-ambiente vêm ganhando importância para que seja possível a detecção de efeitos que testes de locus únicos não são capazes de identificar (Cordell, 2009).

Utilizando a abordagem de análises de interações gene-gene, foi relatado um efeito de interação entre os genes que codificam os receptores de dopamina D2 e D4 sobre a dependência de álcool (Mota et al., 2012). Esse estudo baseou-se em evidências prévias da literatura de que esses receptores formam diferentes padrões de heterodímeros de acordo com a presença de polimorfismos frequentemente avaliados em fenótipos psiquiátricos (Borrotto-Escuela et al., 2011; González et al., 2011). Isso apoia a ideia de que o conhecimento e entendimento de mecanismos fisiológicos pode ser uma ferramenta promissora para a investigação de possíveis efeitos epistáticos, que poderão esclarecer influências genéticas importantes para o sistema de resposta ao estresse.

Em relação ao eixo HPA, foi encontrada uma interação entre os genes que codificam receptores de glicocorticoides e mineralocorticoides (GR e MR), sobre a susceptibilidade à dependência de nicotina, o que é consistente com as evidências de que esses receptores interagem fisicamente e formam diferentes padrões de heterodímeros de acordo com a expressão da isoforma GR-beta, a qual é modificada por variações genéticas (Rovaris et al., 2013b). Outro estudo recente, avaliando níveis de reatividade do cortisol, também encontrou efeitos epistáticos entre os genes *CRH* e *CRHR1* (Sheikh et al., 2013)

Ao analisar interação entre os genes *CRHR1* e *AVPR1B*, um estudo encontrou efeito significativo de interação de um modelo de quatro locus envolvendo os polimorfismos rs28536160 e rs28373064 do *AVPR1B* e rs4076452 e rs110402 do *CRHR1* sobre a susceptibilidade ao TDM (Szczepankiewicz et al., 2013). Keck *et al* (2008) também testaram efeitos de combinação desses dois genes em indivíduos com transtorno do pânico. Um relato interessante desse estudo é que quatro indivíduos com transtorno do pânico, que são

portadores do alelo de risco G para o rs878886 no gene *CRHR1*, possuem também o genótipo de risco AA do rs28632197 no gene *AVPR1b*, enquanto que na amostra controle esse perfil não foi encontrado para nenhum indivíduo. Essa observação também sugere um possível efeito de interação em nível genético.

Em conjunto, esses resultados podem estar refletindo o efeito das variações genéticas sobre a ação dos receptores CRHR1 e AVPR1B, considerando que há evidências que o sinergismo entre esses receptores envolve a formação de heterodímeros (Young et al., 2007; Murat et al., 2012). Dessa forma, é plausível que polimorfismos que modificam as propriedades de heterodimerização dessas proteínas possam ser importantes candidatos para investigação em estudos de interações gene-gene.

### **1.6. Mecanismos envolvidos na formação de heterodímeros**

Os sítios que podem estar envolvidos na interação entre duas GPCRs são as alças extracelulares e intracelulares, as hélices transmembrana e as porções C- e N-terminais, os quais podem interagir por dois mecanismos básicos de dimerização: dímeros de contato ou dímeros de domínio trocado (*domain-swapped dimers*). A dimerização por contato é o processo mais comum e refere-se à interação das superfícies moleculares em sítios específicos, sem alteração relevante da conformação da estrutura proteica. O outro tipo de dimerização é um mecanismo que resulta em grande mudança conformacional, na qual uma parte (domínio) de uma das proteínas é substituída pelo domínio correspondente da outra proteína (Fuxe et al., 2012; Rousseau et al., 2012).

No que diz respeito aos receptores CRHR1 e AVPR1B, a formação de heterodímeros entre eles acima mencionada foi demonstrada por estudos experimentais utilizando as técnicas de transferência de energia de bioluminescência por ressonância (BRET) e de coimunoprecipitação (Young et al., 2007; Murat et al., 2012). Young et al. (2007) sugerem que a formação dos dímeros ocorre durante a síntese da proteínas, no retículo endoplasmático. A hipótese da necessidade de interação física entre esses receptores, que são coexpressos na hipófise, foi levantada por esses autores com base em evidências de cooperação funcional dos efeitos do CRH e AVP. Já foi demonstrado, por exemplo, que a eliminação de células responsivas ao CRH induzida por citotoxina previne o efeito estimulador do AVP no mRNA da POMC, mas não a capacidade do AVP em estimular a secreção do ACTH (van de Pavert et al., 1997). Outra informação relevante é que quando analisados por Western Blot na hipófise

de ratos, ambos os receptores apresentam peso molecular maior do que o predito, apoiando a hipótese de que esses receptores possam se apresentar na forma de complexos proteicos. Além disso, várias evidências demonstram que GCPRs são mais prevalentes na forma de dímeros do que como monômeros (Kroeger et al., 2005). Considerando os achados dos dois estudos experimentais realizados que demonstraram que os receptores CRHR1 e ABPR1B formam heterodímeros, conclui-se que as ações sinérgicas do CRH e AVP, além de parecer serem influenciadas por mecanismos envolvendo segundos mensageiros, também depende dessa interação física entre os seus receptores na hipófise. Essa heterodimerização não parece influenciar a propriedades de ligação dos receptores e as implicações fisiológicas desse processo ainda precisam ser investigadas (Young et al., 2007; Murat et al., 2012).

Para prever as interfaces dessa formação de dímeros e oligômeros, ferramentas de bioinformática podem ser utilizadas, considerando que as proteínas são evolutivamente relacionadas e podem apresentar características estruturais e funcionais semelhantes (Reggio, 2008).

A análise da desordem proteica, que consiste na falta de estabilidade de estruturas terciárias e/ou secundárias, tem demonstrado ser um ponto importante a ser avaliado nesse sentido (Guo et al., 2008). A desordem localizada na alça intracelular 3, o domínio C-terminal (Fuxe et al., 2012) e os domínios das hélices transmembrana (Filizola and Weinstein, 2005) têm sido considerados sítios importantes para as interações entre GPCRs .

As forças eletrostáticas existentes entre os aminoácidos também podem modificar a habilidade de interação entre as GPCRs, portanto, uma troca de aminoácidos pode aumentar ou reduzir a estabilidade e a habilidade de interagir das proteínas durante a formação dos heterodímeros (Fuxe et al., 2012). Dessa forma, se ocorrerem fosforilações durante a formação de heterodímeros, processo que confere carga negativa aos aminoácidos, poderá haver mudanças conformacionais que afetem a atividade e afinidade de ligação dos receptores envolvidos na heterodimerização, devido ao efeito repulsivo gerado pela carga negativa adquirida. A fosforilação ocorre predominantemente em regiões das proteínas intrinsecamente desordenadas (Woods and Jackson, 2013).

Métodos computacionais para identificar as interfaces das interações entre proteínas podem ser baseados em critérios de seleção e pesquisas exaustivas dos sítios de interação, se a informação estrutural está disponível. Se esse conhecimento não for possível, os métodos podem se basear nas informações das sequências e do genoma para prever possíveis regiões

envolvidas nessas interações e resíduos importantes funcionalmente, como os envolvidos nos sinais de transdução e na interação das GCPRs com proteínas G relacionadas (Filizola and Weinstein, 2005).

Embora os métodos computacionais possuam algumas limitações a serem consideradas (Dixon, 1997; Valencia and Pazos, 2002), as ferramentas de bioinformática baseadas em informações sobre as proteínas são úteis para auxiliar na identificação das interfaces da interação durante a formação de heterodímeros entre GPCRs.

Dessa forma, a utilização de ferramentas de bioinformática em combinação com informações sobre a funcionalidade ou outras evidências importantes da literatura em relação aos efeitos dos SNPs sobre transtornos psiquiátricos, pode contribuir significativamente para a escolha guiada por hipóteses de polimorfismos potencialmente envolvidos em interações gene-gene que estejam influenciando tais transtornos.



**CAPÍTULO II**  
**JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS**

---

## 2.1 Justificativa

Os transtornos depressivos afetam uma parcela significativa da população geral e muitas vezes, estão presentes em comorbidade com outros transtornos psiquiátricos, como TDAH e TUS. O risco associado a eles apresenta um forte componente genético e há um grande esforço de pesquisadores na busca de variantes genéticas que contribuam de forma significativa para a susceptibilidade a tais fenótipos. Nesse contexto, o eixo HPA pode ser considerado como de importância óbvia, por mediar toda a resposta fisiológica e emocional ao estresse, elemento essencial na saúde mental. Mais especificamente, devido às funções críticas dos sistemas CRH e AVP na resposta ao estresse, a investigação do papel de polimorfismos em genes que codificam seus componentes é fundamental para o entendimento da etiologia de transtornos psiquiátricos.

No entanto, os estudos realizados até o momento são incapazes de fornecer evidências robustas de influências genéticas diretas. Isso acontece devido à complexidade desses transtornos que são influenciados por uma gama de fatores ambientais e genéticos, e por isso, a contribuição de cada um é muito pequena, tornando difícil a identificação de efeitos isolados replicáveis.

Essa realidade evidencia a necessidade de pesquisas que avaliem interações gene-ambiente e gene-gene, principalmente testando interações genéticas com base em evidências prévias da literatura, para que seja possível um entendimento mais completo da etiologia dos transtornos e dos fatores que influenciam sua susceptibilidade. Todavia, ainda são escassos, no contexto dos estudos genéticos, as avaliações de interações gene-gene possivelmente implicadas no eixo HPA, e suas influências sobre características fenotípicas de transtornos psiquiátricos.

Outra abordagem promissora é a consideração do perfil psiquiátrico e do gênero dos indivíduos nas análises. As diferenças biológicas interindividuais podem levar a respostas ao estresse distintas, sendo assim, esses parâmetros podem modular a influência genética sobre os transtornos psiquiátricos. Essa hipótese é plausível considerando a desigualdade da incidência e gravidade dos sintomas encontrada entre os diferentes fenótipos. Além disso, os efeitos de algumas variantes no gene *CRHR1* sobre a depressão parecem ser específicos de acordo com o gênero.

Dessa forma, aprofundar o conhecimento em relação ao componente genético da depressão através de uma abordagem mais completa pode levar a resultados mais

consistentes, contribuindo para a prevenção do transtorno e para o desenvolvimento de novos tratamentos mais eficazes.

## 2.2 Objetivo Geral

Investigar os efeitos de polimorfismos nos genes *CRHR1* e *AVPR1B* sobre o TDM em amostras clínicas de transtornos psiquiátricos e na população geral.

## 2.3 Objetivos Específicos

I. Avaliar os efeitos principais dos SNPs rs12944712, rs110402 e rs878886 no gene *CRHR1* e do rs28632197 no gene *AVPR1B* sobre o TDM na população geral, em indivíduos com TDAH e em dependentes de álcool e de crack/cocaína.

II. Avaliar a influência de haplótipos formados pelos SNPs do *CRHR1* sobre o TDM em todas as amostras.

III. Testar a possibilidade de interações entre SNPs nos dois genes e seus efeitos sobre o TDM em todas as amostras.

IV. Além das análises considerando os diferentes grupos amostrais de acordo com o perfil psiquiátrico, avaliar os indivíduos agrupando-os de acordo com o gênero para a amostra clínica de pacientes com TDAH e para a população geral, que são compostas por indivíduos de ambos os gêneros.

**CAPÍTULO III**  
**ARTIGO**  
**EM PREPARAÇÃO**

---

Original Article

## Comorbidity and gender modulate the effect of *CRHR1* and *AVPR1B* polymorphisms on major depressive disorder

Bruna S. da Silva<sup>a</sup>, Diego L. Rovaris<sup>a</sup>, Jaqueline B. Schuch<sup>a</sup>, Angelita P. Aroche<sup>a</sup>, Nina R. Mota<sup>a</sup>, Renata B. Cupertino<sup>a</sup>, Guilherme P. Bertuzzi<sup>a</sup>, Rafael G. Karam<sup>b</sup>, Eduardo S. Vitola<sup>b</sup>, Thiago W. Viola<sup>c</sup>, Rodrigo Grassi-Oliveira<sup>c</sup>, Luis A. Rohde<sup>b,d,e</sup>, Luciana Tovo-Rodrigues<sup>f</sup>, Eugenio H. Grevet<sup>b,d</sup> and Claiton H. D. Bau<sup>a,b</sup>.

### Author affiliations:

<sup>a</sup>Department of Genetics, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

<sup>b</sup>ADHD Outpatient Program, Adult Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil;

<sup>c</sup>Centre for Traumatic Stress Studies and Research (NEPTE), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brazil;

<sup>d</sup>Department of Psychiatry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

<sup>e</sup>Institute of Developmental Psychiatry for Children and Adolescents, Sao Paulo, Brazil.

<sup>f</sup>Centre of Emidemiological Research, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brazil.

### Correspondence to:

Dr. Claiton H. D. Bau, Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UFRGS, CEP: 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil. Caixa Postal: 15053. Telephone: (5551) 3308-6718; Fax: (5551) 3308-7311.

Email: [claiton.bau@ufrgs.br](mailto:claiton.bau@ufrgs.br)

### Role of funding source

This work was supported by the following funding sources: CNPq, CAPES and FAPERGS.

### Conflict of interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

### Acknowledgements

There are no acknowledgements.

## Abstract

*Background:* There is evidence implicating *AVPR1B* and *CRHR1* genes in stress response and Major Depressive Disorder (MDD). This study aims to investigate the effects of genetic variations in these genes on the susceptibility to MDD, accounting for comorbidity and gender profiles.

*Methods:* This study included 1462 unrelated Brazilian adult subjects: 555 patients with Attention Deficit-Hyperactivity Disorder (301 males), 629 individuals from general population (312 males), 136 alcohol dependent males and 142 crack/cocaine addicted females. MDD was evaluated using the Structured Clinical Interviews for Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV) in all samples except in crack/cocaine addicts that were evaluated with the Beck Depression Inventory-II.

*Results:* The most consistent finding of this study involves the role of *CRHR1* rs110402 and rs878886 SNPs on MDD susceptibility in the general population sample. Significant haplotype findings as well as an interaction between *CRHR1* rs878886 and *AVPR1B* rs28632197 on the risk of MDD were observed among males from the general population sample. *AVPR1B* rs28632197 was associated with MDD in the sample of patients with alcohol dependence.

*Limitations:* The main limitations of this study are the small sample size (especially for the substance use disorders evaluated), the lack of information on functionality of SNPs on the investigated genes and the possibility of false-positive results due to multiple tests.

*Conclusions:* These findings are consistent with previous evidence on the role of *CRHR1* and *AVPR1B* genes on the pathophysiology of MDD. In addition, they suggest that this influence may be modulated by comorbidity and gender profiles.

*Key-words:* Depression, Mood disorders, stress related genes, epistasis

## 1. Introduction

Major Depressive Disorder (MDD) is a common severe mental illness characterized by prominent emotion dysregulation, low mood, poor affect, and/or anhedonia, as well as cognitive and physiological symptoms. The prevalence of MDD in general population is around 7-11% (Kessler et al., 2007), but in women it is considerably more common and more severe than in men (Kornstein et al., 2000). MDD is frequently associated with other psychiatric disorders and its prevalence rises to 24% in subjects with substance use disorders (Kessler et al., 2003) and to 39% in adults with Attention Deficit-Hyperactivity Disorder (ADHD) (Kessler et al., 2005).

The main hypothesis about the pathogenesis of MDD involves the hyperactivity of the hypothalamus–pituitary–adrenal (HPA) axis, one of the most studied stress systems (Wardenaar et al., 2011). This axis is also dysregulated in other psychiatric disorders, such as ADHD (Isaksson et al., 2012), alcohol dependence (Boschloo et al., 2011) and cocaine addiction (Sinha, 2008).

The HPA axis is activated in response to stressors, as physical and psychological conditions. Its main activation pathway is the stimulation of adrenocorticotropin (ACTH) secretion through the synergistic action of the corticotropin-releasing hormone (CRH) signaling via CRH receptor-1 (CRHR1) and the arginine vasopressin (AVP) signaling via AVP receptor-1B (AVPR1B), resulting in cortisol release in the adrenal cortex (Bonfiglio et al., 2011).

Considering their major activities in stress response, the involvement of both systems (AVP and CRH) on stress-related disorders seems to be evident. Animal studies demonstrated that elevated levels of CRH leads to increased anxiety behavior (Jones et al., 1998; Zorrilla et al., 2002) and that *Crhr1*-knockout mice present reduced stress-induced release of ACTH and corticosterone (cortisol, in humans), as well as less pronounced anxiety-related behavior than wild-type mice (Timpl et al., 1998). Actually, the CRH system, which is considered the main regulator of the physiological response to stress, had already been demonstrated to be involved in the pathophysiology of anxiety and depression (Binder and Nemeroff, 2010). The evidences that this system may exert outstanding functions in depression pathophysiology is not surprising, since increased cerebrospinal fluid levels of CRH are observed in this condition (Banki et al., 1992).



The potential role of the AVP system in affective disorders and behavior was first proposed by Gold et al. (1978). Based on animal studies, they postulated that AVP deficiency is involved in some functions that are altered in affective disorders, such as pain sensitivity and memory processes (Gold et al., 1978). Posterior animal (Yang et al., 2012) and clinical studies (Scott and Dinan, 2002) also supported a role of this system in anxiety disorders. Knockout model studies showed an involvement of the AVP receptor in stress response. *Avpr1b* disruption resulted in decreased release of ACTH and corticosterone after exposition to intoxicating doses of ethanol (Lolait et al., 2007) and antidepressant treatment (Stewart et al., 2008) when compared to controls.

Owing to the critical functions of the systems above, there are several investigations evaluating the role of genes codifying its components in mental disorders (Ebstein et al., 2012; Laryea et al., 2012). This possible involvement is consistent with the hypothesis that genetic variants in such genes may lead to individual differences in response to external stressors and consequently influence the susceptibility to stress-related disorders, such as MDD. In this context, the role of *CRHR1* and *AVPR1B* genes and their interactions are plausible considering the pathophysiology of MDD. The high basal levels of CRH and AVP found in MDD patients (Banki et al., 1992; van Londen et al., 1997) possibly leads to downregulation of its major receptors in the pituitary gland: *CRHR1* and *AVPR1B*, respectively. For *CRHR1*, postmortem studies support this hypothesis, since they have shown decreased CRH binding and levels of *CRHR1* mRNA in depressed suicide victims (Merali et al., 2004).

The *CRHR1* gene is located on chromosome 17q21.31 and contains 13 exons. *CRHR1* polymorphisms were already associated with altered levels of cortisol (Sheikh et al., 2013), alcohol dependence susceptibility (Ribbe et al., 2011), involvement in the etiology of panic disorder (Keck et al., 2008), bipolar disorder (Leszczyńska-Rodziewicz et al., 2012), posttraumatic stress disorder (Amstadter et al., 2011), MDD and severity of depressive symptoms (Bradley et al., 2008; Hsu et al., 2012; Papiol et al., 2007). The *AVPR1B* gene is located in chromosome 1q32 and contains 2 exons. Significant associations of polymorphisms in this gene were reported in studies involving unipolar and bipolar depressive disorders (Dempster et al., 2007), ADHD (Van West et al., 2009), panic disorder (Keck et al., 2008) and suicide attempts (Ben-Efraim et al., 2013).

Based on such evidences suggesting the involvement of CRH and AVP systems in depressive disorders, this study aims to investigate the effects of genetic variations in *CRHR1* and *AVPR1B* genes on the susceptibility to MDD. Patients were ascertained from the general population and from clinical samples of ADHD, alcohol dependence and crack/cocaine addiction. The clinical samples were included due the high prevalence of MDD in these individuals. In addition to the analysis of single markers, we also investigate possible effects of haplotypes within *CRHR1* gene and interactions between these genes on MDD.

## **2. Methods and Materials**

### *2.1. Subjects*

This study included a total of 1462 unrelated Brazilian adult subjects: 555 patients with ADHD (301 males) from the ADHD Outpatient Program at the *Hospital de Clínicas de Porto Alegre*; 629 individuals (312 males) from general population recruited in the blood donation center at the same hospital; and 142 crack/cocaine addicted females and 136 alcohol dependent males admitted to two different inpatient detoxification programs at *Hospital Espírita de Porto Alegre*.

The MDD diagnosis followed the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV) criteria (APA, 1994). The instruments applied were the Structured Clinical Interview for DSM-IV (SCID-IV-R - First et al., 1998 - for the sample of patients with ADHD and the screening module SCIDI/P - First et al., 2002 - for the general population sample), and the Semi-Structured Assessment for the Genetics in Alcoholism (SSAGA) (Bucholz et al., 1994) for the sample of patients with alcohol dependence. The sample of patients with crack/cocaine addiction was evaluated with the Beck Depression Inventory-II (BDI-II). BDI scores were classified according to guidelines that suggest interpreting them as follow: minimal range 0–13, mild depression 14–19, moderate depression 20–28, and severe depression 29–63. More detailed diagnostic procedures and inclusion/exclusion criteria for each group were described elsewhere (Contini et al., 2012; Polina et al., 2014; Silva et al., 2014; Viola et al., 2014).

The project was carried out in accordance with the Declaration of Helsinki. All subjects signed an informed consent form that was previously approved by the Research Ethics Committees of the participating institutions.

## 2.2. *Laboratory Methods*

DNA was extracted from peripheral blood by the salting out method (Lahiri and Nurnberger Jr, 1991). Four polymorphisms were analyzed in this study: three in the *CRHR1* gene (rs12944712, rs110402 and rs878886) and one in the *AVPR1B* gene (rs28632197). All polymorphisms were genotyped using TaqMan SNP genotyping assays (C\_31806052\_10, C\_2544843\_10, C\_7450783\_10, C\_1845024\_20, respectively) according to the manufacture's recommended protocol (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Deviation from Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) was observed for the *AVPR1B* rs28632197 ( $P < 0.05$ ). For this SNP, homozygosis for the rare allele was not found. A similar finding was reported by Szczepankiewicz et al. (2013). Genotyping error rates for all the SNPs were less than 1%.

## 2.3. *SNPs selection*

SNPs were selected based on fulfillment of at least two of the following criteria: minor allele frequencies higher than 10%; possible functional role; evidence of interference in protein interaction properties; and previous associations with psychiatric disorders. The *AVPR1B* rs28632197 was selected considering its feasible role in modifying the protein interaction properties. This is a non-synonymous polymorphism that leads to an arginine to histidine exchange on the intracellular C-terminal domain of the receptor. This is a highly disordered region – according the analysis performed using the PONDR-FIT program (Xue et al., 2010) - and therefore it is prone to interact with other proteins (Fuxe et al., 2012). In addition, the amino acid exchange occurs in a positively charged domain (arginine sequence) with high ability to interact with negative charged regions (Fuxe et al., 2012). Thus, we raised the hypothesis that this region is involved in the *CRHR1* and *AVPR1B* receptors heterodimerization that was demonstrated in experimental studies and probably also occurs in native tissues (Murat et al., 2012). Consequently, such amino acid exchange could reduce the stability and ability of the receptor to interact with other proteins by modifying the heterodimerization process. *CRHR1* SNPs did not present evidence for interference in interaction properties and were selected based solely on their allele frequencies and previous associations with psychiatric disorders. Besides, rs878886 is located in a regulatory region of the *CRHR1* gene and may have a functional role.

#### 2.4. Statistical analysis

Logistic regression were used to evaluate the effects of individual SNPs on MDD in all samples. The crack/cocaine addicts sample was divided in two groups according to the BDI scores: one containing individuals who scored up to 28 points (minimal to moderate depression) and other including those that scored more than 28 points (severe depression). The above analysis was performed using PLINK v1.07 program - <http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/> - (Purcell et al., 2007), as well as the linkage disequilibrium and haplotype analyses (sliding window procedure) for SNPs in *CRHR1* gene.

Using the software IBM SPSS Statistics v18.0, Fisher's exact test was performed to evaluate potential interaction effects between *CRHR1* and *AVPR1b* polymorphisms on the susceptibility to MDD. For these analyses, we created three interaction terms, including the *AVPR1B* SNP and one *CRHR1* SNP per term. For all individuals each interaction term was coded in four categories according to the combination of the genotypes.

Regarding the multiple testing, Bonferroni correction was applied for the gene-gene interaction analyses and the 10,000-permutation procedure for main effects and haplotypes analyses.

### 3. Results

The sample characteristics are listed in Table 1. Minor allele frequencies (MAF) for the SNPs tested can be found in the Supplementary Table 1.

#### 3.1. Single marker association analysis

All SNPs were individually tested for association with MDD within each sample. The distribution of genotypes and the single marker association analysis in the general population and in patients with ADHD including both genders are depicted in Table 2. The genotypic frequencies of *CRHR1* rs12944712 were nominally associated with MDD in the sample of patients with ADHD ( $P = 0.027$ , after 10,000 permutations  $P = 0.160$ ). An additional analysis comparing allele-carriers to non-carriers in this sample showed a significant association even after 10,000 permutations ( $P = 0.030$ ), in which individuals with MDD are more frequently G carriers than those without MDD. A nominally significant allelic association between the *CRHR1* rs878886 and MDD was observed among the general population ( $P = 0.047$ , after 10,000 permutations  $P = 0.147$ ).

Table 3 shows the results for all males included in this study (males from the general population and ADHD samples and the entire alcohol sample that is composed exclusively by males). Nominal associations of *CRHRI* rs878886 with MDD were observed in males from the general population in both allelic and genotypic comparisons ( $P = 0.016$  and  $P = 0.017$ , respectively). These associations do not remain significant after 10,000 permutations ( $P = 0.590$  and  $P = 0.051$ , respectively). For the *AVPR1B* rs28632197, an allelic association with MDD was observed among alcohol dependents ( $P = 0.012$ , after 10,000 permutations  $P = 0.038$ ). No significant associations between the tested SNPs and MDD were found among males with ADHD.

The results of the association analysis among females are presented in Table 4 (females from the general population and ADHD samples and the entire crack/cocaine sample that is composed exclusively by females). *CRHRI* rs110402 was nominally associated with MDD in females from the general population in both allelic and genotypic comparisons ( $P = 0.029$  and  $P = 0.013$ , respectively). These effects do not remain significant after 10,000 permutations ( $P = 0.088$  and  $P = 0.155$ , respectively). In females with ADHD and crack/cocaine addicts, no significant results were found.

### 3.2. *Linkage disequilibrium and haplotype analysis*

Strong linkage disequilibrium was found for all SNPs in *CRHRI* gene included in this study ( $D'$  ranged from 0.96 to 1.00) (Supplementary Table 2). In the global haplotype analyses, when we include both genders for the general population and ADHD samples, no significant associations were found between the *CRHRI* SNPs and MDD (Supplementary Table 3). Performing this analyses grouping the individuals by gender, an influence of haplotypes comprising the rs110402-rs878886 window on MDD was demonstrated in males from the general population (Global  $P$ -value = 0.018, after 10,000 permutations  $P = 0.027$ ). Individual haplotype analysis for this association showed a risk effect of the GG haplotype on MDD for these individuals ( $P = 0.009$ , after 10,000 permutations  $P = 0.041$ , OR = 1.750). No significant results were found in the haplotype analysis in women from any group and in men with ADHD and alcohol dependents (Table 5).

### 3.3. Gene-gene interaction analysis

The analyses of gene-gene interactions including both genders for the general population and patients with ADHD did not reveal effects of the tested interaction terms on MDD (Supplementary Table 4). However, when we divided the samples by gender, we observed a significant effect of the rs28632197-rs878886 interaction term on MDD in males from the general population ( $P = 0.011$ , after Bonferroni correction  $P = 0.033$ ). The results for the gene-gene interaction analysis among males is shown in Table 6. Additionally, also among males, the rs28632197-rs12944712 and rs28632197-rs110402 interaction terms were nominally associated with MDD in the sample of alcohol dependents ( $P = 0.050$  and  $P = 0.041$ , respectively). However, these associations do not remain significant after Bonferroni correction ( $P = 0.150$  and  $P = 0.123$ , respectively). No interaction effects on MDD was observed in females (Supplementary Table 5).

## 4. Discussion

Our results suggest that *CRHR1* and *AVPR1B* genes may exert important roles on the susceptibility to MDD. The most consistent finding in this study involves the role of *CRHR1* rs110402 and rs878886 in MDD susceptibility in the general population sample, especially among males. Haplotype analyses involving these SNPs revealed a significant association with MDD among males from the general population. Additionally, the interaction term involving *CRHR1* rs878886 and *AVPR1B* rs28632197 was associated with MDD in the same subgroup. Other promising finding to be replicated in future studies includes the association between *AVPR1B* rs28632197 and MDD in alcohol dependents. Overall, our results are in line with several previous reports showing associations of *CRHR1* and *AVPR1B* SNPs in mood and anxiety disorders (Heitland et al., 2013; Keck et al., 2008; Wasserman et al., 2010).

Since comorbidity and gender differences are well reported in MDD incidence and symptom severity (Seney and Sibille, 2014) and considering reported hypothesis that the effects of *CRHR1* variation on depression may be sex-specific (Heim et al., 2009), we investigated the effects of individual SNPs and haplotypes on MDD separately considering subgroups according to these variables. Interestingly, most significant effects were observed in the general population, suggesting that the effect of these SNPs might be clearer in the absence of the additional psychiatric comorbidities. In addition, it is possible that gender differences related to hormonal levels, use of oral contraceptives or menstrual cycle variations

could affect the genetic association findings. Our findings suggest that there is a need for further studies splitting samples by presence or not of comorbidities and gender.

On the other hand, the present findings also suggest shared genetic effects of *CRHR1* in males and females. For example, the haplotype window comprising *CRHR1* rs110402 and rs878886, which was significantly associated with MDD in males from the general population, also achieved borderline significance among females ( $P = 0.052$ ). Indeed, this is consistent with previous studies suggesting the influence of rs110402 on MDD (Bradley et al., 2008; Papiol et al., 2007; Wasserman et al., 2009) and of rs878886 on panic disorder (Keck et al., 2008) and human fear acquisition - a behavioral aspect related to depression - (Heitland et al., 2013) in samples composed by both genders.

The association of *AVPR1B* rs28632197 with MDD among alcohol dependents is an additional male-limited finding that survives multiple comparison correction in our study. Interestingly, there is evidence for a key role for vasopressin V1b receptor signaling in the transition to ethanol dependence in rats (Edwards et al., 2012). This may be relevant considering the strong comorbidity between alcohol dependence and MDD. In humans, Keck et al. (2008), showed an effect of this SNP on the susceptibility to panic disorder in a sample including both genders.

Given the plausibility of the synergic actions of CRH and AVP systems, our study emphasized the search for epistatic interactions. The significant effect involving the rs28632197-rs878886 interaction term on MDD should be interpreted with caution, since the rs878886 was the most consistent finding in males from the general population. Thus, this association could be reflecting the strong effect of rs878886 and not the interaction influence. There is also a nominal association of the rs28632197-rs12944712 and rs28632197-rs110402 interaction terms with MDD in the alcohol dependence sample. For the last term, it is noteworthy that all individuals of this sample carrying the A-allele for the rs28632197 also carry the G-allele for the rs110402 and these subjects have increased risk of MDD. At least four sources of evidence justify this emphasis on gene-gene interactions: (1) the molecular interactions between the *AVPR1B* and *CRHR1* receptors mediate their synergic actions (Murat et al., 2012); (2) rs28632197 leads to an amino acid exchange located in an intracellular C-terminal domain of the receptor, a highly disordered region, prone to be an interaction domain (Fuxe et al., 2012) and possibly involved in G-protein coupling. Thus, the rs28632197 may have a potential role to alter the binding properties with *CRHR1*; (3) gene-

gene interactions between *CRHR1* and *AVPR1b* variants have been described as important predictors of MDD susceptibility (Szczepankiewicz et al., 2013); and (4) the most recent GWAS mega-analysis on MDD comprising almost 100.000 subjects was unable to identify robust evidences (Ripke et al., 2013) and gene-gene interactions can be useful to explain this missing heritability (Rovaris et al., 2013).

Considering the analysis including both genders, a nominal association was found in patients with ADHD, involving a protective effect of the AA genotype in *CRHR1* rs12944712 on MDD. This finding is in agreement with previous studies supporting protective effects of the minor allele on the onset and course of posttraumatic stress disorder in children (Amstadter et al., 2011) and on long-term negative health implication of experiencing both child abuse and adult stress (Lessard and Holman, 2014). Moreover, nominal association of the *CRHR1* rs878886 with MDD was also observed in the sample of general population.

It is interesting to mention that the crack/cocaine addicts sample was the only one that did not reach significant associations between the polymorphisms investigated and MDD. It is possible that the regulation of the HPA axis in these patients is such altered that does not allow the identification of the stress-related genes effects on MDD. However, one should note that the evaluation of depression in this sample was performed based on symptoms severity (BDI scores) and higher prevalence of the depression, mainly the severe form, was observed in these patients when compared to our other samples. It is also a factor that could be blunting the effects of the investigated polymorphisms and can be considered one limitation of our study.

Among the other limitations of the present study, we should mention the small sample size, mainly in the crack/cocaine and alcohol dependence samples. Nevertheless, we analyze four different groups of individuals comprising a large number of subjects in totality. Additionally, very little information is available on the functionality of SNPs of the investigated genes, precluding direct inferences on cause-effect relationships. Thus, we highlight the need for functional studies. Finally, although multiple testing correction was applied when necessary, the possibility of false-positive results should always be considered until consistent replications are obtained. In this sense, our findings should be replicated in additional studies with larger sample sizes, especially on the samples of substance use disorders.



In conclusion, our results support an involvement of *CRHR1* and *AVPR1B* genes on MDD that seems to be modulated by gender and comorbidity profile. Further studies on the genetics of the stress system and MDD should consider these variables.

## REFERENCES

- Amstadter, A.B., Nugent, N.R., Yang, B.-Z., Miller, A., Siburian, R., Moorjani, P., Haddad, S., Basu, A., Fagerness, J., Saxe, G., 2011. Corticotrophin-releasing hormone type 1 receptor gene (CRHR1) variants predict posttraumatic stress disorder onset and course in pediatric injury patients. *Disease markers* 30, 89-99.
- APA, A.P.A., 1994. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-IV). American Psychiatric Association.
- Banki, C.M., Karmacsi, L., Bissette, G., Nemeroff, C.B., 1992. Cerebrospinal fluid neuropeptides in mood disorder and dementia. *Journal of affective disorders* 25, 39-45.
- Ben-Efraim, Y.J., Wasserman, D., Wasserman, J., Sokolowski, M., 2013. Family-Based Study of AVPR1B Association and Interaction with Stressful Life Events on Depression and Anxiety in Suicide Attempts. *Neuropsychopharmacology* 38, 1504-1511.
- Binder, E.B., Nemeroff, C.B., 2010. The CRF system, stress, depression and anxiety—insights from human genetic studies. *Molecular psychiatry* 15, 574-588.
- Bonfiglio, J.J., Inda, C., Refojo, D., Holsboer, F., Arzt, E., Silberstein, S., 2011. The corticotropin-releasing hormone network and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: molecular and cellular mechanisms involved. *Neuroendocrinology* 94, 12-20.
- Boschloo, L., Vogelzangs, N., Licht, C.M., Vreeburg, S.A., Smit, J.H., van den Brink, W., Veltman, D.J., de Geus, E.J., Beekman, A.T., Penninx, B.W., 2011. Heavy alcohol use, rather than alcohol dependence, is associated with dysregulation of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis and the autonomic nervous system. *Drug and alcohol dependence* 116, 170-176.
- Bradley, R.G., Binder, E.B., Epstein, M.P., Tang, Y., Nair, H.P., Liu, W., Gillespie, C.F., Berg, T., Evces, M., Newport, D.J., 2008. Influence of child abuse on adult depression: moderation by the corticotropin-releasing hormone receptor gene. *Archives of general psychiatry* 65, 190.
- Bucholz, K.K., Cadoret, R., Cloninger, C.R., Dinwiddie, S.H., Hesselbrock, V.M., Nurnberger Jr, J.I., Reich, T., Schmidt, I., Schuckit, M.A., 1994. A new, semi-structured psychiatric interview for use in genetic linkage studies: a report on the reliability of the SSAGA. *Journal of Studies on Alcohol and Drugs* 55, 149.
- Contini, V., Bertuzzi, G.P., Polina, E.R., Hunemeier, T., Hendler, E.M., Hutz, M.H., Bau, C.H., 2012. A haplotype analysis is consistent with the role of functional HTR1B variants in alcohol dependence. *Drug and alcohol dependence* 122, 100-104.
- Dempster, E.L., Burcescu, I., Wigg, K., Kiss, E., Baji, I., Gadoros, J., Tamas, Z., Kennedy, J.L., Vetro, A., Kovacs, M., 2007. Evidence of an association between the vasopressin V1b receptor gene (AVPR1B) and childhood-onset mood disorders. *Archives of general psychiatry* 64, 1189-1195.

- Ebstein, R.P., Knafo, A., Mankuta, D., Chew, S.H., San Lai, P., 2012. The contributions of oxytocin and vasopressin pathway genes to human behavior. *Hormones and Behavior* 61, 359-379.
- Edwards, S., Guerrero, M., Ghoneim, O.M., Roberts, E., Koob, G.F., 2012. Evidence that vasopressin V1b receptors mediate the transition to excessive drinking in ethanol-dependent rats. *Addiction biology* 17, 76-85.
- First, M.B., Spitzer, R.L., Gibbon, M., Williams, J.B., 1998. Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders: Patient Edition (February 1996 Final), SCID-I/P. Biometrics Research Department, New York State Psychiatric Institute.
- First, M.B., Spitzer, R.L., Gibbon, M., Williams, J.B., 2002. Structured clinical interview for DSM-IV-TR axis I disorders, research version, patient edition. SCID-I/P.
- Fuxe, K., O Borroto-Escuela, D., Marcellino, D., Romero-Fernandez, W., Frankowska, M., Guidolin, D., Filip, M., Ferraro, L., Woods, A., Tarakanov, A., 2012. GPCR heteromers and their allosteric receptor-receptor interactions. *Current medicinal chemistry* 19, 356-363.
- Gold, P., Goodwin, F., Reus, V., 1978. Vasopressin in affective illness. *The Lancet* 311, 1233-1236.
- Heim, C., Bradley, B., Mletzko, T.C., Deveau, T.C., Musselman, D.L., Nemeroff, C.B., Ressler, K.J., Binder, E.B., 2009. Effect of childhood trauma on adult depression and neuroendocrine function: sex-specific moderation by CRH receptor 1 gene. *Frontiers in behavioral neuroscience* 3.
- Heitland, I., Groenink, L., Bijlsma, E.Y., Oosting, R.S., Baas, J.M., 2013. Human fear acquisition deficits in relation to genetic variants of the corticotropin releasing hormone receptor 1 and the serotonin transporter. *PloS one* 8, e63772.
- Hsu, D.T., Mickey, B.J., Langenecker, S.A., Heitzeg, M.M., Love, T.M., Wang, H., Kennedy, S.E., Peciña, M., Shafir, T., Hodgkinson, C.A., 2012. Variation in the corticotropin-releasing hormone receptor 1 (CRHR1) gene influences fMRI signal responses during emotional stimulus processing. *The Journal of Neuroscience* 32, 3253-3260.
- Isaksson, J., Nilsson, K.W., Nyberg, F., Hogmark, Å., Lindblad, F., 2012. Cortisol levels in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Journal of psychiatric research*.
- Jones, D.N., Kortekaas, R., Slade, P.D., Middlemiss, D.N., Hagan, J.J., 1998. The behavioural effects of corticotropin-releasing factor-related peptides in rats. *Psychopharmacology* 138, 124-132.
- Keck, M.E., Kern, N., Erhardt, A., Unschuld, P.G., Ising, M., Salyakina, D., Müller, M.B., Knorr, C.C., Lieb, R., Hohoff, C., 2008. Combined effects of exonic polymorphisms in CRHR1 and AVPR1B genes in a case/control study for panic disorder. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* 147, 1196-1204.

Kessler, R.C., Adler, L.A., Barkley, R., Biederman, J., Conners, C.K., Faraone, S.V., Greenhill, L.L., Jaeger, S., Secnik, K., Spencer, T., 2005. Patterns and predictors of ADHD persistence into adulthood: Results from the National Comorbidity Survey Replication. *Biological psychiatry* 57, 1442.

Kessler, R.C., Berglund, P., Demler, O., Jin, R., Koretz, D., Merikangas, K.R., Rush, A.J., Walters, E.E., Wang, P.S., 2003. The epidemiology of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). *Jama* 289, 3095-3105.

Kessler, R.C., Merikangas, K.R., Wang, P.S., 2007. Prevalence, comorbidity, and service utilization for mood disorders in the United States at the beginning of the twenty-first century. *Annu. Rev. Clin. Psychol.* 3, 137-158.

Kornstein, S.G., Schatzberg, A.F., Thase, M.E., Yonkers, K.A., McCullough, J.P., Keitner, G.I., Gelenberg, A.J., Ryan, C., Hess, A., Harrison, W., 2000. Gender differences in chronic major and double depression. *Journal of Affective disorders* 60, 1-11.

Lahiri, D.K., Nurnberger Jr, J.I., 1991. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic acids research* 19, 5444.

Laryea, G., Arnett, M.G., Muglia, L.J., 2012. Behavioral studies and genetic alterations in corticotropin-releasing hormone (CRH) neurocircuitry: insights into human psychiatric disorders. *Behavioral sciences* 2, 135-171.

Lessard, J., Holman, E.A., 2014. FKBP5 and CRHR1 polymorphisms moderate the stress-physical health association in a national sample. *Health Psychology* 33, 1046.

Leszczyńska-Rodziewicz, A., Szczepankiewicz, A., Dmistrzak-Węglarz, M., Skibińska, M., Hauser, J., 2012. Association between functional polymorphism of the AVPR1b gene and polymorphism rs1293651 of the CRHR1 gene and bipolar disorder with psychotic features. *Journal of affective disorders* 138, 490-493.

Lolait, S.J., Stewart, L.Q., Roper, J.A., Harrison, G., Jessop, D.S., Young, W.r., O'Carroll, A.M., 2007. Attenuated stress response to acute lipopolysaccharide challenge and ethanol administration in vasopressin V1b receptor knockout mice. *Journal of neuroendocrinology* 19, 543-551.

Merali, Z., Du, L., Hrdina, P., Palkovits, M., Faludi, G., Poulter, M.O., Anisman, H., 2004. Dysregulation in the suicide brain: mRNA expression of corticotropin-releasing hormone receptors and GABAA receptor subunits in frontal cortical brain region. *The Journal of neuroscience* 24, 1478-1485.

Murat, B., Devost, D., Andrés, M., Mion, J., Boulay, V., Corbani, M., Zingg, H.H., Guillon, G., 2012. V1b and CRHR1 receptor heterodimerization mediates synergistic biological actions of vasopressin and CRH. *Molecular Endocrinology* 26, 502-520.

Papiol, S., Arias, B., Gastó, C., Gutiérrez, B., Catalán, R., Fañanás, L., 2007. Genetic variability at HPA axis in major depression and clinical response to antidepressant treatment. *Journal of affective disorders* 104, 83-90.

Polina, E.R., Rovaris, D.L., de Azeredo, L.A., Mota, N.R., Vitola, E.S., Silva, K.L., Guimarães-da-Silva, P.O., Picon, F.A., Belmonte-de-Abreu, P., Rohde, L.A., 2014. ADHD diagnosis may influence the association between polymorphisms in nicotinic acetylcholine receptor genes and tobacco smoking. *Neuromolecular medicine* 16, 389-397.

Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M.A., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., De Bakker, P.I., Daly, M.J., 2007. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *The American Journal of Human Genetics* 81, 559-575.

Ribbe, K., Ackermann, V., Schwitulla, J., Begemann, M., Papiol, S., Grube, S., Sperling, S., Friedrichs, H., Jahn, O., Sillaber, I., 2011. Prediction of the risk of comorbid alcoholism in schizophrenia by interaction of common genetic variants in the corticotropin-releasing factor system. *Archives of general psychiatry, archgenpsychiatry*. 2011.2100 v2011.

Ripke, S., Wray, N.R., Lewis, C.M., Hamilton, S.P., Weissman, M.M., Breen, G., Byrne, E.M., Blackwood, D.H., Boomsma, D.I., Cichon, S., 2013. A mega-analysis of genome-wide association studies for major depressive disorder. *Molecular psychiatry* 18, 497-511.

Rovaris, D.L., Mota, N.R., Callegari-Jacques, S.M., Bau, C.H.D., 2013. Approaching “phantom heritability” in psychiatry by hypothesis-driven gene–gene interactions. *Frontiers in human neuroscience* 7.

Scott, L.V., Dinan, T.G., 2002. Vasopressin as a target for antidepressant development: an assessment of the available evidence. *Journal of affective disorders* 72, 113-124.

Seney, M.L., Sibille, E., 2014. Sex differences in mood disorders: perspectives from humans and rodent models. *Biology of sex differences* 5, 17.

Sheikh, H.I., Kryski, K.R., Smith, H.J., Hayden, E.P., Singh, S.M., 2013. Corticotropin-Releasing Hormone System Polymorphisms are Associated with Children’s Cortisol Reactivity. *Neuroscience*.

Silva, K.L., Rovaris, D.L., Guimarães-da-Silva, P.O., Victor, M.M., Salgado, C.A., Vitola, E.S., Contini, V., Bertuzzi, G., Picon, F.A., Karam, R.G., 2014. Could comorbid bipolar disorder account for a significant share of executive function deficits in adults with attention-deficit hyperactivity disorder? *Bipolar disorders* 16, 270-276.

Sinha, R., 2008. Chronic stress, drug use, and vulnerability to addiction. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1141, 105-130.

Stewart, L.Q., Roper, J.A., Young, W.S., O’Carroll, A.-M., Lolait, S.J., 2008. The role of the arginine vasopressin Avp1b receptor in the acute neuroendocrine action of antidepressants. *Psychoneuroendocrinology* 33, 405-415.

Szczepankiewicz, A., Leszczyńska-Rodziewicz, A., Pawlak, J., Rajewska-Rager, A., Wilkosc, M., Zaremba, D., Dmitrzak-Weglarz, M., Skibinska, M., Hauser, J., 2013. Epistatic interaction between CRHR1 and AVPR1b variants as a predictor of major depressive disorder. *Psychiatric Genetics*.

Timpl, P., Spanagel, R., Sillaber, I., Kresse, A., Reul, J.M., Stalla, G.K., Blanquet, V., Steckler, T., Holsboer, F., Wurst, W., 1998. Impaired stress response and reduced anxiety in mice lacking a functional corticotropin-releasing hormone receptor 1. *Nature genetics* 19, 162-166.

van Londen, L., Goekoop, J.G., van Kempen, G.M., Frankhuijzen-Sierevogel, A.C., Wiegant, V.M., van der Velde, E.A., De Wied, D., 1997. Plasma levels of arginine vasopressin elevated in patients with major depression. *Neuropsychopharmacology* 17, 284-292.

Van West, D., Del-Favero, J., Deboutte, D., Van Broeckhoven, C., Claes, S., 2009. Arginine vasopressin receptor gene-based single-nucleotide polymorphism analysis in attention deficit hyperactivity disorder. *Psychiatric genetics* 19, 102-103.

Viola, T.W., Tractenberg, S.G., Levandowski, M.L., Pezzi, J.C., Bauer, M.E., Teixeira, A.L., Grassi-Oliveira, R., 2014. Neurotrophic factors in women with crack cocaine dependence during early abstinence: the role of early life stress. *Journal of psychiatry & neuroscience: JPN* 39, 206.

Wardenaar, K.J., Vreeburg, S.A., van Veen, T., Giltay, E.J., Veen, G., Penninx, B.W., Zitman, F.G., 2011. Dimensions of depression and anxiety and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Biological psychiatry* 69, 366-373.

Wasserman, D., Wasserman, J., Rozanov, V., Sokolowski, M., 2009. Depression in suicidal males: genetic risk variants in the CRHR1 gene. *Genes, Brain and Behavior* 8, 72-79.

Wasserman, D., Wasserman, J., Sokolowski, M., 2010. Genetics of HPA-axis, depression and suicidality. *European Psychiatry* 25, 278-280.

Yang, J., Pan, Y.-J., Yin, Z.-K., Hai, G.-F., Lu, L., Zhao, Y., Wang, D.-X., Wang, H., Wang, G., 2012. Effect of arginine vasopressin on the behavioral activity in the behavior despair depression rat model. *Neuropeptides* 46, 141-149.

Zorrilla, E.P., Valdez, G.R., Nozulak, J., Koob, G.F., Markou, A., 2002. Effects of antalarmin, a CRF type 1 receptor antagonist, on anxiety-like behavior and motor activation in the rat. *Brain research* 952, 188-199.

**Table 1** – Sample characteristics

	<b>General population (n = 629)</b>	<b>Patients with ADHD (n = 555)</b>	<b>Alcohol dependence (n = 136)</b>	<b>Crack/cocaine addiction (n = 142)</b>
	<i>Mean (SD)</i>	<i>Mean (SD)</i>	<i>Mean (SD)</i>	<i>Mean (SD)</i>
Age (years)	29.2 (8.7)	33.9 (10.9)	41.2 (9.8)	28.9 (7.6)
Schooling (years)	13.2 (3.1)	14.0 (3.6)	6.6 (3.4)	7.7 (3.1)
	<i>n (%)</i>	<i>n (%)</i>	<i>n (%)</i>	<i>n (%)</i>
Gender (male)	312 (49.6)	301 (54.2)	136 (100.0)	0 (0.0)
Skin color (white)	629 (100.0)	555 (100.0)	136 (100.0)	44 (30.6)
MDD (yes)	177 (27.5)	203 (36.6)	47 (34.6)	85 (59.9)*

ADHD = Attention Deficit-Hyperactivity Disorder; MDD = Major Depressive Disorder; SD = Standard Deviation

\*Individuals who scored more than 28 points in the Beck Depression Inventory-II

**Table 2** - Association analyses of the investigated SNPs on MDD in the general population and in clinical samples of ADHD

SNP	Model		MDD in the general population (n = 629)			MDD in patients with ADHD (n = 555)		
			No	Yes	P-value	No	Yes	P-value
			n (%)	n (%)		n (%)	n (%)	
rs28632197	Allelic	G	801 (89.0)	309 (90.4)	0.490	636 (91.1)	355 (89.6)	0.398
		A	99 (11.0)	33 (9.60)		62 (8.9)	41 (10.4)	
rs12944712	Genotypic	GG	154 (34.1)	50 (29.4)	0.134	117 (33.2)	66 (32.8)	0.027 <sup>a,c</sup>
		GA	218 (48.2)	78 (45.9)		159 (45.2)	109 (54.2)	
		AA	80 (17.7)	42 (24.7)		76 (21.6)	26 (12.9)	
	Allelic	G	526 (58.2)	178 (52.3)	0.064	393 (55.8)	241 (60.0)	0.184
		A	378 (41.8)	162 (47.7)		311 (44.2)	161 (40.0)	
rs110402	Genotypic	GG	132 (29.3)	65 (38.5)	0.095	118 (33.5)	55 (27.2)	0.276
		GA	215 (47.8)	71 (42.0)		162 (46.0)	105 (52.0)	
		AA	103 (22.9)	33 (19.5)		72 (20.5)	42 (20.8)	
	Allelic	G	479 (53.2)	201 (59.5)	0.057	398 (56.5)	215 (53.2)	0.291
		A	421 (46.8)	137 (40.5)		306 (43.5)	189 (46.8)	
rs878886	Genotypic	CC	295 (64.8)	97 (56.1)	0.123	200 (57.6)	125 (61.9)	0.587
		CG	131 (28.8)	61 (35.3)		132 (38.0)	68 (33.7)	
		GG	29 (6.4)	15 (8.7)		15 (4.3)	9 (4.5)	
	Allelic	C	721 (79.2)	255 (73.7)	0.047 <sup>b</sup>	318 (78.7)	532 (76.3)	0.422
		G	189 (20.8)	91 (26.3)		86 (21.3)	162 (23.7)	

ADHD = Attention Deficit-Hyperactivity Disorder; MDD = Major Depressive Disorder.

P-value corrected after 10,000 permutations to account for multiple SNPs tested [max(T) procedure]: <sup>a</sup>P = 0.160 and <sup>b</sup>P = 0,147.

<sup>c</sup>Post hoc analysis revealed a significant difference among heterozygous and homozygous AA (P = 0.012 and P = 0.040, respectively) with and without MDD.



**Table 3** - Association analyses of the investigated SNPs on MDD in the general population and in clinical samples of ADHD and alcohol dependence (only males)

SNP	Model	MDD in the general population (n = 312)			MDD in patients with ADHD (n = 301)			MDD in alcohol dependents (n = 136)			
		No	Yes	P-value	No	Yes	P-value	No	Yes	P-value	
		n (%)	n (%)		n (%)	n (%)		n (%)	n (%)		
rs28632197	Allelic	G	422 (87.9)	127 (93.4)	0.058	380 (90.9)	152 (86.4)	0.080	157 (92.4)	76 (82.6)	0.012 <sup>c</sup>
		A	58 (12.1)	9 (6.6)		38 (9.1)	24 (13.6)		13 (7.6)	16 (17.4)	
rs12944712	Genotypic	GG	87 (36.0)	19 (28.4)	0.475	74 (35.1)	28 (31.5)	0.138	23 (27.1)	13 (28.3)	0.710
		GA	111 (45.9)	33 (49.3)		92 (43.6)	49 (55.1)		42 (49.4)	25 (54.3)	
		AA	44 (18.2)	15 (22.4)		45 (21.3)	12 (13.5)		20 (23.5)	8 (17.4)	
	Allelic	G	285 (58.9)	71 (53.0)	0.233	240 (56.9)	105 (59.0)	0.638	88 (51.8)	51 (55.4)	0.570
A		199 (41.1)	63 (47.0)	182 (43.1)		73 (41.0)	82 (48.2)		41 (44.6)		
rs110402	Genotypic	GG	77 (32.0)	21 (31.8)	0.761	66 (31.4)	26 (29.2)	0.822	33 (40.2)	14 (30.4)	0.369
		GA	107 (44.4)	32 (48.5)		96 (45.7)	44 (49.4)		34 (41.5)	25 (54.3)	
		AA	57 (23.7)	13 (19.7)		48 (22.9)	19 (21.3)		15 (18.3)	7 (15.2)	
	Allelic	G	261 (54.1)	74 (56.1)	0.708	228 (54.0)	96 (53.9)	0.983	100 (60.6)	53 (57.6)	0.598
A		221 (45.9)	58 (43.9)	194 (46.0)		82 (46.1)	65 (39.4)		39 (42.4)		
rs878886	Genotypic	CC	167 (68.7)	34 (50.0)	0.017 <sup>a,d</sup>	119 (57.5)	54 (60.7)	0.875	47 (53.4)	28 (59.6)	0.181
		CG	62 (25.5)	29 (42.6)		80 (38.6)	32 (36.0)		35 (39.8)	19 (40.4)	
		GG	14 (5.8)	5 (7.4)		8 (3.9)	3 (3.4)		6 (6.8)	0 (0.0)	
	Allelic	C	396 (81.5)	97 (71.3)	0.016 <sup>b</sup>	318 (76.8)	140 (78.7)	0.609	129 (73.3)	75 (79.8)	0.237
G		90 (18.5)	39 (28.7)	96 (23.2)		38 (21.3)	47 (26.7)		19 (20.2)		

ADHD = Attention Deficit-Hyperactivity Disorder; MDD = Major Depressive Disorder.

P-value corrected after 10,000 permutations to account for multiple SNPs tested [max(T) procedure]: <sup>a</sup>P = 0.590, <sup>b</sup>P = 0.051 and <sup>c</sup>P = 0.038.

<sup>d</sup>Post hoc analysis revealed a significant difference among heterozygous and homozygous CC (P = 0.004 and P = 0.006, respectively) with and without MDD.

**Table 4** - Association analyses of the investigated SNPs on MDD in the general population and in clinical samples of ADHD and crack/cocaine addiction (only females)

SNP	Model	MDD in the general population (n = 317)			MDD in patients with ADHD (n = 254)			MDD in crack/cocaine addicts (n = 142)			
		No	Yes	P-value	No	Yes	P-value	No	Yes	P-value	
		n (%)	n (%)		n (%)	n (%)		n (%)	n (%)		
rs28632197	Allelic	G	379 (90.2)	182 (88.3)	0.440	256 (91.4)	203 (92.3)	0.721	104 (92.9)	150 (88.2)	0.178
		A	41 (9.8)	24 (11.7)		24 (8.6)	17 (7.7)		8 (7.1)	20 (11.8)	
rs12944712	Genotypic	GG	67 (31.9)	31 (30.1)	0.165	43 (30.5)	38 (33.9)	0.152	24 (42.1)	28 (32.9)	0.234
		GA	107 (51.0)	45 (43.7)		67 (47.5)	60 (53.6)		27 (47.4)	52 (61.2)	
		AA	36 (17.1)	27 (26.2)		31 (22.0)	14 (12.5)		6 (10.5)	5 (5.9)	
	Allelic	G	241 (57.4)	107 (51.9)	0.203	153 (54.3)	136 (60.7)	0.141	74 (66.1)	108 (63.5)	0.662
A		179 (42.6)	99 (48.1)	129 (45.7)		88 (39.3)	38 (33.9)		62 (36.5)		
rs110402	Genotypic	GG	55 (26.3)	44 (42.7)	0.013 <sup>a,c</sup>	52 (36.9)	29 (25.7)	0.161	19 (33.3)	23 (27.1)	0.564
		GA	108 (51.7)	39 (37.9)		66 (46.8)	61 (54.0)		30 (52.6)	45 (52.9)	
		AA	46 (22.0)	20 (19.4)		23 (16.3)	23 (20.4)		8 (14.0)	17 (20.0)	
	Allelic	G	218 (52.2)	127 (61.7)	0.029 <sup>b</sup>	170 (60.3)	119 (52.7)	0.083	68 (59.6)	91 (53.5)	0.309
A		200 (47.8)	79 (38.3)	112 (39.7)		107 (47.3)	46 (40.4)		79 (46.5)		
rs878886	Genotypic	CC	128 (60.4)	63 (60.0)	0.731	81 (57.9)	71 (62.8)	0.680	44 (77.2)	53 (62.4)	0.060
		CG	69 (32.5)	32 (30.5)		53 (37.1)	36 (31.9)		12 (21.1)	32 (37.6)	
		GG	15 (7.1)	10 (9.5)		7 (5.0)	6 (5.3)		1 (1.8)	0 (0.0)	
	Allelic	C	325 (76.7)	158 (75.2)	0.711	214 (76.4)	178 (78.8)	0.533	100 (87.7)	138 (81.2)	0.142
G		99 (23.3)	52 (24.8)	66 (23.6)		48 (21.2)	14 (12.3)		32 (18.8)		

ADHD = Attention Deficit-Hyperactivity Disorder; MDD = Major Depressive Disorder.

P-value corrected after 10,000 permutations to account for multiple SNPs tested [max(T) procedure]: <sup>a</sup>P = 0.155 and <sup>b</sup>P = 0.088.

<sup>c</sup>Post hoc analysis revealed a significant difference among heterozygous and homozygous GG (P = 0.022 and P = 0.003, respectively) with and without MDD.

**Table 5** - Global haplotype analyses of the effect of *CRHR1* SNPs on MDD in general population and clinical samples of ADHD, crack/cocaine addiction and alcohol dependence

Sample	Window	NHAP	Males		Females	
			STAT	P-value (global)	STAT	P-value (global)
General population	rs12944712 rs110402	3	2.050	0.359	5.210	0.074
	rs110402 rs878886	3	8.030	0.018 <sup>a,b</sup>	5.920	0.052
	rs12944712 rs110402 rs878886	4	6.700	0.082	5.570	0.135
Patients with ADHD	rs12944712 rs110402	3	0.236	0.889	2.800	0.246
	rs110402 rs878886	3	0.231	0.891	2.190	0.335
	rs12944712 rs110402 rs878886	4	0.542	0.910	2.440	0.487
Patients with SUD*	rs12944712 rs110402	3	0.418	0.811	2.570	0.277
	rs110402 rs878886	3	1.570	0.456	4.510	0.105
	rs12944712 rs110402 rs878886	4	0.896	0.826	4.810	0.186

ADHD = Attention Deficit-Hyperactivity Disorder; MDD = Major Depressive Disorder; SUD = Substance Use Disorder.

NHAP = Number of individual haplotypes in that window; STAT = Statistics.

The frequency threshold of 5 % was determined using the '--mhf 0.05' command.

<sup>a</sup>Global P-value corrected after 10000 permutations to account for multiple SNPs tested [max(T) procedure]:  $P_{gl} = 0.027$ .

<sup>b</sup>Individual haplotype analysis revealed a significant association of the GG haplotype in the rs110402-rs878886 window ( $P_{ind} = 0.009$ , after 10,000 permutations  $P_{ind} = 0.041$ , OR = 1.750).

\*males = alcohol dependents, females = crack/cocaine addicts.

**Table 6** - *AVPR1B* and *CRHR1* SNPs interactions on MDD in the general population and in the clinical samples of ADHD and alcohol dependence (only males)

	MDD in the general population (n = 312)			MDD in patients with ADHD (n = 301)			MDD in alcohol dependents (n = 136)		
	No	Yes	P-value	No	Yes	P-value	No	Yes	P-value
rs28632197-rs12944712 interaction			0.162			0.106			0.050 <sup>b,e</sup>
GG and AA	31 (13.0)	14 (20.9)		35 (16.7)	10 (11.4)		14 (16.9)	3 (6.5)	
GG and G carriers	149 (62.6)	44 (65.7)		136 (65.1)	54 (61.4)		56 (67.5)	27 (58.7)	
A carriers and AA	12 (5.0)	1 (1.5)		9 (4.3)	2 (2.3)		5 (6.0)	5 (10.9)	
A carriers and G carriers	46 (19.3)	8 (11.9)		29 (13.9)	22 (25.0)		8 (9.6)	11 (23.9)	
rs28632197-rs110402 interaction			0.256			0.131			0.041 <sup>c,f</sup>
GG and AA	46 (19.4)	11 (16.7)		34 (16.3)	14 (15.9)		15 (18.8)	7 (15.2)	
GG and G carriers	134 (56.5)	46 (69.7)		137 (65.6)	50 (56.8)		53 (66.3)	23 (50.0)	
A carriers and AA	11 (4.6)	2 (3.0)		15 (7.2)	5 (5.7)		0 (0.0)	0 (0.0)	
A carriers and G carriers	46 (19.4)	7 (10.6)		23 (11.0)	19 (21.6)		12 (15.0)	16 (34.8)	
rs28632197-rs878886 interaction			0.011 <sup>a,d</sup>			0.298			0.058
GG and CC	124 (51.7)	29 (42.6)		91 (44.4)	36 (41.4)		41 (48.8)	20 (43.5)	
GG and G carriers	58 (24.2)	30 (44.1)		77 (37.6)	27 (31.0)		30 (35.7)	10 (21.7)	
A carriers and CC	40 (16.7)	5 (7.4)		26 (12.7)	16 (18.4)		4 (4.8)	7 (15.2)	
A carriers and G carriers	18 (7.5)	4 (5.9)		11 (5.4)	8 (9.2)		9 (10.7)	9 (19.6)	

ADHD = Attention Deficit-Hyperactivity Disorder; MDD = Major Depressive Disorder.

P-value corrected (Bonferroni correction = multiplied by the number of interaction terms): <sup>a</sup>P = 0.033; <sup>b</sup>P = 0.150 and <sup>c</sup>P = 0.123.

<sup>d</sup>Post hoc analysis revealed a significant difference among GG and G carriers with and without MDD (P = 0.001).

<sup>e</sup>Post hoc analysis revealed a significant difference among A carriers and G carriers with and without MDD (P = 0.028).

<sup>f</sup>Post hoc analysis revealed a significant difference among A carriers and G carriers with and without MDD (P = 0.010).

**Supplementary Table 1** - SNP characteristics and minor allele frequencies (MAF)

SNP	Gene	CHR	A1/A2	General Population (n = 629)	Patients with ADHD (n = 555)	Alcohol dependence (n = 136)	Crack/cocaine addiction (n = 142)
				MAF	MAF	MAF	MAF
rs28632197	<i>AVPR1B</i>	1	A/G	0.106	0.094	0.110	0.101
rs12944712	<i>CRHR1</i>	17	A/G	0.434	0.427	0.470	0.350
rs110402	<i>CRHR1</i>	17	A/G	0.451	0.447	0.403	0.444
rs878886	<i>CRHR1</i>	17	G/C	0.223	0.226	0.246	0.160

ADHD = Attention Deficit-Hyperactivity Disorder.

CHR = Chromosome. A1 represents the minor allele.

MAF = Minor Allele Frequency.

**Supplementary Table 2** - Linkage disequilibrium information for each SNP pair

SNP1	SNP2	General Population (n = 629)		Patients with ADHD (n = 555)		Alcohol dependence (n = 136)		Crack/cocaine addiction (n = 142)		
		r <sup>2</sup>	D'	r <sup>2</sup>	D'	r <sup>2</sup>	D'	r <sup>2</sup>	D'	
<i>CRHR1</i>										
rs12944712	rs110402	0.611	0.986	0.579	0.984	0.566	0.976	0.436	1.000	
rs12944712	rs878886	0.377	1.000	0.358	0.964	0.369	1.000	0.356	1.000	
rs110402	rs878886	0.237	1.000	0.223	0.973	0.227	1.000	0.152	1.000	

ADHD = Attention Deficit-Hyperactivity Disorder.

**Supplementary Table 3** - Global haplotype analyses of the effect of *CRHRI* SNPs on MDD

<b>Sample</b>	<b>Window</b>	<b>NHAP</b>	<b>STAT</b>	<b>P-value (global)</b>
General population	rs12944712 rs110402	3	3.900	0.142
	rs110402 rs878886	3	4.980	0.082
	rs12944712 rs110402 rs878886	4	4.320	0.228
Patients with ADHD	rs12944712 rs110402	3	1.430	0.489
	rs110402 rs878886	3	0.964	0.618
	rs12944712 rs110402 rs878886	4	1.430	0.699

ADHD = Attention Deficit-Hyperactivity Disorder; MDD = Major Depressive Disorder.

NHAP = Number of individual haplotypes in that window; STAT = Statistics.

The frequency threshold of 5 % was determined using the '--mhf 0.05' command.

**Supplementary Table 4** - *AVPR1B* and *CRHR1* SNPs interactions on MDD in the general population and in patients with ADHD (Fisher's exact test)

	MDD in the general population (n = 629)			MDD among patients with ADHD (n = 555)		
	No	Yes	P-value	No	Yes	P-value
rs28632197-rs12944712 interaction			0.093			0.057
GG and AA	58 (13.0)	36 (21.3)		61 (17.5)	20 (10.1)	
GG and G carriers	290 (64.9)	101 (59.8)		226 (64.8)	137 (69.2)	
A carriers and AA	21 (4.7)	6 (3.6)		14 (4.0)	5 (2.5)	
A carriers and G carriers	78 (17.4)	26 (15.4)		48 (13.8)	36 (18.2)	
rs28632197-rs110402 interaction			0.424			0.105
GG and AA	84 (18.9)	25 (14.9)		50 (14.3)	34 (17.2)	
GG and G carriers	264 (59.3)	111 (66.1)		237 (67.9)	123 (61.1)	
A carriers and AA	19 (4.3)	8 (4.8)		22 (6.3)	7 (3.5)	
A carriers and G carriers	78 (17.5)	24 (14.3)		40 (11.5)	34 (17.2)	
rs28632197-rs878886 interaction			0.187			0.259
GG and CC	228 (50.7)	77 (44.8)		153 (44.3)	96 (48.7)	
GG and G carriers	123 (27.3)	62 (36.0)		131 (38.0)	60 (30.5)	
A carriers and CC	63 (14.0)	19 (11.0)		45 (13.0)	27 (13.7)	
A carriers and G carriers	36 (8.0)	14 (8.1)		16 (4.6)	14 (7.1)	

ADHD = Attention Deficit-Hyperactivity Disorder; MDD = Major Depressive Disorder.



**Supplementary Table 5** - *AVPR1B* and *CRHR1* SNPs interactions on MDD in the general population and in the clinical samples of ADHD and crack/cocaine addiction (only females)

	MDD in the general population (n = 317)			MDD among patients with ADHD (n = 254)			MDD among crack/cocaine addicts (n = 142)		
	No	Yes	P-value	No	Yes	P-value	No	Yes	P-value
rs28632197-rs12944712 interaction			0.165			0.155			0.286
GG and AA	27 (12.9)	22 (21.6)		26 (18.6)	10 (9.1)		6 (10.7)	4 (4.7)	
GG and G carriers	141 (67.5)	57 (55.9)		90 (64.3)	83 (75.5)		42 (75.0)	61 (71.8)	
A carriers and AA	9 (4.3)	5 (4.9)		5 (3.6)	3 (2.7)		0 (0.0)	1 (1.2)	
A carriers and G carriers	32 (15.3)	18 (17.6)		19 (13.6)	14 (12.7)		8 (14.3)	19 (22.4)	
rs28632197-rs110402 interaction			0.661			0.277			0.517
GG and AA	38 (18.3)	14 (13.7)		16 (11.4)	20 (18.2)		7 (12.5)	13 (15.3)	
GG and G carriers	130 (62.5)	65 (63.7)		100 (71.4)	73 (66.4)		41 (73.2)	52 (61.2)	
A carriers and AA	8 (3.8)	6 (5.9)		7 (5.0)	2 (1.8)		1 (1.8)	4 (4.7)	
A carriers and G carriers	32 (15.4)	17 (16.7)		17 (12.1)	15 (13.6)		7 (12.5)	16 (18.8)	
rs28632197-rs878886 interaction			0.882			0.290			0.185
GG and CC	104 (49.5)	48 (46.2)		62 (44.2)	60 (54.5)		39 (69.6)	43 (50.6)	
GG and G carriers	65 (31.0)	32 (30.8)		54 (38.6)	33 (30.0)		9 (16.1)	22 (25.9)	
A carriers and CC	23 (11.0)	14 (13.5)		19 (13.6)	11 (10.0)		4 (7.1)	10 (11.8)	
A carriers and G carriers	18 (8.6)	10 (9.6)		5 (3.6)	6 (5.5)		4 (7.1)	10 (11.8)	

ADHD = Attention Deficit-Hyperactivity Disorder; MDD = Major Depressive Disorder.



Os resultados da presente dissertação fornecem dados relevantes para a investigação de um dos principais mecanismos fisiopatológicos para a depressão, ou seja, a hiperatividade do eixo HPA. Mais especificamente, os dados apontam para a perspectiva de que o papel de variantes genéticas que codificam componentes desse sistema sobre o TDM seja modulado pelo perfil psiquiátrico e gênero dos indivíduos.

O principal regulador do eixo HPA, o CRH, parece estar intimamente relacionado com diferenças individuais na vulnerabilidade a agentes estressores e possivelmente com a fisiopatologia de transtornos depressivos e de ansiedade. Além disso, outro componente importante nesse contexto é o AVP, que age sinergicamente ao CRH durante a ativação do eixo HPA em situações de estresse. Nesse contexto, os componentes envolvidos nesses sistemas, como os receptores desses peptídeos, são de importância óbvia no âmbito de transtornos psiquiátricos.

Os resultados encontrados no presente estudo, sugerindo o envolvimento de variantes genéticas no *CRHRI* e *AVPR1B* com a susceptibilidade ao TDM, corroboram as evidências prévias da literatura sobre a importância desses receptores em transtornos relacionados ao sistema de estresse. No entanto, os polimorfismos específicos que influenciam esses fenótipos ainda precisam ser elucidados.

Além de considerar as associações prévias com transtornos psiquiátricos, a escolha dos SNPs avaliados também se baseou na frequência alélica, incluindo aqueles que a frequência do alelo menor está acima de 10%. Adicionalmente, para o rs28632197 no *AVPR1B* e o rs878886 no *CRHRI*, a localização do polimorfismo foi considerada. O rs28632197 foi escolhido com o auxílio de ferramentas de bioinformática considerando seu potencial papel na modificação das propriedades de interação. No gene *CRHRI*, a utilização de ferramentas de bioinformática para a análise da proteína por ele codificada não apontou evidências relevantes para a participação de polimorfismos em interações gene-gene. Dessa forma, o rs878886 foi selecionado, além dos critérios já mencionados, por estar localizado em uma região regulatória e portanto, com potencial relevância funcional.

Uma abordagem promissora que foi considerada nas nossas análises é a separação das amostras por gênero, pois as diferenças biológicas podem levar a respostas ao estresse distintas entre homens e mulheres. De fato, sabe-se que incidência e gravidade dos sintomas não é igual entre os gêneros (Seney and Sibille, 2014), sugerindo que fatores etiológicos podem também diferir. Além disso, os efeitos de algumas variantes no gene *CRHRI* sobre a

depressão parecem ser específicos de acordo com o gênero, conforme sugerido no presente trabalho e por Heim et al., 2009.

De forma semelhante, o perfil psiquiátrico da amostra pode modular a influência genética sobre outros transtornos psiquiátricos. É possível que os efeitos das interações do *CRHR1* com fatores ambientais e com outros genes sejam diferentes entre indivíduos com diferentes fenótipos. O presente estudo levou em consideração esse parâmetro ao incluir, além de indivíduos com TDM da população geral, amostras de pacientes com transtornos psiquiátricos (TDAH e TUS) que apresentam TDM em comorbidade, devido ao fato de que, nesses indivíduos, a prevalência do TDM é maior do que na população geral.

Os nossos resultados considerando essas abordagens são consistentes com estudos prévios, como um GWAS envolvendo síndrome depressiva em comorbidade com dependência de álcool, que sugere que algumas variantes genéticas podem ter influência apenas sobre os transtornos em comorbidade e não estão associadas com cada transtorno isoladamente (Edwards et al., 2012). Além disso, outro estudo sugere que a influência genética sobre o TDM em comorbidade com o alcoolismo é específica de acordo com o gênero (Prescott et al., 2000). No entanto, esse tipo de abordagem ainda é escassa nos estudos genéticos do TDM.

#### **4.1 TDM na População Geral**

O resultado mais consistente do nosso estudo envolve o papel dos polimorfismos rs110402 e rs878886 no *CRHR1* sobre o TDM na população geral. Além da associação com significância *borderline* com TDM encontrada ao avaliar o efeito individual desses SNPs nas análises considerando ambos os sexos, ao separar a amostra por gênero observamos um efeito mais pronunciado do rs110402 em mulheres e do rs878886 em homens sobre o TDM nesses indivíduos. Adicionalmente, ainda considerando amostras separadas por gênero, a análise de haplótipos revelou uma associação significativa de haplótipos envolvendo esses mesmos SNPs sobre o TDM em homens dessa amostra. Nossos resultados corroboram os achados prévios de associação individual desses SNPs com transtornos depressivos e de ansiedade (Heitland et al., 2013; Keck et al., 2008; Wasserman et al., 2010). Outros grupos também relatam associações significativas de haplótipos envolvendo SNPs no gene *CRHR1*. Um efeito protetor do haplótipo TAT formado pelos SNPs rs7209436, rs110402 e rs242924 contra a depressão já foi demonstrado e replicado (Bradley et al., 2008; Polanczyk et al., 2009). Em

relação às interações gene-gene, encontramos um efeito do termo de interação rs878886-rs28632197 sobre o TDM em homens da população geral, o qual sobreviveu à correção de Bonferroni. Esse efeito de interação estatisticamente significativo deve ser interpretado com cautela, uma vez que envolve o genótipo de risco do rs878886, que foi o polimorfismo mais consistentemente associado com o TDM em homens da população geral, considerando as análises de efeitos principais e de haplótipos. Assim, existe a possibilidade de que essa associação reflita apenas o efeito do genótipo de risco do rs878886 sobre o TDM e não a influência da interação entre os SNPs.

É interessante enfatizar que os principais resultados significativos do estudo envolvem a população geral, sugerindo que o efeito desses SNPs parece ser mais pronunciado em indivíduos nos quais o TDM não está presente em comorbidade com outros transtornos psiquiátricos. Além disso, os nossos resultados sugerem que há uma tendência diferente entre os gêneros em relação aos efeitos dos polimorfismos investigados sobre o TDM, o que pode estar refletindo algumas diferenças, como as relacionadas aos níveis hormonais, existentes entre homens e mulheres.

Apesar de os nossos resultados, de maneira geral, apontarem para a necessidade de considerar o perfil psiquiátrico e gênero dos indivíduos em estudos futuros, a diferença dos efeitos dos polimorfismos sobre o TDM entre homens e mulheres não é tão marcante quanto a encontrada entre indivíduos com e sem comorbidades. Alguns dos nossos achados são semelhantes em homens e mulheres. Por exemplo, a análise de haplótipos formados pelos SNPs rs110402 e rs878886, que demonstrou associação significativa em homens da população geral, alcançou significância *borderline* em mulheres dessa amostra ( $P = 0.052$ ).

#### **4.2 TDM em pacientes com TDAH**

O único polimorfismo que demonstrou influência sobre o TDM em pacientes com TDAH envolve o rs12944712, sugerindo um efeito protetor do genótipo AA. Essa associação perdeu significância estatística após 10.000 permutações. No entanto, esse achado é consistente com outros estudos que já reportaram efeitos protetores do alelo A no início e curso do transtorno de estresse pós-traumático (Amstadter et al., 2011) e em implicações negativas na saúde a longo prazo relacionadas com o abuso na infância e também com o estresse na vida adulta (Lessard and Holman, 2014). Assim, este polimorfismo merece mais

estudos, tanto do ponto de vista de seu possível efeito funcional como também sobre as consequências fenotípicas.

### 4.3 TDM em dependentes de álcool

Nessa amostra, que é composta inteiramente por homens, encontramos um efeito do rs28632197 sobre o TDM, onde o genótipo heterozigoto mostrou-se mais frequentemente encontrado no grupo de alcoolistas com TDM. Vale destacar que o efeito desse SNP sobre o TDM em homens da população geral alcançou significância *borderline* ( $P = 0.058$ ), porém, na direção oposta, ou seja, o genótipo heterozigoto apresentou maior frequência em indivíduos sem TDM. Isso pode ser uma evidência adicional apoiando a hipótese abordada no presente estudo de que os efeitos dos SNPs nos genes investigados podem ser modulados de acordo com o perfil psiquiátrico da amostra. O único relato de associação significativa desse polimorfismo em transtornos psiquiátricos envolve uma amostra de pacientes com transtorno do pânico composta predominantemente por mulheres (Keck et al., 2008).

Outra associação encontrada, que apesar de ser nominal, parece ter um significado biológico interessante, envolve a influência do termo de interação rs28632197-rs110402 na amostra de dependentes de álcool. Observamos que todos os indivíduos (com e sem MDD) portadores do alelo A do SNP rs28632197 também são portadores do alelo G do SNP rs110402. Estes indivíduos apresentam risco aumentado para o desenvolvimento de depressão. Apesar de não termos observado resultados estatisticamente significativos desse termo de interação sobre o TDM nas outras amostras investigadas no nosso estudo, de maneira geral, observamos que essa combinação de genótipos tende a ser mais frequente em indivíduos com TDM nas amostras clínicas de outros transtornos psiquiátricos (TDAH e TUS), mas o oposto ocorre na população geral, mais especificamente em homens dessa amostra. Esses achados sugerem que, da mesma forma que ocorre para a influência individual dos SNPs sobre o TDM, os efeitos de interação sobre o TDM também parecem ser diferentes em amostras com perfis psiquiátricos distintos.

### 4.4 TDM em dependentes de crack/cocaína

Não foram observadas associações significativas entre os polimorfismos estudados e o TDM na amostra de dependentes de crack/cocaína. É possível que o eixo HPA nesses pacientes esteja muito desregulado a ponto de mascarar os efeitos dos genes do sistema de

estresse sobre o TDM. De fato, já foi demonstrado que os níveis plasmáticos de cortisol estão aumentados em dependentes de cocaína mesmo durante o período de abstinência (Contoreggi et al., 2003). No entanto, também devem ser consideradas limitações do estudo, notadamente o limitado tamanho amostral. Além disso, é importante mencionar que nessa amostra, a depressão foi avaliada de acordo com a gravidade dos sintomas, sendo os pacientes divididos em dois subgrupos para as análises: indivíduos com sintomas leves/moderados *versus* indivíduos com sintomas severos. Considerando que a prevalência de depressão, principalmente a forma severa, é consideravelmente maior nesses indivíduos do que no restante da nossa amostra, esse também pode ser um fator que esteja impedindo a identificação dos efeitos dos polimorfismos investigados sobre a depressão nessa amostra.

#### 4.5 Considerações gerais

De maneira geral, os estudos de genes candidatos avaliando polimorfismos envolvidos na etiologia de transtornos psiquiátricos são pouco consistentes (Ben-Efraim et al., 2013; Leszczyńska-Rodziewicz et al., 2013a; Treutlein et al., 2006; Zai et al., 2012). Similarmente, os GWAS desses transtornos tem obtido sucesso aquém do esperado. Apesar de existirem alguns exemplos recentes de sucesso dessa abordagem, como um GWAS de esquizofrenia, que identificou 108 *loci* associados com esse transtorno mental (Ripke, 2014), para o TDM, os achados até o momento não alcançaram tal sucesso. Uma recente mega-análise do TDM não foi capaz de demonstrar evidências robustas de associação (Ripke et al., 2013).

Mesmo assim, a falta de evidências robustas não significa que não há efeitos de tais variantes genéticas. As diferenças nas associações encontradas podem estar refletindo o efeito de outros polimorfismos que estejam em alto desequilíbrio de ligação. Além disso, resultados não significativos podem refletir uma variedade de limitações dos estudos genéticos, como o pequeno tamanho de efeito das variantes genéticas, o pequeno poder estatístico nos testes de associações genéticas em fenótipos complexos, pequeno tamanho amostral e diferenças quanto à caracterização clínica das amostras. Enfim, a etiologia multifatorial dos transtornos psiquiátricos torna complexa a identificação de associações robustas e replicáveis.

Além das dificuldades próprias já mencionadas, outro desafio é a necessidade de incluir nos estudos genéticos as interações gene-gene, principalmente as guiadas por hipóteses. Há evidências de que estudos deste tipo podem auxiliar na identificação da assim chamada “herdabilidade perdida” (Rovaris et al., 2013a). Efeitos de interações gene-gene

entre o *CRHRI* e o *AVPR1B* sobre susceptibilidade ao TDM já foram relatados, mas com polimorfismos diferentes dos investigados no presente estudo (Szczepankiewicz et al., 2013). Por outro lado, a análise de um modelo de interação entre os genes *NR3C1*, *AVPR1B* e *CRHRI* não foi capaz de demonstrar efeitos significativos sobre o risco de tentativa de suicídio (Leszczyńska-Rodziewicz et al., 2013b). Dessa forma, os estudos sobre efeitos de interação entre polimorfismos nesses genes permanecem um desafio.

Em relação às limitações do nosso estudo, devemos mencionar o pequeno tamanho amostral, principalmente das amostras de dependentes de crack/cocaína e álcool. No entanto, é importante destacar que analisamos os efeitos das variantes genéticas sobre o TDM em quatro grupos amostrais, sendo três deles provenientes de amostras clínicas de transtornos psiquiátricos e um da população geral, totalizando um grande número de indivíduos. Outra limitação é a falta de estudos relacionados à funcionalidade dos SNPs nos genes investigados que impossibilita inferências diretas sobre as relações causa-efeito. Assim, o nosso estudo evidencia a necessidade de estudos funcionais envolvendo polimorfismos nesses genes. Por fim, apesar da correção para múltiplos testes ter sido aplicada quando necessário, a possibilidade de resultados falso-positivos deve ser sempre considerada até que replicações consistentes sejam conduzidas. Nesse contexto, nossos resultados devem ser replicados por estudos adicionais com amostras maiores.

É importante mencionar também como uma limitação que apesar de a frequência do alelo raro do rs28632197 ser de 10%, nas nossas amostras, não observamos indivíduos com o genótipo homozigoto para o alelo raro. Essa falta de homozigotos também foi observada por um grupo de pesquisadores que avaliou uma amostra de indivíduos poloneses com TDM e transtorno bipolar (Szczepankiewicz et al., 2013). Esse grupo também realizou a genotipagem utilizando o ensaio TaqMan® (Applied Biosystems). No entanto, outro estudo encontrou homozigotos para o alelo raro de acordo com o esperado em uma amostra de indivíduos alemães com transtorno do pânico (Keck et al., 2008). Nesse estudo, os autores utilizaram espectrometria de massa MALDI-TOF (MassArray® System, Sequenom) para a genotipagem. Considerando-se, no entanto, a baixa frequência esperada de homozigotos para o alelo raro (1%), entendemos que a mesma não poderia influenciar significativamente os resultados aqui observados. No entanto, na sequência deste projeto pretendemos genotipar novamente os indivíduos heterozigotos com uma técnica mais adequada.



#### **4.6 Conclusão**

Os achados do presente estudo são consistentes com evidências prévias do papel dos genes *CRHR1* e *AVPR1B* na fisiopatologia do TDM. Além disso, propomos que a influência desses genes sobre o TDM parece ser modulada pelo perfil psiquiátrico e gênero dos indivíduos. Embora essa perspectiva seja bastante plausível considerando a complexidade do sistema de resposta ao estresse, em especial do eixo HPA, trata-se ainda de uma novidade nos estudos genéticos do sistema.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amstadter, A.B., Nugent, N.R., Yang, B.-Z., Miller, A., Siburian, R., Moorjani, P., Haddad, S., Basu, A., Fagerness, J., Saxe, G., 2011. Corticotrophin-releasing hormone type 1 receptor gene (CRHR1) variants predict posttraumatic stress disorder onset and course in pediatric injury patients. *Disease markers* 30, 89-99.
- APA, 1994. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-IV-TR®*. American Psychiatric Pub, Washington DC.
- Bale, T.L., Vale, W.W., 2004. CRF and CRF receptors: role in stress responsivity and other behaviors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44, 525-557.
- Banki, C.M., Karmacsi, L., Bissette, G., Nemeroff, C.B., 1992. Cerebrospinal fluid neuropeptides in mood disorder and dementia. *Journal of affective disorders* 25, 39-45.
- Bao, A.-M., Swaab, D.F., 2010. Chapter 18 - Corticotropin-Releasing Hormone and Arginine Vasopressin in Depression: Focus on the Human Postmortem Hypothalamus, In: Gerald, L. (Ed.), *Vitamins & Hormones*. Academic Press, pp. 339-365.
- Ben-Efraim, Y.J., Wasserman, D., Wasserman, J., Sokolowski, M., 2013. Family-Based Study of AVPR1B Association and Interaction with Stressful Life Events on Depression and Anxiety in Suicide Attempts. *Neuropsychopharmacology* 38, 1504-1511.
- Beurel, E., Nemeroff, C.B., 2014. Interaction of stress, corticotropin-releasing factor, arginine vasopressin and behaviour, *Behavioral Neurobiology of Stress-related Disorders*. Springer, pp. 67-80.
- Binder, E.B., Nemeroff, C.B., 2010. The CRF system, stress, depression and anxiety—insights from human genetic studies. *Molecular psychiatry* 15, 574-588.
- Birnbaumer, M., 2000. Vasopressin receptors. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 11, 406-410.
- Blomeyer, D., Treutlein, J., Esser, G., Schmidt, M.H., Schumann, G., Laucht, M., 2008. Interaction between CRHR1 gene and stressful life events predicts adolescent heavy alcohol use. *Biol Psychiatr* 63, 146–151
- Bonfiglio, J.J., Inda, C., Refojo, D., Holsboer, F., Arzt, E., Silberstein, S., 2011. The corticotropin-releasing hormone network and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: molecular and cellular mechanisms involved. *Neuroendocrinology* 94, 12-20.
- Borroto-Escuela, D.O., Craenenbroeck, K.V., Romero-Fernandez, W., Guidolin, D., Woods, A.S., Rivera, A., Haegeman, G., Agnati, L.F., Tarakanov, A.O., Fuxe, K., 2011. Dopamine D2 and D4 receptor heteromerization and its allosteric receptor–receptor interactions. *Biochemical and biophysical research communications* 404, 928-934.

- Boschloo, L., Vogelzangs, N., Licht, C.M., Vreeburg, S.A., Smit, J.H., van den Brink, W., Veltman, D.J., de Geus, E.J., Beekman, A.T., Penninx, B.W., 2011. Heavy alcohol use, rather than alcohol dependence, is associated with dysregulation of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis and the autonomic nervous system. *Drug and alcohol dependence* 116, 170-176.
- Bradley, R.G., Binder, E.B., Epstein, M.P., Tang, Y., Nair, H.P., Liu, W., Gillespie, C.F., Berg, T., Evces, M., Newport, D.J., 2008. Influence of child abuse on adult depression: moderation by the corticotropin-releasing hormone receptor gene. *Archives of general psychiatry* 65, 190.
- Burns, L., Teesson, M., 2002. Alcohol use disorders comorbid with anxiety, depression and drug use disorders: Findings from the Australian National Survey of Mental Health and Well Being. *Drug and alcohol dependence* 68, 299-307.
- Cagliani, R., Fumagalli, M., Pozzoli, U., Riva, S., Cereda, M., Comi, G.P., Pattini, L., Bresolin, N., Sironi, M., 2009. A complex selection signature at the human AVPR1B gene. *BMC evolutionary biology* 9, 123.
- Charmandari, E., Tsigos, C., Chrousos, G., 2005. Endocrinology of the stress response 1. *Annu. Rev. Physiol.* 67, 259-284.
- Chrousos, G.P., 2009. Stress and disorders of the stress system. *Nature Reviews Endocrinology* 5, 374-381.
- Contoreggi, C., Herning, R.I., Koeppl, B., Simpson, P.M., Negro Jr, P.J., Fortner-Burton, C., Hess, J., 2003. Treatment-seeking inpatient cocaine abusers show hypothalamic dysregulation of both basal prolactin and cortisol secretion. *Neuroendocrinology* 78, 154-162.
- Cordell, H.J., 2009. Detecting gene–gene interactions that underlie human diseases. *Nature Reviews Genetics* 10, 392-404.
- Cortese, S., 2012. The neurobiology and genetics of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD): What every clinician should know. *European Journal of Paediatric Neurology* 16, 422-433.
- Dempster, E.L., Burcescu, I., Wigg, K., Kiss, E., Baji, I., Gadoros, J., Tamas, Z., Kennedy, J.L., Vetro, A., Kovacs, M., 2007. Evidence of an association between the vasopressin V1b receptor gene (AVPR1B) and childhood-onset mood disorders. *Archives of general psychiatry* 64, 1189-1195.
- Dixon, J.S., 1997. Evaluation of the CASP2 docking section. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 29, 198-204.
- Edwards, A.C., Aliev, F., Bierut, L.J., Bucholz, K.K., Edenberg, H., Hesselbrock, V., Kramer, J., Kuperman, S., Nurnberger Jr, J.I., Schuckit, M.A., 2012. Genome-wide association study of comorbid depressive syndrome and alcohol dependence. *Psychiatric genetics* 22, 31.

- Fayyad, J., De Graaf, R., Kessler, R., Alonso, J., Angermeyer, M., Demyttenaere, K., De Girolamo, G., Haro, J.M., Karam, E.G., Lara, C., 2007. Cross-national prevalence and correlates of adult attention-deficit hyperactivity disorder. *The British Journal of Psychiatry* 190, 402-409.
- Fernández-Castillo, N., Roncero, C., Grau-Lopez, L., Barral, C., Prat, G., Rodriguez-Cintas, L., Sánchez-Mora, C., Gratacòs, M., Ramos-Quiroga, J.A., Casas, M., 2013. Association study of 37 genes related to serotonin and dopamine neurotransmission and neurotrophic factors in cocaine dependence. *Genes, Brain and Behavior* 12, 39-46.
- Filizola, M., Weinstein, H., 2005. The study of G-protein coupled receptor oligomerization with computational modeling and bioinformatics. *Febs Journal* 272, 2926-2938.
- Flint, J., Kendler, K.S., 2014. The genetics of major depression. *Neuron* 81, 484-503.
- Fortier, M.-È., Sengupta, S.M., Grizenko, N., Choudhry, Z., Thakur, G., Joobar, R., 2013. Genetic Evidence for the Association of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) Axis with ADHD and Methylphenidate Treatment Response. *Neuromolecular medicine*, 1-11.
- Freitag, C.M., Rohde, L.A., Lempp, T., Romanos, M., 2010. Phenotypic and measurement influences on heritability estimates in childhood ADHD. *European child & adolescent psychiatry* 19, 311-323.
- Fuxe, K., O Borroto-Escuela, D., Marcellino, D., Romero-Fernandez, W., Frankowska, M., Guidolin, D., Filip, M., Ferraro, L., Woods, A., Tarakanov, A., 2012. GPCR heteromers and their allosteric receptor-receptor interactions. *Current medicinal chemistry* 19, 356-363.
- Gianoulakis, C., Dai, X., Brown, T., 2003. Effect of Chronic Alcohol Consumption on the Activity of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis and Pituitary  $\beta$ -Endorphin as a Function of Alcohol Intake, Age, and Gender. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 27, 410-423.
- Gizer, I.R., Ficks, C., Waldman, I.D., 2009. Candidate gene studies of ADHD: a meta-analytic review. *Human genetics* 126, 51-90.
- González, S., Rangel-Barajas, C., Peper, M., Lorenzo, R., Moreno, E., Ciruela, F., Borycz, J., Ortiz, J., Lluís, C., Franco, R., 2011. Dopamine D4 receptor, but not the ADHD-associated D4. 7 variant, forms functional heteromers with the dopamine D2S receptor in the brain. *Molecular psychiatry* 17, 650-662.
- Grammatopoulos, D.K., Chrousos, G.P., 2002. Functional characteristics of CRH receptors and potential clinical applications of CRH-receptor antagonists. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 13, 436-444.
- Grant, B.F., Dawson, D.A., Stinson, F.S., Chou, S.P., Dufour, M.C., Pickering, R.P., 2004. The 12-month prevalence and trends in DSM-IV alcohol abuse and dependence: United States, 1991-1992 and 2001-2002. *Drug Alcohol Depend* 74, 223-34.

- Grazzini, E., Lodboerer, A., Perez-Martin, A., Joubert, D., Guillon, G., 1996. Molecular and functional characterization of V1b vasopressin receptor in rat adrenal medulla. *Endocrinology* 137, 3906-3914.
- Guindalini, C., Howard, M., Haddley, K., Laranjeira, R., Collier, D., Ammar, N., Craig, I., O’Gara, C., Bubb, V.J., Greenwood, T., 2006. A dopamine transporter gene functional variant associated with cocaine abuse in a Brazilian sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 4552-4557.
- Guo, W., Urizar, E., Kralikova, M., Mobarec, J.C., Shi, L., Filizola, M., Javitch, J.A., 2008. Dopamine D2 receptors form higher order oligomers at physiological expression levels. *The EMBO journal* 27, 2293-2304.
- Heim, C., Bradley, B., Mletzko, T.C., Deveau, T.C., Musselman, D.L., Nemeroff, C.B., Ressler, K.J., Binder, E.B., 2009. Effect of childhood trauma on adult depression and neuroendocrine function: sex-specific moderation by CRH receptor 1 gene. *Frontiers in behavioral neuroscience* 3.
- Heitland, I., Groenink, L., Bijlsma, E.Y., Oosting, R.S., Baas, J.M., 2013. Human fear acquisition deficits in relation to genetic variants of the corticotropin releasing hormone receptor 1 and the serotonin transporter. *PloS one* 8, e63772.
- Hillemacher, T., 2011. Biological mechanisms in alcohol dependence—new perspectives. *Alcohol and alcoholism* 46, 224-230.
- Holsboer, F., Ising, M., 2010. Stress hormone regulation: biological role and translation into therapy. *Annual review of psychology* 61, 81-109.
- Hsu, D.T., Mickey, B.J., Langenecker, S.A., Heitzeg, M.M., Love, T.M., Wang, H., Kennedy, S.E., Peciña, M., Shafir, T., Hodgkinson, C.A., 2012. Variation in the corticotropin-releasing hormone receptor 1 (CRHR1) gene influences fMRI signal responses during emotional stimulus processing. *The Journal of Neuroscience* 32, 3253-3260.
- Isaksson, J., Nilsson, K.W., Nyberg, F., Hogmark, Å., Lindblad, F., 2012. Cortisol levels in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Journal of psychiatric research*.
- Ishitobi, Y., Nakayama, S., Yamaguchi, K., Kanehisa, M., Higuma, H., Maruyama, Y., Ninomiya, T., Okamoto, S., Tanaka, Y., Tsuru, J., 2012. Association of CRHR1 and CRHR2 with major depressive disorder and panic disorder in a Japanese population. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* 159, 429-436.
- Johnson, J.E., O’Leary, C.C., Striley, C.W., Abdallah, A.B., Bradford, S., Cottler, L.B., 2011. Effects of major depression on crack use and arrests among women in drug court. *Addiction*, 106, 1279-86.
- Jones, D.N., Kortekaas, R., Slade, P.D., Middlemiss, D.N., Hagan, J.J., 1998. The behavioural effects of corticotropin-releasing factor-related peptides in rats. *Psychopharmacology* 138, 124-132.

- Keck, M.E., Kern, N., Erhardt, A., Unschuld, P.G., Ising, M., Salyakina, D., Müller, M.B., Knorr, C.C., Lieb, R., Hohoff, C., 2008. Combined effects of exonic polymorphisms in CRHR1 and AVPR1B genes in a case/control study for panic disorder. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* 147, 1196-1204.
- Kessler, R., Adler, L., Barkley, R., Biederman, J., Conners, C., Demler, O., Faraone, S., Greenhill, L., Howes, M., Secnik, K., 2006. The prevalence and correlates of adult ADHD in the United States: results from the National Comorbidity Survey Replication. *American Journal of Psychiatry* 163, 716-723.
- Kessler, R.C., Adler, L.A., Barkley, R., Biederman, J., Conners, C.K., Faraone, S.V., Greenhill, L.L., Jaeger, S., Secnik, K., Spencer, T., 2005. Patterns and predictors of ADHD persistence into adulthood: Results from the National Comorbidity Survey Replication. *Biological psychiatry* 57, 1442.
- Kessler, R.C., Berglund, P., Demler, O., Jin, R., Koretz, D., Merikangas, K.R., Rush, A.J., Walters, E.E., Wang, P.S., 2003. The epidemiology of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). *Jama* 289, 3095-3105.
- Kessler, R.C., Merikangas, K.R., Wang, P.S., 2007. Prevalence, comorbidity, and service utilization for mood disorders in the United States at the beginning of the twenty-first century. *Annu. Rev. Clin. Psychol.* 3, 137-158.
- Kornstein, S.G., Schatzberg, A.F., Thase, M.E., Yonkers, K.A., McCullough, J.P., Keitner, G.I., Gelenberg, A.J., Ryan, C., Hess, A., Harrison, W., 2000. Gender differences in chronic major and double depression. *Journal of Affective disorders* 60, 1-11.
- Koshimizu, T.-a., Nakamura, K., Egashira, N., Hiroyama, M., Nonoguchi, H., Tanoue, A., 2012. Vasopressin V1a and V1b receptors: from molecules to physiological systems. *Physiological reviews* 92, 1813-1864.
- Kreek, M.J., Levran, O., Reed, B., Schlussman, S.D., Zhou, Y., Butelman, E.R., 2012. Opiate addiction and cocaine addiction: underlying molecular neurobiology and genetics. *The Journal of clinical investigation* 122, 3387.
- Kroeger, K.M., Pflieger, K.D.G., Eidne, K.A., 2005. Biophysical and biochemical methods to study GCPR oligomerization. In: Devi L.A editor. *The G protein-coupled receptors handbook*. Contemporary Clinical Neuroscience. Totowa, N.J: Humana Press, 217-41.
- Laranjeira, R., Pinsky, I., Sanches, M., Zaleski, M., Caetano, R., 2010. Alcohol use patterns among Brazilian adults. *Revista Brasileira de Psiquiatria* 32, 231-241.
- Laryea, G., Arnett, M.G., Muglia, L.J., 2012. Behavioral studies and genetic alterations in corticotropin-releasing hormone (CRH) neurocircuitry: insights into human psychiatric disorders. *Behavioral sciences* 2, 135-171.

Lessard, J., Holman, E.A., 2014. FKBP5 and CRHR1 polymorphisms moderate the stress–physical health association in a national sample. *Health Psychology* 33, 1046.

Leszczyńska-Rodziewicz, A., Szczepankiewicz, A., Dmitrzak-Węglarz, M., Rajewska-Rager, A., Skibińska, M., Hauser, J., 2013a. No association between polymorphisms and haplotypes of the AVPR1b, CRHR1 and NR3C1 genes and depression with melancholic features in the course of bipolar disorder. *Psychiatry research* 207, 140-142.

Leszczyńska-Rodziewicz, A., Szczepankiewicz, A., Pawlak, J., Dmitrzak-Węglarz, M., Hauser, J., 2013b. Association, Haplotype, and Gene-Gene Interactions of the HPA Axis Genes with Suicidal Behaviour in Affective Disorders. *The Scientific World Journal* 2013.

Linnet, K.M., Dalsgaard, S., Obel, C., Wisborg, K., Henriksen, T.B., Rodriguez, A., Kotimaa, A., Moilanen, I., Thomsen, P.H., Olsen, J., 2003. Maternal lifestyle factors in pregnancy risk of attention deficit hyperactivity disorder and associated behaviors: review of the current evidence. *American journal of psychiatry* 160, 1028-1040.

Liu, Z., Zhu, F., Wang, G., Xiao, Z., Wang, H., Tang, J., Wang, X., Qiu, D., Liu, W., Cao, Z., 2006. Association of corticotropin-releasing hormone receptor1 gene SNP and haplotype with major depression. *Neuroscience letters* 404, 358-362.

Lohoff, F.W., Weller, A.E., Bloch, P.J., Nall, A.H., Ferraro, T.N., Kampman, K.M., Pettinati, H.M., Oslin, D.W., Dackis, C.A., O'Brien, C.P., 2008. Association between the catechol-O-methyltransferase Val158Met polymorphism and cocaine dependence. *Neuropsychopharmacology* 33, 3078-3084.

Lolait, S.J., O'Carroll, A.-M., Mahan, L.C., Felder, C.C., Button, D.C., Young, W.S., Mezey, E., Brownstein, M.J., 1995. Extrapituitary expression of the rat V1b vasopressin receptor gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92, 6783-6787.

Lolait, S.J., Stewart, L.Q., Jessop, D.S., Young, W.S., O'Carroll, A.-M., 2007. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to stress in mice lacking functional vasopressin V1b receptors. *Endocrinology* 148, 849-856.

Ma, L., Chen, Y.-H., Chen, H., Liu, Y.-Y., Wang, Y.-X., 2011. The function of hypothalamus–pituitary–adrenal axis in children with ADHD. *Brain research* 1368, 159-162.

Majzoub, J.A., 2006. Corticotropin-releasing hormone physiology. *European journal of endocrinology* 155, S71-S76.

Maletic, V., Robinson, M., Oakes, T., Iyengar, S., Ball, S.G., Russel, J., 2007. Neurobiology of depression: an integrated view of key findings. *Int J Clin Pract* 61, 2030-2040.

Matthies, S., Holzner, S., Feige, B., Scheel, C., Perlov, E., Ebert, D., van Elst, L.T., Philipsen, A., 2013. ADHD as a serious risk factor for early smoking and nicotine dependence in adulthood. *Journal of Attention Disorders* 17, 176-186.

Merali, Z., Du, L., Hrdina, P., Palkovits, M., Faludi, G., Poulter, M.O., Anisman, H., 2004. Dysregulation in the suicide brain: mRNA expression of corticotropin-releasing hormone

receptors and GABAA receptor subunits in frontal cortical brain region. *The Journal of neuroscience* 24, 1478-1485.

Mota, N., Rovaris, D., Bertuzzi, G., Contini, V., Vitola, E., Grevet, E., Roman, T., Callegari-Jacques, S., Hutz, M., Bau, C., 2012. DRD2/DRD4 heteromerization may influence genetic susceptibility to alcohol dependence. *Molecular psychiatry* 18, 401-402.

Müller, M.B., Zimmermann, S., Sillaber, I., Hagemeyer, T.P., Deussing, J.M., Timpl, P., Kormann, M.S., Droste, S.K., Kühn, R., Reul, J.M., 2003. Limbic corticotropin-releasing hormone receptor 1 mediates anxiety-related behavior and hormonal adaptation to stress. *Nature neuroscience* 6, 1100-1107.

Murat, B., Devost, D., Andrés, M., Mion, J., Boulay, V., Corbani, M., Zingg, H.H., Guillon, G., 2012. V1b and CRHR1 receptor heterodimerization mediates synergistic biological actions of vasopressin and CRH. *Molecular Endocrinology* 26, 502-520.

Najt, P., Fusar-Poli, P., Brambilla, P., 2011. Co-occurring mental and substance abuse disorders: a review on the potential predictors and clinical outcomes. *Psychiatry Research* 186, 159-164.

Neale, B.M., Medland, S.E., Ripke, S., Asherson, P., Franke, B., Lesch, K.-P., Faraone, S.V., Nguyen, T.T., Schäfer, H., Holmans, P., 2010. Meta-analysis of genome-wide association studies of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry* 49, 884-897.

Nesse, R.M., 2000. Is depression an adaptation? *Archives of General Psychiatry* 57, 14-20.

Nestler, E.J., 2005. The neurobiology of cocaine addiction. *Science & Practice Perspectives* 3, 4.

NIDA, 2010. Research Report: Cocaine: Abuse and Addiction. NIH Pub Number: 10-4166.

Papiol, S., Arias, B., Gastó, C., Gutiérrez, B., Catalán, R., Fañanás, L., 2007. Genetic variability at HPA axis in major depression and clinical response to antidepressant treatment. *Journal of affective disorders* 104, 83-90.

Onnink, A.M., Zwiers, M.P., Hoogman, M., Mostert, J.C., Kan, C.C., Buitelaar, J., Franke, B., 2013. Brain alterations in adult ADHD: effects of gender, treatment and comorbid depression. *Eur Neuropsychopharmacol* 24, 397-409.

Pisipati, S., Hashim, H., 2011. Vasopressin receptors in voiding dysfunction, *Urinary Tract*. Springer, pp. 453-483.

Polanczyk, G., Caspi, A., Williams, B., Price, T.S., Danese, A., Sugden, K., Uher, R., Poulton, R., Moffitt, T.E., 2009. Protective effect of CRHR1 gene variants on the development of adult depression following childhood maltreatment: replication and extension. *Archives of general psychiatry* 66, 978-985.

Polanczyk, G., de Lima, M., Horta, B., Biederman, J., Rohde, L., 2007. The worldwide prevalence of ADHD: a systematic review and metaregression analysis. *American journal of psychiatry* 164, 942-948.



- Prescott, C.A., Aggen, S.H., Kendler, K.S., 2000. Sex-specific genetic influences on the comorbidity of alcoholism and major depression in a population-based sample of US twins. *Archives of General Psychiatry* 57, 803-811.
- Reggio, P.H., 2008. Computational methods in drug design: modeling G protein-coupled receptor monomers, dimers, and oligomers, *Drug Addiction*. Springer, pp. 41-68.
- Ribbe, K., Ackermann, V., Schwitulla, J., Begemann, M., Papiol, S., Grube, S., Sperling, S., Friedrichs, H., Jahn, O., Sillaber, I., 2011. Prediction of the risk of comorbid alcoholism in schizophrenia by interaction of common genetic variants in the corticotropin-releasing factor system. *Archives of general psychiatry, archgenpsychiatry*. 2011.2100 v2011.
- Richards, J.M., Stipelman, B.A., Bornovalova, M.A., Daughters, S.B., Sinha, R., Lejuez, C., 2011. Biological mechanisms underlying the relationship between stress and smoking: state of the science and directions for future work. *Biological psychology* 88, 1-12.
- Ripke, S., Wray, N.R., Lewis, C.M., Hamilton, S.P., Weissman, M.M., Breen, G., Byrne, E.M., Blackwood, D.H., Boomsma, D.I., Cichon, S., 2013. A mega-analysis of genome-wide association studies for major depressive disorder. *Molecular psychiatry* 18, 497-511.
- Ripke, S.W.G.o.t.P.G.C., 2014. Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature* 511, 421-427.
- Rousseau, F., Schymkowitz, J., Itzhaki, L.S., 2012. Implications of 3D domain swapping for protein folding, misfolding and function, *Protein Dimerization and Oligomerization in Biology*. Springer, pp. 137-152.
- Rovaris, D.L., Mota, N.R., Callegari-Jacques, S.M., Bau, C.H.D., 2013a. Approaching “phantom heritability” in psychiatry by hypothesis-driven gene–gene interactions. *Frontiers in human neuroscience* 7.
- Rovaris, D.L., Mota, N.R., de Azeredo, L.A., Cupertino, R.B., Bertuzzi, G.P., Polina, E.R., Contini, V., Kortmann, G.L., Vitola, E.S., Grevet, E.H., 2013b. MR and GR functional SNPs may modulate tobacco smoking susceptibility. *Journal of Neural Transmission*, 1-7.
- Rucklidge, J.J., Downs-Woolley, M., Brown, J.A., Harrow, S.E., 2014. Psychiatric Comorbidities in a New Zealand sample of adults with ADHD. *J Atten Disord*, 1-9.
- Seney, M.L., Sibille, E., 2014. Sex differences in mood disorders: perspectives from humans and rodent models. *Biology of sex differences* 5, 17.
- Sheikh, H.I., Kryski, K.R., Smith, H.J., Hayden, E.P., Singh, S.M., 2013. Corticotropin-Releasing Hormone System Polymorphisms are Associated with Children’s Cortisol Reactivity. *Neuroscience*.
- Silverstein, B., 2014. Gender differences in the prevalence of somatic versus pure depression: a replication.

- Simon, V., Czobor, P., Bálint, S., Mészáros, Á., Bitter, I., 2009. Prevalence and correlates of adult attention-deficit hyperactivity disorder: meta-analysis. *The British Journal of Psychiatry* 194, 204-211.
- Sinha, R., Garcia, M., Paliwal, P., Kreek, M.J., Rounsaville, B.J., 2006. Stress-induced cocaine craving and hypothalamic-pituitary-adrenal responses are predictive of cocaine relapse outcomes. *Archives of general psychiatry* 63, 324.
- Smoller, J.W., Yamaki, L.H., Fagerness, J.A., Biederman, J., Racette, S., Laird, N.M., Kagan, J., Snidman, N., Faraone, S.V., Hirshfeld-Becker, D., 2005. The corticotropin-releasing hormone gene and behavioral inhibition in children at risk for panic disorder. *Biological psychiatry* 57, 1485-1492.
- Stephens, M.A.C., Wand, G., 2012. Stress and the HPA axis: role of glucocorticoids in alcohol dependence. *Alcohol research: current reviews* 34, 468.
- Stergiakouli, E., Thapar, A., 2010. Fitting the pieces together: current research on the genetic basis of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). *Neuropsychiatric disease and treatment* 6, 551.
- Suda, T., Kageyama, K., Sakihara, S., Nigawara, T., 2004. Physiological roles of urocortins, human homologues of fish urotensin I, and their receptors. *Peptides* 25, 1689-1701.
- Sullivan, P.F., Neale, M.C., Kendler, K.S., 2000. Genetic epidemiology of major depression: review and meta-analysis. *Genetic Epidemiology* 157.
- Szczepankiewicz, A., Leszczyńska-Rodziewicz, A., Pawlak, J., Rajewska-Rager, A., Wilkosc, M., Zaremba, D., Dmitrzak-Weglarczyk, M., Skibinska, M., Hauser, J., 2013. Epistatic interaction between CRHR1 and AVPR1b variants as a predictor of major depressive disorder. *Psychiatric Genetics*.
- Tae, W.S., Kim, S.S., Lee, K.U., Nam, E.C., Kim, K.W., 2008. Validation of hippocampal volumes measured using a manual method and two automated methods (FreeSurfer and IBASPM) in chronic major depressive disorder. *Neuroradiology* 50, 569-81.
- Timpl, P., Spanagel, R., Sillaber, I., Kresse, A., Reul, J.M., Stalla, G.K., Blanquet, V., Steckler, T., Holsboer, F., Wurst, W., 1998. Impaired stress response and reduced anxiety in mice lacking a functional corticotropin-releasing hormone receptor 1. *Nature genetics* 19, 162-166.
- Treutlein, J., Kissling, C., Frank, J., Wiemann, S., Dong, L., Depner, M., Saam, C., Lascorz, J., Soyka, M., Preuss, U., 2006. Genetic association of the human corticotropin releasing hormone receptor 1 (CRHR1) with binge drinking and alcohol intake patterns in two independent samples. *Molecular psychiatry* 11, 594-602.
- Tyrka, A.R., Price, L.H., Gelernter, J., Schepker, C., Anderson, G.M., Carpenter, L.L., 2009. Interaction of childhood maltreatment with the corticotropin-releasing hormone receptor gene: effects on hypothalamic-pituitary-adrenal axis reactivity. *Biological psychiatry* 66, 681-685.

UNODC, 2013. World Drug Report. United Nations publication Sales No. E.13.XI.6.

Vale, W., Spiess, J., Rivier, C., Rivier, J., 1981. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science* 213, 1394-1397.

Valencia, A., Pazos, F., 2002. Computational methods for the prediction of protein interactions. *Current opinion in structural biology* 12, 368-373.

van de Pavert, S.A., Clark, I.J., Rao, A., Vrana, K.E., Schwartz, J., 1997. Effects of vasopressin and elimination of corticotropin-releasing hormone-target cells on pro-opiomelanocortin mRNA levels and adrenocorticotropin secretion in ovine anterior pituitary cells. *J Endocrinol* 134, 139-47.

van der Kooij, M.A., Glennon, J.C., 2007. Animal models concerning the role of dopamine in attention-deficit hyperactivity disorder. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 31, 597-618.

van Londen, L., Goekoop, J.G., van Kempen, G.M., Frankhuijzen-Sierevogel, A.C., Wiegant, V.M., van der Velde, E.A., De Wied, D., 1997. Plasma levels of arginine vasopressin elevated in patients with major depression. *Neuropsychopharmacology* 17, 284-292.

Van West, D., Del-Favero, J., Aulchenko, Y., Oswald, P., Souery, D., Forsgren, T., Sluijs, S., Bel-Kacem, S., Adolfsson, R., Mendlewicz, J., 2004. A major SNP haplotype of the arginine vasopressin 1B receptor protects against recurrent major depression. *Molecular psychiatry* 9, 287-292.

Van West, D., Del-Favero, J., Deboutte, D., Van Broeckhoven, C., Claes, S., 2009. Arginine vasopressin receptor gene-based single-nucleotide polymorphism analysis in attention deficit hyperactivity disorder. *Psychiatric genetics* 19, 102-103.

Villanueva, R., 2013. Neurobiology of Major Depressive Disorder. *Neural Plast* 2013, 873278.

Wardenaar, K.J., Vreeburg, S.A., van Veen, T., Giltay, E.J., Veen, G., Penninx, B.W., Zitman, F.G., 2011. Dimensions of depression and anxiety and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Biological psychiatry* 69, 366-373.

Wasserman, D., Wasserman, J., Sokolowski, M., 2010. Genetics of HPA-axis, depression and suicidality. *European Psychiatry* 25, 278-280.

Wild, T.C., el-Guebaly, N., Fischer, B., Brissette, S., Brochu, S., Bruneau, J., Noël, L., Rehm, J., Tyndall, M., Mun, P., 2005. Comorbid depression among untreated illicit opiate users: results from a multisite Canadian study. *Can J Psychiatry*, 50, 512-8.

Willcutt, E.G., 2012. The prevalence of DSM-IV attention-deficit/hyperactivity disorder: a meta-analytic review. *Neurotherapeutics* 9, 490-499.

Woods, A.S., Jackson, S.N., 2013. How adenylate cyclase choreographs the pas de deux of the Receptors heteromerization dance. *Neuroscience*.

Xiong, F., Zhang, L., 2012. Role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in developmental programming of health and disease. *Frontiers in neuroendocrinology*.

Xue, B., Dunbrack, R.L., Williams, R.W., Dunker, A.K., Uversky, V.N., 2010. PONDR-FIT: a meta-predictor of intrinsically disordered amino acids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* 1804, 996-1010.

Yan, J., Aliev, F., Webb, B.T., Kendler, K.S., Williamson, V.S., Edenberg, H.J., Agrawal, A., Kos, M.Z., Almasy, L., Nurnberger, J.I., 2013. Using genetic information from candidate gene and genome-wide association studies in risk prediction for alcohol dependence. *Addiction biology*.

Yang, J., Pan, Y.-J., Yin, Z.-K., Hai, G.-F., Lu, L., Zhao, Y., Wang, D.-X., Wang, H., Wang, G., 2012. Effect of arginine vasopressin on the behavioral activity in the behavior despair depression rat model. *Neuropeptides* 46, 141-149.

Young, S.F., Griffante, C., Aguilera, G., 2007. Dimerization between vasopressin V1b and corticotropin releasing hormone type 1 receptors. *Cel Mol neurobiol* 27, 439-461.

Young-Wolff, K.C., Enoch, M.-A., Prescott, C.A., 2011. The influence of gene–environment interactions on alcohol consumption and alcohol use disorders: A comprehensive review. *Clinical psychology review* 31, 800-816.

Zai, C.C., Muir, K.E., Nowrouzi, B., Shaikh, S.A., Choi, E., Berall, L., Trépanier, M.-O., Beitchman, J.H., Kennedy, J.L., 2012. Possible genetic association between vasopressin receptor 1B and child aggression. *Psychiatry research*.

Zmijewski, M.A., Slominski, A.T., 2010. Emerging role of alternative splicing of CRF1 receptor in CRF signaling. *Acta biochimica Polonica* 57, 1.

Zorrilla, E.P., Valdez, G.R., Nozulak, J., Koob, G.F., Markou, A., 2002. Effects of antalarmin, a CRF type 1 receptor antagonist, on anxiety-like behavior and motor activation in the rat. *Brain research* 952, 188-199.

## Anexo 1 – Produção científica adicional no período de mestrado

## Review

For reprint orders, please contact: [reprints@futuremedicine.com](mailto:reprints@futuremedicine.com)

## Pharmacogenomics



## Should we keep on? Looking into pharmacogenomics of ADHD in adulthood from a different perspective

A considerable proportion of adults with attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) do not respond to the treatment with methylphenidate. This scenario could be due to inherited interindividual differences that may alter pharmacologic treatment response. In this sense, in 2012 we conducted a systematic search on PUBMED-indexed literature for articles containing information about pharmacogenomics of ADHD in adults. Five studies were found on methylphenidate pharmacogenomics and the only significant association was reported by one particular study. However, this single association with the *SLC6A3* gene was not replicated in two subsequent reports. In the present review, although we could not find additional pharmacogenomics studies, we discuss these up-to-date findings and suggest new approaches for this field. Additionally, using systemic-oriented databases, we provide a broad picture of new possible candidate genes as well as potential gene–gene interactions to be investigated in pharmacogenomics of persistent ADHD.

**Keywords:** adults • attention-deficit/hyperactivity disorder • gene–gene interactions • methylphenidate • pharmacogenomics

Attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) is a worldwide psychiatric condition characterized by inattention and/or hyperactivity/impulsivity symptoms that emerge in childhood. In about 15% of the cases it persists into adulthood as a full diagnosis while in 40–65% there is only partial remission of the symptoms [1]. In adults, ADHD is associated with financial difficulties, interpersonal problems and a variety of comorbidities, including an increased risk for substance use disorders [2].

ADHD has a multifactorial etiology with heritability estimates ranging from 70 to 80% in both children and adults [3–5]. On the most recent review on the genetics of ADHD in adults, Franke *et al.* [3] showed that associations have been found with classical dopaminergic and serotonergic genes – such as the dopamine D4 (*DRD4*) and D5 (*DRD5*) receptors, the catechol-O-methyltransferase (*COMT*), the dopa decarboxylase (*DDC*), the monoamine oxidase B (*MAOB*), the

serotonin 2A receptor (*HTR2A*) and the tryptophan hydroxylase-1 (*TPHI*) – and that the most robust association, derived from a meta-analysis of 1440 cases and 1769 controls, was found for a haplotype of the dopamine transporter gene (*SLC6A3*). Additionally, the authors also mention that linkage and genome-wide association studies (GWAS) have suggested new candidate *loci* for ADHD, such as *LPHN3*, which encodes a G-protein-coupled receptor, and *CDH13*, which encodes a molecule involved in cell adhesion.

Although both pharmacological and non-pharmacological treatments may be indicated for ADHD, pharmacotherapy with methylphenidate (MPH) seems to be the first-line treatment of choice [6,7]. Meta-analytic studies have consistently shown a significant effect of MPH on symptom reduction in adults, with estimated effect sizes ranging from moderate [8,9] to large [10]. Despite the proved general efficacy of

Diego L Rovaris<sup>1,2</sup>,  
Nina R Mota<sup>1,2</sup>, Bruna Santos  
da Silva<sup>1,2</sup>, Pricila Girardi<sup>3</sup>,  
Marcelo M Victor<sup>2</sup>,  
Eugenio H Grevet<sup>2,4</sup>,  
Claiton HD Bau<sup>5,6,7,8</sup>  
& Verônica Contini<sup>9</sup>

<sup>1</sup>Department of Genetics, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil


<sup>2</sup>ADHD Outpatient Clinic, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil

<sup>3</sup>Postgraduate Program in Biotechnology, Centro Universitário UNIVATES, Brazil

<sup>4</sup>Department of Psychiatry, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil

<sup>5</sup>Campus do Vale, UFRGS, Departamento de Genética, Av. Bento Gonçalves, 9500, 91501-91970, Porto Alegre, RS, Brazil

\*Author for correspondence:  
Tel: +55 5551 3308 6718  
Fax: +55 5551 3308 7311  
[claiton.bau@ufrgs.br](mailto:claiton.bau@ufrgs.br)

Future  
Medicine part of 

## Anexo 2 – Aprovação Comissão de Ética em Pesquisa do HCPA



### HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

#### RESOLUÇÃO

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB0000921) analisaram o projeto:

**Projeto:** 01-321

**Versão do Projeto:** 22/01/2002

**Versão do TCLE:** 22/01/2002

**Pesquisadores:**

PAULO SILVA BELMONTE DE ABREU  
CLAITON H. O. BAU  
EUGENIO GREVET  
CARLOS ALBERTO IGLESIAS SALGADO  
BETINA CHAIT

**Título:** ESTUDO DAS BASES MOLECULARES DO TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO/HIPERATIVIDADE EM ADULTOS

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, inclusive quanto ao seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Os membros do CEP/HCPA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente ao CEP/HCPA.

Por pertencer a uma área temática especial este projeto somente poderá ser iniciado após a sua aprovação pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Porto Alegre, 25 de janeiro de 2002.

Prof. Themis Reverbel da Silveira  
Coordenadora do GPPG e CEP-HCPA

### Anexo 3 – Aprovação Comissão de Ética em Pesquisa da PUCRS



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Faculdade de Psicologia  
Programa de Pós-Graduação em Psicologia

Ofício 063/2010 – SGL

Porto Alegre, 16 de novembro de 2010.

Senhor(a) Pesquisador(a)

A Comissão Científica da Faculdade de Psicologia da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo intitulado **“COMPORTAMENTOS MOTIVADOS EM USUÁRIAS DE CRACK: RELAÇÃO COM NEGLIGÊNCIA NA INFÂNCIA E O CRAVING”**.

Sua investigação está autorizada a partir da presente data, sem a necessidade de passar pelo Comitê de Ética, devido à aprovação do projeto maior **“ESTILOS PARENTAIS, NEGLIGÊNCIA NA INFÂNCIA E O CRAVING EM USUÁRIAS DE CRACK: RELAÇÃO COM FUNÇÕES EXECUTIVAS, COMPORTAMENTO AGRESSIVO E MARCADORES BIOLÓGICOS”**, conforme ofício CEP nº 1229/10.

Atenciosamente,

  
Prof. Dra. Margareth da Silva Oliveira

Coordenadora da Comissão Científica da Faculdade de Psicologia

Ilmo(a) Sr(a)

Prof. Orientador: Rodrigo Grassi de Oliveira

Pesquisador(a): Ingrid D'Avila Francke

**PUCRS**

**Campus Central**

Av. Ipiranga, 6681 – P. 11– 9º andar – CEP 90619-900

Porto Alegre – RS – Brasil

Fone: (51) 3320-3500 – Fax (51) 3320 – 3633

E-mail: [psicologia-pg@pucrs.br](mailto:psicologia-pg@pucrs.br)

[www.pucrs.br/psipos](http://www.pucrs.br/psipos)



**Anexo 4 – Aprovação Comissão de Ética em Pesquisa do HCPA****GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE****RESOLUÇÃO**

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

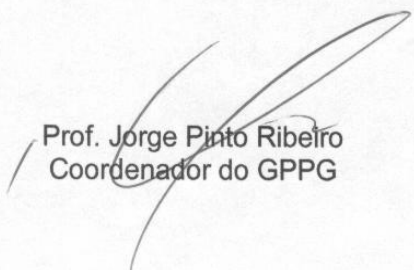
**Número:** 136/93

**Título:** " HETEROGENEIDADE GENÉTICA E FENOTÍPICA NO ALCOOLISMO ".

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

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

Porto Alegre, 10 de janeiro de 1994.



Prof. Jorge Pinto Ribeiro  
Coordenador do GPPG



