

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
Instituto de Biociências  
Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

# **Genética do eixo HPA e marcas moleculares do estresse na dependência de crack**

**DIEGO LUIZ ROVARIS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

**Orientador: Prof. Dr. Claiton Henrique Dotto Bau**

**Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Grassi de Oliveira**

Porto Alegre, março de 2017

## Instituições Financiadoras

---

A presente Tese de Doutorado foi desenvolvida nos seguintes laboratórios:

- Laboratório de Genética Humana Molecular do Departamento de Genética do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio grande do Sul.
- *Developmental Cognitive Neuroscience Lab* do Instituto de Pesquisas Biomédicas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

O aluno recebeu bolsa de estudos concedida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). As instituições governamentais que fomentaram a presente Tese de Doutorado foram: (1) CNPq, (2) Departamento de Ciência e Tecnologia (Decit/SCTIE/MS), (3) Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e (3) Secretaria Nacional de Políticas Sobre Drogas - Ministério da Justiça.

*"If you're looking for trouble  
You came to the right place  
If you're looking for trouble  
Just look right in my face  
I was born standing up  
And talking back  
My daddy was a green-eyed mountain jack  
Because I'm evil, my middle name is misery  
Well I'm evil, so don't you mess around with me"*

*Presley, E*

*"They tried to make me go to rehab  
But I said "no, no, no"  
Yes, I've been black, but when I come back  
You'll know-know-know  
I ain't got the time  
And if my daddy thinks I'm fine  
He's tried to make me go to rehab  
But I won't go, go, go"*

*Winehouse, A*

## Agradecimentos

---

Tive a sorte de contar com muitas pessoas incríveis ao longo de todo esse período, cujo conhecimento e apoio foram fundamentais para a execução do meu trabalho. Por essa ajuda fundamental e estupenda, agradeço fortemente as seguintes pessoas:

Claiton Bau  
Rodrigo Grassi de Oliveira  
Lucimar Rovaris  
Marines Rovaris  
Silvana Andara  
Fabiana Michelsen de Andrade  
Sídia Callegari-Jacques  
Eugenio Grevet  
Verônica Contini  
Katiane Silva  
Jaqueline Schuch  
Bruna Santos  
Nina Mota  
Djenifer Kappel  
Renata Cupertino  
Diana Müller  
Angelita Aroche  
Cibele Bandeira  
Alana de Castro  
Cristina Winkler  
Lauren Alves  
Breno Sanvicente Vieira  
Elmo Cardoso

Gostaria de agradecer as Professoras Maria Cátira Bortolini e Júlia Pasqualini Genro pelas contribuições colocadas durante a minha qualificação de Doutorado e ao Professor Francisco Mauro Salzano pela revisão da primeira versão oficial da minha Tese. Também gostaria de dedicar uma parte significativa desses agradecimentos aos amigos da divisão de adultos do PRODAH-HCPA e do DCNL-PUCRS e aos meus amigos da praia de Figueirinha e de Porto Alegre.

Muito obrigado!

## Organização da Tese

---

A presente Tese de Doutorado segue a estrutura de um gene clássico:

- A região promotora da Tese (Seção I) reúne a Introdução geral (Capítulo 1) e um artigo de revisão publicado como um capítulo de livro (Capítulo 2). Além disso, a Seção I apresenta no Capítulo 3 a Justificativa e Objetivos da presente Tese de Doutorado.
- A região codificadora da Tese (Seção II), formada pelos Capítulos 4 a 10, apresenta dados publicados e ainda não publicados obtidos ao longo dos quatro anos de Doutorado.
- Na região 3' UTR da Tese (Seção III), há uma Discussão geral (Capítulo 11), além de um glossário (Capítulo 12) contendo termos e expressões que facilitarão o entendimento da revisão de literatura conduzida na Introdução geral, bem como de alguns aspectos apresentados na Discussão. Por fim, uma cauda Poli-Abstracts reúne uma lista de outras produções científicas que ocorreram no período do Doutorado (Capítulo 13).

## Sumário

---

Lista de abreviaturas .....	10
Lista de figuras .....	13
Resumo .....	14
Abstract .....	15
<b>SEÇÃO I .....</b>	<b>16</b>
<b>Capítulo 1 - Introdução geral .....</b>	<b>17</b>
<b>1.1 Breve contextualização.....</b>	<b>17</b>
<b>1.2 Epidemiologia da dependência de cocaína e crack (DCC) .....</b>	<b>18</b>
<b>1.3 Caracterização fenotípica da DCC.....</b>	<b>20</b>
1.3.1 Mecanismo de ação da cocaína .....	20
1.3.2 Diagnóstico.....	22
1.3.3 Comorbidades psiquiátricas.....	24
1.3.4 Tratamento da DCC.....	24
<i>1.3.4.1 Tratamento farmacológico.....</i>	<i>24</i>
<i>1.3.4.2 Tratamento não farmacológico .....</i>	<i>26</i>
<b>1.4 Diferenças entre a dependência de cocaína em pó e a dependência de crack .....</b>	<b>26</b>
<b>1.5 Fatores ambientais e biológicos .....</b>	<b>28</b>
1.5.1 Trauma precoce e cuidado parental na DCC .....	28
1.5.2 Desregulação do sistema de estresse e DCC .....	30
1.5.3 Fatores genéticos envolvidos na DCC .....	34
1.5.4 Interações genéticas e DCC.....	36
1.5.5 Fator neurotrófico derivado do cérebro e DCC .....	38
1.5.6 Envelhecimento celular acelerado e DCC .....	41
<b>Capítulo 2 – Genetic findings on the relationship between smoking and the stress system.....</b>	<b>78</b>
Introduction.....	79
The HPA axis and the molecular effects of GCs .....	79
The glucocorticoid receptor coding gene (NR3C1).....	81

Functional aspects of NR3C1 polymorphisms.....	82
Effects of NR3C1 polymorphisms on smoking behavior .....	83
The MR coding gene.....	83
Functional aspects of NR3C2 polymorphisms.....	85
Effects of NR3C2 polymorphisms on smoking behavior .....	85
Potential for MR/GR interactions beyond the statistical level .....	85
Perspectives.....	85
Applications to other addictions and substance misuse .....	86
<b>Capítulo 3 Justificativa e Objetivos .....</b>	<b>91</b>
3.1 Justificativa .....	91
3.2 Objetivo Geral .....	92
3.3 Objetivos Específicos .....	92
<b>SEÇÃO II .....</b>	<b>94</b>
<b>Capítulo 4 – Corticosteroid receptor genes and childhood neglect influence susceptibility to crack/cocaine addiction and response to detoxification treatment.....</b>	<b>95</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>96</b>
<b>Methods and materials .....</b>	<b>97</b>
Design.....	97
Sample.....	97
Instruments .....	98
SNP selection and laboratory methods .....	98
Statistical analysis .....	98
<b>Results.....</b>	<b>99</b>
Case-only analysis for G x E interactions on crack/cocaine addiction susceptibility.....	99
Predictors of severity of withdrawal symptoms over time .....	99
Additional analyses including rs10052957 and rs41423247 .....	99
<b>Discussion.....</b>	<b>100</b>
<b>Supplementary material.....</b>	<b>104</b>

**Capítulo 5 – Glucocorticoid receptor gene modulates severity of depression in women with crack cocaine addiction.....113**

**Introduction..... 115**

**Experimental procedures ..... 115**

    Sample and diagnostic procedures ..... 115

    Genes and SNPs selection ..... 116

*NR3C2 (the MR coding gene – chromosome 4q31.1)..... 116*

*NR3C1 (the GR coding gene – chromosome 5q31-32) ..... 116*

*FKBP5 (the FK506 binding protein 5 coding gene – chromosome 6p21.31) ..... 116*

*CRHR1 (the CRH receptor 1 coding gene – chromosome 17q21.31)..... 116*

    Genotyping ..... 116

    Statistical analysis ..... 116

*Exploratory analysis in a transversal design ..... 116*

*Driven analysis in a longitudinal design ..... 117*

**Results..... 117**

    Exploratory analysis results ..... 117

    Driven analysis results..... 117

**Discussion..... 117**

**Supplementary material..... 124**

**Capítulo 6 – Effects of crack cocaine addiction and stress-related genes on peripheral BDNF levels .....164**

**Introduction..... 165**

**Methods ..... 166**

    Study design, sample, and ethics..... 166

    Diagnoses ..... 166

    Laboratory methods..... 166

*BDNF measurements ..... 166*

*SNPs selection and genotyping ..... 166*

    Statistical analyses ..... 167

**Results..... 168**

    Case-control status ..... 168

    Serum BDNF levels variability ..... 168



Secondary analyses in the crack cocaine sample .....	169
<b>Discussion.....</b>	<b>169</b>
<b>Supplementary material.....</b>	<b>173</b>
<b>Capítulo 7 – Effects of telomere length and childhood adversities on depression in a crack cocaine addiction background .....</b>	<b>178</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>180</b>
<b>Methods .....</b>	<b>181</b>
Study design .....	181
Subjects .....	181
Clinical evaluation .....	181
Laboratory methods.....	182
Statistical analyses .....	182
<b>Results.....</b>	<b>182</b>
<b>Discussion.....</b>	<b>183</b>
<b>Supplementary material.....</b>	<b>196</b>
<b>Capítulo 8 – Dados adicionais relevantes.....</b>	<b>203</b>
<b>Capítulo 9 – Stress-related SNPs predicting childhood adversities in crack cocaine addicted women.....</b>	<b>209</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>211</b>
<b>Methods .....</b>	<b>212</b>
Subjects clinical evaluation, and ethics.....	212
SNPs selection and laboratory methods.....	213
Statistical analyses .....	213
<b>Results.....</b>	<b>214</b>
Single marker analyses.....	214
Haplotypic analyses.....	214
SNP-SNP interaction analyses .....	215
Complementary analyses.....	215
<b>Discussion.....</b>	<b>216</b>
<b>Supplementary material.....</b>	<b>232</b>

Capítulo 10 – Cracking the puzzle of crack addiction epidemic in Brazil .....	240
<b>SEÇÃO III .....</b>	<b>245</b>
<b>Capítulo 11 – Discussão geral .....</b>	<b>246</b>
11.1 Uma síntese dos resultados encontrados .....	247
11.2 As interações gene-gene, o tabagismo e a cocaína fumada.....	248
11.3 As interações gene-ambiente e a não existência delas .....	250
11.4 As marcas moleculares do estresse .....	251
11.5 As perspectivas e os próximos passos .....	252
<b>Capítulo 12 – Glossário .....</b>	<b>257</b>
<b>Capítulo 13 – Outras produções científicas .....</b>	<b>264</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>291</b>
Apêndice I – Parecer da CONEP sobre o COCCaINE .....	292

## Lista de abreviaturas

---

### Em português

5-HTTLPR	Polimorfismo do gene do transportador de serotonina
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
DAT	Transportador de dopamina
DCC	Dependência de cocaína e crack
DSM	Manual Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GABRA2	Receptor de ácido gama-aminobutírico tipo 2
HPA	Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal
LENAD	Levantamento nacional de álcool e drogas
NET	Transportador de norepinefrina
SERT	Transportador de serotonina
TDM	Transtorno depressivo maior

### Em inglês

<i>ACTH</i>	<i>Adrenocorticotropic hormone</i>
<i>AF1</i>	<i>Activation function 1</i>
<i>ASSIST</i>	<i>The alcohol, smoking and substance involvement screening test</i>
<i>BDNF</i>	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
<i>CDK1</i>	<i>Cyclin-dependent kinase 1</i>
<i>CI</i>	<i>Confidence interval</i>
<i>coOR</i>	<i>Case-only odds ratio</i>
<i>COPD</i>	<i>Chronic obstructive pulmonary disease</i>
<i>CSSA</i>	<i>Cocaine selective severity assessment</i>
<i>CRH</i>	<i>Corticotropin-releasing hormone</i>
<i>CRHR1</i>	<i>CRH receptor type 1</i>
<i>CTQ</i>	<i>Childhood trauma questionnaire</i>
<i>DBD</i>	<i>DNA-binding domain</i>
<i>FAM53B</i>	<i>Family with sequence similarity 53, member B</i>
<i>FKBP4</i>	<i>FK506 binding protein 4</i>

<i>FKBP5</i>	<i>FK506 binding protein 5</i>
<i>FTND</i>	<i>Fagerström test for nicotine dependence</i>
<i>GBD</i>	<i>Global burden of diseases</i>
<i>GC</i>	<i>Glucocorticoid</i>
<i>GEE</i>	<i>Generalized estimating equations</i>
<i>GR</i>	<i>Glucocorticoid receptor</i>
<i>GR<math>\beta</math></i>	<i>Glucocorticoid receptor beta isoform</i>
<i>GRE</i>	<i>Glucocorticoid responsive element</i>
<i>GWAS</i>	<i>Genome-wide association study</i>
<i>G<math>\times</math>E</i>	<i>Gene-environment</i>
<i>HPA</i>	<i>Hypothalamic-pituitary-adrenal axis</i>
<i>IQ</i>	<i>Intelligence quotient</i>
<i>KSADS-PL</i>	<i>Kiddie-Sads-present and lifetime version</i>
<i>LBD</i>	<i>Ligand-binding domain</i>
<i>MDD</i>	<i>Major depressive disorder</i>
<i>MINI</i>	<i>Mini international neuropsychiatric interview</i>
<i>MMSE</i>	<i>Mini mental state examination</i>
<i>MR</i>	<i>Mineralocorticoid receptor</i>
<i>mRNA</i>	<i>Messenger RNA</i>
<i>nAChRs</i>	<i>Nicotinic acetylcholine receptors</i>
<i>NCOR2</i>	<i>Nuclear receptor corepressor 2</i>
<i>NPC</i>	<i>Nuclear pore complex</i>
<i>NR3C1</i>	<i>Nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1</i>
<i>NR3C2</i>	<i>Nuclear receptor subfamily 3, group C, member 2</i>
<i>NTD</i>	<i>N-terminal transactivation domain</i>
<i>PCR</i>	<i>Polymerase chain reaction</i>
<i>PGC</i>	<i>Psychiatric Genomics Consortium</i>
<i>PN</i>	<i>Physical neglect</i>
<i>POMC</i>	<i>Pro-opiomelanocortin</i>
<i>PPI</i>	<i>Protein-protein interaction</i>
<i>RFLP</i>	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
<i>RM</i>	<i>Repeated measures</i>

*SCID* *Structured clinical interview for DSM*  
*SNP* *Single nucleotide polymorphism*  
*TrkB* *Tyrosine receptor kinase B (BDNF receptor)*  
*T/S* *Telomere/single copy gene*  
*TSST* *Trier social stress test*  
*WASI* *Wechsler abbreviated scale of intelligence*

## Lista de figuras

---

Figura 1 - Perfil sociodemográfico dos usuários de crack no Brasil .....	19
Figura 2 - Efeito farmacológico da cocaína proposto atualmente .....	21
Figura 3 - Herdabilidades estimadas a partir de estudos com gêmeos e <i>genome complex trait analysis</i> .....	37
Figura 4 - Replicação da ponta dos cromossomos pela telomerase .....	42
Figura 5 - Modelos estatísticos que consideram o efeito de uma terceira variável .....	251
Figura 6 - O sistema dopaminérgico mesocorticolímbico .....	260

## Resumo

---

A dependência de cocaína ou crack (DCC) é atualmente um grande problema de saúde pública, estando associada à violência urbana e marginalização social. A DCC é um transtorno psiquiátrico altamente influenciado pela genética, com uma herdabilidade estimada em 70%. Dessa forma, a identificação de fatores possivelmente envolvidos no curso desse transtorno é uma demanda de saúde pública emergente. Dentre os fatores biológicos, um grande número de evidências sugere o estresse, a partir da ação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), como um mecanismo biológico envolvido na DCC. Mudanças na liberação de cortisol geradas por alterações do eixo HPA parecem ter um papel tanto na iniciação, quanto na manutenção e recaída ao uso de cocaína e crack. Além disso, o funcionamento do eixo HPA é individualmente heterogêneo e influenciado pelo alto grau de variabilidade nos genes que codificam as proteínas desse sistema. Dessa forma, a presente Tese de Doutorado teve como objetivo principal avaliar os efeitos de variações em genes que codificam proteínas do eixo HPA, marcas moleculares do estresse, eventos traumáticos sofridos na infância e suas potenciais interações e correlações na dependência de crack. A partir de duas amostras, uma de mulheres (n = 288) e outra de homens (n = 280) dependentes de crack, essa Tese pôde mostrar que variantes nos genes que codificam os receptores de mineralocorticoide (*NR3C2*), de glicocorticoide (*NR3C1*) e do hormônio liberador de corticotrofina (*CRHR1*) estão envolvidas em diversos aspectos da DCC, incluindo susceptibilidade, resposta ao tratamento de desintoxicação e gravidade dos sintomas de depressão. Variantes nesses genes também foram associadas com o histórico de adversidades sofridas na infância, incluindo relatos de abuso e negligência. Além disso, os efeitos de variantes genéticas do sistema de estresse nos níveis séricos do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) não foram detectados nos dependentes de crack, possivelmente devido à grande influência da DCC nos níveis dessa neurotrofina. No caso de marcas moleculares, como o encurtamento dos telômeros, nossos dados também sugerem que a DCC torna indetectável a bem conhecida associação entre envelhecimento celular precoce e transtorno depressivo maior, e isso pode estar relacionado ao grande tamanho de efeito que a DCC apresenta sobre essa marca molecular do estresse. Assim, os dados da presente Tese de Doutorado corroboram a hipótese inicial de que a variabilidade genética do sistema de estresse está associada à DCC. A partir de esforços gerados durante o desenvolvimento desse trabalho, uma nova perspectiva envolvendo análises de varredura genômica e epigenômica resultará, no futuro próximo, em uma maior compreensão dos mecanismos biológicos envolvidos no desenvolvimento e curso clínico da DCC.

## Abstract

---

Cocaine or crack addiction is currently a major public health problem, associated with urban violence, social marginalization, and early death. It is a psychiatric disorder highly influenced by genetics, presenting a heritability estimated at 70%. Thus, the identification of sociodemographic and biological factors possibly involved in the course of this disorder is an emerging public health demand, mainly in Brazil, the # 1 consumer of crack. Among the possible factors, a bulk of evidence suggests that stress, related to the action of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, is a biological mechanism involved in cocaine or crack addiction. Dysregulations in cortisol release generated by altered response of the HPA axis appear to play an important role on several aspects of this addiction, including initiation, maintenance, and relapse. Furthermore, the functioning of the HPA axis is individually heterogeneous and influenced by the high degree of variability in the genes coding the proteins of that system. Therefore, this Doctoral thesis aimed to evaluate the role of stress-related polymorphisms, childhood adversities, molecular signatures of stress, and their potential interactions and correlations on crack addiction. Using two clinical samples, one composed by crack addicted women (n = 288) and another by crack addicted men (n = 280), this thesis suggested that variants in genes coding the mineralocorticoid receptor (*NR3C2*), the glucocorticoid receptor (*NR3C1*) and the corticotropin releasing hormone receptor 1 (*CRHR1*) are involved in many aspects of crack addiction, including susceptibility, response to detoxification treatment, and severity of depression symptoms. Variants in these genes were also associated with a history of childhood adversities, including reports of abuse and neglect. Additionally, the effects of stress-related genetic variants on brain-derived neurotrophic factor (BDNF) serum levels were not detected in crack addicted patients, possibly due to the large influence of crack addiction on this neurotrophin levels. Regarding molecular signatures of stress, such as accelerated shortening of telomeres, our findings also suggest that crack addiction renders undetectable the well-known association between accelerated cellular aging and major depressive disorder, and this may be related to the large effect size that crack addition has on this molecular signature. Therefore, data from the present Doctoral thesis corroborates the initial hypothesis that the genetic variability in stress system-related genes is associated with crack addiction. The efforts employed in the development of this work also led to a new perspective involving genome and epigenome wide analyses, which will soon contribute to a better comprehension of the biological underpinnings involved in the development and clinical course of cocaine or crack addiction.



# Seção I

*“Todas as coisas são números”  
Pitágoras*

# 1

## Introdução geral

### 1.1 Breve contextualização

*“Eu gosto dos franceses porque eles tiram a coroa dos reis antes de cortar a cabeça deles. Assim a coroa não amassa e você pode guardá-la num museu em Paris ou vendê-la para uma pessoa com muito dinheiro, como nós.”*

O trecho acima foi retirado do livro intitulado *“Festa no covil”*, do escritor mexicano Juan Pablo Villalobos. Nesse curto romance, um pequeno “príncipe”, chamado Tochtli, conta sua própria história. Esse garoto vive trancado em um suposto palácio, cheio de quartos, sem saber toda a verdade sobre o seu pai, um perigoso narcotraficante mexicano, conhecido, segundo Tochtli, como Yolcaut, o rei.

Tochtli gosta de ler o dicionário diariamente para aprender palavras difíceis e, como não vai à escola, conta que conhece, talvez, umas 13 ou 14 pessoas, mas que se fosse contabilizar as pessoas mortas dentro do seu palácio, esse número aumentaria um pouco, aproximando-se de 20.

O maior sonho de Tochtli consiste em completar seu mini zoológico com um hipopótamo anão da Libéria, e esse contexto todo em muito lembra o colombiano Pablo Escobar, dono de “palácios” e de um mini zoológico particular. Sem sombra de dúvidas, Pablo Escobar, da mesma forma que Yolcaut, foi um rei do narcotráfico. É bem possível que Pablo tenha sido o traficante de cocaína mais temido do mundo.

Infelizmente, as civilizações pré-colombianas, que há mais de 4.000 anos já tinham o hábito de cultivar e ingerir folhas do arbusto de coca (Biondich e Joslin 2015), não puderam prever que esse presente “enviado pelo Deus Sol” despertaria o interesse de traficantes de drogas, como Pablo Escobar, e que causaria tantos problemas. Embora já usada

fora dos Andes na idade moderna, foi somente no começo do século passado, quando passou a fazer parte da composição de tônicos e elixires usados no tratamento de diversas doenças, que a cocaína se tornou uma droga de abuso (Biondich e Joslin 2015; Biondich e Joslin 2016).

Atualmente, há uma relação clara entre o uso da cocaína, criminalidade e violência, e a dependência dessa substância já é reconhecida no mundo inteiro como um grande problema social e de saúde pública (UNODC 2015). No mercado de drogas, a cocaína pode ser encontrada em duas apresentações principais: a cocaína em pó e as pedras de crack. A primeira consiste em um pó que pode ser aspirado ou injetado quando solubilizado em água. Já o crack, é uma versão alcalina em formato de pequenas pedras, que pode ser fumado utilizando cachimbos e similares.

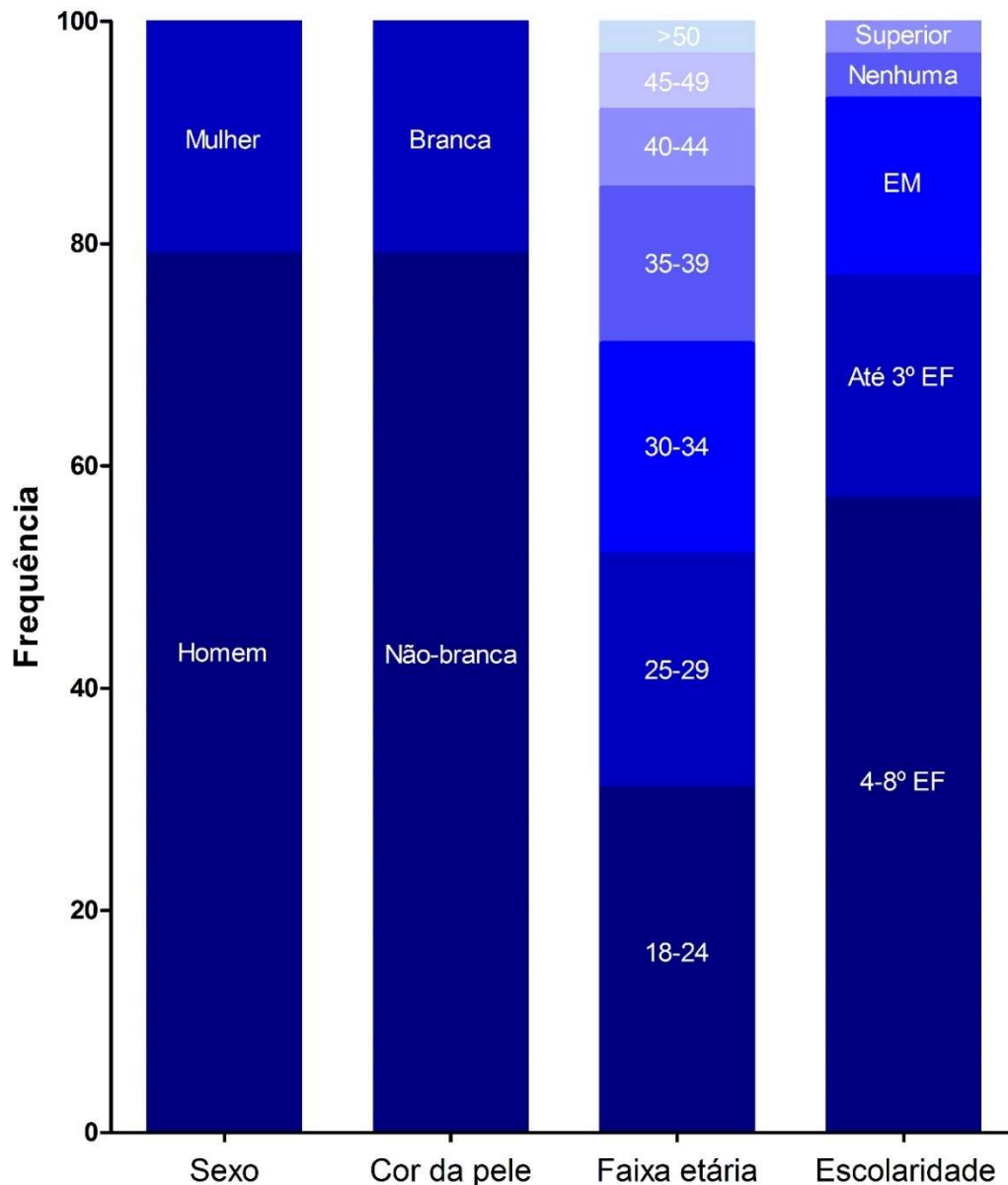
O crack apresenta um efeito muito mais rápido e devastador do que a cocaína aspirada, já que a fumaça inalada pelos usuários atinge rapidamente os pulmões e, conseqüentemente, a circulação sanguínea (Scheidweiler et al. 2003). Devido ao caráter epidêmico do uso do crack e ao grande impacto econômico gerado para a saúde pública, o governo brasileiro criou o *Plano Integrado de Enfrentamento ao Crack e outras Drogas* (decreto nº 7.426) que, desde 2010, vem trabalhando na tentativa de criar ações de prevenção, tratamento e reinserção social dos dependentes, além de fortalecer as ações contra o narcotráfico em todo o território nacional.

Dessa forma, a presente Tese de Doutorado se insere no contexto do entendimento da epidemia de dependência de crack, pois visa aumentar a compreensão sobre os fatores etiológicos, além de tentar buscar um entendimento maior sobre as variáveis envolvidas na gravidade da dependência e resposta ao tratamento de desintoxicação dos usuários. Devido a uma base neurobiológica semelhante à da dependência de cocaína aspirada e ao fato de que a maioria dos estudos relevantes conduzidos na área utilizou amostras de dependentes de cocaína aspirada ou injetada, o escopo da literatura revisada nesse capítulo introdutório, bem como nos artigos e na Discussão geral da Tese, incluiu também a dependência de cocaína resultante a partir dessas duas vias de administração. Deste modo, nos itens que seguem, a expressão “dependência de cocaína e crack (DCC)” será empregada, quando necessário. Além disso, como o significado de algumas expressões e de funções de áreas cerebrais envolvidas na DCC podem não ser de conhecimento comum, um número sobrescrito ao lado de alguns desses termos e expressões sinalizará sua descrição em um glossário localizado no Capítulo 12 da presente Tese.

## **1.2 Epidemiologia da DCC**

O último *World Drug Report do United Nations Office on Drugs and Crime* (UNODC 2016) aponta que, apesar de um leve aumento de ≈10% no cultivo de folhas de coca, a prevalência

anual de uso de cocaína no mundo se manteve estável em 0,3-0,4% em 2014, totalizando ≈18.300.000 de usuários. Na América do Sul, a prevalência anual aumentou de 1,2% em 2012 para 1,5% em 2014 (UNODC 2016). É importante ressaltar que o relatório anterior (UNODC 2015) já havia salientado que essa alta observada na América do Sul pode ser explicada pelo aumento da prevalência no Brasil, que foi estimada em 1,7% em 2013. Devido a sua extensão geográfica e grande população urbana, o Brasil tornou-se muito vulnerável ao tráfico e consumo da droga.



**Figura 1** – Perfil sociodemográfico dos usuários de crack no Brasil de acordo com a última pesquisa nacional sobre o uso de crack (Bastos e Bertoni 2014). EF = ensino fundamental; EM = ensino médio.

Os dados do *World Drug Report 2015/2016* corroboram as estimativas elevadas obtidas no II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas (II LENAD 2012). De acordo com o LENAD de 2012, a prevalência de uso de cocaína em algum momento da vida é de 3,9% na população geral

brasileira, enquanto que a prevalência de transtorno por uso de cocaína na população geral é de 0,6%. Entre os adolescentes, a prevalência de uso de cocaína em algum momento da vida foi estimada em 3,6%. No caso do crack, a prevalência de uso em algum momento da vida foi estimada em 1,5%. Entre os adolescentes, 0,8% já usaram pelo menos uma vez na vida crack e outras formas de cocaína fumada, como a merla e o oxi (Abdalla et al. 2014; INPAD 2014).

É importante salientar, que os dependentes de crack, tanto no Brasil quanto em outros países, vivem em uma situação de marginalização social, apresentando prevalências elevadas de doenças infecciosas, como HIV, hepatite C e tuberculose, envolvimento em crimes, além de altos níveis de mortalidade (Fischer et al. 2015). No Brasil, estima-se que ≈35% dos usuários de crack não possuem moradia fixa, vivendo nas ruas (UNODC 2016). A Figura 1 apresenta uma breve caracterização sociodemográfica dos usuários de crack, de acordo com a última pesquisa brasileira sobre o uso dessa droga, que destacou, por exemplo, a alta prevalência de usuários negros e pardos, além do baixo nível socioeconômico dessa população (Bastos e Bertoni 2014).

A partir do último *Global Burden of Diseases* (GBD-2015), que avalia a prevalência de transtorno por uso de substâncias e não o número de usuários, foi estimado que ≈3.850.000 de pessoas ao redor do mundo foram afetadas pelo transtorno por uso de cocaína em 2015 (GBD-2015 2016a), resultando em um milhão de Anos de Vida Perdidos Ajustados por Incapacidade (GBD-2015 2016b). Além disso, o GBD estimou que 11.100 mortes foram atribuídas diretamente a esse transtorno (GBD-2015 2016c), um número que pode estar muito subestimado, possivelmente, devido a problemas de notificação, ou notificações de mortes por outras causas associadas à DCC, como, por exemplo, doenças infecciosas e mortes relacionadas à violência.

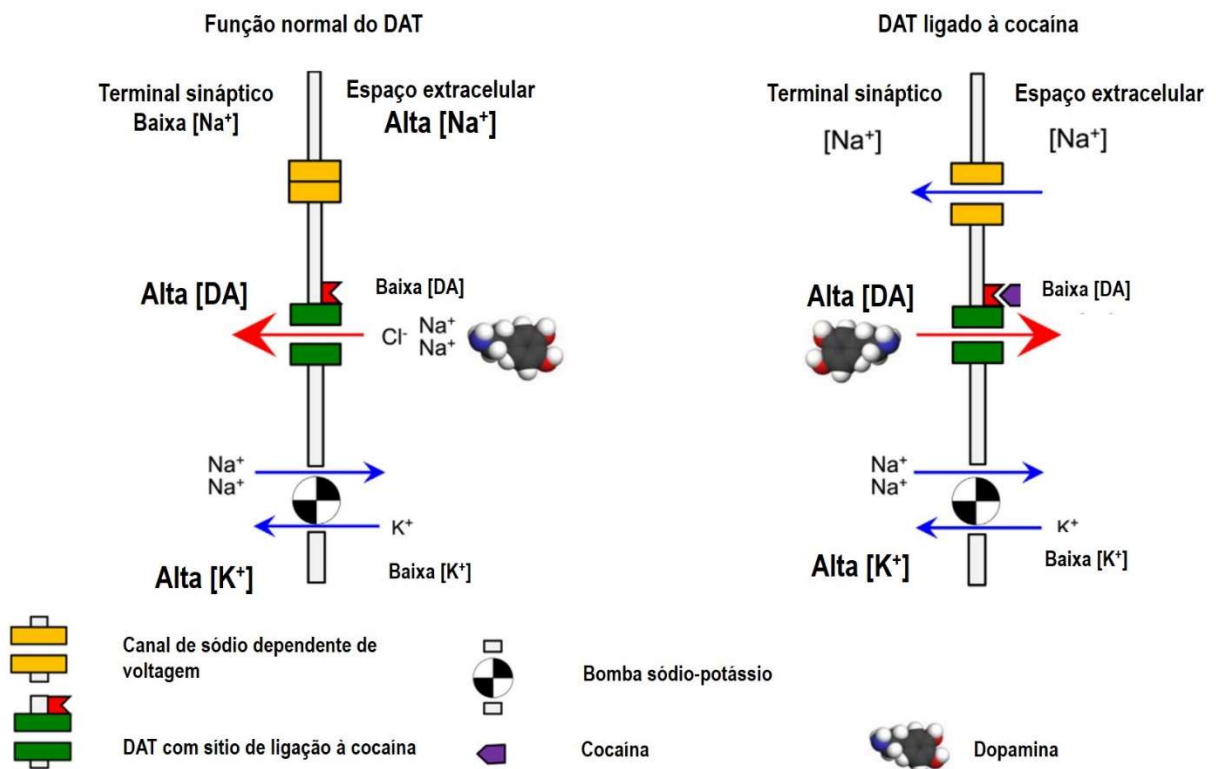
### **1.3 Caracterização fenotípica da DCC**

#### **1.3.1 Mecanismo de ação da cocaína**

A administração de cocaína aumenta a atividade do sistema nervoso central, produzindo potentes efeitos relacionados à recompensa, como euforia e hiperatividade. A cocaína atua no sistema dopaminérgico mesocorticolímbico<sup>1</sup> via modulação do transportador de dopamina (DAT), que é responsável pela recaptação de dopamina da fenda sináptica (Shorter et al. 2015). Embora os efeitos da cocaína como um modulador alostérico negativo<sup>2</sup> do DAT sejam mais bem caracterizados e discutidos, há tempo já foi demonstrado que ela exerce um efeito mais geral ao modificar os níveis de monoaminas, sendo capaz de bloquear também os transportadores de norepinefrina (NET) e de serotonina (SERT) (Richelson e Pfenning 1984).

Outros neurotransmissores também podem estar envolvidos no mecanismo de ação da cocaína. A literatura aponta, por exemplo, para um papel relevante do glutamato na mediação dos efeitos de recompensa induzidos pelos psicoestimulantes (D'Souza 2015). Por outro lado, o ácido gama-aminobutírico (GABA), neurotransmissor que pode inibir a transmissão glutamatérgica, diminui esses efeitos de recompensa (Siniscalchi et al. 2015). Esses achados vêm permitindo que fármacos que modulam esses sistemas também sejam explorados como opção terapêutica para o tratamento da DCC (ver item "1.3.4 Tratamento da DCC").

Embora a cocaína interfira em diferentes sistemas de neurotransmissão, o potencial para dependência está fortemente relacionado à transmissão dopaminérgica (Korpi et al. 2015). Por exemplo, em um experimento com ratos *knock-in* expressando uma variante funcional que tornou o DAT insensível à cocaína, a administração dessa droga não aumentou a atividade locomotora<sup>3</sup> e o efluxo de dopamina no núcleo accumbens<sup>4</sup> desses animais, e não induziu efeitos de recompensa medidos em experimentos de preferência condicionada por lugar<sup>5</sup> (Chen et al. 2006). Esses dados ressaltaram o papel preponderante da dopamina (e DAT) na ação da cocaína.



**Figura 2** – Efeito farmacológico da cocaína proposto atualmente. No lado esquerdo do esquema está representada a ação normal do transportador de dopamina (DAT), que consiste na recaptação de dopamina (DA) da fenda sináptica. A literatura propõe que quando a cocaína se liga no DAT, além do bloqueio do receptor, mudanças conformacionais são induzidas, fazendo com que esse transportador libere dopamina na fenda sináptica (agonista inverso). A versão original da figura, bem como uma extensa revisão sobre os mecanismos farmacológicos da cocaína, pode ser encontrada em Heal et al. (2014).

É importante mencionar que o efeito de bloqueio exercido pela cocaína sobre o DAT, e também sobre o NET e SERT, é considerado bioquimicamente fraco para explicar a magnitude de efeitos da droga (Hyttel 1982; Richelson e Pfenning 1984; Heal et al. 2014). Isso sugere que as propriedades farmacológicas da cocaína envolvem mecanismos moleculares adicionais para suportar a sua gama de efeitos patofisiológicos. De fato, achados bioquímicos e moleculares vêm apoiando uma hipótese de que a cocaína é, na verdade, um agonista inverso do DAT e, potencialmente, dos outros transportadores de monoaminas (Figura 2) (Heal et al. 2014).

### 1.3.2 Diagnóstico

Apesar de algumas mudanças, os critérios do Manual Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais 5ª edição - DSM-5 (APA 2013) para o diagnóstico de transtornos por uso de substâncias mantiveram-se similares aos critérios para o diagnóstico de abuso ou dependência de substâncias do DSM-IV (APA 1994). Entretanto, esses critérios foram combinados em uma lista única. De acordo com o DSM-5, a principal característica de um transtorno por uso de substância envolve a presença de sintomas cognitivos, comportamentais e fisiológicos que indiquem o uso contínuo de uma substância pelo indivíduo, apesar do prejuízo causado por ela.

Como as anfetaminas e substâncias do tipo anfetamina apresentam efeitos parecidos com os da cocaína, os critérios diagnósticos para transtorno por uso de estimulantes são apresentados no DSM-5 como um único transtorno, no qual se pode especificar o estimulante que está sendo usado. Os sintomas foram distribuídos em quatro grupos: baixo controle (quatro critérios), deterioração social (três critérios), uso arriscado da substância (dois critérios) e critérios farmacológicos (dois critérios), formando o Critério A de diagnóstico. De um modo geral, o Critério A busca caracterizar um padrão de uso de cocaína que leva a um comprometimento ou sofrimento clinicamente significativo para o paciente, manifestado por pelo menos dois critérios, ocorrendo durante um período de no mínimo 12 meses. O DSM-5 ainda classifica as dependências químicas em: leve (presença de dois ou três sintomas), moderada (quatro ou cinco sintomas) ou grave (seis ou mais sintomas). No caso da DCC, esses sintomas são:

- **BAIXO CONTROLE:**

1. A cocaína é frequentemente consumida em maiores quantidades ou por um período mais longo do que o pretendido;
2. Existe um desejo persistente ou esforços malsucedidos no sentido de reduzir ou controlar o uso de cocaína;

3. Muito tempo é gasto em atividades necessárias para a obtenção da cocaína, em utilização, ou na recuperação de seus efeitos;
4. Fissura ou um forte desejo ou necessidade de usar a cocaína.

▪ **DETERIORAÇÃO SOCIAL:**

5. Uso recorrente de cocaína resultando em fracasso em cumprir obrigações importantes no trabalho, na escola ou em casa;
6. Uso continuado de cocaína apesar de problemas sociais ou interpessoais persistentes ou recorrentes causados ou exacerbados pelos efeitos da cocaína;
7. Importantes atividades sociais, profissionais ou recreacionais são abandonadas ou reduzidas em virtude do uso de cocaína.

▪ **USO ARRISCADO DA SUBSTÂNCIA:**

8. Uso recorrente de cocaína em situações nas quais isso representa perigo para a integridade física;
9. O uso de cocaína é mantido apesar da consciência de ter um problema físico ou psicológico persistente ou recorrente que tende a ser causado ou exacerbado pela cocaína.

▪ **CRITÉRIOS FARMACOLÓGICOS:**

10. Tolerância, definida por qualquer um dos seguintes aspectos:
  - a. Necessidade de quantidades progressivamente maiores de cocaína para atingir a intoxicação ou o efeito desejado;
  - b. Efeito acentuadamente menor com o uso continuado da mesma quantidade de cocaína.
11. Abstinência, manifestada por qualquer dos seguintes aspectos:
  - a. Síndrome de abstinência característica do uso de cocaína;
  - b. A cocaína (ou uma substância estreitamente relacionada) é consumida para aliviar ou evitar os sintomas de abstinência.



### 1.3.3 Comorbidades psiquiátricas

Dependentes de cocaína e crack apresentam concomitantemente outros transtornos mentais (APA 2013), entretanto, as estimativas de prevalência de comorbidades psiquiátricas, embora sempre altas (>50%), variam muito entre as diferentes amostras estudadas (Vergara-Moragues et al. 2012; Daigre et al. 2013; González-Saiz et al. 2014; Milby et al. 2015; Saunders et al. 2015; Martínez-Gras et al. 2016). Mesmo a coocorrência de outros transtornos por uso de substâncias pode variar bastante, sendo que algumas populações usam heroína com mais frequência, por exemplo, enquanto que em outras, o uso de álcool e de maconha é mais frequente (Kessler et al. 2012; Vergara-Moragues et al. 2013; Saunders et al. 2015).

Transtornos internalizantes e externalizantes são bem prevalentes, com destaque para os transtornos de humor, transtornos de ansiedade, transtorno de conduta, transtorno de oposição desafiante, transtorno de personalidade antissocial e transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (Vergara-Moragues et al. 2012; Saunders et al. 2015; Martínez-Gras et al. 2016; Pianca et al. 2016). Por exemplo, em um estudo envolvendo adolescentes dependentes de crack, 81% apresentaram o diagnóstico de transtorno de conduta (Pianca et al. 2016). É importante ressaltar que os transtornos externalizantes são considerados fortes preditores do desenvolvimento de dependência de drogas ilícitas, incluindo a DCC (Lee et al. 2011; Erskine et al. 2016; Ottosen et al. 2016; Vogel et al. 2016). Além disso, a caracterização das comorbidades é extremamente relevante, já que a presença delas também está associada com piores respostas ao tratamento da dependência (Vergara-Moragues et al. 2013; González-Saiz et al. 2014).

### 1.3.4 Tratamento da DCC

#### 1.3.4.1 Tratamento farmacológico

Dados da literatura mostram que o investimento no tratamento e acompanhamento de pacientes com transtorno por uso de substâncias, incluindo dependentes de cocaína aspirada e de crack, é vantajoso para a sociedade, já que gera uma economia de gastos públicos utilizados para combater a violência e criminalidade (Flynn et al. 1999; Ettner et al. 2006). Entretanto, até o momento, as opções de tratamento farmacológico são limitadas, não havendo um medicamento específico para o tratamento da DCC aprovado pelo *Food and Drug Administration*.

Ensaio clínico de fase II e III já foram, ou estão sendo conduzidos, para uma gama de agentes farmacológicos que interferem na neurotransmissão. Os fármacos que vêm sendo testados têm como finalidade reduzir a fissura pela cocaína, atenuar os efeitos subjetivos e de

recompensa e/ou aliviar os sintomas de parada (Shorter et al. 2015). Nesse contexto, entram os agonistas dopaminérgicos, como a levodopa, amantadina e bromocriptina, que têm sido avaliados em alguns estudos. Entretanto, uma metanálise não demonstrou efeito significativo desses fármacos, mesmo em combinação com intervenções psicossociais (Minozzi et al. 2015a).

Outros psicoestimulantes, incluindo a bupropiona, dexanfetamina, lisdexanfetamina, metanfetamina, metilfenidato, modafinil, mazindol e selegilina, também têm sido testados na DCC, com algum potencial terapêutico apoiado por uma metanálise (Castells et al. 2016). Esses fármacos aumentaram significativamente o tempo de abstinência, mas não reduziram a frequência de uso naqueles pacientes que continuaram a usar droga. Além disso, a proporção de pacientes alcançando abstinência sustentada parece ser maior para a bupropiona e dexanfetamina. Além da bupropiona e selegilina, outros fármacos antidepressivos, incluindo a desipramina, fluoxetina, nefazodona, ritanserina, buspirona, gepirona, paroxetina, citalopram, venlafaxina, sertralina e imipramina, já foram avaliados no tratamento da DCC. De qualquer forma, as evidências de uma metanálise não apoiaram o uso desses fármacos no tratamento desse transtorno, além do fato de que a diminuição dos sintomas de depressão nos dependentes não foi associada com uma melhora nos indicadores diretos da dependência (Pani et al. 2011).

Os antipsicóticos risperidona, olanzapina, quetiapina, aripiprazol, haloperidol e reserpina também vêm sendo avaliados. De qualquer forma, três metanálises mostraram que as evidências disponíveis até o momento não justificam o uso desses agentes no tratamento da DCC (Álvarez et al. 2013; Kishi et al. 2013; Indave et al. 2016). A única diferença observada para o uso de qualquer antipsicótico, foi uma redução significativa no número de pacientes que abandonaram o tratamento quando comparado com o grupo placebo (Álvarez et al. 2013; Indave et al. 2016).

Agentes que diminuem a atividade noradrenérgica central, como a doxazosina, dissulfiram e o nepicastat, além de agonistas GABAérgicos, incluindo o topiramato e os análogos da vigabatrina, também fazem parte da lista de potenciais medicamentos a serem utilizados no tratamento da DCC (Shorter et al. 2015). Uma metanálise não descartou o uso clínico do dissulfiram no tratamento desse transtorno, embora a evidência tenha sido considerada fraca a partir da análise dos estudos publicados até o ano de 2009 (Pani et al. 2010). Ensaios clínicos subsequentes obtiveram resultados mistos (Oliveto et al. 2011; Haile et al. 2012; Carroll et al. 2016) e demonstraram diferenças de acordo com o sexo (DeVito et al. 2014) e alelos do gene da dopamina  $\beta$ -hidroxilase (Kosten et al. 2013b; Schottenfeld et al. 2014). No caso do topiramato, uma metanálise não demonstrou efeito na retenção ao tratamento, mas apontou um efeito significativo quando o desfecho analisado foi abstinência sustentada (Singh et al. 2016). De

qualquer forma, outras duas metanálises não apoiaram a eficácia do topiramato e outros anticonvulsivantes, como a carbamazepina, gabapentina, lamotrigina, fenitoína, tiagabina e vigabatrina, no tratamento de dependentes de cocaína (Alvarez et al. 2010; Minozzi et al. 2015b).

Com o objetivo de criar anticorpos contra a cocaína e bloquear os seus efeitos, uma vacina foi desenvolvida (Orson et al. 2014). Ensaios clínicos sugerem que a vacina anti-cocaína é eficaz em pacientes que recebem um cronograma de vacinação mais intenso e/ou atingem uma concentração maior de anticorpo (Martell et al. 2005; Martell et al. 2009; Haney et al. 2010). Entretanto, em um estudo maior, somente tendências em direção a melhores resultados para a vacina em relação ao placebo foram observadas (Kosten et al. 2014). Além disso, fatores genéticos parecem influenciar na resposta imunológica gerada pela vacina (Kosten et al. 2013a; Nielsen et al. 2013). Assim, estudos adicionais são necessários para caracterizar os pacientes mais propensos a responder à vacina e, também, aos fármacos descritos anteriormente.

#### *1.3.4.2 Tratamento não farmacológico*

Em combinação ou não com a terapia farmacológica, vários estudos clínicos na DCC têm avaliado o efeito de intervenções psicossociais, como, por exemplo, a terapia cognitiva e comportamental<sup>6</sup>, aconselhamento sobre drogas e psicoterapia interpessoal<sup>7</sup> (ex.: Festinger et al. 2014; Petitjean et al. 2014; Carroll et al. 2016; McCollister et al. 2016; Shepard et al. 2016). Algumas metanálises sugerem efeitos favoráveis no tratamento da DCC para o manejo de contingências<sup>6</sup>, uma abordagem da terapia cognitiva e comportamental (Prendergast et al. 2006; Schumacher et al. 2007; Knapp et al. 2007; Dutra et al. 2008). Apesar de achados mais recentes também apoiarem a eficácia do manejo de contingências na DCC (Miguel et al. 2016), a única metanálise atualizada foi retirada do *Cochrane Database* (Knapp et al. 2015).

### **1.4 Diferenças entre a dependência de cocaína em pó e a dependência de crack**

Como já mencionado, a fumaça exalada pela queima das pedras de crack é absorvida pelos pulmões e rapidamente enviada ao cérebro, resultando em um efeito mais intenso para o crack do que para a cocaína aspirada (Scheidweiler et al. 2003). Dessa forma, é possível que existam diferenças importantes entre os usuários das diferentes vias de administração. Embora o DSM-5 reconheça que as apresentações da cocaína tenham diferenças de potência e efeitos, nenhuma distinção de critérios diagnósticos é feita na tentativa de separar o transtorno por uso de cocaína aspirada ou injetada do transtorno por uso de crack, já que a substância ativa é a mesma.

Nos Estados Unidos, diferenças entre a cocaína em pó e o crack foram muito discutidas na década de 80, mas a questão esteve mais centrada no âmbito legal. Nessa época, a legislação norte-americana concluiu que o crack era mais perigoso que a cocaína em pó, pois “parecia” estar mais associado com criminalidade e violência, e estabeleceu uma razão de 100:1 como limiar para aplicação de uma pena mínima obrigatória de cinco anos de prisão para quem fosse apreendido portando crack. A partir desse critério, um norte-americano poderia ser preso se possuísse mais do que 5 gramas de crack, enquanto que para cocaína em pó, essa quantidade teria que ser superior a 500 gramas. Essa medida foi chamada pelo Congresso dos Estados Unidos de *Anti-Drug Abuse Act of 1986* (United States Government Publishing Office 1986).

Dez anos depois do *Anti-Drug Abuse Act*, uma revisão sistemática reuniu a literatura disponível da época e discutiu as similaridades e diferenças entre a cocaína em pó e o crack, bem como as implicações disso na legislação vigente dos Estados Unidos e políticas de tratamento dos dependentes (Hatsukami e Fischman 1996). Nesse estudo, os autores concluíram que os efeitos fisiológicos e psicoativos da cocaína são semelhantes independentemente da forma e via de administração. Contudo, os autores apontaram evidências que demonstram maior risco para abuso e dependência e consequências mais graves quando a cocaína é fumada ou administrada por via intravenosa em comparação com a via intranasal. Como o uso de cocaína aspirada geralmente é uma porta de entrada para o uso de crack, os autores concluíram o artigo dizendo que a razão de 100:1 usada para estabelecer uma penalidade legal era excessiva. Em 2010, o *Fair Sentencing Act* reduziu essa razão para 18:1, além de eliminar a pena mínima obrigatória para a simples posse de crack (United States Government Publishing Office 2010).

Estudos conduzidos dentro e fora dos Estados Unidos depois dos atos de 1986 e 2010 continuaram a mostrar que usuários de crack apresentam algumas diferenças sociodemográficas e clínicas quando comparados com usuários de cocaína aspirada. Por exemplo, o percentual de negros é maior entre usuários de crack do que entre usuários de cocaína em pó (Guindalini et al. 2006a; Vaughn et al. 2010; Martin et al. 2014). Como o uso de crack é mais prevalente em comunidades carentes, e existe uma relação histórica entre vulnerabilidade social, violência e determinados grupos étnicos, a etnia precisa ser considerada como uma variável confundidora nas análises que comparam usuários de crack e de cocaína em pó (Palamar et al. 2015).

Além disso, quando comparados com usuários de cocaína em pó, usuários de crack apresentam menor grau de escolaridade, menor probabilidade de engajamento em um emprego fixo ou de turno integral e maior probabilidade de se envolverem em atividades ilegais e violentas (Gossop et al. 2006; Guindalini et al. 2006b; Vaughn et al. 2010; Pope et al. 2011; Kessler et al.

2012; Martin et al. 2014; Stewart et al. 2014; Palamar et al. 2015). É importante ressaltar que o maior índice de violência atribuído ao crack, quando comparado com a cocaína em pó, deixa de ser significativo ao ser ajustado pelo perfil sociodemográfico e psiquiátrico, sugerindo que outras variáveis que aumentam a probabilidade de usar crack em vez de cocaína em pó, e não o próprio crack, são responsáveis pelo maior índice de violência observado (Vaughn et al. 2010).

A literatura também vem apontando algumas diferenças clínicas entre dependentes de cocaína em pó e dependentes de crack. Por exemplo, a maioria das consequências relacionadas ao uso de cocaína, como tolerância, problemas emocionais, inabilidade para interromper o uso, redução de atividades importantes, uso por mais tempo do que o pretendido, uso de outras drogas ilícitas e problemas físicos, parecem ser significativamente influenciadas pela via de administração, sendo mais frequentes ou apresentando maior gravidade entre os usuários de crack (Chen e Anthony 2004; Gossop et al. 2006; Martin et al. 2014; Stewart et al. 2014).

Conjuntamente, esses dados sugerem que o uso de crack está associado com baixo nível socioeconômico quando comparado com o uso de cocaína em pó. Além disso, a progressão do uso de cocaína inalada para o uso de crack parece caracterizar um quadro bem mais grave, com grande potencial para dependência. O uso concomitante de cocaína em pó e crack também está associado com maior gravidade relacionada ao uso de outras drogas ilícitas e criminalidade quando comparado com o uso não intercambiável dessas substâncias (Guindalini et al. 2006b). De qualquer forma, a possibilidade de que indivíduos propensos a usarem crack já tenham um risco maior para se tornarem dependentes não pode ser descartada (Chen e Anthony 2004).

## **1.5 Fatores ambientais e biológicos**

### **1.5.1 Trauma precoce e cuidado parental na DCC**

Como a etiologia da DCC, e de qualquer dependência química, é multifatorial, variáveis do ambiente são potenciais preditores desse transtorno. Dentre os fatores ambientais já associados com uso de drogas em geral, encontram-se o trauma precoce e o malcuidado parental (Edalati e Krank 2016). Sabe-se que eventos traumáticos sofridos na infância podem interferir no desenvolvimento normal de áreas cerebrais críticas como, por exemplo, amígdala<sup>8</sup>, hipocampo<sup>9</sup> e córtex pré-frontal<sup>10</sup>, e que isso está associado com surgimento de transtornos mentais, incluindo transtornos por uso de substâncias (Puetz e McCrory 2015; Teicher e Samson 2016).

Vários trabalhos têm avaliado o impacto do trauma precoce no desenvolvimento de transtornos por uso de substâncias na vida adulta, incluindo alguns estudos longitudinais. Por

exemplo, após sete anos de seguimento de uma grande amostra populacional ( $\approx 6$  mil indivíduos), o abuso físico sofrido na infância foi associado com o uso de drogas ilícitas 30 dias antes e durante o ano que antecedeu a reavaliação, além de aumentar significativamente os problemas relacionados ao uso de drogas ilícitas no início da vida adulta (Huang et al. 2011b). Nessa mesma população, em um estudo com um tempo de seguimento de 13 anos ( $\approx 20$  mil indivíduos), o abuso e a negligência física foram associados a aumentos mais rápidos de episódios de consumo pesado de álcool durante a adolescência e início da vida adulta (Shin et al. 2013). Em outro estudo, que acompanhou pré-adolescentes por três anos, as adversidades que refletiam mal-estar dos participantes, problemas conjugais dos pais e estressores socioculturais também foram relacionados com o início mais precoce do consumo de álcool (Ramos-Olazagasti et al. 2016). Em um estudo que acompanhou crianças até a vida adulta, o abuso na pré-escola e o abuso sexual sofrido até os 18 anos foram associados negativamente com laços parentais que, por sua vez, foram associados com o uso de maconha na vida adulta (Mason et al. 2017).

É importante ressaltar que o trauma precoce também influencia no curso dos transtornos por uso de substâncias. Por exemplo, maus-tratos sofridos na infância foram associados com persistência à dependência de álcool e de nicotina depois de três anos de seguimento, sendo que um efeito mais robusto foi observado para o abuso sexual (Elliott et al. 2014). Em outro estudo longitudinal, adversidades emocionais e físicas sofridas na infância foram associadas com maiores probabilidades de fumar e de persistir no hábito (Taha et al. 2014).

No caso da cocaína, especificamente, um estudo envolvendo uma amostra populacional de adolescentes ( $\approx 10$  mil indivíduos) com idade entre 13 e 18 anos, demonstrou que violências interpessoais sofridas antes dos 11 anos aumentaram o risco de uso de drogas, sendo que esse risco foi maior para o uso de cocaína (Carliner et al. 2016). Ainda, o trauma precoce parece modular características de importância clínica nos dependentes dessa droga. Por exemplo, em um estudo que avaliou perfis de personalidade, os pacientes do grupo formado por dependentes de cocaína com história de trauma precoce foram mais neuróticos e menos abertos, agradáveis e conscienciosos do que os indivíduos controle sem trauma (Brents et al. 2015). Além disso, adversidades sofridas na infância parecem modular a percepção que os dependentes de cocaína têm em relação ao ambiente que eles vivem, contribuindo para um aumento da irritabilidade relacionada a eventos de vida que ocorrem no dia a dia (Back et al. 2008).

Em relação ao tratamento de desintoxicação e abstinência, a literatura também aponta efeitos importantes do trauma precoce na DCC. Mulheres dependentes de crack com história de maus-tratos apresentaram consistentemente uma resposta inflamatória alterada durante a

abstinência precoce quando comparadas a mulheres com história negativa de maus-tratos (Levandowski et al. 2013; Levandowski et al. 2014; Levandowski et al. 2016b). Nessa mesma amostra, a presença de história de negligência na infância foi associada a uma redução menos acentuada nos sintomas de abstinência (Francke et al. 2013) e com prejuízos na memória e funções executivas (Viola et al. 2013; Tractenberg et al. 2015) durante o tratamento de desintoxicação. Além disso, em um estudo que acompanhou dependentes de cocaína por 90 dias após a alta, o trauma precoce foi associado com uma maior probabilidade de recaída e intensificação do uso de cocaína em mulheres (Hyman et al. 2008). Conjuntamente, esses dados corroboram a relevância do trauma precoce no entendimento da etiologia e curso da DCC.

### 1.5.2 Desregulação do sistema de estresse e DCC

O eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), considerado o principal sistema de resposta ao estresse, exerce papéis fundamentais no desenvolvimento, progressão e manutenção dos transtornos por uso de substâncias (Sinha 2001; Sinha 2008; Sinha 2013). Mais especificamente, sabe-se que a desregulação do eixo HPA ocorre nas dependências de álcool, nicotina, opioides e também de cocaína (Sinha et al. 2006; Sinha 2008; Brady et al. 2009; Richards et al. 2011; Evans et al. 2012; Sinha 2013). Além disso, as alterações funcionais e estruturais no cérebro provocadas pelo trauma precoce mencionadas no item anterior são moduladas por hormônios do eixo HPA (Edalati e Krank 2016), os quais apresentam papéis importantes em processos cerebrais, incluindo excitabilidade, sinalização e plasticidade neuronal (McEwen et al. 2015; Sapolsky 2015).

Estudos com o objetivo de explorar as relações entre os efeitos da cocaína e componentes do eixo HPA já foram conduzidos em ratos, macacos e em humanos (Manetti et al. 2014). De um modo geral, os trabalhos com modelos animais mostram consistentemente que a administração aguda de cocaína estimula a atividade desse eixo, aumentando a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e corticosterona (Moldow e Fischman 1987; Rivier e Vale 1987; Borowsky e Kuhn 1991; Levy et al. 1991; Sarnyai et al. 1993; Rivier e Lee 1994; Zhou et al. 2002). Contudo, a exposição crônica pode estar associada ao desenvolvimento de uma resposta atenuada do eixo HPA (Zhou et al. 1996; Mantsch et al. 2000), embora elevações nos níveis de ACTH e corticosterona ocorram durante a retirada aguda da cocaína (Zhou et al. 2003).

Adicionalmente, estudos recentes vêm reforçando o fato de que componentes do eixo HPA estão envolvidos em comportamentos induzidos pela cocaína, como procura pela droga e preferência condicionada por lugar (Graf et al. 2013; Manvich et al. 2016; McReynolds et al. 2016a; McReynolds et al. 2016b; Cason et al. 2016). Importammentemente, já foi demonstrado que a

ablação do receptor de glicocorticoide, proteína chave envolvida na ação da corticosterona e cortisol, diminui a autoadministração de cocaína e a ativação de neurônios dopaminérgicos (Ambroggi et al. 2009). Esses achados em modelos animais, de forma conjunta, sugerem que a ativação do eixo HPA induzida pela cocaína está envolvida na manutenção do uso da droga.

Vários estudos já avaliaram o efeito da cocaína na atividade do eixo HPA em humanos (Manetti et al. 2014). Por exemplo, dependentes de cocaína (n = 9) apresentaram níveis mais elevados de ACTH e cortisol quando comparados a controles (n = 9) (Vescovi et al. 1992). A administração intravenosa de cocaína aumentou os níveis de ACTH, resultado que não foi observado após a administração de placebo em 18 homens dependentes (Mendelson et al. 1992). Além disso, a administração de cocaína modificou o perfil pulsátil de secreção de ACTH em um experimento conduzido também em homens dependentes (n = 18) (Teoh et al. 1994).

Em um estudo independente (n = 8), a administração intravenosa de cocaína aumentou de forma significativa os níveis de cortisol, efeito não observado após a administração de placebo (Baumann et al. 1995). Esses aumentos na concentração de ACTH já foram correlacionados com aumentos nos níveis de cocaína plasmática em usuários ocasionais (n = 12), sendo que os tempos necessários para alcançar a concentração máxima de cocaína e de ACTH no plasma foram praticamente idênticos. Ainda nesse experimento, os níveis de cortisol também aumentaram significativamente após a administração intravenosa de cocaína, resultado que não foi observado após a administração de placebo (Sholar et al. 1998). Chama a atenção o fato de que, em outro estudo, os níveis de ACTH foram significativamente mais elevados em usuários ocasionais (n = 6) de cocaína quando comparados aos níveis de dependentes (n = 6), o que sugere um mecanismo de adaptação ou tolerância aos efeitos dessa droga sobre o eixo HPA (Mendelson et al. 1998).

Adicionalmente, os aumentos observáveis nos níveis de ACTH e cortisol após a injeção de cocaína já foram positivamente correlacionados com sintomas totais de depressão em um estudo envolvendo homens e mulheres (n = 12) (Elman et al. 1999). Em outro experimento (n = 6), foi demonstrada uma concordância temporal entre a liberação de ACTH, adrenalina e sintomas subjetivos de euforia após a administração intravenosa de cocaína (Mendelson et al. 2002).

Além disso, as modificações na atividade do eixo HPA induzidas pela cocaína parecem ter implicações clínicas relevantes. Por exemplo, a administração de cortisol em dependentes (n = 12) foi associada com um aumento na fissura por cocaína (Elman et al. 2003). Em um estudo piloto com 10 dependentes, a exposição a imagens estressantes aumentou a fissura pela droga e os níveis de cortisol na saliva (Sinha et al. 1999). Esses achados foram replicados em outro experimento (n = 20), que adicionou imagens relacionadas ao uso de cocaína (*drug cues script*)



(Sinha et al. 2000). Em um estudo subsequente, envolvendo 54 dependentes, a exposição a imagens estressantes ou imagens que lembravam o uso de cocaína foi associada com um aumento simultâneo na fissura por cocaína, sintomas subjetivos de ansiedade, ACTH e cortisol plasmáticos quando comparado com a exposição a imagens neutras (Sinha et al. 2003).

Diferenças de acordo com o sexo também já foram descritas na literatura. Em um estudo de exposição a imagens estressoras e imagens relacionadas ao uso de cocaína, os homens dependentes (n = 25) apresentaram maiores níveis de ACTH e cortisol basais e um aumento mais acentuado nesses hormônios durante a exposição às imagens quando comparados com as mulheres (n = 25). Entretanto, nenhuma diferença relacionada ao sexo foi detectada na avaliação de ansiedade e de fissura pela droga (Fox et al. 2006). Esses achados que apontam para uma resposta do eixo HPA atenuada em mulheres também foram observados em um estudo que submeteu 53 dependentes de cocaína e 47 controles a um teste de estresse social e a um teste de visualização de artefatos usados por dependentes. De qualquer forma, essas diferenças relacionadas ao sexo não foram igualmente observáveis nos dois testes (Waldrop et al. 2010).

Os efeitos induzidos pela cocaína no eixo HPA parecem ser diferentes durante a abstinência da droga. Por exemplo, depois de 15 dias em abstinência de cocaína, os níveis de ACTH e cortisol nos casos (n = 9), que estavam aumentados no dia da internação, foram similares aos dos controles (Vescovi et al. 1992). Em outro estudo, nenhuma diferença nos níveis de cortisol e na estimulação de ACTH a partir da administração de hormônio liberador de corticotrofina (CRH) foi observada entre controles (n = 8) e dependentes de crack (n = 9) com mais de 21 dias de abstinência (Jacobsen et al. 2001). Os níveis de CRH no líquido cefalorraquidiano também não apresentaram diferenças significativas entre homens dependentes em abstinência (n = 29) e controles (n = 66) (Roy et al. 2003). Os níveis de cortisol diminuíram gradualmente ao longo do tratamento em um grupo de 36 homens dependentes, entretanto, pacientes que usavam cocaína mais frequentemente apresentaram níveis mais elevados de cortisol nas quatro medidas realizadas ao longo dos 21 dias de tratamento de desintoxicação (Buydens-Branchey et al. 2002).

Um experimento que avaliou a resposta neuroendócrina à hipertermia em dependentes que estavam em abstinência por um mês (n = 10) demonstrou um aumento de ACTH e cortisol somente nos indivíduos controles (n = 10). Além disso, essa ausência de resposta de ativação do eixo HPA nos dependentes se repetiu em uma avaliação depois de um ano de abstinência (Vescovi 2000). Por outro lado, em um estudo conduzido no primeiro mês de abstinência de 12 mulheres, os níveis de cortisol, medidos diariamente, foram mais altos do que nas mulheres

controles (n = 10) (Fox et al. 2008). Conjuntamente, esses achados sugerem que, mesmo durante a abstinência, o eixo HPA pode estar desregulado nos dependentes de cocaína.

As adversidades sofridas ao longo da vida podem adicionar complexidade na relação entre a cocaína e o eixo HPA. Por exemplo, em um estudo com 23 mulheres dependentes de crack, o número de eventos negativos vivenciados 90 e 30 dias antes da internação foi positivamente associado com a concentração de cortisol no cabelo (Grassi-Oliveira et al. 2012). Tratando-se de trauma precoce, uma associação entre abuso sexual e uma atividade diminuída do eixo HPA, medida a partir de cortisol urinário, já foi demonstrada em dependentes de cocaína abstinentes (n = 46) (Roy 2002). Por outro lado, altos níveis de ACTH e cortisol foram observados em dependentes abstinentes por mais de seis meses (n = 28) quando comparados aos controles (n = 44). Nesse trabalho, a atividade do eixo HPA foi diretamente correlacionada com histórico de negligência e antipatia dos pais (Gerra et al. 2008). Em outro estudo do mesmo grupo, dependentes abstinentes (n = 50) com histórico de negligência e baixo cuidado parental apresentaram níveis significativamente mais elevados de ACTH e cortisol quando comparados aos dependentes com baixos escores de negligência e escores mais elevados de cuidado parental. Além disso, esse último grupo não apresentou diferenças na atividade do eixo HPA em relação aos controles (n = 44) (Gerra et al. 2009), sugerindo que o histórico de adversidades pode ser um fator de confusão nos resultados obtidos em pacientes que estão em abstinência de cocaína.

Como o foco da presente Tese de Doutorado envolve o efeito de variantes genéticas em genes que codificam componentes do eixo HPA sobre a DCC, uma revisão mais aprofundada sobre a fisiologia desse sistema, bem como dos genes de interesse para esse trabalho, faz-se necessária. Dessa forma, o Capítulo 2 da Tese pode ser entendido como um complemento desta Introdução, que tem como objetivo suprir essa necessidade. O Capítulo 2 apresenta um artigo de revisão publicado na forma de um capítulo em um livro (Rovaris et al. 2016b). Embora o foco desse capítulo tenha sido o tabagismo e a genética do sistema de estresse envolvida nesse transtorno, toda a revisão de fisiologia e genética, bem como as ilustrações, complementa a presente Introdução, focada, especificamente, na DCC. O único estudo de associação na DCC que avaliou variantes em genes do sistema de estresse é mencionado no item subsequente, bem como nas introduções e/ou discussões dos capítulos contidos na Seção II da presente Tese.

### 1.5.3 Fatores genéticos envolvidos na DCC

Até o momento, nenhum estudo avaliou especificamente a herdabilidade da dependência de crack, entretanto, os trabalhos que estimaram o papel da genética no abuso/dependência de cocaína mostraram que esses fenótipos, tanto em homens quanto em mulheres, são substancialmente influenciados por fatores genéticos. Nos três estudos com gêmeos conduzidos até o momento, as estimativas de herdabilidade variaram de 42 a 79% (Kendler e Prescott 1998; van den Bree et al. 1998; Kendler et al. 2000), com uma média ponderada de 72%, considerada a mais alta entre as dependências de substâncias (Ducci e Goldman 2012).

Embora as estimativas de herdabilidade apontem para um papel relevante da genética na DCC, a identificação de fatores genéticos de predisposição tem encontrado como principal obstáculo a complexidade do modo multifatorial de herança, além da heterogeneidade clínica relacionada ao abuso simultâneo de outras substâncias. De qualquer forma, muitos estudos genéticos de associação já foram conduzidos, avaliando uma gama muito grande de polimorfismos em diversos genes. Destacam-se genes que codificam proteínas dos sistemas de neurotransmissão dopaminérgico (Lohoff et al. 2008; Bloch et al. 2009; Fernández-Castillo et al. 2010; Lohoff et al. 2010; Levran et al. 2015c), serotoninérgico (Fernández-Castillo et al. 2013; Yang and Li 2014; Levran et al. 2015a) e colinérgico (Grucza et al. 2008; Culverhouse et al. 2014; Sadler et al. 2014), além dos sistemas opioide (Clarke et al. 2012; Crist et al. 2013), endocanabinoide (Herman et al. 2006; Zuo et al. 2009) e de estresse (Levran et al. 2014). Alguns estudos também avaliaram genes que codificam proteínas envolvidas na plasticidade sináptica, liberação de neurotransmissores e transdução de sinais (Fernández-Castillo et al. 2012; Levran et al. 2015b).

Destacam-se também alguns trabalhos que avaliaram o papel de polimorfismos em genes dos sistemas citados anteriormente sobre endofenótipos, gravidade e subtipos da dependência de cocaína (Zayats et al. 2013; Bi et al. 2014; Havranek et al. 2015a; Havranek et al. 2015b), além da função cerebral de dependentes e controles a partir de exames de neuroimagem, resposta à administração intravenosa de cocaína e terapia farmacológica (Alia-Klein et al. 2011; Shorter et al. 2013; Liu et al. 2014; Moeller et al. 2014; Schottenfeld et al. 2014; Spellicy et al. 2014; Brewer et al. 2015). Outros trabalhos, ainda, avaliaram o papel de variantes raras no risco de desenvolvimento desse transtorno (Wang et al. 2012; Clarke et al. 2013b; Haller et al. 2014).

No Brasil, alguns estudos genéticos de associação foram conduzidos em duas amostras distintas, uma que incluiu pacientes oriundos de São Paulo (Messas et al. 2005; Guindalini et al. 2005; Guindalini et al. 2006a; Guindalini et al. 2008; Negrão et al. 2013) e a outra do Rio Grande

do Sul (Stolf et al. 2014). Algumas associações significativas, principalmente para polimorfismos no gene que codifica o DAT foram demonstradas. Enquanto a amostra de São Paulo recrutou pacientes que usavam cocaína pelas duas principais vias de administração, aspirada e fumada, o estudo realizado no Rio Grande do Sul foi desenhado para incluir somente dependentes de crack (Stolf et al. 2014). Fora do Brasil, somente um estudo foi conduzido em uma amostra composta exclusivamente por dependentes de crack (Ballon et al. 2007). Nos Capítulos 4, 5 da presente Tese, dois estudos que tiveram como objetivo avaliar o papel de polimorfismos do eixo HPA na susceptibilidade e aspectos clínicos da dependência de crack serão apresentados e, no Capítulo 11, discutidos conjuntamente (Rovaris et al. 2015a; Rovaris et al. 2016).

Embora, até o momento, ainda não exista nenhuma variante consolidada como fator de risco para DCC e as metanálises não tenham mostrado resultados muito fortes (Cao et al. 2013a; Clarke et al. 2013a; Cao et al. 2013b), um SNP (*single nucleotide polymorphism*) no gene de uma subunidade do receptor nicotínico colinérgico (rs16969968) foi associado com dependência de cocaína em três estudos (Grucza et al. 2008; Saccone et al. 2008; Sherva et al. 2010), gerando um valor-P combinado de  $7,64 \times 10^{-5}$  (Bühler et al. 2015). Interessantemente, o alelo A desse SNP apresenta um efeito protetor contra a dependência de cocaína, mas está fortemente associado com risco para dependência de nicotina (valor-P combinado =  $1,6 \times 10^{-31}$ ) (Bühler et al. 2015).

Tratando-se de genotipagens em larga escala, alguns estudos de associação por varredura genômica (GWAS) se preocuparam em avaliar desfechos compostos por vários transtornos por uso de substâncias (Drgon et al. 2010; Chen et al. 2011; Wetherill et al. 2015), o que possibilita análises com tamanhos amostrais maiores, mas pode introduzir alta heterogeneidade clínica e fenotípica nas análises. Somente duas varreduras avaliaram especificamente dependentes de cocaína. No primeiro estudo, que incluiu 440 casos e 605 controles, nenhum resultado significativo em nível de varredura genômica foi detectado. Entretanto, 330 SNPs que alcançaram o limiar de significância de  $5 \times 10^{-4}$  apresentaram uma boa capacidade de prever o risco para dependência de cocaína (área sob a curva = 0,718) (Wei et al. 2012). Mais recentemente, em um grande estudo, que incluiu  $\approx 12$  mil casos e controles, algumas associações significativas em nível de varredura genômica foram reveladas para SNPs nos genes *FAM53B* (*family with sequence similarity 53, member B*), *NCOR2* (*nuclear receptor corepressor 2*) e *CDK1* (*cyclin-dependent kinase 1*) (Gelernter et al. 2014). O gene *NCOR2* codifica uma proteína que regula a função de receptores nucleares, incluindo os receptores de glicocorticoide e de mineralocorticoide, que são fundamentais na resposta ao estresse (Yang e Young 2009; Glass e Saijo 2010).

Como praticamente toda a herdabilidade da DCC ainda é considerada perdida e/ou fantasma, há a necessidade de mais estudos genéticos nos dois principais níveis, larga escala e gene candidato. Além disso, a avaliação de outros desfechos, além do tradicional estudo do tipo caso-controle, será fundamental para o entendimento da biologia associada à gravidade da DCC.

#### 1.5.4 Interações genéticas e DCC

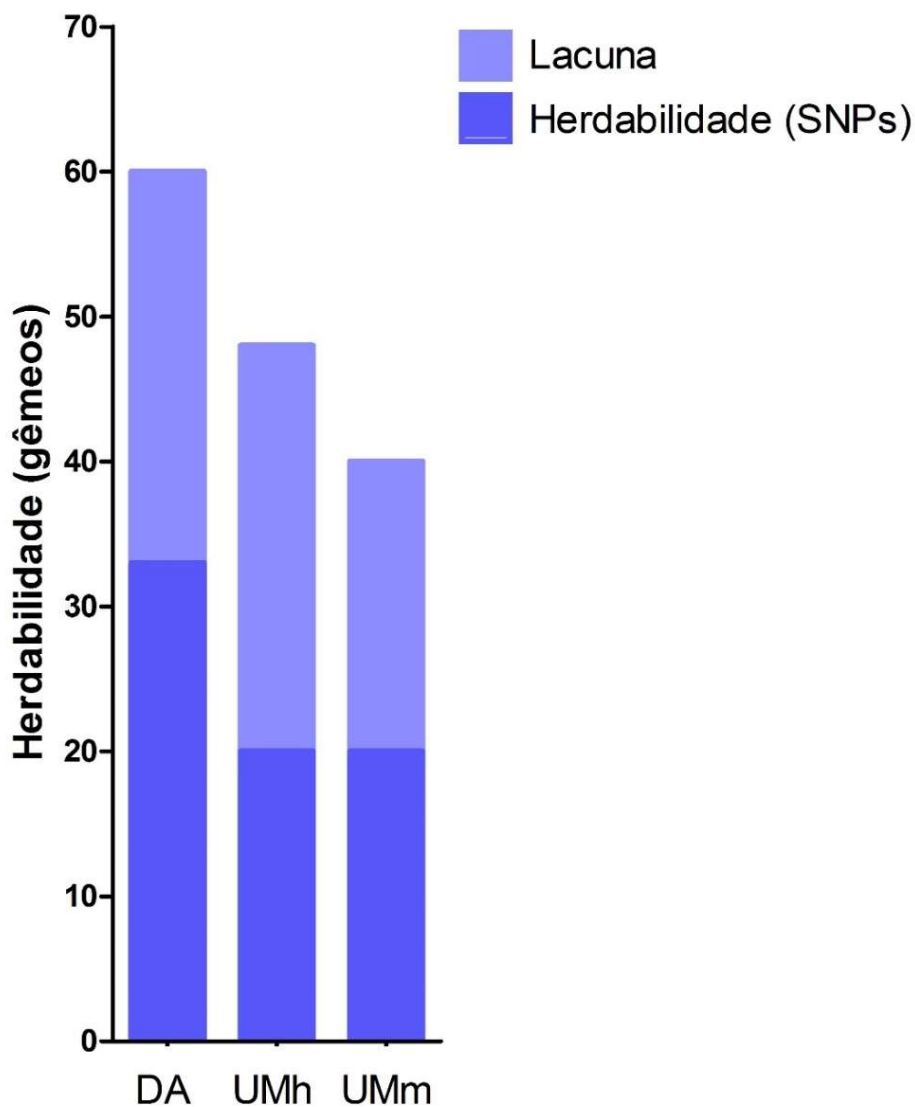
As interações genéticas parecem influenciar substancialmente fenótipos humanos (Hemani et al. 2014) e esforços têm sido realizados para detectar, compreender e quantificar o tamanho de efeito das interações gene-ambiente e gene-gene nas doenças complexas (Cordell 2009; Duncan et al. 2014; Wei et al. 2014). Recentemente, a maior metanálise de estudos de herdabilidade já realizada demonstrou que pelo menos 40% dos fenótipos investigados são influenciados por um componente genético não aditivo (interações genéticas) (Polderman et al. 2015). Mais interessante ainda, é o fato de que as interações gene-gene podem ser um determinante importante da variância genética aditiva (Monnahan e Kelly 2015).

Em relação à psiquiatria, estudos têm demonstrado o papel de interações gene-ambiente e gene-gene na etiologia de transtornos mentais com elevado impacto social e econômico (Mota et al. 2013; Sullivan et al. 2013; Rocha et al. 2015; Rovaris et al. 2015b; Schuch et al. 2016). Além disso, nos últimos anos, cresceu o número de evidências que colocam as interações genéticas como um mecanismo relevante envolvido no ‘mistério’ da herdabilidade perdida dos fenótipos complexos (Marian 2012; Zuk et al. 2012; Rovaris et al. 2013). A herdabilidade perdida é caracterizada pela fórmula:  $100 - \text{herdabilidade explicada pelas variantes já conhecidas}$ , sendo a contribuição genética ainda não descoberta a responsável pela formação desse fenômeno (Zuk et al. 2012). Sob o ponto de vista biológico, a herdabilidade perdida pode representar muitos *loci* ainda desconhecidos (Visscher et al. 2012), incluindo variantes genéticas raras (Rivas et al. 2011), enquanto que, matematicamente, ela pode ser ‘herdabilidade fantasma’, a qual nunca poderá ser explicada pela descoberta de variantes genéticas adicionais (Zuk et al. 2012).

Por outro lado, linhas sólidas de evidências apontam que as interações genéticas representam uma boa parte da herdabilidade perdida e isso é apoiado pelo fato de que, em um organismo complexo, os eventos moleculares não ocorrem de forma independente (Cordell 2009). Além disso, para diversos fenótipos, incluindo os transtornos por uso de substâncias, há uma grande lacuna entre a herdabilidade molecular e a herdabilidade estimada em estudos com gêmeos (Verweij et al. 2010; Uher 2014; Mbarek et al. 2015; Palmer et al. 2015a; Palmer et al. 2015b; Stringer et al. 2016; Figura 3), reforçando a possibilidade da influência de fatores

genéticos não aditivos, como as interações gene-ambiente e gene-gene. Entretanto, a maioria dos estudos de varredura ou do tipo gene candidato avalia as variantes genéticas isoladamente, não considerando possíveis interações entre os fatores genéticos (Cordell 2009; Wei et al. 2014).

No caso da DCC, poucos trabalhos abordaram o papel de interações gene-ambiente e gene-gene. Em um estudo caso-controle envolvendo homens europeus, os escores de cuidado paterno e materno percebido modificaram o efeito do genótipo SS do polimorfismo inserção/deleção no gene do transportador de serotonina (*5-HTTLPR*) sobre o risco para dependência de cocaína (Gerra et al. 2007). Uma interação entre um SNP (rs11503014) no gene que codifica uma subunidade do receptor de ácido gama-aminobutírico tipo 2 (*GABRA2*) e trauma na infância foi associada com risco de dependência de cocaína em homens afro-americanos (Enoch et al. 2010).



**Figura 3** – Herdabilidades estimadas a partir de estudos com gêmeos e genome-wide complex trait analysis (baseada em SNPs). Dados retirados das metanálises de Verweij et al. (2010), Stringer et al. (2016) e Mbarek et al. (2015). DA = dependência de álcool; UMh = uso de maconha ao longo da vida considerando somente homens; UMm = uso de maconha ao longo da vida considerando somente mulheres.

Em uma amostra de tecido cerebral de dependentes de cocaína que morreram intoxicados pela droga e de indivíduos em que a morte não foi relacionada com uso de substâncias, o risco de morte por causa do uso de cocaína atribuível ao alelo T do rs2283265 no gene que codifica o receptor de dopamina D2 aumentou significativamente em homozigotos para o alelo de 6 repetições do rs3836790 no gene que codifica DAT (Sullivan et al. 2013). Essa interação também modulou a atividade do DAT no putâmen<sup>11</sup> de dependentes de cocaína. Em outro estudo, uma busca exaustiva de interações de dois até cinco SNPs em genes de receptores e do transportador de serotonina revelou interações SNP-SNP significativas modulando o risco para dependência de cocaína (Yang e Li 2014). SNPs independentes que estão localizados no mesmo gene também podem interagir. Esse tipo de interação SNP-SNP modulando o risco de dependência de cocaína foi demonstrado para duas variantes no receptor de canabinóide tipo 1 (rs6454674 e rs806368) tanto em um estudo com famílias quanto no estudo de caso-controle (Zuo et al. 2009).

O Capítulo 4 da presente Tese apresenta o único estudo genético de associação focado especificamente em SNPs associados com desregulação do sistema de estresse e suas possíveis interações SNP-SNP e SNP-trauma precoce na dependência de crack (Rovaris et al. 2015a). Já o Capítulo 9 explora o efeito de correlações gene-ambiente na DCC (dados não publicados).

### 1.5.5 Fator neurotrófico derivado do cérebro e DCC

O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) pertence a família de neurotrofinas, moléculas secretadas, que atuam a partir de uma cascata de sinalização que envolve receptores de tirosina quinase (Chao 2003). As neurotrofinas desempenham uma série de funções relacionadas com crescimento, sobrevivência e diferenciação neuronal durante o desenvolvimento do sistema nervoso (Lipsky e Marini 2007; Bernd 2008). Como o BDNF também participa do remodelamento da função neuronal no sistema nervoso adulto, ele tem sido amplamente estudado nas dependências químicas, já que esse evento é crítico na transição do uso casual de uma droga para o desenvolvimento da dependência (Li e Wolf 2015; Koskela et al. 2016).

Muitos estudos com modelos animais mostraram que a cocaína pode influenciar os níveis de BDNF em várias áreas cerebrais (extensamente revisado por Li e Wolf 2015). De um modo geral, independente do regime de exposição (autoadministração ou não-contingente), a cocaína aumenta a expressão do RNA mensageiro e/ou da proteína BDNF no núcleo accumbens (Fumagalli et al. 2013; Li et al. 2013), corpo estriado dorsal<sup>11</sup> (Liu et al. 2006; Im et al. 2010), área tegmental ventral<sup>12</sup> (Pu et al. 2006; Schmidt et al. 2012), córtex pré-frontal e córtex frontal (Liu et al. 2006; Fumagalli et al. 2013). Entretanto, dependendo das condições experimentais, níveis

baixos também podem ser observados (Fumagalli et al. 2007), demonstrando que a cocaína pode afetar a expressão de *BDNF* nas duas direções. Esses efeitos descritos na expressão do *BDNF*, de uma forma complexa, são importantes na modulação de comportamentos nos animais que são induzidos pela cocaína, como preferência condicionada por lugar (St. Laurent et al. 2013; Otis et al. 2014), sensibilização comportamental<sup>13</sup> (Lu et al. 2010; Huang et al. 2011a), manutenção e restabelecimento da autoadministração (Im et al. 2010; Sadri-Vakili et al. 2010; Li et al. 2013) e incubação de *craving*<sup>14</sup> pela droga (Grimm et al. 2003; Lu et al. 2004; Li et al. 2013).

O primeiro estudo conduzido em humanos não encontrou diferenças significativas nos níveis de *BDNF* entre dependentes de cocaína (n = 15) e controles (n = 15) (Angelucci et al. 2007). Entretanto, corroborando os achados obtidos a partir de modelos animais, a concentração de *BDNF* no soro ou plasma tem sido sugerida como um potencial biomarcador envolvido em vários aspectos da DCC em estudos subsequentes, embora essa relação seja complexa e pareça ser influenciada por outros fatores, incluindo o período do tratamento de detoxificação em que a avaliação foi realizada (abstinência aguda ou tardia) (von Diemen et al. 2016).

No primeiro trabalho longitudinal que explorou relações entre *BDNF* e DCC, os autores avaliaram casos (n = 35) e controles (n = 34) pareados por sexo (D'Sa et al. 2011). Os pacientes dependentes de cocaína foram acompanhados por quatro meses, sendo um mês de tratamento e três meses de seguimento após a alta. Os níveis de *BDNF* foram medidos em três dias consecutivos a partir do 14º dia de admissão. O grupo de dependentes de cocaína apresentou níveis significativamente elevados de *BDNF* sérico, sendo que pacientes que recaíram dentro do período de três meses tiveram níveis de *BDNF* mais elevados do que os pacientes que não recaíram. Os níveis de *BDNF* também foram associados com menor tempo para recaída e com maior frequência e quantidade de cocaína utilizada durante o período de acompanhamento.

Em outro estudo, 23 dependentes de cocaína sem história de psicose foram acompanhados durante um protocolo de desintoxicação de 12 dias (Corominas-Roso et al. 2013b). Os níveis de *BDNF* no soro foram mensurados no primeiro e último dia de tratamento no grupo de casos, e também em um grupo controle composto por 46 indivíduos. Na avaliação basal, os níveis de *BDNF* foram significativamente mais baixos no grupo de dependentes, entretanto, após 12 dias do tratamento houve um aumento significativo nos níveis de *BDNF* nesse grupo. Em um estudo subsequente, os autores exploraram as relações entre *BDNF* e DCC adicionando um grupo de 19 casos com história de psicose induzida pelo uso de cocaína (Corominas-Roso et al. 2013a). Nessas análises, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos de pacientes com história positiva e história negativa de psicose. Entretanto, somente o grupo com história



negativa teve aumento nos níveis de BDNF após os 12 dias de desintoxicação. Em um estudo de outro grupo, 100 dependentes de cocaína em abstinência tardia (média = 235 dias) e 85 controles tiveram os níveis de BDNF no plasma avaliados (Pedraz et al. 2015). Os autores não observaram diferenças significativas entre os dois grupos, embora os níveis de BDNF tenham se correlacionado com quimiocinas e N-aciletanolaminas somente no grupo controle.

No Brasil, cinco estudos exploraram o efeito dos níveis de BDNF na DCC. No primeiro estudo, 53 pacientes dependentes de crack e 50 controles pareados por sexo e idade foram avaliados. Os níveis de BDNF foram significativamente mais altos no grupo de dependentes e esse efeito foi relacionado com o uso da droga no último mês e não com a abstinência, embora o tamanho amostral para essa última análise tenha sido muito pequeno (Narvaez et al. 2013). Em uma amostra composta exclusivamente por homens dependentes de crack (n = 49) e controles (n = 97), os níveis de BDNF foram significativamente mais baixos nos dependentes nas primeiras 24 horas de hospitalização e aumentaram durante o tratamento de desintoxicação, ficando similar à média dos controles na medida realizada 24 horas antes da alta (von Diemen et al. 2014). Além disso, uma correlação negativa entre o percentual de aumento nos níveis de BDNF e número de pedras de crack usadas nos últimos 30 dias antes da admissão foi observada. Em um estudo subsequente nessa amostra, os níveis de BDNF foram inversamente correlacionados com a gravidade da dependência e com níveis de estresse oxidativo (Sordi et al. 2014).

Em uma amostra composta exclusivamente por mulheres (Viola et al. 2014), os níveis de BDNF plasmático foram mensurados três vezes após o quarto dia de admissão. A análise foi realizada comparando dependentes de crack com história positiva ou negativa de abuso sexual na infância (n = 22 e n = 82, respectivamente) e mulheres saudáveis (n = 20). Independentemente do *status* de abuso sexual na infância, um aumento significativo e sustentado nos níveis de BDNF foi observado quando comparado ao grupo controle. Em uma subamostra de casos (n = 25) e controles pareados por idade e escolaridade (n = 25), relações entre BDNF, DCC e performance cognitiva foram investigadas (Viola et al. 2015). Apesar de apresentarem níveis de BDNF elevados, as dependentes apresentaram prejuízos de memória quando comparadas com as mulheres controles. Especificamente, níveis de BDNF plasmático predisseram uma performance cognitiva melhor somente no grupo de casos, que já apresentava prejuízos de memória.

Os níveis de BDNF periférico apresentam um grau importante de controle genético (Terracciano et al. 2013) e estão relacionados com o funcionamento do sistema de estresse, já que expressão de *BDNF* pode ativar o eixo HPA (Givalois et al. 2004; Naert et al. 2006; Krishnan et al. 2007; Naert et al. 2015), bem como o eixo HPA pode modular a expressão de *BDNF* (Walsh

et al. 2014). A partir disso, o Capítulo 6 da presente Tese apresenta um estudo genético de associação focado especificamente em explorar interações entre SNPs relacionados com o eixo HPA e dependência de crack sobre os níveis periféricos de BDNF (Rovaris et al. 2017).

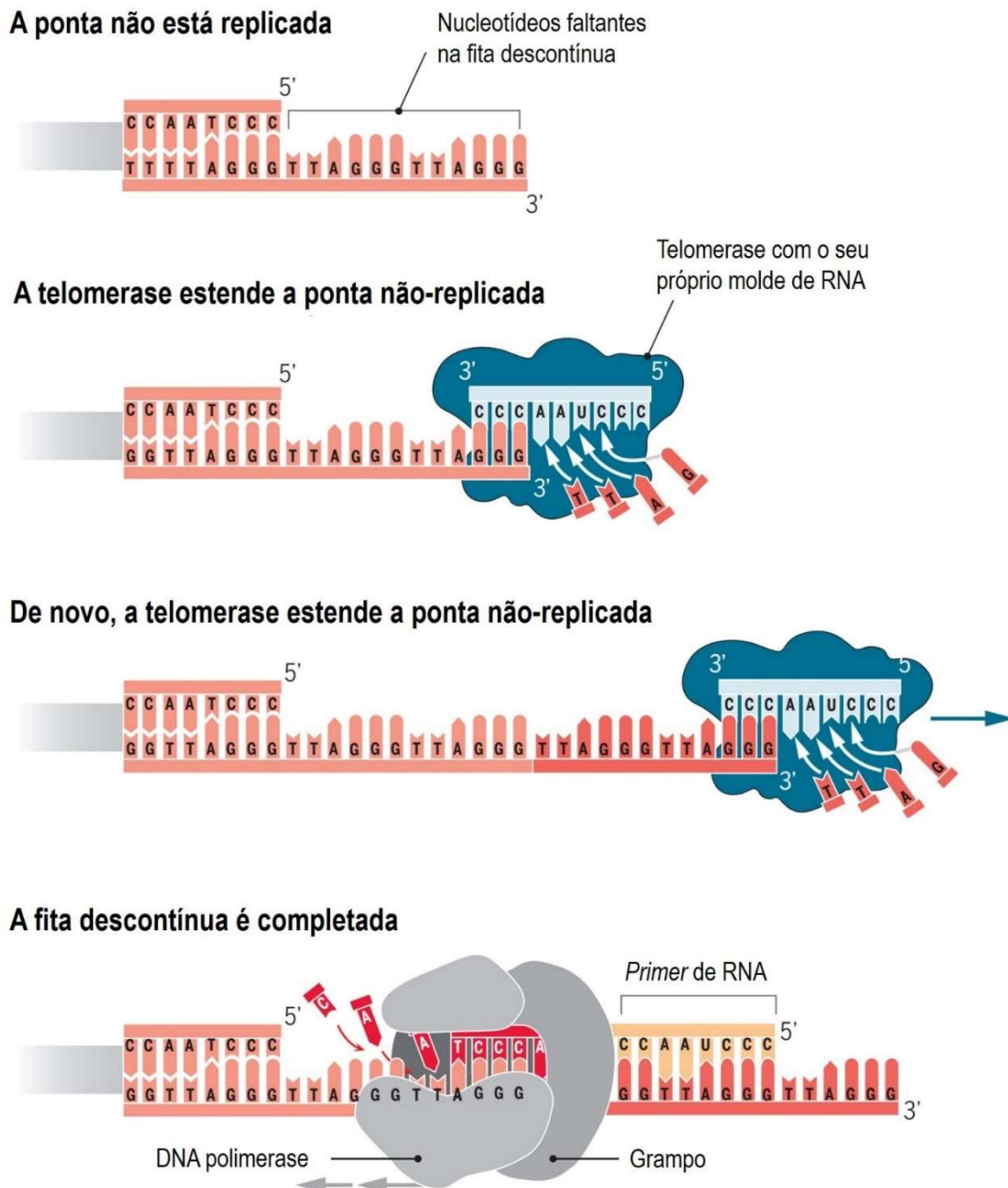
### 1.5.6 Envelhecimento celular acelerado e DCC

As dependências químicas estão associadas com processos patofisiológicos que aceleram o envelhecimento, incluindo estresse oxidativo e inflamação (Bachi et al. 2017). No caso da DCC, a literatura sugere que essa dependência resulta em uma “via rápida” para a senescência celular. Por exemplo, sabe-se que dependentes de cocaína apresentam uma taxa de mortalidade de 4 a 8 vezes maior que a população saudável, e que muitas dessas mortes estão relacionadas a doenças do envelhecimento, incluindo as doenças cardiovasculares (Degenhardt et al. 2011). Além disso, indivíduos dependentes de cocaína exibem um declínio no volume cerebral relacionado à idade significativamente maior quando comparado com controles saudáveis, sugerindo um quadro de envelhecimento cerebral prematuro (Ersche et al. 2013). Em relação à cognição, dois trabalhos que compararam pacientes dependentes com controles mais velhos sugeriram que a DCC resulta em prejuízos cognitivos que são relacionados ao envelhecimento em indivíduos saudáveis (Kalapatapu et al. 2011; Sanvicente-Vieira et al. 2016).

Embora processos patofisiológicos com efeitos amplos, incluindo o já mencionado estresse oxidativo e a inflamação, estejam envolvidos no envelhecimento celular associado às dependências de substâncias, ainda não há um consenso sobre quais eventos moleculares em um nível mais específico estão envolvidos no processo de senescência celular precoce. Um possível mecanismo pode ser o encurtamento acelerado dos telômeros. Os telômeros são estruturas formadas por DNA não codificante e proteínas que têm como função proteger os cromossomos de danos, mantendo sua integridade e estabilidade estrutural (Aubert 2014). A região telomérica é constituída por repetições em tandem de hexâmeros TTAGGG e seu encurtamento é um acontecimento que diferencia a senescência replicativa da quiescência celular (Aubert and Lansdorp 2008; Blackburn et al. 2015). Enquanto que a quiescência se caracteriza por um estado não-proliferativo reversível, na senescência replicativa, devido ao encurtamento crítico dos telômeros, a célula perde a capacidade proliferativa (Terzi et al. 2016).

Em relação à dinâmica funcional, os telômeros podem passar de um estado “fechado” para um estado “aberto”. O estado aberto permite o acesso da telomerase, o complexo enzimático que tem como função alongar a região telomérica, evitando o seu encurtamento até um nível

crítico (Aubert e Lansdorp 2008) (Figura 4). Além da replicação normal do DNA, erros de replicação, estresse oxidativo, inflamação e outros fatores que interferem na passagem do estado “fechado” para o “aberto” estão envolvidos na senescência celular. O resultado final é a apoptose e, ao longo do tempo, o envelhecimento do organismo como um todo. De qualquer forma, um grau de alongamento dos telômeros é mantido (ou induzido) por recombinação de DNA, mecanismos alternativos de alongamento e pela atividade da telomerase (Aubert 2014).



**Figura 4** – Replicação da ponta dos cromossomos pelo complexo proteína-RNA que forma a telomerase. A subunidade transcriptase reversa da telomerase alonga a ponta da fita descontínua a partir de um molde contido na subunidade formada por uma molécula de RNA dobrada. Na sequência, a DNA polimerase estende a dupla fita de DNA adicionando nucleotídeos. A versão original da figura, bem como uma revisão sobre a biologia dos telômeros, pode ser encontrada em Blackburn et al. (2015).

O tamanho dos telômeros vem sendo estudado em diversas doenças a partir da sua medição, principalmente, em leucócitos ou na saliva. Na psiquiatria, metanálises têm mostrado resultados significativos e apontado que indivíduos com transtornos mentais apresentam telômeros mais curtos quando comparados com controles saudáveis (Darrow et al. 2016). O racional que moveu desde o início os estudos na área do comportamento humano envolve o fato de que os transtornos mentais resultam em elevadas taxas de incapacidade, morbidade e mortalidade (GBD-2015 2016a; GBD-2015 2016b; GBD-2015 2016c) e isso se deve, em parte, às fortes associações entre transtornos psiquiátricos e doenças relacionadas ao envelhecimento, como, por exemplo, doenças metabólicas e declínio cognitivo (Darrow et al. 2016).

O melhor exemplo encontrado na literatura psiquiátrica envolve o transtorno depressivo maior (TDM), onde quatro metanálises recentes, com diferentes critérios de inclusão de estudos, mostraram que indivíduos com TDM apresentam telômeros mais curtos do que controles (Schutte and Malouff 2015; Darrow et al. 2016; Lin et al. 2016; Ridout et al. 2016). Independentemente da inclusão ou não do estudo do consórcio CONVERGE (*China Oxford and VCU Experimental Research on Genetic Epidemiology*), que apresenta o maior tamanho amostral (5,864 casos e 5,783 controles) (Cai et al. 2015), os resultados são significativos no TDM.

No caso da esquizofrenia e do transtorno bipolar, as metanálises sugerem que pacientes não medicados ou não responsivos ao tratamento apresentam telômeros mais curtos, enquanto que pacientes responsivos apresentam uma média comparável aos controles ou até mesmo maior (Colpo et al. 2015; Lin 2015; Polho et al. 2015; Rao et al. 2016). Isso se deve ao fato de que os antipsicóticos, antidepressivos e o lítio podem induzir o alongamento dos telômeros via efeitos antioxidantes, modulação dos níveis de serotonina e neurotrofinas e ativação da  $\beta$ -catenina, mecanismos que podem induzir a expressão da telomerase (Bersani et al. 2015).

Em relação aos transtornos por uso de substâncias, embora ainda não hajam metanálises, muitos trabalhos, majoritariamente com tabagismo, têm sido publicados. De um modo geral, o tabagismo (Rode et al. 2014; Chen et al. 2015; Müezziner et al. 2015; Verde et al. 2015; Latifovic et al. 2016; Wulaningsih et al. 2016), o tabagismo passivo (Wulaningsih et al. 2016) e a exposição pré-natal ao tabaco (Salihu et al. 2015; Ip et al. 2016) já foram associados com tamanho reduzido de telômeros. No caso de outras substâncias, um estudo mostrou que abusadores de álcool apresentam telômeros mais curtos quando comparados com pessoas que bebem socialmente (Pavanello et al. 2011). Entretanto, em outro estudo, o consumo de álcool medido quantitativamente não foi associado com tamanho de telômeros (Latifovic et al. 2016). Interessantemente, alcoolistas apresentaram telômeros mais curtos em células epiteliais do

esôfago quando comparados com controles, sugerindo um mecanismo molecular para a associação entre consumo de álcool e câncer nesse órgão (Aida et al. 2011). Além disso, uma associação com uso de drogas em geral e telômeros mais curtos foi demonstrada em uma amostra de chineses do grupo étnico Han (Yang et al. 2013). No caso da DCC, um estudo recente demonstrou que mulheres dependentes de crack apresentam telômeros mais curtos quando comparadas com mulheres controles sem transtornos mentais (Levandowski et al. 2016a).

Dentre os fatores ambientais envolvidos no encurtamento dos telômeros, os eventos estressores ocorridos no período pré-natal, na infância ou na vida adulta, têm ganhado destaque na literatura (Entringer et al. 2012; Shalev et al. 2013). Recentemente, duas metanálises demonstraram o papel do estresse percebido no tamanho dos telômeros (Mathur et al. 2016; Schutte e Malouff 2016). Além disso, uma revisão sistemática mostrou que o estresse social crônico foi associado com telômeros reduzidos na maioria dos estudos avaliados (Oliveira et al. 2016). Embora ainda não hajam metanálises, a literatura também aponta para um papel significativo do trauma precoce no tamanho dos telômeros (Shalev et al. 2013; Ridout et al. 2015). Em um estudo populacional, adversidades isoladas tenderam a não ter associação significativa com tamanho de telômeros, enquanto que o conjunto de adversidades acumuladas ao longo da vida predisse significativamente telômeros encurtados, sendo esse resultado explicado, principalmente, por eventos traumáticos ocorridos na infância (Puterman et al. 2016).

Esses resultados são corroborados pela forte ligação entre trauma precoce e desregulação do eixo HPA (Gonzalez 2013; Smart et al. 2015). Ensaio *in vitro* já demonstraram que o cortisol reduz a atividade da telomerase em linfócitos humanos e esse efeito parece ser devido a uma diminuição na expressão da subunidade transcriptase reversa desse complexo enzimático (Choi et al. 2008). Embora existam resultados conflitantes (Aulinas et al. 2014; Vasunilashorn and Cohen 2014), vários estudos mostram uma associação entre altos níveis de cortisol e telômeros mais curtos (Kroenke et al. 2011; Tomiyama et al. 2012; Révész et al. 2014; Gotlib et al. 2015; Zahran et al. 2015). Além disso, alguns achados levantam a hipótese de que a associação entre cortisol e tamanho dos telômeros possa seguir uma curva em formato de U invertido (ver Figura 3 do Capítulo 2), já que, em pacientes com depressão e indivíduos da população geral, telômeros mais curtos foram associados com um estado hipocortisolêmico (Wikgren et al. 2012).

Como a biologia dos telômeros é muito complexa, espera-se que fatores genéticos também apresentem um papel muito relevante. De fato, uma metanálise mostrou que a herdabilidade do tamanho dos telômeros é bem alta, sendo estimada em 70% (Broer et al. 2013). Mais recentemente, um estudo longitudinal mostrou uma alta herdabilidade basal, estimada em 64%

(Hjelmborg et al. 2015). Como nesse estudo a avaliação no tamanho dos telômeros foi realizada em dois pontos, com um intervalo médio de 12 anos, os autores puderam avaliar a herdabilidade do encurtamento dos telômeros ao longo do tempo. Essa estimativa foi de 28%, mostrando que o tamanho dos telômeros parece ser muito mais influenciado por fatores genéticos, enquanto que o seu encurtamento parece ser mais influenciado por fatores ambientais. Corroborando isso, em outro estudo longitudinal, com intervalo de 6 anos entre as duas medições de tamanho de telômeros, escores de trauma precoce foram associados somente com o encurtamento e não com tamanho dos telômeros na medição basal (Révész et al. 2016).

Conjuntamente, esses dados reforçam uma hipótese que recentemente vem sendo muito discutida; a de que o tamanho dos telômeros não é somente um biomarcador de gravidade, ou somente um reflexo do exposoma<sup>15</sup>, mas também um fator de risco para o desenvolvimento de doenças (Blackburn et al. 2015). Interessantemente, foi demonstrado que filhas de mães com diagnóstico de TDM têm telômeros mais curtos, ilustrando a possibilidade de que o tamanho dos telômeros seja um fator de risco para o desenvolvimento de depressão (Gotlib et al. 2015).

Em relação às variantes genéticas já associadas com tamanho de telômeros, até o momento, SNPs em 12 genes apresentaram significância em nível de varredura genômica, sendo um *locus* com associação exclusiva em indianos Punjabi (Levy et al. 2010; Mangino et al. 2012; Codd et al. 2013; Saxena et al. 2014; Mangino et al. 2015). De qualquer forma, todas as variantes associadas com tamanho de telômeros em um nível de significância de varredura explicam uma fração muito pequena da herdabilidade (< 5%) desse fenótipo (Mangino et al. 2015). Além disso, a herdabilidade molecular do tamanho dos telômeros foi estimada em 28% (Faul et al. 2016). Essa lacuna entre as estimativas (Figura 3) reforça a possibilidade de que interações genéticas possam estar envolvidas na herdabilidade perdida do tamanho dos telômeros. Nos Capítulos 7 e 8 da presente Tese as relações entre SNPs do sistema de estresse, tamanho de telômeros, trauma precoce e gravidade dos sintomas de depressão na dependência de crack foram explorados (dados não publicados) e, no Capítulo 11, esses dados serão discutidos em conjunto.

## Referências bibliográficas

- Abdalla RR, Madruga CS, Ribeiro M, Pinsky I, Caetano R and Laranjeira R (2014) Prevalence of cocaine use in Brazil: data from the II Brazilian national alcohol and drugs survey (BNADS). *Addict Behav* 39:297–301.
- Aida J, Yokoyama A, Izumiyama N, Nakamura K, Ishikawa N, Poon SS, Fujiwara M, Sawabe M, Matsuura M, Arai T et al. (2011) Alcoholics show reduced telomere length in the oesophagus. *J Pathol* 223:410–6. doi: 10.1002/path.2817
- Alex Mason W, Jean Russo M, Chmelka MB, Herrenkohl RC and Herrenkohl TI (2017) Parent and peer pathways linking childhood experiences of abuse with marijuana use in adolescence and adulthood. *Addict Behav* 66:70–75. doi: 10.1016/j.addbeh.2016.11.013
- Alia-Klein N, Parvaz MA, Woicik PA, Konova AB, Maloney T, Shumay E, Wang R, Telang F, Biegan A, Wang G-J et al. (2011) Gene x disease interaction on orbitofrontal gray matter in cocaine addiction. *Arch Gen Psychiatry* 68:283–94. doi: 10.1001/archgenpsychiatry.2011.10
- Alvarez Y, Farré M, Fonseca F and Torrens M (2010) Anticonvulsant drugs in cocaine dependence: A systematic review and meta-analysis. *J Subst Abuse Treat* 38:66–73. doi: 10.1016/j.jsat.2009.07.001
- Álvarez Y, Pérez-Mañá C, Torrens M and Farré M (2013) Antipsychotic drugs in cocaine dependence: A systematic review and meta-analysis. *J Subst Abuse Treat* 45:1–10. doi: 10.1016/j.jsat.2012.12.013
- Ambroggi F, Turiault M, Milet A, Deroche-Gamonet V, Parnaudeau S, Balado E, Barik J, van der Veen R, Maroteaux G, Lemberger T et al. (2009) Stress and addiction: glucocorticoid receptor in dopaminergic neurons facilitates cocaine seeking. *Nat Neurosci* 12:247–9. doi: 10.1038/nn.2282
- Angelucci F, Ricci V, Pomponi M, Conte G, Mathe AA, Attilio Tonali P and Bria P (2007) Chronic heroin and cocaine abuse is associated with decreased serum concentrations of the nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor. *J Psychopharmacol* 21:820–825. doi: 10.1177/0269881107078491
- APA APA (2013) *Diagnostic and statistical manual of mental disorders*, 5th ed. Arlington, VA
- APA APA (1994) *Diagnostic and statistical manual of mental disorders*, 4th ed. Washington, DC
- Aubert G (2014) Telomere dynamics and aging. *Prog Mol Biol Transl Sci* 125:89–111. doi:

10.1016/B978-0-12-397898-1.00004-9

Aubert G and Lansdorp PM (2008) Telomeres and aging. *Physiol Rev* 88:557–79. doi: 10.1152/physrev.00026.2007

Aulinas A, Ramirez M-J, Barahona M-J, Valassi E, Resmini E, Mato E, Santos A, Crespo I, Bell O, Surralles J et al. (2014) Telomere length analysis in Cushing's syndrome. *Eur J Endocrinol* 171:21–29. doi: 10.1530/EJE-14-0098

Bachi K, Sierra S, Volkow ND, Goldstein RZ and Alia-Klein N (2017) Is biological aging accelerated in drug addiction? *Curr Opin Behav Sci* 13:34–39. doi: 10.1016/j.cobeha.2016.09.007

Back SE, Brady KT, Waldrop AE, Yeatts SD, McRae AL and Spratt E (2008) Early life trauma and sensitivity to current life stressors in individuals with and without cocaine dependence. *Am J Drug Alcohol Abuse* 34:389–96. doi: 10.1080/00952990802122614

Ballon N, Leroy S, Roy C, Bourdel M-C, Olie J-P, Charles-Nicolas A, Krebs M-O and Poirier M-F (2007) Polymorphisms TaqI A of the DRD2, Ball of the DRD3, exon III repeat of the DRD4, and 3' UTR VNTR of the DAT: association with childhood ADHD in male African-Caribbean cocaine dependents? *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 144B:1034–41. doi: 10.1002/ajmg.b.30540

Bastos FI and Bertoni N (2014) Pesquisa Nacional sobre o uso de crack: quem são os usuários de crack e/ou similares do Brasil? quantos são nas capitais brasileiras? [https://www.icict.fiocruz.br/sites/www.icict.fiocruz.br/files/Pesquisa Nacional sobre o Uso de Crack.pdf](https://www.icict.fiocruz.br/sites/www.icict.fiocruz.br/files/Pesquisa%20Nacional%20sobre%20o%20Uso%20de%20Crack.pdf).

Baumann MH, Gendron TM, Becketts KM, Henningfield JE, Gorelick DA and Rothman RB (1995) Effects of intravenous cocaine on plasma cortisol and prolactin in human cocaine abusers. *Biol Psychiatry* 38:751–5. doi: 10.1016/0006-3223(95)00083-6

Bernd P (2008) The role of neurotrophins during early development. *Gene Expr* 14:241–50.

Bersani FS, Lindqvist D, Mellon SH, Penninx BWJH, Verhoeven JE, Révész D, Reus VI and Wolkowitz OM (2015) Telomerase activation as a possible mechanism of action for psychopharmacological interventions. *Drug Discov Today* 20:1305–9. doi: 10.1016/j.drudis.2015.06.016

Bi J, Gelernter J, Sun J and Kranzler HR (2014) Comparing the utility of homogeneous subtypes of cocaine use and related behaviors with DSM-IV cocaine dependence as traits for genetic association analysis. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 165B:148–56. doi:



10.1002/ajmg.b.32216

Biondich AS and Joslin JD (2015) Coca: High Altitude Remedy of the Ancient Incas. *Wilderness Environ Med* 26:567–571. doi: 10.1016/j.wem.2015.07.006

Biondich AS and Joslin JD (2016) Coca: The History and Medical Significance of an Ancient Andean Tradition. *Emerg Med Int* 2016:1–5. doi: 10.1155/2016/4048764

Blackburn EH, Epel ES and Lin J (2015) Human telomere biology: A contributory and interactive factor in aging, disease risks, and protection. *Science* 350:1193–8. doi: 10.1126/science.aab3389

Bloch PJ, Nall AH, Weller AE, Ferraro TN, Berrettini WH, Kampman KM, Pettinati HM, Dackis CA, O'Brien CP, Oslin DW et al. (2009) Association analysis between polymorphisms in the dopamine D3 receptor (DRD3) gene and cocaine dependence. *Psychiatr Genet* 19:275–6. doi: 10.1097/YPG.0b013e32832cec12

Borowsky B and Kuhn CM (1991) Monoamine mediation of cocaine-induced hypothalamo-pituitary-adrenal activation. *J Pharmacol Exp Ther* 256:204–10.

Brady KT, McRae AL, Moran-Santa Maria MM, DeSantis SM, Simpson AN, Waldrop AE, Back SE and Kreek MJ (2009) Response to corticotropin-releasing hormone infusion in cocaine-dependent individuals. *Arch Gen Psychiatry* 66:422–30. doi: 10.1001/archgenpsychiatry.2009.9

Brents LK, Tripathi SP, Young J, James GA and Kilts CD (2015) The role of childhood maltreatment in the altered trait and global expression of personality in cocaine addiction. *J Psychiatr Res* 64:23–31. doi: 10.1016/j.jpsychires.2015.02.015

Brewer AJ, Nielsen DA, Spellicy CJ, Hamon SC, Gingrich J, Thompson-Lake DGY, Nielsen EM, Mahoney JJ, Kosten TR, Newton TF et al. (2015) Genetic variation of the dopamine transporter (DAT1) influences the acute subjective responses to cocaine in volunteers with cocaine use disorders. *Pharmacogenet Genomics* 25:296–304. doi: 10.1097/FPC.000000000000137

Broer L, Codd V, Nyholt DR, Deelen J, Mangino M, Willemsen G, Albrecht E, Amin N, Beekman M, de Geus EJC et al. (2013) Meta-analysis of telomere length in 19,713 subjects reveals high heritability, stronger maternal inheritance and a paternal age effect. *Eur J Hum Genet* 21:1163–8. doi: 10.1038/ejhg.2012.303

Bühler K-M, Giné E, Echeverry-Alzate V, Calleja-Conde J, de Fonseca FR and López-Moreno JA (2015) Common single nucleotide variants underlying drug addiction: more than a decade of research. *Addict Biol* 20:845–71. doi: 10.1111/adb.12204

Buydens-Branchey L, Branchey M, Hudson J and Dorota Majewska M (2002) Perturbations

of plasma cortisol and DHEA-S following discontinuation of cocaine use in cocaine addicts. *Psychoneuroendocrinology* 27:83–97.

Cai N, Chang S, Li Y, Li Q, Hu J, Liang J, Song L, Kretschmar W, Gan X, Nicod J et al. (2015) Molecular signatures of major depression. *Curr Biol* 25:1146–56. doi: 10.1016/j.cub.2015.03.008

Cao J, Hudziak JJ and Li D (2013a) Multi-cultural association of the serotonin transporter gene (SLC6A4) with substance use disorder. *Neuropsychopharmacology* 38:1737–47. doi: 10.1038/npp.2013.73

Cao J, LaRocque E and Li D (2013b) Associations of the 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1B gene (HTR1B) with alcohol, cocaine, and heroin abuse. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 162B:169–76. doi: 10.1002/ajmg.b.32128

Carliner H, Keyes KM, McLaughlin KA, Meyers JL, Dunn EC and Martins SS (2016) Childhood Trauma and Illicit Drug Use in Adolescence: A Population-Based National Comorbidity Survey Replication-Adolescent Supplement Study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 55:701–8. doi: 10.1016/j.jaac.2016.05.010

Carroll KM, Nich C, Petry NM, Eagan DA, Shi JM and Ball SA (2016) A randomized factorial trial of disulfiram and contingency management to enhance cognitive behavioral therapy for cocaine dependence. *Drug Alcohol Depend* 160:135–142. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2015.12.036

Cason AM, Kohtz A and Aston-Jones G (2016) Role of Corticotropin Releasing Factor 1 Signaling in Cocaine Seeking during Early Extinction in Female and Male Rats. *PLoS One* 11:e0158577. doi: 10.1371/journal.pone.0158577

Castells X, Cunill R, Pérez-Mañá C, Vidal X and Capellà D (2016) Psychostimulant drugs for cocaine dependence. *Cochrane Database Syst Rev*. doi: 10.1002/14651858.CD007380.pub4

Chao M V. (2003) Neurotrophins and their receptors: A convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci* 4:299–309. doi: 10.1038/nrn1078

Chen C-Y and Anthony JC (2004) Epidemiological estimates of risk in the process of becoming dependent upon cocaine: cocaine hydrochloride powder versus crack cocaine. *Psychopharmacology (Berl)* 172:78–86. doi: 10.1007/s00213-003-1624-6

Chen R, Tilley MR, Wei H, Zhou F, Zhou F-M, Ching S, Quan N, Stephens RL, Hill ER, Nottoli T et al. (2006) Abolished cocaine reward in mice with a cocaine-insensitive dopamine transporter. *Proc Natl Acad Sci* 103:9333–9338. doi: 10.1073/pnas.0600905103

Chen X, Cho K, Singer BH and Zhang H (2011) The nuclear transcription factor PKNOX2 is a

candidate gene for substance dependence in European-origin women. *PLoS One* 6:e16002. doi: 10.1371/journal.pone.0016002

Chen X, Velez JC, Barbosa C, Pepper M, Andrade A, Stoner L, De Vivo I, Gelaye B and Williams MA (2015) Smoking and perceived stress in relation to short salivary telomere length among caregivers of children with disabilities. *Stress* 18:20–8. doi: 10.3109/10253890.2014.969704

Choi J, Fauce SR and Effros RB (2008) Reduced telomerase activity in human T lymphocytes exposed to cortisol. *Brain Behav Immun* 22:600–605. doi: 10.1016/j.bbi.2007.12.004

Clarke T-K, Ambrose-Lanci L, Ferraro TN, Berrettini WH, Kampman KM, Dackis CA, Pettinati HM, O'Brien CP, Oslin DW and Lohoff FW (2012) Genetic association analyses of PDYN polymorphisms with heroin and cocaine addiction. *Genes Brain Behav* 11:415–23. doi: 10.1111/j.1601-183X.2012.00785.x

Clarke T-K, Bloch PJ, Ambrose-Lanci LM, Ferraro TN, Berrettini WH, Kampman KM, Dackis CA, Pettinati HM, O'Brien CP, Oslin DW et al. (2013a) Further evidence for association of polymorphisms in the CNR1 gene with cocaine addiction: confirmation in an independent sample and meta-analysis. *Addict Biol* 18:702–8. doi: 10.1111/j.1369-1600.2011.00346.x

Clarke T-K, Crist RC, Kampman KM, Dackis CA, Pettinati HM, O'Brien CP, Oslin DW, Ferraro TN, Lohoff FW and Berrettini WH (2013b) Low frequency genetic variants in the  $\mu$ -opioid receptor (OPRM1) affect risk for addiction to heroin and cocaine. *Neurosci Lett* 542:71–5. doi: 10.1016/j.neulet.2013.02.018

Codd V, Nelson CP, Albrecht E, Mangino M, Deelen J, Buxton JL, Hottenga JJ, Fischer K, Esko T, Surakka I et al. (2013) Identification of seven loci affecting mean telomere length and their association with disease. *Nat Genet* 45:422–7, 427–2. doi: 10.1038/ng.2528

Colpo GD, Leffa DD, Köhler CA, Kapczinski F, Quevedo J and Carvalho AF (2015) Is bipolar disorder associated with accelerating aging? A meta-analysis of telomere length studies. *J Affect Disord* 186:241–8. doi: 10.1016/j.jad.2015.06.034

Cordell HJ (2009) Detecting gene-gene interactions that underlie human diseases. *Nat Rev Genet* 10:392–404. doi: 10.1038/nrg2579

Corominas-Roso M, Roncero C, Eiroa-Orosa F-J, Ribasés M, Barral C, Daigre C, Martínez-Luna N, Sánchez-Mora C, Ramos-Quiroga JA and Casas M (2013a) Serum brain-derived neurotrophic factor levels and cocaine-induced transient psychotic symptoms. *Neuropsychobiology* 68:146–55. doi: 10.1159/000353259

Corominas-Roso M, Roncero C, Eiroa-Orosa FJ, Gonzalvo B, Grau-Lopez L, Ribases M, Rodriguez-Cintas L, Sánchez-Mora C, Ramos-Quiroga J-A and Casas M (2013b) Brain-derived neurotrophic factor serum levels in cocaine-dependent patients during early abstinence. *Eur Neuropsychopharmacol* 23:1078–84. doi: 10.1016/j.euroneuro.2012.08.016

Crist RC, Ambrose-Lanci LM, Vaswani M, Clarke TK, Zeng A, Yuan C, Ferraro TN, Hakonarson H, Kampman KM, Dackis CA et al. (2013) Case-control association analysis of polymorphisms in the  $\delta$ -opioid receptor, OPRD1, with cocaine and opioid addicted populations. *Drug Alcohol Depend* 127:122–8. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2012.06.023

Culverhouse RC, Johnson EO, Breslau N, Hatsukami DK, Sadler B, Brooks AI, Hesselbrock VM, Schuckit MA, Tischfield JA, Goate AM et al. (2014) Multiple distinct CHRN3-CHRNA6 variants are genetic risk factors for nicotine dependence in African Americans and European Americans. *Addiction* 109:814–22. doi: 10.1111/add.12478

D'Sa C, Fox HC, Hong AK, Dileone RJ and Sinha R (2011) Increased serum brain-derived neurotrophic factor is predictive of cocaine relapse outcomes: a prospective study. *Biol Psychiatry* 70:706–11. doi: 10.1016/j.biopsych.2011.05.013

D'Souza MS (2015) Glutamatergic transmission in drug reward: implications for drug addiction. *Front Neurosci* 9:404. doi: 10.3389/fnins.2015.00404

Daigre C, Roncero C, Grau-López L, Martínez-Luna N, Prat G, Valero S, Tejedor R, Ramos-Quiroga JA and Casas M (2013) Attention deficit hyperactivity disorder in cocaine-dependent adults: A psychiatric comorbidity analysis. *Am J Addict* 22:466–473. doi: 10.1111/j.1521-0391.2013.12047.x

Darrow SM, Verhoeven JE, Révész D, Lindqvist D, Penninx BWJH, Delucchi KL, Wolkowitz OM and Mathews CA (2016) The Association Between Psychiatric Disorders and Telomere Length: A Meta-Analysis Involving 14,827 Persons. *Psychosom Med* 78:776–87. doi: 10.1097/PSY.0000000000000356

Degenhardt L, Singleton J, Calabria B, McLaren J, Kerr T, Mehta S, Kirk G and Hall WD (2011) Mortality among cocaine users: a systematic review of cohort studies. *Drug Alcohol Depend* 113:88–95. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2010.07.026

DeVito EE, Babuscio TA, Nich C, Ball SA and Carroll KM (2014) Gender differences in clinical outcomes for cocaine dependence: Randomized clinical trials of behavioral therapy and disulfiram. *Drug Alcohol Depend* 145:156–167. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2014.10.007

Drgon T, Zhang P-W, Johnson C, Walther D, Hess J, Nino M and Uhl GR (2010) Genome wide association for addiction: replicated results and comparisons of two analytic approaches.

PLoS One 5:e8832. doi: 10.1371/journal.pone.0008832

Ducci F and Goldman D (2012) The genetic basis of addictive disorders. *Psychiatr Clin North Am* 35:495–519. doi: 10.1016/j.psc.2012.03.010

Duncan LE, Pollastri AR and Smoller JW (2014) Mind the gap: why many geneticists and psychological scientists have discrepant views about gene-environment interaction (G×E) research. *Am Psychol* 69:249–68. doi: 10.1037/a0036320

Dutra L, Stathopoulou G, Basden SL, Leyro TM, Powers MB and Otto MW (2008) A Meta-Analytic Review of Psychosocial Interventions for Substance Use Disorders. *Am J Psychiatry* 165:179–187. doi: 10.1176/appi.ajp.2007.06111851

Edalati H and Krank MD (2016) Childhood Maltreatment and Development of Substance Use Disorders: A Review and a Model of Cognitive Pathways. *Trauma Violence Abuse* 17:454–467. doi: 10.1177/1524838015584370

Elliott JC, Stohl M, Wall MM, Keyes KM, Goodwin RD, Skodol AE, Krueger RF, Grant BF and Hasin DS (2014) The risk for persistent adult alcohol and nicotine dependence: the role of childhood maltreatment. *Addiction* 109:842–50. doi: 10.1111/add.12477

Elman I, Breiter HC, Gollub RL, Krause S, Kantor HL, Baumgartner WA, Gastfriend DR and Rosen BR (1999) Depressive symptomatology and cocaine-induced pituitary-adrenal axis activation in individuals with cocaine dependence. *Drug Alcohol Depend* 56:39–45.

Elman I, Lukas SE, Karlsgodt KH, Gasic GP and Breiter HC (2003) Acute cortisol administration triggers craving in individuals with cocaine dependence. *Psychopharmacol Bull* 37:84–9.

Enoch M-A, Hodgkinson CA, Yuan Q, Shen P-H, Goldman D and Roy A (2010) The influence of GABRA2, childhood trauma, and their interaction on alcohol, heroin, and cocaine dependence. *Biol Psychiatry* 67:20–7. doi: 10.1016/j.biopsych.2009.08.019

Entringer S, Buss C and Wadhwa PD (2012) Prenatal stress, telomere biology, and fetal programming of health and disease risk. *Sci Signal* 5:pt12. doi: 10.1126/scisignal.2003580

Ersche KD, Jones PS, Williams GB, Robbins TW and Bullmore ET (2013) Cocaine dependence: a fast-track for brain ageing? *Mol Psychiatry* 18:134–5. doi: 10.1038/mp.2012.31

Erskine HE, Norman RE, Ferrari AJ, Chan GCK, Copeland WE, Whiteford HA and Scott JG (2016) Long-Term Outcomes of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder and Conduct Disorder: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 55:841–850. doi: 10.1016/j.jaac.2016.06.016

Ettner SL, Huang D, Evans E, Rose Ash D, Hardy M, Jourabchi M and Hser Y-I (2006)

Benefit-Cost in the California Treatment Outcome Project: Does Substance Abuse Treatment &quot;Pay for Itself&quot;? *Health Serv Res* 41:192–213. doi: 10.1111/j.1475-6773.2005.00466.x

Evans BE, Greaves-Lord K, Euser AS, Franken IHA and Huizink AC (2012) The relation between hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis activity and age of onset of alcohol use. *Addiction* 107:312–22. doi: 10.1111/j.1360-0443.2011.03568.x

Faul JD, Mitchell CM, Smith JA and Zhao W (2016) Estimating Telomere Length Heritability in an Unrelated Sample of Adults: Is Heritability of Telomere Length Modified by Life Course Socioeconomic Status? *Biodemography Soc Biol* 62:73–86. doi: 10.1080/19485565.2015.1120645

Fernàndez-Castillo N, Cormand B, Roncero C, Sánchez-Mora C, Grau-Lopez L, Gonzalvo B, Miquel L, Corominas R, Ramos-Quiroga JA, Casas M et al. (2012) Candidate pathway association study in cocaine dependence: the control of neurotransmitter release. *World J Biol Psychiatry* 13:126–34. doi: 10.3109/15622975.2010.551406

Fernàndez-Castillo N, Ribasés M, Roncero C, Casas M, Gonzalvo B and Cormand B (2010) Association study between the DAT1, DBH and DRD2 genes and cocaine dependence in a Spanish sample. *Psychiatr Genet* 20:317–20. doi: 10.1097/YPG.0b013e32833b6320

Fernàndez-Castillo N, Roncero C, Grau-Lopez L, Barral C, Prat G, Rodriguez-Cintas L, Sánchez-Mora C, Gratacòs M, Ramos-Quiroga JA, Casas M et al. (2013) Association study of 37 genes related to serotonin and dopamine neurotransmission and neurotrophic factors in cocaine dependence. *Genes Brain Behav* 12:39–46. doi: 10.1111/gbb.12013

Festinger DS, Dugosh KL, Kirby KC and Seymour BL (2014) Contingency management for cocaine treatment: Cash vs. vouchers. *J Subst Abuse Treat* 47:168–174. doi: 10.1016/j.jsat.2014.03.001

Fischer B, Blanken P, Da Silveira D, Gallassi A, Goldner EM, Rehm J, Tyndall M and Wood E (2015) Effectiveness of secondary prevention and treatment interventions for crack-cocaine abuse: a comprehensive narrative overview of English-language studies. *Int J Drug Policy* 26:352–63. doi: 10.1016/j.drugpo.2015.01.002

Flynn PM, Kristiansen PL, Porto J V and Hubbard RL (1999) Costs and benefits of treatment for cocaine addiction in DATOS. *Drug Alcohol Depend* 57:167–74.

Fox HC, Garcia M, Kemp K, Milivojevic V, Kreek MJ and Sinha R (2006) Gender differences in cardiovascular and corticoadrenal response to stress and drug cues in cocaine dependent individuals. *Psychopharmacology (Berl)* 185:348–57. doi: 10.1007/s00213-005-0303-1

Fox HC, Hong KA, Paliwal P, Morgan PT and Sinha R (2008) Altered levels of sex and stress steroid hormones assessed daily over a 28-day cycle in early abstinent cocaine-dependent females. *Psychopharmacology (Berl)* 195:527–36. doi: 10.1007/s00213-007-0936-3

Francke ID, Viola TW, Tractenberg SG and Grassi-Oliveira R (2013) Childhood neglect and increased withdrawal and depressive severity in crack cocaine users during early abstinence. *Child Abuse Negl* 37:883–9. doi: 10.1016/j.chiabu.2013.04.008

Fumagalli F, Di Pasquale L, Caffino L, Racagni G and Riva MA (2007) Repeated exposure to cocaine differently modulates BDNF mRNA and protein levels in rat striatum and prefrontal cortex. *Eur J Neurosci* 26:2756–2763. doi: 10.1111/j.1460-9568.2007.05918.x

Fumagalli F, Moro F, Caffino L, Orrù A, Cassina C, Giannotti G, Di Clemente A, Racagni G, Riva MA and Cervo L (2013) Region-specific effects on BDNF expression after contingent or non-contingent cocaine i.v. self-administration in rats. *Int J Neuropsychopharmacol* 16:913–918. doi: 10.1017/S146114571200096X

GBD-2015 (2016a) Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet (London, England)* 388:1545–1602. doi: 10.1016/S0140-6736(16)31678-6

GBD-2015 (2016b) Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 315 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE), 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet (London, England)* 388:1603–1658. doi: 10.1016/S0140-6736(16)31460-X

GBD-2015 (2016c) Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet (London, England)* 388:1459–1544. doi: 10.1016/S0140-6736(16)31012-1

Gelernter J, Sherva R, Koesterer R, Almasy L, Zhao H, Kranzler HR and Farrer L (2014) Genome-wide association study of cocaine dependence and related traits: FAM53B identified as a risk gene. *Mol Psychiatry* 19:717–23. doi: 10.1038/mp.2013.99

Gerra G, Leonardi C, Cortese E, Zaimovic A, Dell’Agnello G, Manfredini M, Somaini L, Petracca F, Caretti V, Baroni C et al. (2008) Adrenocorticotrophic hormone and cortisol plasma levels directly correlate with childhood neglect and depression measures in addicted patients. *Addict Biol* 13:95–104. doi: 10.1111/j.1369-1600.2007.00086.x

Gerra G, Leonardi C, Cortese E, Zaimovic A, Dell’agnello G, Manfredini M, Somaini L,

Petracca F, Caretti V, Raggi MA et al. (2009) Childhood neglect and parental care perception in cocaine addicts: relation with psychiatric symptoms and biological correlates. *Neurosci Biobehav Rev* 33:601–10. doi: 10.1016/j.neubiorev.2007.08.002

Gerra G, Zaimovic A, Garofano L, Ciusa F, Moi G, Avanzini P, Talarico E, Gardini F, Brambilla F, Manfredini M et al. (2007) Perceived parenting behavior in the childhood of cocaine users: relationship with genotype and personality traits. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 144B:52–7. doi: 10.1002/ajmg.b.30388

Givalois L, Naert G, Rage F, Ixart G, Arancibia S and Tapia-Arancibia L (2004) A single brain-derived neurotrophic factor injection modifies hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis activity in adult male rats. *Mol Cell Neurosci* 27:280–95. doi: 10.1016/j.mcn.2004.07.002

Glass CK and Saijo K (2010) Nuclear receptor transrepression pathways that regulate inflammation in macrophages and T cells. *Nat Rev Immunol* 10:365–76. doi: 10.1038/nri2748

González-Saiz F, Vergara-Moragues E, Verdejo-García A, Fernández-Calderón F and Lozano OM (2014) Impact of Psychiatric Comorbidity on the In-Treatment Outcomes of Cocaine-Dependent Patients in Therapeutic Communities. *Subst Abus* 35:133–140. doi: 10.1080/08897077.2013.812544

Gonzalez A (2013) The impact of childhood maltreatment on biological systems: Implications for clinical interventions. *Paediatr Child Health* 18:415–8.

Gossop M, Manning V and Ridge G (2006) Concurrent use of alcohol and cocaine: differences in patterns of use and problems among users of crack cocaine and cocaine powder. *Alcohol Alcohol* 41:121–5. doi: 10.1093/alcalc/agh260

Gotlib IH, LeMoult J, Colich NL, Foland-Ross LC, Hallmayer J, Joormann J, Lin J and Wolkowitz OM (2015) Telomere length and cortisol reactivity in children of depressed mothers. *Mol Psychiatry* 20:615–620. doi: 10.1038/mp.2014.119

Graf EN, Wheeler RA, Baker DA, Ebben AL, Hill JE, McReynolds JR, Robble MA, Vranjkovic O, Wheeler DS, Mantsch JR et al. (2013) Corticosterone acts in the nucleus accumbens to enhance dopamine signaling and potentiate reinstatement of cocaine seeking. *J Neurosci* 33:11800–10. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1969-13.2013

Grassi-Oliveira R, Pezzi JC, Daruy-Filho L, Viola TW, Francke IDA, Leite CE and Brietzke E (2012) Hair cortisol and stressful life events retrospective assessment in crack cocaine users. *Am J Drug Alcohol Abuse* 38:535–8. doi: 10.3109/00952990.2012.694538

Grimm JW, Lu L, Hayashi T, Hope BT, Su T-P and Shaham Y (2003) Time-dependent increases in brain-derived neurotrophic factor protein levels within the mesolimbic dopamine



system after withdrawal from cocaine: implications for incubation of cocaine craving. *J Neurosci* 23:742–7.

Grucza RA, Wang JC, Stitzel JA, Hinrichs AL, Saccone SF, Saccone NL, Bucholz KK, Cloninger CR, Neuman RJ, Budde JP et al. (2008) A risk allele for nicotine dependence in *CHRNA5* is a protective allele for cocaine dependence. *Biol Psychiatry* 64:922–9. doi: 10.1016/j.biopsych.2008.04.018

Guindalini C, Howard M, Haddley K, Laranjeira R, Collier D, Ammar N, Craig I, O’Gara C, Bubb VJ, Greenwood T et al. (2006a) A dopamine transporter gene functional variant associated with cocaine abuse in a Brazilian sample. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:4552–7. doi: 10.1073/pnas.0504789103

Guindalini C, Laranjeira R, Collier D, Messas G, Vallada H and Breen G (2008) Dopamine-beta hydroxylase polymorphism and cocaine addiction. *Behav Brain Funct* 4:1. doi: 10.1186/1744-9081-4-1

Guindalini C, O’Gara C, Laranjeira R, Collier D, Castelo A, Vallada H and Breen G (2005) A *GSTP1* functional variant associated with cocaine dependence in a Brazilian population. *Pharmacogenet Genomics* 15:891–3.

Guindalini C, Vallada H, Breen G and Laranjeira R (2006b) Concurrent crack and powder cocaine users from Sao Paulo: Do they represent a different group? *BMC Public Health* 6:10. doi: 10.1186/1471-2458-6-10

Haile CN, De La Garza R, Mahoney JJ, Nielsen DA, Kosten TR and Newton TF (2012) The Impact of Disulfiram Treatment on the Reinforcing Effects of Cocaine: A Randomized Clinical Trial. *PLoS One* 7:e47702. doi: 10.1371/journal.pone.0047702

Haller G, Kapoor M, Budde J, Xuei X, Edenberg H, Nurnberger J, Kramer J, Brooks A, Tischfield J, Almasy L et al. (2014) Rare missense variants in *CHRN3* and *CHRNA3* are associated with risk of alcohol and cocaine dependence. *Hum Mol Genet* 23:810–9. doi: 10.1093/hmg/ddt463

Haney M, Gunderson EW, Jiang H, Collins ED and Foltin RW (2010) Cocaine-specific antibodies blunt the subjective effects of smoked cocaine in humans. *Biol Psychiatry* 67:59–65. doi: 10.1016/j.biopsych.2009.08.031

Hatsukami DK and Fischman MW (1996) Crack cocaine and cocaine hydrochloride. Are the differences myth or reality? *JAMA* 276:1580–8.

Havranek MM, Hulka LM, Tasiudi E, Eisenegger C, Vonmoos M, Preller KH, Mössner R, Baumgartner MR, Seifritz E, Grünblatt E et al. (2015a)  $\alpha 2A$  -Adrenergic receptor polymorphisms

and mRNA expression levels are associated with delay discounting in cocaine users. *Addict Biol.* doi: 10.1111/adb.12324

Havranek MM, Vonmoos M, Müller CP, Büetiger JR, Tasiudi E, Hulka LM, Preller KH, Mössner R, Grünblatt E, Seifritz E et al. (2015b) Serotonin Transporter and Tryptophan Hydroxylase Gene Variations Mediate Working Memory Deficits of Cocaine Users. *Neuropsychopharmacology* 40:2929–37. doi: 10.1038/npp.2015.146

Heal DJ, Gosden J and Smith SL (2014) Dopamine reuptake transporter (DAT) “inverse agonism” – A novel hypothesis to explain the enigmatic pharmacology of cocaine. *Neuropharmacology* 87:19–40. doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.06.012

Hemani G, Shakhbazov K, Westra H-J, Esko T, Henders AK, McRae AF, Yang J, Gibson G, Martin NG, Metspalu A et al. (2014) Detection and replication of epistasis influencing transcription in humans. *Nature* 508:249–53. doi: 10.1038/nature13005

Herman AI, Kranzler HR, Cubells JF, Gelernter J and Covault J (2006) Association study of the CNR1 gene exon 3 alternative promoter region polymorphisms and substance dependence. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 141B:499–503. doi: 10.1002/ajmg.b.30325

Hjelmborg JB, Dalgård C, Möller S, Steenstrup T, Kimura M, Christensen K, Kyvik KO and Aviv A (2015) The heritability of leucocyte telomere length dynamics. *J Med Genet* 52:297–302. doi: 10.1136/jmedgenet-2014-102736

Huang C-C, Yeh C-M, Wu M-Y, Chang AYW, Chan JYH, Chan SHH and Hsu K-S (2011a) Cocaine Withdrawal Impairs Metabotropic Glutamate Receptor-Dependent Long-Term Depression in the Nucleus Accumbens. *J Neurosci* 31:4194–4203. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5239-10.2011

Huang S, Trapido E, Fleming L, Arheart K, Crandall L, French M, Malcolm S and Prado G (2011b) The long-term effects of childhood maltreatment experiences on subsequent illicit drug use and drug-related problems in young adulthood. *Addict Behav* 36:95–102. doi: 10.1016/j.addbeh.2010.09.001

Hyman SM, Paliwal P, Chaplin TM, Mazure CM, Rounsaville BJ and Sinha R (2008) Severity of childhood trauma is predictive of cocaine relapse outcomes in women but not men. *Drug Alcohol Depend* 92:208–16. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2007.08.006

Hyttel J (1982) Citalopram--pharmacological profile of a specific serotonin uptake inhibitor with antidepressant activity. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 6:277–95.

Im H-I, Hollander JA, Bali P and Kenny PJ (2010) MeCP2 controls BDNF expression and cocaine intake through homeostatic interactions with microRNA-212. *Nat Neurosci* 13:1120–

1127. doi: 10.1038/nn.2615

Indave BI, Minozzi S, Pani PP and Amato L (2016) Antipsychotic medications for cocaine dependence. *Cochrane Database Syst Rev.* doi: 10.1002/14651858.CD006306.pub3

INPAD (2014) II Brazilian national alcohol and drugs survey. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Políticas Públicas do Álcool e Outras Drogas. <http://inpad.org.br/wp-content/uploads/2014/03/Lenad-II-Relatório.pdf>. Accessed 18 Feb 2016

Ip P, Chung BHY, Ho FKW, Chan GCF, Deng W, Wong WHS, Lee SL, Chan PYT, Ying D, Wong WL et al. (2016) Prenatal Tobacco Exposure Shortens Telomere Length in Children. *Nicotine Tob Res.* doi: 10.1093/ntr/ntw139

Jacobsen LK, Giedd JN, Kreek MJ, Gottschalk C and Kosten TR (2001) Quantitative medial temporal lobe brain morphology and hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in cocaine dependence: a preliminary report. *Drug Alcohol Depend* 62:49–56.

Kalapatapu RK, Vadhan NP, Rubin E, Bedi G, Cheng WY, Sullivan MA and Foltin RW (2011) A pilot study of neurocognitive function in older and younger cocaine abusers and controls. *Am J Addict* 20:228–39. doi: 10.1111/j.1521-0391.2011.00128.x

Kendler KS, Karkowski LM, Neale MC and Prescott CA (2000) Illicit psychoactive substance use, heavy use, abuse, and dependence in a US population-based sample of male twins. *Arch Gen Psychiatry* 57:261–9.

Kendler KS and Prescott CA (1998) Cocaine use, abuse and dependence in a population-based sample of female twins. *Br J Psychiatry* 173:345–50.

Kessler FHP, Barbosa Terra M, Faller S, Ravy Stolf A, Carolina Peuker A, Benzano D and Pechansky F (2012) Crack Users Show High Rates of Antisocial Personality Disorder, Engagement in Illegal Activities and Other Psychosocial Problems. *Am J Addict* 21:370–380. doi: 10.1111/j.1521-0391.2012.00245.x

Kishi T, Matsuda Y, Iwata N and Correll CU (2013) Antipsychotics for Cocaine or Psychostimulant Dependence. *J Clin Psychiatry* 74:e1169–e1180. doi: 10.4088/JCP.13r08525

Knapp WP, Soares B, Farrell M and Silva de Lima M (2007) Psychosocial interventions for cocaine and psychostimulant amphetamines related disorders. *Cochrane Database Syst Rev.* doi: 10.1002/14651858.CD003023.pub2

Knapp WP, Soares BG, Farrell MF and Silva de Lima M (2015) Psychosocial interventions for cocaine and psychostimulant amphetamines related disorders. *Cochrane Database Syst Rev.* doi: 10.1002/14651858.CD003023.pub3

Korpi ER, den Hollander B, Farooq U, Vashchinkina E, Rajkumar R, Nutt DJ, Hyttiä P and

Dawe GS (2015) Mechanisms of Action and Persistent Neuroplasticity by Drugs of Abuse. *Pharmacol Rev* 67:872–1004. doi: 10.1124/pr.115.010967

Koskela M, Bäck S, Vöikar V, Richie CT, Domanskyi A, Harvey BK and Airavaara M (2016) Update of neurotrophic factors in neurobiology of addiction and future directions. *Neurobiol Dis*. doi: 10.1016/j.nbd.2016.05.010

Kosten TR, Domingo CB, Hamon SC and Nielsen DA (2013a) DBH gene as predictor of response in a cocaine vaccine clinical trial. *Neurosci Lett* 541:29–33. doi: 10.1016/j.neulet.2013.02.037

Kosten TR, Domingo CB, Shorter D, Orson F, Green C, Somoza E, Sekerka R, Levin FR, Mariani JJ, Stitzer M et al. (2014) Vaccine for cocaine dependence: A randomized double-blind placebo-controlled efficacy trial. *Drug Alcohol Depend* 140:42–47. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2014.04.003

Kosten TR, Wu G, Huang W, Harding MJ, Hamon SC, Lappalainen J and Nielsen DA (2013b) Pharmacogenetic Randomized Trial for Cocaine Abuse: Disulfiram and Dopamine  $\beta$ -Hydroxylase. *Biol Psychiatry* 73:219–224. doi: 10.1016/j.biopsych.2012.07.011

Krishnan V, Han M-H, Graham DL, Berton O, Renthal W, Russo SJ, Laplant Q, Graham A, Lutter M, Lagace DC et al. (2007) Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. *Cell* 131:391–404. doi: 10.1016/j.cell.2007.09.018

Kroenke CH, Epel E, Adler N, Bush NR, Obradović J, Lin J, Blackburn E, Stamperdahl JL and Boyce WT (2011) Autonomic and Adrenocortical Reactivity and Buccal Cell Telomere Length in Kindergarten Children. *Psychosom Med* 73:533–540. doi: 10.1097/PSY.0b013e318229acfc

Latifovic L, Peacock SD, Massey TE and King WD (2016) The Influence of Alcohol Consumption, Cigarette Smoking, and Physical Activity on Leukocyte Telomere Length. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 25:374–80. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-14-1364

Lee SS, Humphreys KL, Flory K, Liu R and Glass K (2011) Prospective association of childhood attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) and substance use and abuse/dependence: a meta-analytic review. *Clin Psychol Rev* 31:328–41. doi: 10.1016/j.cpr.2011.01.006

Levandowski ML, Tractenberg SG, de Azeredo LA, De Nardi T, Rovaris DL, Bau CHD, Rizzo LB, Maurya PK, Brietzke E, Tyrka AR et al. (2016a) Crack cocaine addiction, early life stress and accelerated cellular aging among women. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 71:83–9. doi: 10.1016/j.pnpbp.2016.06.009

Levandowski ML, Viola TW, Prado CH, Wieck A, Bauer ME, Brietzke E and Grassi-Oliveira R

(2016b) Distinct behavioral and immunoendocrine parameters during crack cocaine abstinence in women reporting childhood abuse and neglect. *Drug Alcohol Depend* 167:140–8. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2016.08.010

Levandowski ML, Viola TW, Tractenberg SG, Teixeira AL, Brietzke E, Bauer ME and Grassi-Oliveira R (2013) Adipokines during early abstinence of crack cocaine in dependent women reporting childhood maltreatment. *Psychiatry Res* 210:536–40. doi: 10.1016/j.psychres.2013.07.007

Levandowski ML, Viola TW, Wearick-Silva LE, Wieck A, Tractenberg SG, Brietzke E, Bauer ME, Teixeira AL and Grassi-Oliveira R (2014) Early life stress and tumor necrosis factor superfamily in crack cocaine withdrawal. *J Psychiatr Res* 53:180–6. doi: 10.1016/j.jpsychires.2014.02.017

Levrán O, Peles E, Randesi M, Correa da Rosa J, Ott J, Rotrosen J, Adelson M and Kreek MJ (2015a) Susceptibility loci for heroin and cocaine addiction in the serotonergic and adrenergic pathways in populations of different ancestry. *Pharmacogenomics* 16:1329–42. doi: 10.2217/pgs.15.86

Levrán O, Peles E, Randesi M, Correa da Rosa J, Ott J, Rotrosen J, Adelson M and Kreek MJ (2015b) Synaptic Plasticity and Signal Transduction Gene Polymorphisms and Vulnerability to Drug Addictions in Populations of European or African Ancestry. *CNS Neurosci Ther* 21:898–904. doi: 10.1111/cns.12450

Levrán O, Randesi M, da Rosa JC, Ott J, Rotrosen J, Adelson M and Kreek MJ (2015c) Overlapping dopaminergic pathway genetic susceptibility to heroin and cocaine addictions in African Americans. *Ann Hum Genet* 79:188–98. doi: 10.1111/ahg.12104

Levrán O, Randesi M, Li Y, Rotrosen J, Ott J, Adelson M and Kreek MJ (2014) Drug addiction and stress-response genetic variability: association study in African Americans. *Ann Hum Genet* 78:290–8. doi: 10.1111/ahg.12064

Levy AD, Li QA, Kerr JE, Rittenhouse PA, Milonas G, Cabrera TM, Battaglia G, Alvarez Sanz MC and Van de Kar LD (1991) Cocaine-induced elevation of plasma adrenocorticotropin hormone and corticosterone is mediated by serotonergic neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 259:495–500.

Levy D, Neuhausen SL, Hunt SC, Kimura M, Hwang S-J, Chen W, Bis JC, Fitzpatrick AL, Smith E, Johnson AD et al. (2010) Genome-wide association identifies OBFC1 as a locus involved in human leukocyte telomere biology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:9293–8. doi: 10.1073/pnas.0911494107

Li X, DeJoseph MR, Urban JH, Bahi A, Dreyer J-L, Meredith GE, Ford KA, Ferrario CR, Loweth JA and Wolf ME (2013) Different Roles of BDNF in Nucleus Accumbens Core versus Shell during the Incubation of Cue-Induced Cocaine Craving and Its Long-Term Maintenance. *J Neurosci* 33:1130–1142. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3082-12.2013

Li X and Wolf ME (2015) Multiple faces of BDNF in cocaine addiction. *Behav Brain Res* 279:240–54. doi: 10.1016/j.bbr.2014.11.018

Lin P-Y (2015) Shortened leukocyte telomere length in patients with schizophrenia is related to disease status. *Schizophr Res* 168:597–8. doi: 10.1016/j.schres.2015.07.038

Lin P-Y, Huang Y-C and Hung C-F (2016) Shortened telomere length in patients with depression: A meta-analytic study. *J Psychiatr Res* 76:84–93. doi: 10.1016/j.jpsychires.2016.01.015

Lipsky RH and Marini AM (2007) Brain-Derived Neurotrophic Factor in Neuronal Survival and Behavior-Related Plasticity. *Ann N Y Acad Sci* 1122:130–143. doi: 10.1196/annals.1403.009

Liu Q-R, Lu L, Zhu X-G, Gong J-P, Shaham Y and Uhl GR (2006) Rodent BDNF genes, novel promoters, novel splice variants, and regulation by cocaine. *Brain Res* 1067:1–12. doi: 10.1016/j.brainres.2005.10.004

Liu S, Green CE, Lane SD, Kosten TR, Moeller FG, Nielsen DA and Schmitz JM (2014) The influence of dopamine  $\beta$ -hydroxylase gene polymorphism rs1611115 on levodopa/carbidopa treatment for cocaine dependence: a preliminary study. *Pharmacogenet Genomics* 24:370–3. doi: 10.1097/FPC.0000000000000055

Lohoff FW, Bloch PJ, Hodge R, Nall AH, Ferraro TN, Kampman KM, Dackis CA, O'Brien CP, Pettinati HM and Oslin DW (2010) Association analysis between polymorphisms in the dopamine D2 receptor (DRD2) and dopamine transporter (DAT1) genes with cocaine dependence. *Neurosci Lett* 473:87–91. doi: 10.1016/j.neulet.2010.02.021

Lohoff FW, Weller AE, Bloch PJ, Nall AH, Ferraro TN, Kampman KM, Pettinati HM, Oslin DW, Dackis CA, O'Brien CP et al. (2008) Association between the catechol-O-methyltransferase Val158Met polymorphism and cocaine dependence. *Neuropsychopharmacology* 33:3078–84. doi: 10.1038/npp.2008.126

Lu H, Cheng P, Lim BK, Khoshnevisrad N and Poo M (2010) Elevated BDNF after Cocaine Withdrawal Facilitates LTP in Medial Prefrontal Cortex by Suppressing GABA Inhibition. *Neuron* 67:821–833. doi: 10.1016/j.neuron.2010.08.012

Lu L, Dempsey J, Liu SY, Bossert JM and Shaham Y (2004) A Single Infusion of Brain-Derived Neurotrophic Factor into the Ventral Tegmental Area Induces Long-Lasting Potentiation

of Cocaine Seeking after Withdrawal. *J. Neurosci.* 24:

Manetti L, Cavagnini F, Martino E and Ambrogio A (2014) Effects of cocaine on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Endocrinol Invest* 37:701–8. doi: 10.1007/s40618-014-0091-8

Mangino M, Christiansen L, Stone R, Hunt SC, Horvath K, Eisenberg DTA, Kimura M, Petersen I, Kark JD, Herbig U et al. (2015) DCAF4, a novel gene associated with leucocyte telomere length. *J Med Genet* 52:157–62. doi: 10.1136/jmedgenet-2014-102681

Mangino M, Hwang S-J, Spector TD, Hunt SC, Kimura M, Fitzpatrick AL, Christiansen L, Petersen I, Elbers CC, Harris T et al. (2012) Genome-wide meta-analysis points to CTC1 and ZNF676 as genes regulating telomere homeostasis in humans. *Hum Mol Genet* 21:5385–94. doi: 10.1093/hmg/ddc382

Mantsch JR, Schlussman SD, Ho A and Kreek MJ (2000) Effects of cocaine self-administration on plasma corticosterone and prolactin in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 294:239–47.

Manvich DF, Stowe TA, Godfrey JR and Weinschenker D (2016) A Method for Psychosocial Stress-Induced Reinstatement of Cocaine Seeking in Rats. *Biol Psychiatry* 79:940–6. doi: 10.1016/j.biopsych.2015.07.002

Marian AJ (2012) Elements of “missing heritability”. *Curr Opin Cardiol* 27:197–201. doi: 10.1097/HCO.0b013e328352707d

Martell BA, Mitchell E, Poling J, Gonsai K and Kosten TR (2005) Vaccine Pharmacotherapy for the Treatment of Cocaine Dependence. *Biol Psychiatry* 58:158–164. doi: 10.1016/j.biopsych.2005.04.032

Martell BA, Orson FM, Poling J, Mitchell E, Rossen RD, Gardner T and Kosten TR (2009) Cocaine vaccine for the treatment of cocaine dependence in methadone-maintained patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled efficacy trial. *Arch Gen Psychiatry* 66:1116–23. doi: 10.1001/archgenpsychiatry.2009.128

Martin G, Macdonald S, Pakula B and Roth EA (2014) A comparison of motivations for use among users of crack cocaine and cocaine powder in a sample of simultaneous cocaine and alcohol users. *Addict Behav* 39:699–702. doi: 10.1016/j.addbeh.2013.10.029

Martínez-Gras I, Ferre Navarrete F, Pascual Arriazu J, Peñas Pascual J, de Içeta Ruiz de Gauna M, Fraguas Herráez D, Rubio Valladolid G and Addiction Psychiatry Investigation Group (GIPA) O (2016) Psychiatric comorbidity in a sample of cocaine-dependent outpatients seen in the Community of Madrid drug addiction care network. *Adicciones* 28:6–18. doi:

10.20882/adicciones.785

Mathur MB, Epel E, Kind S, Desai M, Parks CG, Sandler DP and Khazeni N (2016) Perceived stress and telomere length: A systematic review, meta-analysis, and methodologic considerations for advancing the field. *Brain Behav Immun* 54:158–69. doi: 10.1016/j.bbi.2016.02.002

Mbarek H, Milaneschi Y, Fedko IO, Hottenga J-J, de Moor MHM, Jansen R, Gelernter J, Sherva R, Willemsen G, Boomsma DI et al. (2015) The genetics of alcohol dependence: Twin and SNP-based heritability, and genome-wide association study based on AUDIT scores. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 168:739–48. doi: 10.1002/ajmg.b.32379

McCollister K, Yang X and McKay JR (2016) Cost-effectiveness analysis of a continuing care intervention for cocaine-dependent adults. *Drug Alcohol Depend* 158:38–44. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2015.10.032

McEwen BS, Bowles NP, Gray JD, Hill MN, Hunter RG, Karatsoreos IN and Nasca C (2015) Mechanisms of stress in the brain. *Nat Neurosci* 18:1353–1363. doi: 10.1038/nn.4086

McReynolds JR, Doncheck EM, Vranjkovic O, Ganzman GS, Baker DA, Hillard CJ and Mantsch JR (2016a) CB1 receptor antagonism blocks stress-potentiated reinstatement of cocaine seeking in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 233:99–109. doi: 10.1007/s00213-015-4092-x

McReynolds JR, Taylor A, Vranjkovic O, Ambrosius T, Derricks O, Nino B, Kurtoglu B, Wheeler RA, Baker DA, Gasser PJ et al. (2016b) Corticosterone Potentiation of Cocaine-Induced Reinstatement of Conditioned Place Preference in Mice is Mediated by Blockade of the Organic Cation Transporter 3. *Neuropsychopharmacology*. doi: 10.1038/npp.2016.187

Mendelson J, Sholar M, Mello NK, Teoh SK and Sholar JW (1998) Cocaine Tolerance: Behavioral, Cardiovascular, and Neuroendocrine Function in Men. *Neuropsychopharmacology* 18:263–271. doi: 10.1016/S0893-133X(97)00146-2

Mendelson JH, Mello NK, Sholar MB, Siegel AJ, Mutschler N and Halpern J (2002) Temporal concordance of cocaine effects on mood states and neuroendocrine hormones. *Psychoneuroendocrinology* 27:71–82.

Mendelson JH, Teoh SK, Mello NK, Ellingboe J and Rhoades E (1992) Acute effects of cocaine on plasma adrenocorticotrophic hormone, luteinizing hormone and prolactin levels in cocaine-dependent men. *J Pharmacol Exp Ther* 263:505–9.

Messas G, Meira-Lima I, Turchi M, Franco O, Guindalini C, Castelo A, Laranjeira R and Vallada H (2005) Association study of dopamine D2 and D3 receptor gene polymorphisms with



cocaine dependence. *Psychiatr Genet* 15:171–4.

Miguel AQC, Madruga CS, Cogo-Moreira H, Yamauchi R, Simões V, da Silva CJ, McPherson S, Roll JM and Laranjeira RR (2016) Contingency management is effective in promoting abstinence and retention in treatment among crack cocaine users in Brazil: A randomized controlled trial. *Psychol Addict Behav* 30:536–543. doi: 10.1037/adb0000192

Milby JB, Conti K, Wallace D, Mennemeyer S, Mrug S and Schumacher JE (2015) Comorbidity effects on cocaine dependence treatment and examination of reciprocal relationships between abstinence and depression. *J Consult Clin Psychol* 83:45–55. doi: 10.1037/a0037960

Minozzi S, Amato L, Pani PP, Solimini R, Vecchi S, De Crescenzo F, Zuccaro P and Davoli M (2015a) Dopamine agonists for the treatment of cocaine dependence. *Cochrane Database Syst Rev*. doi: 10.1002/14651858.CD003352.pub4

Minozzi S, Cinquini M, Amato L, Davoli M, Farrell MF, Pani PP and Vecchi S (2015b) Anticonvulsants for cocaine dependence. *Cochrane Database Syst Rev*. doi: 10.1002/14651858.CD006754.pub4

Moeller SJ, Parvaz MA, Shumay E, Wu S, Beebe-Wang N, Konova AB, Misyrlis M, Alia-Klein N and Goldstein RZ (2014) Monoamine polygenic liability in health and cocaine dependence: imaging genetics study of aversive processing and associations with depression symptomatology. *Drug Alcohol Depend* 140:17–24. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2014.04.019

Moldow RL and Fischman AJ (1987) Cocaine induced secretion of ACTH, beta-endorphin, and corticosterone. *Peptides* 8:819–22.

Monnahan PJ and Kelly JK (2015) Epistasis Is a Major Determinant of the Additive Genetic Variance in *Mimulus guttatus*. *PLoS Genet* 11:e1005201. doi: 10.1371/journal.pgen.1005201

Mota NR, Rovaris DL, Bertuzzi GP, Contini V, Vitola ES, Grevet EH, Roman T, Callegari-Jacques SM, Hutz MH and Bau CHD (2013) DRD2/DRD4 heteromerization may influence genetic susceptibility to alcohol dependence. *Mol Psychiatry* 18:401–2. doi: 10.1038/mp.2012.50

Müezzinler A, Mons U, Dieffenbach AK, Butterbach K, Saum K-U, Schick M, Stammer H, Boukamp P, Holleczeck B, Stegmaier C et al. (2015) Smoking habits and leukocyte telomere length dynamics among older adults: Results from the ESTHER cohort. *Exp Gerontol* 70:18–25. doi: 10.1016/j.exger.2015.07.002

Naert G, Ixart G, Tapia-Arancibia L and Givalois L (2006) Continuous i.c.v. infusion of brain-derived neurotrophic factor modifies hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity, locomotor activity and body temperature rhythms in adult male rats. *Neuroscience* 139:779–89. doi:

10.1016/j.neuroscience.2005.12.028

Naert G, Zussy C, Tran Van Ba C, Chevallier N, Tang Y-P, Maurice T and Givalois L (2015) Involvement of Endogenous Brain-Derived Neurotrophic Factor in Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Activity. *J Neuroendocrinol* 27:850–60. doi: 10.1111/jne.12324

Narvaez JCM, Magalhães P V, Fries GR, Colpo GD, Czepielewski LS, Vianna P, Chies JAB, Rosa AR, Von Diemen L, Vieta E et al. (2013) Peripheral toxicity in crack cocaine use disorders. *Neurosci Lett* 544:80–4. doi: 10.1016/j.neulet.2013.03.045

Negrão AB, Pereira AC, Guindalini C, Santos HC, Messas GP, Laranjeira R and Vallada H (2013) Butyrylcholinesterase genetic variants: association with cocaine dependence and related phenotypes. *PLoS One* 8:e80505. doi: 10.1371/journal.pone.0080505

Nielsen DA, Hamon SC and Kosten TR (2013) The  $\kappa$ -opioid receptor gene as a predictor of response in a cocaine vaccine clinical trial. *Psychiatr Genet* 23:225–232. doi: 10.1097/YPG.0000000000000008

Oliveira BS, Zunzunegui MV, Quinlan J, Fahmi H, Tu MT and Guerra RO (2016) Systematic review of the association between chronic social stress and telomere length: A life course perspective. *Ageing Res Rev* 26:37–52. doi: 10.1016/j.arr.2015.12.006

Oliveto A, Poling J, Mancino MJ, Feldman Z, Cubells JF, Pruzinsky R, Gonsai K, Cargile C, Sofuoglu M, Chopra MP et al. (2011) Randomized, double blind, placebo-controlled trial of disulfiram for the treatment of cocaine dependence in methadone-stabilized patients. *Drug Alcohol Depend* 113:184–191. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2010.07.022

Orson FM, Wang R, Brimijoin S, Kinsey BM, Singh RA, Ramakrishnan M, Wang HY and Kosten TR (2014) The future potential for cocaine vaccines. *Expert Opin Biol Ther* 14:1271–1283. doi: 10.1517/14712598.2014.920319

Otis JM, Fitzgerald MK and Mueller D (2014) Infralimbic BDNF/TrkB Enhancement of GluN2B Currents Facilitates Extinction of a Cocaine-Conditioned Place Preference. *J Neurosci* 34:6057–6064. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4980-13.2014

Ottosen C, Petersen L, Larsen JT and Dalsgaard S (2016) Gender Differences in Associations Between Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder and Substance Use Disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 55:227–234.e4. doi: 10.1016/j.jaac.2015.12.010

Palamar JJ, Davies S, Ompad DC, Cleland CM and Weitzman M (2015) Powder cocaine and crack use in the United States: An examination of risk for arrest and socioeconomic disparities in use. *Drug Alcohol Depend* 149:108–116. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2015.01.029

Palmer RHC, Brick L, Nugent NR, Bidwell LC, McGeary JE, Knopik VS and Keller MC (2015a)

Examining the role of common genetic variants on alcohol, tobacco, cannabis and illicit drug dependence: genetics of vulnerability to drug dependence. *Addiction* 110:530–7. doi: 10.1111/add.12815

Palmer RHC, McGeary JE, Heath AC, Keller MC, Brick LA and Knopik VS (2015b) Shared additive genetic influences on DSM-IV criteria for alcohol dependence in subjects of European ancestry. *Addiction* 110:1922–31. doi: 10.1111/add.13070

Pani PP, Trogu E, Vacca R, Amato L, Vecchi S and Davoli M (2010) Disulfiram for the treatment of cocaine dependence. *Cochrane Database Syst Rev*. doi: 10.1002/14651858.CD007024.pub2

Pani PP, Trogu E, Vecchi S and Amato L (2011) Antidepressants for cocaine dependence and problematic cocaine use. *Cochrane Database Syst Rev*. doi: 10.1002/14651858.CD002950.pub3

Pavanello S, Hoxha M, Dioni L, Bertazzi PA, Snenghi R, Nalesso A, Ferrara SD, Montisci M and Baccarelli A (2011) Shortened telomeres in individuals with abuse in alcohol consumption. *Int J cancer* 129:983–92. doi: 10.1002/ijc.25999

Pedraz M, Martín-Velasco AI, García-Marchena N, Araos P, Serrano A, Romero-Sanchiz P, Suárez J, Castilla-Ortega E, Barrios V, Campos-Cloute R et al. (2015) Plasma concentrations of BDNF and IGF-1 in abstinent cocaine users with high prevalence of substance use disorders: relationship to psychiatric comorbidity. *PLoS One* 10:e0118610. doi: 10.1371/journal.pone.0118610

Petitjean SA, Dürsteler-MacFarland KM, Krokhar MC, Strasser J, Mueller SE, Degen B, Trombini M V., Vogel M, Walter M, Wiesbeck GA et al. (2014) A randomized, controlled trial of combined cognitive-behavioral therapy plus prize-based contingency management for cocaine dependence. *Drug Alcohol Depend* 145:94–100. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2014.09.785

Pianca TG, Rohde LA, Rosa RL, Begnis APA, Ferronato PB, Jensen MC, Pechansky F, Ceresér KMM, Fairchild VP and Szobot CM (2016) Crack Cocaine Use in Adolescents. *J Clin Psychiatry* 77:e1205–e1210. doi: 10.4088/JCP.15m09894

Polderman TJC, Benyamin B, de Leeuw CA, Sullivan PF, van Bochoven A, Visscher PM and Posthuma D (2015) Meta-analysis of the heritability of human traits based on fifty years of twin studies. *Nat Genet* 47:702–9. doi: 10.1038/ng.3285

Polho GB, De-Paula VJ, Cardillo G, dos Santos B and Kerr DS (2015) Leukocyte telomere length in patients with schizophrenia: A meta-analysis. *Schizophr Res* 165:195–200. doi: 10.1016/j.schres.2015.04.025

Pope SK, Falck RS, Carlson RG, Leukefeld C and Booth BM (2011) Characteristics of Rural Crack and Powder Cocaine Use: Gender and Other Correlates. *Am J Drug Alcohol Abuse* 37:491–496. doi: 10.3109/00952990.2011.600380

Prendergast M, Podus D, Finney J, Greenwell L and Roll J (2006) Contingency management for treatment of substance use disorders: a meta-analysis. *Addiction* 101:1546–1560. doi: 10.1111/j.1360-0443.2006.01581.x

Pu L, Liu Q and Poo M (2006) BDNF-dependent synaptic sensitization in midbrain dopamine neurons after cocaine withdrawal. *Nat Neurosci* 9:605–607. doi: 10.1038/nn1687

Puetz VB and McCrory E (2015) Exploring the Relationship Between Childhood Maltreatment and Addiction: A Review of the Neurocognitive Evidence. *Curr Addict Reports* 2:318–325. doi: 10.1007/s40429-015-0073-8

Puterman E, Gemmill A, Karasek D, Weir D, Adler NE, Prather AA and Epel ES (2016) Lifespan adversity and later adulthood telomere length in the nationally representative US Health and Retirement Study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113:E6335–E6342. doi: 10.1073/pnas.1525602113

Ramos-Olazagasti MA, Bird HR, Canino GJ and Duarte CS (2016) Childhood Adversity and Early Initiation of Alcohol Use in Two Representative Samples of Puerto Rican Youth. *J Youth Adolesc*. doi: 10.1007/s10964-016-0575-2

Rao S, Kota LN, Li Z, Yao Y, Tang J, Mao C, Jain S, Xu Y and Xu Q (2016) Accelerated leukocyte telomere erosion in schizophrenia: Evidence from the present study and a meta-analysis. *J Psychiatr Res* 79:50–6. doi: 10.1016/j.jpsychires.2016.04.010

Révész D, Milaneschi Y, Terpstra EM and Penninx BWJH (2016) Baseline biopsychosocial determinants of telomere length and 6-year attrition rate. *Psychoneuroendocrinology* 67:153–162. doi: 10.1016/j.psyneuen.2016.02.007

Révész D, Verhoeven JE, Milaneschi Y, de Geus EJC, Wolkowitz OM and Penninx BWJH (2014) Dysregulated physiological stress systems and accelerated cellular aging. *Neurobiol Aging* 35:1422–1430. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.12.027

Richards JM, Stipelman BA, Bornovalova MA, Daughters SB, Sinha R and Lejuez CW (2011) Biological mechanisms underlying the relationship between stress and smoking: state of the science and directions for future work. *Biol Psychol* 88:1–12. doi: 10.1016/j.biopsycho.2011.06.009

Richelson E and Pfenning M (1984) Blockade by antidepressants and related compounds of biogenic amine uptake into rat brain synaptosomes: most antidepressants selectively block

norepinephrine uptake. *Eur J Pharmacol* 104:277–86.

Ridout KK, Ridout SJ, Price LH, Sen S and Tyrka AR (2016) Depression and telomere length: A meta-analysis. *J Affect Disord* 191:237–47. doi: 10.1016/j.jad.2015.11.052

Ridout SJ, Ridout KK, Kao H-T, Carpenter LL, Philip NS, Tyrka AR and Price LH (2015) Telomeres, early-life stress and mental illness. *Adv Psychosom Med* 34:92–108. doi: 10.1159/000369088

Rivas MA, Beaudoin M, Gardet A, Stevens C, Sharma Y, Zhang CK, Boucher G, Ripke S, Ellinghaus D, Burt N et al. (2011) Deep resequencing of GWAS loci identifies independent rare variants associated with inflammatory bowel disease. *Nat Genet* 43:1066–73. doi: 10.1038/ng.952

Rivier C and Lee S (1994) Stimulatory Effect of Cocaine on ACTH Secretion: Role of the Hypothalamus. *Mol Cell Neurosci* 5:189–195. doi: 10.1006/mcne.1994.1021

Rivier C and Vale W (1987) Cocaine stimulates adrenocorticotropin (ACTH) secretion through a corticotropin-releasing factor (CRF)-mediated mechanism. *Brain Res* 422:403–6.

Rocha TB-M, Hutz MH, Salatino-Oliveira A, Genro JP, Polanczyk G V, Sato JR, Wehrmeister FC, Barros FC, Menezes AMB, Rohde LA et al. (2015) Gene-Environment Interaction in Youth Depression: Replication of the 5-HTTLPR Moderation in a Diverse Setting. *Am J Psychiatry* 172:978–85. doi: 10.1176/appi.ajp.2015.14070896

Rode L, Bojesen SE, Weischer M and Nordestgaard BG (2014) High tobacco consumption is causally associated with increased all-cause mortality in a general population sample of 55,568 individuals, but not with short telomeres: a Mendelian randomization study. *Int J Epidemiol* 43:1473–83. doi: 10.1093/ije/dyu119

Rovaris DL, Aroche AP, da Silva BS, Kappel DB, Pezzi JC, Levandowski ML, Hess ARB, Schuch JB, de Almeida RMM, Grassi-Oliveira R et al. (2016a) Glucocorticoid receptor gene modulates severity of depression in women with crack cocaine addiction. *Eur Neuropsychopharmacol*. doi: 10.1016/j.euroneuro.2016.06.010

Rovaris DL, Mota NR and Bau CHD (2016b) Chapter 20 – Genetic Findings on the Relationship between Smoking and the Stress System. *Neuropathology of Drug Addictions and Substance Misuse*. pp 209–220

Rovaris DL, Mota NR, Bertuzzi GP, Aroche AP, Callegari-Jacques SM, Guimarães LSP, Pezzi JC, Viola TW, Bau CHD and Grassi-Oliveira R (2015a) Corticosteroid receptor genes and childhood neglect influence susceptibility to crack/cocaine addiction and response to detoxification treatment. *J Psychiatr Res* 68:83–90. doi: 10.1016/j.jpsychires.2015.06.008

Rovaris DL, Mota NR, Bertuzzi GP, Aroche AP, Callegari-Jacques SM, Guimarães LSP, Pezzi JC, Viola TW, Bau CHD and Grassi-Oliveira R (2015b) Corticosteroid receptor genes and childhood neglect influence susceptibility to crack/cocaine addiction and response to detoxification treatment. *J Psychiatr Res* 68:83–90. doi: 10.1016/j.jpsychires.2015.06.008

Rovaris DL, Mota NR, Callegari-Jacques SM and Bau CHD (2013) Approaching “phantom heritability” in psychiatry by hypothesis-driven gene-gene interactions. *Front Hum Neurosci* 7:210. doi: 10.3389/fnhum.2013.00210

Rovaris DL, Schuch JB, Grassi-Oliveira R, Sanvicente-Vieira B, da Silva BS, Walss-Bass C, Müller D, Stolf AR, von Diemen L, Ceresér KMM et al. (2017) Effects of crack cocaine addiction and stress-related genes on peripheral BDNF levels. *J Psychiatr Res*. doi: 10.1016/j.jpsychires.2017.02.011

Roy A (2002) Urinary free cortisol and childhood trauma in cocaine dependent adults. *J Psychiatr Res* 36:173–7.

Roy A, Bissette G, Williams R, Berman J and Gonzalez B (2003) CSF CRH in abstinent cocaine-dependent patients. *Psychiatry Res* 117:277–80.

Saccone NL, Saccone SF, Goate AM, Gruzca RA, Hinrichs AL, Rice JP and Bierut LJ (2008) In search of causal variants: refining disease association signals using cross-population contrasts. *BMC Genet* 9:58. doi: 10.1186/1471-2156-9-58

Sadler B, Haller G, Agrawal A, Culverhouse R, Bucholz K, Brooks A, Tischfield J, Johnson EO, Edenberg H, Schuckit M et al. (2014) Variants near CHRN3-CHRNA6 are associated with DSM-5 cocaine use disorder: evidence for pleiotropy. *Sci Rep* 4:4497. doi: 10.1038/srep04497

Sadri-Vakili G, Kumaresan V, Schmidt HD, Famous KR, Chawla P, Vassoler FM, Overland RP, Xia E, Bass CE, Terwilliger EF et al. (2010) Cocaine-Induced Chromatin Remodeling Increases Brain-Derived Neurotrophic Factor Transcription in the Rat Medial Prefrontal Cortex, Which Alters the Reinforcing Efficacy of Cocaine. *J Neurosci* 30:11735–11744. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2328-10.2010

Salihu HM, Pradhan A, King L, Paothong A, Nwoga C, Marty PJ and Whiteman V (2015) Impact of intrauterine tobacco exposure on fetal telomere length. *Am J Obstet Gynecol* 212:205.e1-8. doi: 10.1016/j.ajog.2014.08.026

Sanvicente-Vieira B, Kommers-Molina J, De Nardi T, Francke I and Grassi-Oliveira R (2016) Crack-cocaine dependence and aging: effects on working memory. *Rev Bras Psiquiatr* 38:58–60. doi: 10.1590/1516-4446-2015-1708

Sapolsky RM (2015) Stress and the brain: individual variability and the inverted-U. *Nat*

Neurosci 18:1344–1346. doi: 10.1038/nn.4109

Sarnyai Z, Bíró E and Telegdy G (1993) Cocaine-induced elevation of plasma corticosterone is mediated by different neurotransmitter systems in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 45:209–14.

Saunders EC, Lambert-Harris C, McGovern MP, Meier A and Xie H (2015) The Prevalence of Posttraumatic Stress Disorder Symptoms among Addiction Treatment Patients with Cocaine Use Disorders. *J Psychoactive Drugs* 47:42–50. doi: 10.1080/02791072.2014.977501

Saxena R, Bjonnes A, Prescott J, Dib P, Natt P, Lane J, Lerner M, Cooper JA, Ye Y, Li KW et al. (2014) Genome-wide association study identifies variants in casein kinase II (CSNK2A2) to be associated with leukocyte telomere length in a Punjabi Sikh diabetic cohort. *Circ Cardiovasc Genet* 7:287–95. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.113.000412

Scheidweiler KB, Plessinger MA, Shojaie J, Wood RW and Kwong TC (2003) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of methylecgonidine, a crack cocaine pyrolyzate. *J Pharmacol Exp Ther* 307:1179–87. doi: 10.1124/jpet.103.055434

Schmidt HD, Sangrey GR, Darnell SB, Schassburger RL, Cha J-HJ, Pierce RC and Sadri-Vakili G (2012) Increased brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression in the ventral tegmental area during cocaine abstinence is associated with increased histone acetylation at BDNF exon I-containing promoters. *J Neurochem* 120:202–209. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07571.x

Schottenfeld RS, Chawarski MC, Cubells JF, George TP, Lappalainen J and Kosten TR (2014) Randomized clinical trial of disulfiram for cocaine dependence or abuse during buprenorphine treatment. *Drug Alcohol Depend* 136:36–42. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2013.12.007

Schuch JB, Polina ER, Rovaris DL, Kappel DB, Mota NR, Cupertino RB, Silva KL, Guimarães-da-Silva PO, Karam RG, Salgado CAI et al. (2016) Pleiotropic effects of Chr15q25 nicotinic gene cluster and the relationship between smoking, cognition and ADHD. *J Psychiatr Res* 80:73–8. doi: 10.1016/j.jpsychires.2016.06.002

Schumacher JE, Milby JB, Wallace D, Meehan D-C, Kertesz S, Vuchinich R, Dunning J and Usdan S (2007) Meta-analysis of day treatment and contingency-management dismantling research: Birmingham Homeless Cocaine Studies (1990–2006). *J Consult Clin Psychol* 75:823–828. doi: 10.1037/0022-006X.75.5.823

Schutte NS and Malouff JM (2015) The association between depression and leukocyte telomere length: a meta-analysis. *Depress Anxiety* 32:229–38. doi: 10.1002/da.22351

Schutte NS and Malouff JM (2016) The Relationship Between Perceived Stress and

Telomere Length: A Meta-analysis. *Stress Health* 32:313–319. doi: 10.1002/smi.2607

Shalev I, Entringer S, Wadhwa PD, Wolkowitz OM, Puterman E, Lin J and Epel ES (2013) Stress and telomere biology: a lifespan perspective. *Psychoneuroendocrinology* 38:1835–42. doi: 10.1016/j.psyneuen.2013.03.010

Shepard DS, Daley MC, Neuman MJ, Blaakman AP and McKay JR (2016) Telephone-based continuing care counseling in substance abuse treatment: Economic analysis of a randomized trial. *Drug Alcohol Depend* 159:109–116. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2015.11.034

Sherva R, Kranzler HR, Yu Y, Logue MW, Poling J, Arias AJ, Anton RF, Oslin D, Farrer LA and Gelernter J (2010) Variation in nicotinic acetylcholine receptor genes is associated with multiple substance dependence phenotypes. *Neuropsychopharmacology* 35:1921–31. doi: 10.1038/npp.2010.64

Shin SH, Miller DP and Teicher MH (2013) Exposure to childhood neglect and physical abuse and developmental trajectories of heavy episodic drinking from early adolescence into young adulthood. *Drug Alcohol Depend* 127:31–8. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2012.06.005

Sholar MB, Mendelson JH, Mello NK, Siegel AJ, Kaufman MJ, Levin JM, Renshaw PF and Cohen BM (1998) Concurrent Pharmacokinetic Analysis of Plasma Cocaine and Adrenocorticotrophic Hormone in Men 1. *J Clin Endocrinol Metab* 83:966–968. doi: 10.1210/jcem.83.3.4654

Shorter D, Domingo CB and Kosten TR (2015) Emerging drugs for the treatment of cocaine use disorder: a review of neurobiological targets and pharmacotherapy. *Expert Opin Emerg Drugs* 20:15–29. doi: 10.1517/14728214.2015.985203

Shorter D, Nielsen DA, Huang W, Harding MJ, Hamon SC and Kosten TR (2013) Pharmacogenetic randomized trial for cocaine abuse: disulfiram and  $\alpha$ 1A-adrenoceptor gene variation. *Eur Neuropsychopharmacol* 23:1401–7. doi: 10.1016/j.euroneuro.2013.05.014

Singh M, Keer D, Klimas J, Wood E and Werb D (2016) Topiramate for cocaine dependence: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Addiction* 111:1337–1346. doi: 10.1111/add.13328

Sinha R (2013) Chapter 23 – Stress and Addiction. *Principles of Addiction*. pp 223–234

Sinha R (2001) How does stress increase risk of drug abuse and relapse? *Psychopharmacology (Berl)* 158:343–59. doi: 10.1007/s002130100917

Sinha R (2008) Chronic Stress, Drug Use, and Vulnerability to Addiction. *Ann N Y Acad Sci* 1141:105–130. doi: 10.1196/annals.1441.030

Sinha R, Catapano D and O'Malley S (1999) Stress-induced craving and stress response in



cocaine dependent individuals. *Psychopharmacology (Berl)* 142:343–51.

Sinha R, Fuse T, Aubin LR and O'Malley SS (2000) Psychological stress, drug-related cues and cocaine craving. *Psychopharmacology (Berl)* 152:140–8.

Sinha R, Garcia M, Paliwal P, Kreek MJ and Rounsaville BJ (2006) Stress-induced cocaine craving and hypothalamic-pituitary-adrenal responses are predictive of cocaine relapse outcomes. *Arch Gen Psychiatry* 63:324–31. doi: 10.1001/archpsyc.63.3.324

Sinha R, Talih M, Malison R, Cooney N, Anderson GM and Kreek MJ (2003) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis and sympatho-adreno-medullary responses during stress-induced and drug cue-induced cocaine craving states. *Psychopharmacology (Berl)* 170:62–72. doi: 10.1007/s00213-003-1525-8

Siniscalchi A, Bonci A, Biagio Mercuri N, Pirritano D, Squillace A, De Sarro G and Gallelli L (2015) The Role of Topiramate in the Management of Cocaine Addiction: a Possible Therapeutic Option. *Curr Neuropharmacol* 13:815–8. doi: 10.2174/1570159x13666150729222643

Smart C, Strathdee G, Watson S, Murgatroyd C and McAllister-Williams RH (2015) Early life trauma, depression and the glucocorticoid receptor gene--an epigenetic perspective. *Psychol Med* 45:3393–410. doi: 10.1017/S0033291715001555

Sordi AO, Pechansky F, Kessler FHP, Kapczinski F, Pfaffenseller B, Gubert C, de Aguiar BW, de Magalhães Narvaez JC, Ornell F and von Diemen L (2014) Oxidative stress and BDNF as possible markers for the severity of crack cocaine use in early withdrawal. *Psychopharmacology (Berl)* 231:4031–9. doi: 10.1007/s00213-014-3542-1

Spellacy CJ, Harding MJ, Hamon SC, Mahoney JJ, Reyes JA, Kosten TR, Newton TF, De La Garza R and Nielsen DA (2014) A variant in ANKK1 modulates acute subjective effects of cocaine: a preliminary study. *Genes Brain Behav* 13:559–64. doi: 10.1111/gbb.12121

St. Laurent R, Helm SR and Glenn MJ (2013) Reduced cocaine-seeking behavior in heterozygous BDNF knockout rats. *Neurosci Lett* 544:94–99. doi: 10.1016/j.neulet.2013.03.050

Stewart MJ, Fulton HG and Barrett SP (2014) Powder and Crack Cocaine Use Among Opioid Users. *J Addict Med* 8:264–270. doi: 10.1097/ADM.0000000000000047

Stolf AR, Szobot CM, Halpern R, Akutagava-Martins GC, Müller D, Guimaraes LSP, Kessler FHP, Pechansky F and Roman T (2014) Crack cocaine users show differences in genotype frequencies of the 3' UTR variable number of tandem repeats of the dopamine transporter gene (DAT1/SLC6A3). *Neuropsychobiology* 70:44–51. doi: 10.1159/000365992

Stringer S, Minică CC, Verweij KJH, Mbarek H, Bernard M, Derringer J, van Eijk KR, Isen JD, Loukola A, Maciejewski DF et al. (2016) Genome-wide association study of lifetime cannabis use

based on a large meta-analytic sample of 32 330 subjects from the International Cannabis Consortium. *Transl Psychiatry* 6:e769. doi: 10.1038/tp.2016.36

Sullivan D, Pinsonneault JK, Papp AC, Zhu H, Lemeshow S, Mash DC and Sadee W (2013) Dopamine transporter DAT and receptor DRD2 variants affect risk of lethal cocaine abuse: a gene-gene-environment interaction. *Transl Psychiatry* 3:e222. doi: 10.1038/tp.2012.146

Taha F, Galea S, Hien D and Goodwin RD (2014) Childhood maltreatment and the persistence of smoking: a longitudinal study among adults in the US. *Child Abuse Negl* 38:1995–2006. doi: 10.1016/j.chiabu.2014.10.022

Teicher MH and Samson JA (2016) Annual Research Review: Enduring neurobiological effects of childhood abuse and neglect. *J Child Psychol Psychiatry* 57:241–266. doi: 10.1111/jcpp.12507

Teoh SK, Sarnyai Z, Mendelson JH, Mello NK, Springer SA, Sholar JW, Wapler M, Kuehnle JC and Gelles H (1994) Cocaine effects on pulsatile secretion of ACTH in men. *J Pharmacol Exp Ther* 270:1134–8.

Terracciano A, Piras MG, Lobina M, Mulas A, Meirelles O, Sutin AR, Chan W, Sanna S, Uda M, Crisponi L et al. (2013) Genetics of serum BDNF: meta-analysis of the Val66Met and genome-wide association study. *World J Biol Psychiatry* 14:583–9. doi: 10.3109/15622975.2011.616533

Terzi MY, Izmirli M and Gogebakan B (2016) The cell fate: senescence or quiescence. *Mol Biol Rep*. doi: 10.1007/s11033-016-4065-0

Tomiya AJ, O'Donovan A, Lin J, Puterman E, Lazaro A, Chan J, Dhabhar FS, Wolkowitz O, Kirschbaum C, Blackburn E et al. (2012) Does cellular aging relate to patterns of allostasis? An examination of basal and stress reactive HPA axis activity and telomere length. *Physiol Behav* 106:40–5. doi: 10.1016/j.physbeh.2011.11.016

Tractenberg SG, Viola TW, Gomes CFA, Wearick-Silva LE, Kristensen CH, Stein LM and Grassi-Oliveira R (2015) Dual-memory processes in crack cocaine dependents: The effects of childhood neglect on recall. *Memory* 23:955–971. doi: 10.1080/09658211.2014.938084

Uher R (2014) Gene-environment interactions in severe mental illness. *Front psychiatry* 5:48. doi: 10.3389/fpsy.2014.00048

UNODC (2015) World Drug Report 2015. In: United Nations Off. Drugs Crime, World Drug Rep. 2015 (United Nations Publ. Sales No. E.15.XI.6).

[https://www.unodc.org/documents/wdr2015/World\\_Drug\\_Report\\_2015.pdf](https://www.unodc.org/documents/wdr2015/World_Drug_Report_2015.pdf).

UNODC (2016) World Drug Report 2016. <https://www.unodc.org/wdr2016/>. Accessed 23

Feb 2017

USGPO (1986) United States Government Publishing Office, PUBLIC LAW 99-570—OCT. 27, 1986. <https://www.gpo.gov/fdsys/pkg/STATUTE-100/pdf/STATUTE-100-Pg3207.pdf>.

USGPO (2010) United States Government Publishing Office, PUBLIC LAW 111–220—AUG. 3, 2010. <https://www.gpo.gov/fdsys/pkg/PLAW-111publ220/pdf/PLAW-111publ220.pdf>.

van den Bree MB, Johnson EO, Neale MC and Pickens RW (1998) Genetic and environmental influences on drug use and abuse/dependence in male and female twins. *Drug Alcohol Depend* 52:231–41.

Vasunilashorn S and Cohen AA (2014) Stress Responsive Biochemical Anabolic/Catabolic Ratio and Telomere Length in Older Adults. *Biodemography Soc Biol* 60:174–184. doi: 10.1080/19485565.2014.950722

Vaughn MG, Fu Q, Perron BE, Bohnert ASB and Howard MO (2010) Is Crack Cocaine Use Associated with Greater Violence than Powdered Cocaine Use? Results from a National Sample. *Am J Drug Alcohol Abuse* 36:181–186. doi: 10.3109/00952990.2010.491877

Verde Z, Reinoso-Barbero L, Chicharro L, Garatachea N, Resano P, Sánchez-Hernández I, Rodríguez González-Moro JM, Bandrés F, Santiago C and Gómez-Gallego F (2015) Effects of cigarette smoking and nicotine metabolite ratio on leukocyte telomere length. *Environ Res* 140:488–94. doi: 10.1016/j.envres.2015.05.008

Vergara-Moragues E, González-Saiz F, Lozano OM, Betanzos Espinosa P, Fernández Calderón F, Bilbao-Acebos I, Pérez García M and Verdejo García A (2012) Psychiatric comorbidity in cocaine users treated in therapeutic community: substance-induced versus independent disorders. *Psychiatry Res* 200:734–41. doi: 10.1016/j.psychres.2012.07.043

Vergara-Moragues E, González-Saiz F, Lozano OM and García AV (2013) Psychiatric Profile of Three-Month Retention in Cocaine-Dependent Patients Treated in a Therapeutic Community. *J Stud Alcohol Drugs* 74:452–459. doi: 10.15288/jsad.2013.74.452

Verweij KJH, Zietsch BP, Lynskey MT, Medland SE, Neale MC, Martin NG, Boomsma DI and Vink JM (2010) Genetic and environmental influences on cannabis use initiation and problematic use: a meta-analysis of twin studies. *Addiction* 105:417–30. doi: 10.1111/j.1360-0443.2009.02831.x

Vescovi PP (2000) Cardiovascular and hormonal responses to hyperthermic stress in cocaine addicts after a long period of abstinence. *Addict Biol* 5:91–5. doi: 10.1080/13556210071315

Vescovi PP, Coiro V, Volpi R and Passeri M (1992) Diurnal variations in plasma ACTH,

cortisol and beta-endorphin levels in cocaine addicts. *Horm Res* 37:221–4.

Viola TW, Tractenberg SG, Kluwe-Schiavon B, Levandowski ML, Sanvicente-Vieira B, Wearick-Silva LE, de Azeredo LA, Teixeira AL and Grassi-Oliveira R (2015) Brain-Derived Neurotrophic Factor and Delayed Verbal Recall in Crack/Cocaine Dependents. *Eur Addict Res* 21:273–8. doi: 10.1159/000430436

Viola TW, Tractenberg SG, Levandowski ML, Pezzi JC, Bauer ME, Teixeira AL and Grassi-Oliveira R (2014) Neurotrophic factors in women with crack cocaine dependence during early abstinence: the role of early life stress. *J Psychiatry Neurosci* 39:206–14.

Viola TW, Tractenberg SG, Pezzi JC, Kristensen CH and Grassi-Oliveira R (2013) Childhood physical neglect associated with executive functions impairments in crack cocaine-dependent women. *Drug Alcohol Depend* 132:271–276. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2013.02.014

Visscher PM, Goddard ME, Derks EM and Wray NR (2012) Evidence-based psychiatric genetics, AKA the false dichotomy between common and rare variant hypotheses. *Mol Psychiatry* 17:474–85. doi: 10.1038/mp.2011.65

Vogel T, Dom G, van de Glind G, Studer J, Gmel G, Strik W and Moggi F (2016) Is attention deficit/hyperactivity disorder among men associated with initiation or escalation of substance use at 15-month follow-up? A longitudinal study involving young Swiss men. *Addiction* 111:1867–1878. doi: 10.1111/add.13422

von Diemen L, Brolese G, Possa M, Schuch SB and Sordi AO (2016) Neuropathology of Drug Addictions and Substance Misuse. *Neuropathol Drug Addict Subst Misuse*. doi: 10.1016/B978-0-12-800212-4.00004-2

von Diemen L, Kapczinski F, Sordi AO, de Magalhães Narvaez JC, Guimarães LSP, Kessler FHP, Pfaffenseller B, de Aguiar BW, de Moura Gubert C and Pechansky F (2014) Increase in brain-derived neurotrophic factor expression in early crack cocaine withdrawal. *Int J Neuropsychopharmacol* 17:33–40. doi: 10.1017/S146114571300103X

Waldrop AE, Price KL, Desantis SM, Simpson AN, Back SE, McRae AL, Spratt EG, Kreek MJ and Brady KT (2010) Community-dwelling cocaine-dependent men and women respond differently to social stressors versus cocaine cues. *Psychoneuroendocrinology* 35:798–806. doi: 10.1016/j.psyneuen.2009.11.005

Walsh JJ, Friedman AK, Sun H, Heller EA, Ku SM, Juarez B, Burnham VL, Mazei-Robison MS, Ferguson D, Golden SA et al. (2014) Stress and CRF gate neural activation of BDNF in the mesolimbic reward pathway. *Nat Neurosci* 17:27–9. doi: 10.1038/nn.3591

Wang F, Gelernter J, Kranzler HR and Zhang H (2012) Identification of POMC exonic

variants associated with substance dependence and body mass index. *PLoS One* 7:e45300. doi: 10.1371/journal.pone.0045300

Wei C, Anthony JC and Lu Q (2012) Genome-environmental risk assessment of cocaine dependence. *Front Genet* 3:83. doi: 10.3389/fgene.2012.00083

Wei W-H, Hemani G and Haley CS (2014) Detecting epistasis in human complex traits. *Nat Rev Genet* 15:722–33. doi: 10.1038/nrg3747

Wetherill L, Agrawal A, Kapoor M, Bertelsen S, Bierut LJ, Brooks A, Dick D, Hesselbrock M, Hesselbrock V, Koller DL et al. (2015) Association of substance dependence phenotypes in the COGA sample. *Addict Biol* 20:617–27. doi: 10.1111/adb.12153

Wikgren M, Maripuu M, Karlsson T, Nordfjäll K, Bergdahl J, Hultdin J, Del-Favero J, Roos G, Nilsson L-G, Adolfsson R et al. (2012) Short Telomeres in Depression and the General Population Are Associated with a Hypocortisolemic State. *Biol Psychiatry* 71:294–300. doi: 10.1016/j.biopsych.2011.09.015

Wulaningsih W, Serrano FEC, Utarini A, Matsuguchi T and Watkins J (2016) Smoking, second-hand smoke exposure and smoking cessation in relation to leukocyte telomere length and mortality. *Oncotarget*. doi: 10.18632/oncotarget.11051

Yang J and Li MD (2014) Association and interaction analyses of 5-HT<sub>3</sub> receptor and serotonin transporter genes with alcohol, cocaine, and nicotine dependence using the SAGE data. *Hum Genet* 133:905–18. doi: 10.1007/s00439-014-1431-7

Yang J and Young MJ (2009) The mineralocorticoid receptor and its coregulators. *J Mol Endocrinol* 43:53–64. doi: 10.1677/JME-09-0031

Yang Z, Ye J, Li C, Zhou D, Shen Q, Wu J, Cao L, Wang T, Cui D, He S et al. (2013) Drug addiction is associated with leukocyte telomere length. *Sci Rep* 3:1542. doi: 10.1038/srep01542

Zahran S, Snodgrass JG, Maranon DG, Upadhyay C, Granger DA and Bailey SM (2015) Stress and telomere shortening among central Indian conservation refugees. *Proc Natl Acad Sci* 112:E928–E936. doi: 10.1073/pnas.1411902112

Zayats T, Yang B-Z, Xie P, Poling J, Farrer LA and Gelernter J (2013) A complex interplay between personality domains, marital status and a variant in *CHRNA5* on the risks of cocaine, nicotine dependences and cocaine-induced paranoia. *PLoS One* 8:e49368. doi: 10.1371/journal.pone.0049368

Zhou Y, Spangler R, LaForge KS, Maggos CE, Ho A and Kreek MJ (1996) Corticotropin-releasing factor and type 1 corticotropin-releasing factor receptor messenger RNAs in rat brain and pituitary during ‘binge’-pattern cocaine administration and chronic

withdrawal. *J Pharmacol Exp Ther* 279:351–8.

Zhou Y, Spangler R, Schlussman SD, Ho A and Kreek MJ (2003) Alterations in hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity and in levels of proopiomelanocortin and corticotropin-releasing hormone-receptor 1 mRNAs in the pituitary and hypothalamus of the rat during chronic “binge” cocaine and withdrawal. *Brain Res* 964:187–99.

Zhou Y, Spangler R, Schlussman SD, Yuferov VP, Sora I, Ho A, Uhl GR and Kreek MJ (2002) Effects of acute “binge” cocaine on preprodynorphin, preproenkephalin, proopiomelanocortin, and corticotropin-releasing hormone receptor mRNA levels in the striatum and hypothalamic-pituitary-adrenal axis of mu-opioid receptor knockout mice. *Synapse* 45:220–9. doi: 10.1002/syn.10101

Zuk O, Hechter E, Sunyaev SR and Lander ES (2012) The mystery of missing heritability: Genetic interactions create phantom heritability. *Proc Natl Acad Sci* 109:1193–1198. doi: 10.1073/pnas.1119675109

Zuo L, Kranzler HR, Luo X, Yang B, Weiss R, Brady K, Poling J, Farrer L and Gelernter J (2009) Interaction between two independent CNR1 variants increases risk for cocaine dependence in European Americans: a replication study in family-based sample and population-based sample. *Neuropsychopharmacology* 34:1504–13. doi: 10.1038/npp.2008.206

# 2

## Genetic findings on the relationship between smoking and the stress system

**Publicado como um capítulo de livro:** Rovaris DL, Mota NR e Bau CHD. *Neuropathology of Drug Addictions and Substance Misuse Volume 1, 1st Edition - Foundations of Understanding, Tobacco, Alcohol, Cannabinoids and Opioids* (2016) DOI: 10.1016/B978-0-12-800213-1.00020-1

## Chapter 20

# Genetic Findings on the Relationship between Smoking and the Stress System

Diego L. Rovaris, Nina R. Mota, Claiton H.D. Bau

*Department of Genetics, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil*

### Abbreviations

<b>ACTH</b>	Adrenocorticotrophic hormone
<b>AF1</b>	Activation function 1
<b>COPD</b>	Chronic obstructive pulmonary disease
<b>CRH</b>	Corticotropin-releasing hormone
<b>CRHR1</b>	CRH receptor type 1
<b>DBD</b>	DNA-binding domain
<b>FKBP4</b>	FK506 binding protein 4
<b>FKBP5</b>	FK506 binding protein 5
<b>FTND</b>	Fagerström Test for Nicotine Dependence
<b>GC</b>	Glucocorticoid
<b>GR</b>	Glucocorticoid receptor
<b>GRE</b>	Glucocorticoid-response element
<b>GWAS</b>	Genome-wide association studies
<b>HPA</b>	Hypothalamic–pituitary–adrenal axis
<b>LBD</b>	Ligand-binding domain
<b>mRNA</b>	Messenger RNA
<b>MR</b>	Mineralocorticoid receptor
<b>nAChRs</b>	Nicotinic acetylcholine receptors
<b>NPC</b>	Nuclear pore complex
<b>NR3C1</b>	Nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1
<b>NR3C2</b>	Nuclear receptor subfamily 3, group C, member 2
<b>NTD</b>	<i>N</i> -terminal transactivation domain
<b>POMC</b>	Pro-opiomelanocortin
<b>PPI</b>	Protein–protein interaction
<b>SNP</b>	Single-nucleotide polymorphism
<b>TSST</b>	Trier social stress test

### INTRODUCTION

There are several studies showing that the dysregulation of the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis plays a fundamental role in nicotine dependence and that stress has an important effect on several aspects of smoking behavior, including initiation, maintenance, and relapse (Brujinzeel, 2012). Smokers present higher cortisol levels (Mendelson, Goletiani, Sholar, Siegel, & Mello, 2008), and nicotine, the most important compound of tobacco cigarettes, activates the HPA axis in a dose-dependent manner (Lutfy et al., 2012). Additionally, it has been demonstrated that glucocorticoids (GCs) increase dopamine release in mesocorticolimbic

circuits involved in the reward and reinforcement effects of drugs of abuse (Wand et al., 2007) and that the corticotropin-releasing hormone (CRH) may also operate independent of the HPA axis, activating the sympathetic nervous system (Sutton, Koob, Le Moal, Rivier, & Vale, 1982).

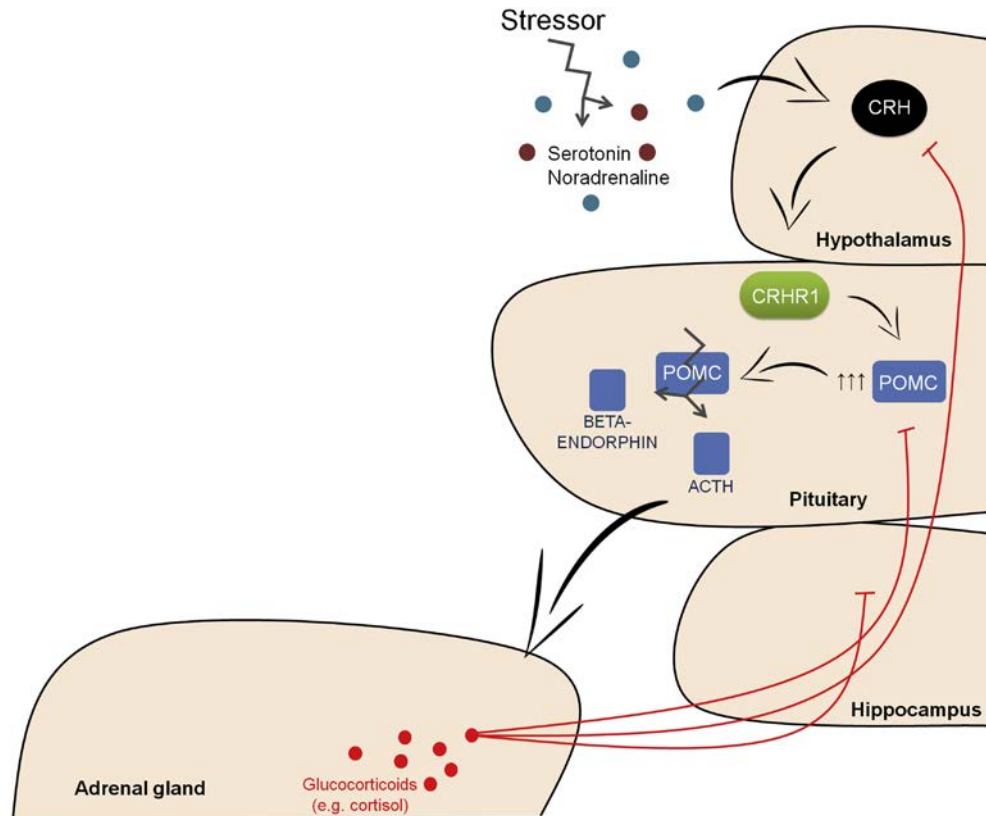
As a general scenario, the literature suggests a hyperreactivity of the HPA axis related to smoking, which affects the reward and reinforcement effects of nicotine on the brain. Conversely, abstinence states may result in hyporeactivity of the HPA axis, with a consequent decrease in the levels of circulating GCs (Brujinzeel, 2012). The reduction of cortisol levels is associated with increased relapse rates (al'Absi, Hatsukami, Davis, & Wittmers, 2004) and this may be related to the modulating effects of GCs on nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs). Animal model findings have suggested that, similar to nicotine, corticosterone desensitizes the nAChRs (Robinson, Grun, Pauly, & Collins, 1996), and this could add to the explanation of withdrawal symptoms, considering the sudden reduction in cortisol levels in abstainers.

In this chapter, we will briefly describe the functioning of the HPA axis and the possible implications of the variability of stress-related genes in smoking behaviors. In particular, we will characterize on a molecular level the structure and mode of action of GC receptors (GRs) and mineralocorticoid receptors (MRs), which are considered the maestros that orchestrate the events of response and adaptation to stressors. Polymorphisms in the genes encoding these receptors have been implicated in various stress response patterns and have been associated with several psychiatric disorders, including substance use disorders (SUDs). Here we will discuss association findings from candidate gene and genome-wide association studies (GWAS) involving GR- and MR-coding genes and smoking, suggesting new research approaches.

### THE HPA AXIS AND THE MOLECULAR EFFECTS OF GCs

The HPA axis is the main stress response system and it is involved in several relevant biological processes, such as the modulation of normal and pathologic behavior (Sapolsky, Romero, & Munck, 2000). The most important mediators of





**FIGURE 1 HPA axis functioning in humans.** When the human body is subjected to a threat, be it of physiological (e.g., drug withdrawal symptoms), psychological (e.g., death of a family member and loss of relationship), or pharmacological origin (e.g., drugs, including nicotine and cocaine), the activation of the HPA axis occurs. The release of serotonin and noradrenaline stimulates the production of CRH by the hypothalamus. In the anterior pituitary, CRH activates the CRH receptor type 1 (CRHR1), resulting in increased expression of pro-opiomelanocortin (POMC). The POMC is cleaved, generating  $\beta$ -endorphin and ACTH. Acting as an endocrine hormone, ACTH stimulates the production of GCs (e.g., cortisol) in the adrenal cortex. Increased levels of cortisol result in negative feedback on the hypothalamus, anterior pituitary, and hippocampus through the activation of GRs and MRs.

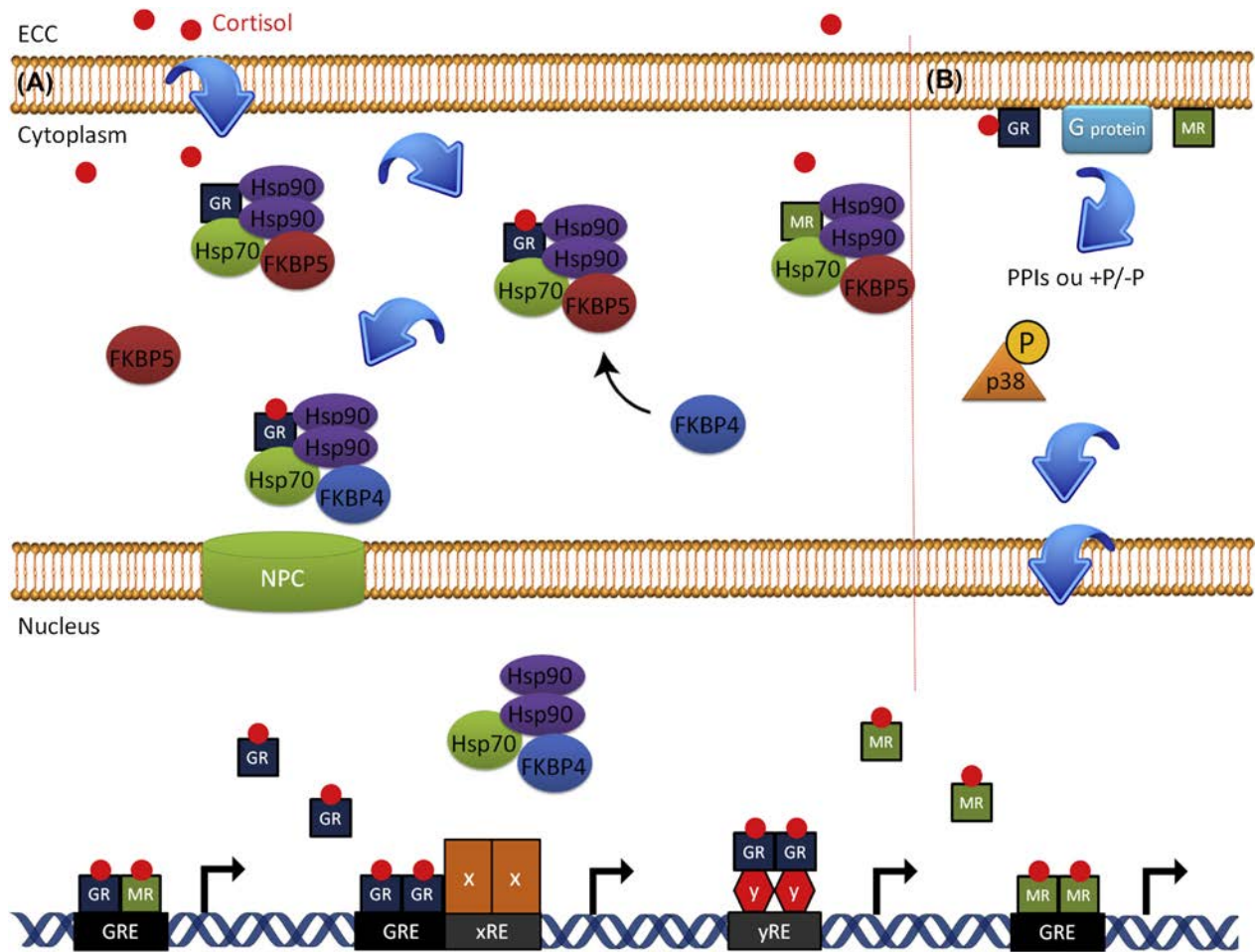
this neuroendocrine circuit are CRH, adrenocorticotrophic hormone (ACTH), and cortisol (Figure 1). Following a challenge or a threat, there is activation of the HPA axis by noradrenaline and serotonin and, consequently, an increase in GC levels (cortisol in humans and corticosterone in rodents). In response to a stressor agent (nicotine, e.g.), the hypothalamus secretes CRH, which in the anterior pituitary stimulates the expression of the gene encoding pro-opiomelanocortin (POMC). POMC is then processed, resulting in ACTH and other peptides, including  $\beta$ -endorphin (Zhou, Proudnikov, Yuferov, & Kreek, 2010). Subsequently, ACTH is released into the bloodstream and, in the adrenal cortex, it stimulates the enzymes that are involved in producing GCs (e.g., cortisol).

GCs exert their effects through their binding to GRs and MRs, which are ligand-dependent transcription factors (Derijk, 2009). The GR (Nr3c1) and the MR (Nr3c2), along with the progesterone and the androgen receptors (Nr3c3 and Nr3c4, respectively), are part of nuclear receptor subfamily 3 (Kassahn, Ragan, & Funder, 2011). These receptors are structurally similar and present three functionally distinct regions: an N-terminal transcription activation domain (NTD), a central zinc finger DNA-binding domain (DBD), and a C-terminal ligand-binding domain (LBD) (Oakley & Cidlowski, 2013). The interactions between GCs and the GRs and MRs result in conformational changes that allow these receptors to interact with specific DNA sequences and, consequently,

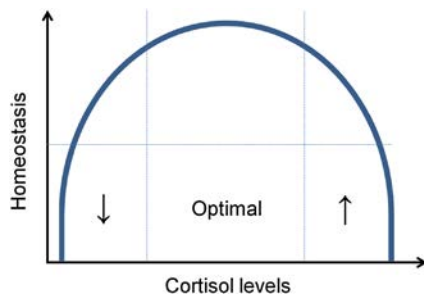
modulate the expression of several genes (Schoneveld, Gaemers, & Lamers, 2004; Figure 2(A)).

GRs and MRs are ubiquitously distributed in the brain and regulate a series of neurophysiologic processes related to stress reactions. Among the cerebral effects resulting from the activation of GRs and MRs are the facilitation of alertness, arousal, vigilance, attention, and aggression, in addition to the maintenance of cognitive functions and the activation of negative feedback loops (Joels, Karst, DeRijk, & de Kloet, 2008). The HPA axis presents an inverted U-shaped dose–response curve (Figure 3), in which homeostasis is maintained when the system activity (GC production) is optimal (Chrousos, 2009). However, inappropriate responses can result in inefficient adaptation states (increased and insufficient levels of GCs), which may increase the risk or moderate the course of stress-related diseases, including smoking.

Traditionally, the GR and MR were known as cytosolic receptors that, when activated, would translocate to the nucleus; however, in the past few years, several pieces of evidence have emerged indicating that these receptors could also be located on the membrane (as G-protein-coupled receptors), mediating fast and nongenomic actions of GCs (Prager & Johnson, 2009; Figure 2(B)). In this sense, the cytosolic MR seems to be involved in the maintenance of cellular excitability and also with the stress response initiation, while the membrane MR is thought to amplify such signals (Joels, et al., 2008). Meanwhile, the membrane and



**FIGURE 2** Mechanisms of GR and MR actions. Cortisol (red dots) spreads from the extracellular compartment (ECC) to the intracellular compartment (cytoplasm) and it interacts with the cytosolic GR or MR. (A) The binding to cortisol promotes conformational changes in the receptors allowing the exchange of FKBP4 for FKBP5 and subsequent nuclear transfer through the nuclear pore complex (NPC). In the nucleus, the chaperone proteins (Hsp70, Hsp90, and FKBP4) dissociate and the activated GRs and MRs interact with glucocorticoid response elements (GREs). Through the interaction with other transcription factors (shown as X or Y), these receptors may also modulate different responsive elements (shown as xRE or yRE). GRs and MRs act as homodimers or heterodimers. (B) In addition to this classical pathway controlling gene expression, there is another one comprising rapid and nongenomic effects, which involves phosphorylation (+P), dephosphorylation (–P), and protein–protein interactions (PPIs). This pathway indirectly modulates gene expression. P38=p38 MAP kinase; TF, transcription factor.



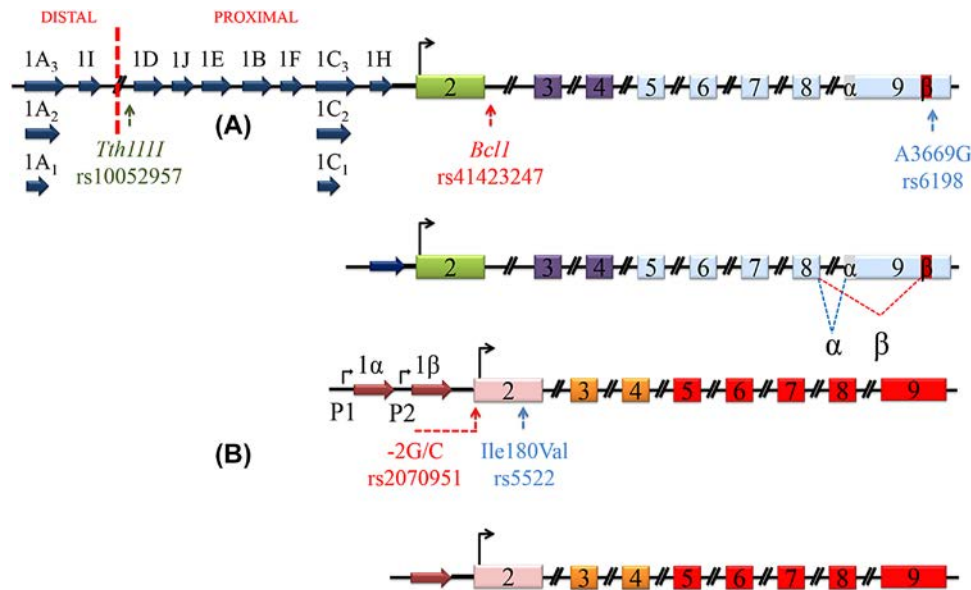
**FIGURE 3** Inverted U-shaped dose–response curve. Inappropriate cortisol exposures (deficiency or excess) may be a consequence of inefficient adaptive responses, which are associated with susceptibility to stress-related diseases, including SUDs.

cytosolic GRs are responsible for the recovery and consolidation of the response to stress, allowing the storage of this information in memory (Oitzl, Champagne, van der Veen, & de Kloet, 2010). Such temporally coordinated action mechanism explains why

MRs are always occupied (either while activated or not) by GCs, even at low levels of these hormones, whereas GRs are occupied only after GCs reach plasma peak (Martinierie et al., 2013).

### THE GLUCOCORTICOID RECEPTOR-CODING GENE (*NR3C1*)

The GR is encoded by the *NR3C1* gene, which is located on chromosome region 5q31–q32 and can be considered highly complex, as its organization differs from that of a classical gene. The first exon of this gene is not translated and presents nine different promoters, leading to the so-called nine alternative untranslated first exons (1A, 1I, 1D, 1J, 1E, 1B, 1F, 1C, and 1H) (Turner et al., 2010; Figure 4(A)). The coding region of *NR3C1* is composed by eight other exons and alternative splicing processes, influenced by the different promoters, result in the expression of five main GR isoforms: GR $\alpha$ , GR $\beta$ , GR $\gamma$ , GR-A, and GR-P. These isoforms differ in their C-terminal extremities and display different functions



**FIGURE 4** Schematic representation of the structure of the GR and the MR. The NTD (exon 2), the central DBD (exons 3 and 4), and the C-terminal LBD (exons 5–9) are indicated in different colors. (A) The *NR3C1* gene has nine alternative first exons that are transcribed but not translated. Different mRNAs are generated from the selection of the first alternative exon. The promoter region is formed by a distal portion (control of exons 1A and 1I) and a proximal portion (control of exons 1L, 1M, 1E, 1B, 1F, 1C, and 1H). The selection of the first exon appears to influence the isoform that will be expressed. For example, the use of promoter 1C increases the expression of GR $\alpha$ . The most common isoforms are  $\alpha$  and  $\beta$ . The first is generated by an alternative splicing between the end of exon 8 and exon 9, while GR $\beta$  is formed by joining the end of exon 8 with a splicing site located downstream of exon 9. Exon 2 has eight alternative translation initiation codons, which enables the formation of different variants of GR (not shown) with shorter *N*-terminal ends. The rs198, rs10052967, and rs414123247 SNPs are indicated. (B) The *NR3C2* gene has two first untranslated exons (1 $\alpha$  and 1 $\beta$ ) that are alternatively transcribed. The promoter region is formed by two sequences called P1 and P2, which are located upstream of exons 1 $\alpha$  and 1 $\beta$ , respectively. Multiple isoforms of MR are also formed from alternative splicing and alternative translation initiation. The rs2070951 and rs5522 SNPs are indicated.

(Kino, Su, & Chrousos, 2009). Moreover, additional variants can be formed according to the initiation codon used, since exon 2 has eight ATG initiation codons (on residues 1, 27, 86, 90, 98, 316, 330, and 336), which result in eight variants of GR $\alpha$  (and possibly of other isoforms) with progressively shorter *N*-terminal extremities (GR $\alpha$ -A, GR $\alpha$ -B, GR $\alpha$ -C1, GR $\alpha$ -C2, GR $\alpha$ -C3, GR $\alpha$ -D1, GR $\alpha$ -D2, and GR $\alpha$ -D3) (Oakley & Cidlowski, 2013).

The GR is expressed in virtually all tissues and, in the nervous system, it can be traced to almost every area of the brain, although high GR levels are found only on the hippocampus and the amygdala (Sapolsky, et al., 2000). GR $\alpha$  is a cytosolic functional isoform and it is involved in the transactivation and transrepression of multiple genes regulated by GCs (Saif et al., 2014). GR $\beta$  is located in the cytoplasm and in the nucleus and does not bind to the GCs as does the classic GR $\alpha$ . When these two isoforms are coexpressed, GR $\beta$  acts as a dominant-negative inhibitor of GR $\alpha$  by avoiding the binding of this isoform to glucocorticoid response elements, competing for transcriptional coregulators and/or forming inactive GR $\alpha$ /GR $\beta$  dimers (Oakley & Cidlowski, 2013). In this sense, high levels of GR $\beta$  seem to confer resistance to GCs in the tissues in which it is expressed, while low GR $\beta$  levels may be related to increased sensitivity to these hormones (Lewis-Tuffin & Cidlowski, 2006).

High-throughput gene expression findings have suggested that GR $\beta$  might also act directly as a transcriptional factor and that such mechanism is independent of its activity as a dominant-negative inhibitor of GR $\alpha$  (Kino et al., 2009; Lewis-Tuffin, Jewell, Bienstock, Collins, & Cidlowski, 2007). Corticosteroid receptors have two activation function domains (AF1 and AF2), which are

capable of interactions with other proteins, integrating signals from different pathways. As a consequence of GR's alternative splicing, the AF2 region is removed from the RNA that originates the GR $\beta$  isoform. Nevertheless, GR $\beta$  preserves the AF1 domain intact and this specific feature permits several interactions with transcriptional machinery, enabling gene expression modulation through GR $\beta$  (Kino, Su, et al., 2009). Corroborating this idea, transcriptome assays showed that mifepristone, a GC antagonist, is able to bind to GR $\beta$  and abolish the gene expression changes induced by this isoform, similar to GR $\alpha$  (Lewis-Tuffin, et al., 2007).

With respect to the remaining isoforms, scarce information can be found in the literature. It is known that GR $\gamma$  binds to GCs but it has a limited ability in stimulating the target genes of these hormones (Meijsing et al., 2009). It has been shown that the GR-A and GR-P isoforms, along with GR $\beta$  and the different GR $\alpha$  variants, can be found on the human placenta and that there is a distinct expression pattern according to gender. These data suggest that nonclassical isoforms of GR mediate differences in the sensitivity to cortisol between male and female fetuses during the intrauterine period (Saif, et al., 2014).

## FUNCTIONAL ASPECTS OF *NR3C1* POLYMORPHISMS

The *NR3C1* gene is quite polymorphic and some of its SNPs (single-nucleotide polymorphisms) have been investigated with respect to their effects on HPA axis responsiveness, especially

rs10052957 (*Thl1111*), rs41423247 (*Bcl11*), and rs6198 (A3669G). The rs10052957 SNP is characterized by a cytosine-to-thymine change in the intron between untranslated exons 1A<sub>1-3</sub> and 1D (Figure 4(A)) and it has been associated with higher total and evening cortisol levels (Rosmond et al., 2000). The rs41423247 SNP is a cytosine-to-guanine substitution 646 nucleotides downstream of exon 2 (Figure 4(A)) that has been associated with response differences during the Trier Social Stress Test (TSST) (Kumsta et al., 2007; Wust et al., 2004) and with variations on corticosteroid sensitivity (Panarelli et al., 1998; van Rossum & Lamberts, 2004; Stevens et al., 2004). It also has been shown that both SNPs modulate the differences in the expression of GR isoforms on the dorsolateral prefrontal cortex between individuals with and without schizophrenia and bipolar disorder (Sinclair, Fullerton, Webster, & Shannon Weickert, 2012).

The rs6198 SNP consists in an adenine-to-guanine substitution at the 3669 nucleotide position (Figure 4(A)). This change occurs on the first A (adenine) of an ATTTA sequence, which is responsible for a GR $\beta$  mRNA destabilization. The presence of the G (guanine) allele of rs6198 in this motif results in a better stability and, consequently, in an increased GR $\beta$  expression (Derijk et al., 2001). Clinically, G carriers present an exacerbated response to cortisol during the TSST or after the dexamethasone suppression test, possibly owing to a less efficient negative feedback (Kumsta et al., 2007, 2009).

## EFFECTS OF *NR3C1* POLYMORPHISMS ON SMOKING BEHAVIOR

As of this writing, there are three candidate gene association studies investigating the role of *NR3C1* SNPs in smoking, and two of the SNPs mentioned above (rs41423247 and rs6198) have been implicated in such behavior (Rogausch, Kochen, Meineke, & Hennig, 2007; Rovaris, Mota, de Azeredo et al., 2013; Siiskonen et al., 2009). These studies based their hypotheses on results from clinical and preclinical findings showing that tobacco stimulates the release of GCs (Badrick, Kirschbaum, & Kumari, 2007; Lutfy, et al., 2012; Mendelson, et al., 2008) and that such release can modify the reward and reinforcement effects of nicotine by activating GRs on dopaminergic neurons (de Jong & de Kloet, 2004; Rouge-Pont, Deroche, Le Moal, & Piazza, 1998).

The first study tested the association between the *NR3C1* rs41423247 SNP and smoking status and severity (Rogausch, et al., 2007). They analyzed smoking behavior data from 327 Caucasian patients with asthma or chronic obstructive pulmonary disease, which were classified as “smokers” or “nonsmokers.” Subjects from the first group represented 23.2% of the total sample and were further classified as “light” and “heavy” smokers according to their scores on the Fagerström Test for Nicotine Dependence (FTND). The rs41423247G allele was significantly associated with an increased probability of being a smoker, since more than 25% of the individuals carrying the G allele were smokers, compared to only 17.3% of the CC individuals. Additionally, G carriers had significantly higher daily cigarette consumption than C homozygotes.

The influence of the rs41423247 SNP on smoking was also investigated in a large population cohort sample, in which 6358 individuals were evaluated three times after baseline during a

follow-up period of 12 years (mean=6.2 years) (Siiskonen, et al., 2009). The main outcome was a polytomous variable: current smokers, ex-smokers, and nonsmokers. Additionally, the role of the rs41423247 SNP on smoking severity was assessed in the current smokers group and survival analyses tested its effect on smoking cessation during follow-up. At baseline, 22.8% of individuals were current smokers, 41.8% were ex-smokers, and 35.4% were nonsmokers. No significant difference in smoking status or severity was observed between the two genotype groups (CC vs G carriers). During follow-up, 407 individuals had stopped smoking; however, no influence of the rs41423247 SNP was detected on smoking cessation.

The effects of the rs6198 SNP on smoking behavior were assessed in a population sample of 627 individuals, for which the main outcome was smoking status (lifetime smokers vs nonsmokers) (Rovaris, Mota, de Azeredo, et al., 2013). Additionally, analysis of smoking severity was conducted within the lifetime smokers group. No main effect of the rs6198 SNP on smoking status was observed. However, when a combined analysis considered its effect together with an SNP in the gene that encodes the MR (*NR3C2*), the presence of the rs6198G allele was associated with either risk or protection depending on the *NR3C2* alleles present, suggesting a gene–gene interaction effect. Additionally, the presence of the rs6198G allele in lifetime smokers was significantly associated with a higher number of cigarettes smoked per day and to greater severity according to the FTND scores.

To the best of our knowledge, no other *NR3C1* SNP has been associated with smoking by candidate gene studies nor has any significant hit been detected near this gene by GWAS on smoking (Table 1).

## THE MR CODING GENE

As mentioned above, the MR is encoded by the *NR3C2* gene (chromosome 4q31.1), which can be expressed as distinct isoforms (Pascual-Le Tallec & Lombes, 2005; Viengchareun et al., 2007; Figure 4(B)). MR $\alpha$  and MR $\beta$  are the products of splicing of the first two alternative untranslated exons, 1 $\alpha$  and 1 $\beta$ , respectively, and they are expressed in several tissues (Zennaro, Farman, Bonvalet, & Lombes, 1997). Moreover, alternative splicing events involving the 3' region, as well as alternative translation initiation sites, increase the diversity of MR variants encoded by the *NR3C2* gene (Pascual-Le Tallec & Lombes, 2005). At least two of these variants, MRA and MRB, with different transactivation abilities (MRA>MRB), are produced by the use of different alternative translation initiation sites (Pascual-Le Tallec, Demange, & Lombes, 2004).

The transcription of *NR3C2* is regulated by two promoters, known as P1 and P2, which are located upstream of the two first alternative exons (Listwak, Gold, & Whitfield, 1996; Figure 4(B)). Results from in vivo experiments showed a tissue- and a temporal-specific pattern of use of these promoters. While P1 is active in aldosterone target organs, such as brain, kidneys, colon, heart, lungs, adipose tissue, and liver, activation of P2 is restricted to some developmental stages (Le Menuet et al., 2000).

In the brain specifically, the MR is expressed in regulatory structures involved in the maintenance of the electrolyte balance, such as the organum vasculosum of the lamina terminalis, amygdala, and other periventricular regions (Funder, Pearce, Smith, & Smith, 1988).

**TABLE 1** Results Involving *NR3C1* and *NR3C2* Genes from GWAS and Meta-analysis of GWAS. The Outcomes Were Any Smoking Phenotype

Article	Initial Sample	Replication Sample	P-Value $\leq 5 \times 10^{-8}$	P-Value between $5 \times 10^{-8}$ and $5 \times 10^{-5}$	Gene	SNP	PubMed PMID
Loukola et al. (2014)	1114 <sup>a</sup>	5294 <sup>a</sup>	No	No	–		23752247
McGue et al. (2013)	7188	–	No	No	–		23942779
Kumasaka et al. (2012)	11,696	5462	No	No	–		23049750
David et al. (2012)	>32,000	–	No	No	–		22832964
Rice et al. (2012)	3365	835	No	No	–		22524403
Wang et al. (2012)	2420	3304	No	No	–		22377092
Yoon et al. (2012)	8442	1366	No	No	–		22006218
Liu et al. (2010)	41,150	120,516	No	No	–		20418889
TAG Consortium (2010)	>74,000	>68,000	No	No	–		20418890
Thorgerirsson et al. (2010)	31,266	54,731	No	No	–		20418888
Uhl et al. (2010a)	369	–	No	No	–		20811658
Uhl et al. (2010b)	324	–	No	No	–		20235792
Vink et al. (2009)	3497	6215	No	No	–		19268276
Caporaso et al. (2009)	4342	–	No	No	–		19247474
Liu et al. (2009)	840	8874	No	No	–		19188921
Drgon et al. (2009)	480	–	No	No	–		19009022
Uhl et al. (2008)	550	–	No	No	–		18519826
Thorgerirsson et al. (2008)	10,995	4848	No	No	–		18385739
Berrettini et al. (2008)	7481	~2000	No	Yes	<i>NR3C2</i>	rs5522, rs5525	18227835
Uhl et al. (2007)	454	–	No	No	–		17407593
Bierut et al. (2007)	948	981	No	No	–		17158188

<sup>a</sup>Twins.  
From GWAS catalog, <http://www.genome.gov/gwastudies/>.

Furthermore, high MR levels are found in the hippocampus and other limbic regions, where this receptor binds to GCs as well as synthetic corticosteroids and progesterone (Baker, Funder, & Kattoula, 2013; Le Menuet & Lombes, 2014).

## FUNCTIONAL ASPECTS OF *NR3C2* POLYMORPHISMS

The *NR3C2* is also a highly polymorphic gene; however, only a few of its SNPs have been analyzed in relation to their effects on HPA axis reactivity. Among these, particularly notable are rs2070951 (−2G/C) and rs5522 (I180V) (Figure 4(B)). The rs2070951 SNP, located on exon 2, is characterized by a change from a guanine to a cytosine two nucleotides before the first ATG start codon, whereas the rs5522 SNP, also located on exon 2, is a thymine-to-cytosine variation at codon 180, resulting in a change of the amino acid isoleucine (Ile) to a valine (Val) (Derijk, 2009).

Results from in vitro assays have shown that these two SNPs affect the MR transactivation activity when cortisol or dexamethasone is used as ligand (Arai et al., 2003; DeRijk et al., 2006; van Leeuwen et al., 2011). Moreover, these SNPs have been associated with plasmatic and salivary cortisol level changes and with variation in HPA axis suppression by dexamethasone (DeRijk, et al., 2006; Kuningas et al., 2007; van Leeuwen et al., 2010). In addition, differences have been found in responses to the TSSST and the Trier Inventory for the Assessment of Chronic Stress (van Leeuwen, et al., 2011); however, these results could not be replicated by others (Bouma et al., 2011).

## EFFECTS OF *NR3C2* POLYMORPHISMS ON SMOKING BEHAVIOR

Regarding GWAS, the only two nominal associations of SNPs in corticosteroid receptor genes and smoking behavior come from the *NR3C2* gene. A GWAS focusing on heavy smoking, with a total of about 9500 individuals of European descent, in which subjects who smoked 25 or more cigarettes per day were considered “cases,” was conducted (Berrettini et al., 2008). In the pooled analysis the rs5522 Val allele and the rs5525 A allele, which is another SNP located in exon 2, were both nominally associated with heavy smoking ( $P=1.52E-5$  and  $3.78E-5$ , respectively).

A subsequent candidate gene study evaluated, in a Brazilian sample of European descent, the role of the rs5522 polymorphism and 20 other SNPs in genes previously associated with smoking behaviors (dos Santos et al., 2012). This study included 168 lifetime smokers and 363 controls who had never smoked or who had smoked  $\leq 100$  cigarettes in their lifetime. No effect of the 5522 Val allele on smoking status was found in the case–control analysis.

As mentioned before, a study evaluated the effects of functional SNPs in the *NR3C1* and *NR3C2* genes on smoking susceptibility and smoking severity (Rovaris, Mota, de Azeredo, et al., 2013). This study also investigated if epistatic interactions between *NR3C1* rs6198 and *NR3C2* rs5522 could play a role in addiction. In the case–control analysis, an interaction effect between the *NR3C1* rs6198 and the *NR3C2* rs5522 SNPs was observed on susceptibility to smoking, but not on smoking severity. The presence of the rs6198G allele in rs5522 Val carriers was significantly associated with a protective effect against smoking, while in Val noncarriers

a risk effect was observed. Afterward, the same interaction pattern was replicated in smoked cocaine addiction, highlighting the need for functional studies (Rovaris et al., 2015).

## POTENTIAL FOR MR/GR INTERACTIONS BEYOND THE STATISTICAL LEVEL

The interdependent actions of GRs and MRs reinforce the potential for gene–gene interactions. The binding of GCs to MRs and GRs results in conformational changes that culminate in receptor dimerization on DNA (Figure 2(A)). Such processes may result in MR/MR, GR/MR, or GR/GR dimers with different transactivation abilities (Liu, Wang, Sauter, & Pearce, 1995; Savory et al., 2001; Trapp, Rupprecht, Castren, Reul, & Holsboer, 1994). Additionally, the efficiency of the heterodimerization process can differ according to the presence or absence of the GR $\beta$  isoform, which acts as an inhibitor of the classical MR and GR isoforms (Bamberger, Bamberger, Wald, Chrousos, & Schulte, 1997; Oakley & Cidlowski, 2013).

An MR/GR balance hypothesis has been proposed, since these receptors necessarily need to act together in regulating different steps of the stress response (Joels, et al., 2008; Oitzl, et al., 2010). In this way, inadequate operation of either receptor could compromise stress reactions, increasing the risk of developing stress-related disorders, including smoking. A study was designed to explore if the impact of MR levels on the HPA axis or cognitive functions of mice is influenced by the levels of GR and vice versa (Harris, Holmes, de Kloet, Chapman, & Seckl, 2013). Their results showed MR/GR interactions controlling the HPA-axis activity under stress, but not under basal conditions, as well as main and interactive effects modulating a range of cognitive functions.

## PERSPECTIVES

Several genes have been significantly (or nominally) associated with smoking and other addictions in GWAS. However, replication of such findings did not succeed in many subsequent studies (Ho et al., 2010), making the understanding and application of these results difficult. In addition, the effect of all variants already associated with multifactorial traits, either smoking or any other, explains only a small fraction of their heritabilities (Lander, 2011). Thus, there is a remaining undiscovered genetic contribution, which has been called “missing heritability.” Several explanations for the phenomenon of missing heritability have been proposed in the literature, such as the existence of multiple interactions among genes, as well as the possibility of gene–environment interactions (Zuk, Hechter, Sunyaev, & Lander, 2012).

Although the effect of genetic interactions in complex phenotypes is usually mentioned as a possibility, it has been neglected in practice (Rovaris, Mota, Callegari-Jacques, & Bau, 2013). The majority of GWAS and candidate gene studies carried out to date used single-locus approaches, making epistatic effects undetectable (Cordell, 2009). In this way, the study of the impact of gene–gene interactions on smoking behaviors could help us understand why results of preclinical and clinical studies are so distant from GWAS findings. Several studies have shown that dysregulation of

the stress system is crucial in all aspects of smoking (Bruijnzeel, 2012), while there is no GWAS showing genome-wide significant signals for genes of the HPA axis (Table 1). It is possible that the additive model is not capable of detecting significant effects of SNPs in genes coding for proteins that have a high probability of interacting, as in the case of GR and MR.

Therefore, limitations of the additive model in explaining missing heritability, including the fact that epistasis can be a major determinant of the additive genetic variance (Monnahan & Kelly, 2015), indicate that the study of gene–gene interactions may be a relevant approach for the genetic analyses of phenotypes related to drug dependence. One of the challenges would be to develop models showing when additive, epistatic, and other complex mechanisms could be considered in the molecular pathways of addiction to each substance of abuse. Also, different sources of biological and biochemical data could be integrated and used to help optimize the analyses.

Additionally, new strategies in the search of relevant SNPs should be applied. This step forward was reached in a genome-wide methylation study in postmortem brains investigating epigenetic associations with suicidal behaviors (Guintivano et al., 2014). The results demonstrated a relevant methylation site located right on top of the rs7208505 SNP. Interestingly, this SNP is located in the gene encoding SKA2, a protein involved in chaperoning GRs from the cytoplasm to the nucleus, which may have altered expression when hypermethylated. The thymine allele of this SNP eliminates the cytosine–guanine (CpG) dinucleotide, making the methylation on this site impossible, and significantly reduces the risk for suicidal behavior and progression from suicidal ideation to suicide attempt. So, could events like that occurring in other genes related to the stress systems, such as *NR3C1* and *NR3C2*, affect SUD susceptibility? Since stress-related genes are rich in CpG islands and highly polymorphic, this may be another perspective for the study of smoking behavior, as well as for other psychiatric disorders.

## APPLICATIONS TO OTHER ADDICTIONS AND SUBSTANCE MISUSE

Since the dysregulation of the stress system is involved in several aspects of addiction to alcohol, nicotine, cocaine, and other drugs of abuse (Richards et al., 2011; Sinha, 2008), genetic investigations should give special emphasis to this system. Additionally, more attention should be given to analyses involving severity and response to treatment of each SUD. It is reasonable to think that variations in stress-related genes may have an impact on the clinical heterogeneity of addictive behaviors.

## DEFINITION OF TERMS

**Alternative splicing** In this process, particular introns of a gene may be included as exons in the processed mRNA and vice versa. By this process, a single gene encodes two or more distinct protein isoforms.

**Candidate gene study** This approach to association studies focuses on genes selected considering prior evidence suggesting possible involvement in the biological underpinnings of the phenotype of interest. Genes in regions appointed by genome scans are also called candidate genes.

**Dominant-negative inhibitor** A mutated protein that interferes in the functionality of the corresponding normal protein.

**Gene–gene interactions** Interactions between genetic loci. Often “gene–gene interaction” is used as a synonym of “epistasis.”

**Genome-wide association study** An association study that examines hundreds of thousands of common genetic variants, especially SNPs, throughout the whole genome.

**Heritability** The proportion of observed variation of a phenotype in a population that is due to genetic differences.

**Homeostasis** In an organism, this concept means to maintain the internal environment in a stable condition.

**Stressor agent** A psychological, physiological, or pharmacological “event” that disturbs the homeostasis.

**Transactivation** A process in which the expression of multiple genes can be increased by transcription factors.

## KEY FACTS

### Key Facts of Smoking Behaviors

- Smoking behaviors are influenced by genetic and environmental factors.
- Smoking traits have heritability estimates ranging from 30% to 80%.
- Dysregulation of the stress system has an important role in smoking behaviors.
- Some loci influencing smoking behaviors have been revealed by GWAS.
- Loci revealed by GWAS explain a small proportion of the variance of smoking traits.
- Gene–gene interactions may be involved in the missing heritability of smoking behaviors.

### Key Facts of the Stress System

- Homeostasis is disturbed when an organism faces a stressor.
- The HPA axis is activated by stressful situations.
- Nicotine is a pharmacological stressor that activates the HPA axis.
- Cortisol release is a consequence of the activation of the HPA axis.
- GRs and MRs are the “maestros” that orchestrate stress reactions.
- MRs and GRs interact directly and indirectly.

## SUMMARY POINTS

- This chapter focuses on the functioning of the HPA axis and the possible implications of related genetic variation in smoking.
- The HPA axis seems to have a putative role in various aspects of smoking behaviors.
- The GRs and MRs are expressed in several brain areas and play a key role in negative feedback of the HPA axis.
- An MR/GR balance hypothesis suggests that an imbalance between these receptors may result in dysfunctional stress responses, increasing susceptibility to stress-related diseases, including smoking.

- Functional polymorphisms in the *NR3C1* and *NR3C2* genes (encoding the GR and MR, respectively) become candidates for association studies in smoking.
- Association findings, from candidate gene studies and GWAS, involving the *NR3C1* and *NR3C2* genes and smoking are discussed in this chapter.

## REFERENCES

- al' Absi, M., Hatsukami, D., Davis, G. L., & Wittmers, L. E. (2004). Prospective examination of effects of smoking abstinence on cortisol and withdrawal symptoms as predictors of early smoking relapse. *Drug Alcohol Dependence*, 73(3), 267–278. <http://dx.doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2003.10.014>. pii:S0376871603003089.
- Arai, K., Nakagomi, Y., Iketani, M., Shimura, Y., Amemiya, S., Ohyama, K., & Shibasaki, T. (2003). Functional polymorphisms in the mineralocorticoid receptor and amiloride-sensitive sodium channel genes in a patient with sporadic pseudohypaldosteronism. *Human Genetics*, 112(1), 91–97. <http://dx.doi.org/10.1007/s00439-002-0855-7>.
- Badrick, E., Kirschbaum, C., & Kumari, M. (2007). The relationship between smoking status and cortisol secretion. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 92(3), 819–824. <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2006-2155>.
- Baker, M. E., Funder, J. W., & Kattoula, S. R. (2013). Evolution of hormone selectivity in glucocorticoid and mineralocorticoid receptors. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 137, 57–70. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.07.009>. pii:S0960-0760(13)00138-6.
- Bamberger, C. M., Bamberger, A. M., Wald, M., Chrousos, G. P., & Schulte, H. M. (1997). Inhibition of mineralocorticoid activity by the beta-isoform of the human glucocorticoid receptor. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 60(1–2), 43–50.
- Berrettini, W., Yuan, X., Tozzi, F., Song, K., Francks, C., Chilcoat, H., ... Mooser, V. (2008). Alpha-5/alpha-3 nicotinic receptor subunit alleles increase risk for heavy smoking. *Molecular Psychiatry*, 13(4), 368–373. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.mp.40021544002154>.
- Bierut, L. J., Madden, P. A., Breslau, N., Johnson, E. O., Hatsukami, D., Pomerleau, O. F., ... Ballinger, D. G. (2007). Novel genes identified in a high-density genome wide association study for nicotine dependence. *Human Molecular Genetics*, 16(1), 24–35. <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddl441>. ddl441 [pii].
- Bouma, E. M., Riese, H., Nolte, I. M., Oosterom, E., Verhulst, F. C., Ormel, J., & Oldehinkel, A. J. (2011). No associations between single nucleotide polymorphisms in corticoid receptor genes and heart rate and cortisol responses to a standardized social stress test in adolescents: the TRAILS study. *Behavior Genetics*, 41(2), 253–261. <http://dx.doi.org/10.1007/s10519-010-9385-6>.
- Brujinzeel, A. W. (2012). Tobacco addiction and the dysregulation of brain stress systems. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 36(5), 1418–1441. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2012.02.015>. pii:S0149-7634(12)00041-3.
- Caporaso, N., Gu, F., Chatterjee, N., Sheng-Chih, J., Yu, K., Yeager, M., ... Bergen, A. W. (2009). Genome-wide and candidate gene association study of cigarette smoking behaviors. *PLoS One*, 4(2), e4653. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0004653>.
- Chrousos, G. P. (2009). Stress and disorders of the stress system. *Nature Reviews Endocrinology*, 5(7), 374–381. <http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2009.106>.
- Cordell, H. J. (2009). Detecting gene-gene interactions that underlie human diseases. *Nature Reviews Genetics*, 10(6), 392–404. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg2579>.
- David, S. P., Hamidovic, A., Chen, G. K., Bergen, A. W., Wessel, J., Kasberger, J. L., ... Furberg, H. (2012). Genome-wide meta-analyses of smoking behaviors in African Americans. *Translational Psychiatry*, 2, e119. <http://dx.doi.org/10.1038/tp.2012.41>. tp201241 [pii].
- Derijk, R. H. (2009). Single nucleotide polymorphisms related to HPA axis reactivity. *Neuroimmunomodulation*, 16(5), 340–352. <http://dx.doi.org/10.1159/000216192000216192>.
- Derijk, R. H., Schaaf, M. J., Turner, G., Datson, N. A., Vreugdenhil, E., Cidrowski, J., ... Detera-Wadleigh, S. D. (2001). A human glucocorticoid receptor gene variant that increases the stability of the glucocorticoid receptor beta-isoform mRNA is associated with rheumatoid arthritis. *The Journal of Rheumatology*, 28(11), 2383–2388.
- DeRijk, R. H., Wust, S., Meijer, O. C., Zennaro, M. C., Federenko, I. S., Hellhammer, D. H., ... de Kloet, E. R. (2006). A common polymorphism in the mineralocorticoid receptor modulates stress responsiveness. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 91(12), 5083–5089. <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2006-0915>.
- Drgon, T., Montoya, I., Johnson, C., Liu, Q. R., Walther, D., Hamer, D., & Uhl, G. R. (2009). Genome-wide association for nicotine dependence and smoking cessation success in NIH research volunteers. *Molecular Medicine*, 15(1–2), 21–27. <http://dx.doi.org/10.2119/molmed.2008.00096>.
- Funder, J. W., Pearce, P. T., Smith, R., & Smith, A. I. (1988). Mineralocorticoid action: target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated. *Science*, 242(4878), 583–585.
- Guintivano, J., Brown, T., Newcomer, A., Jones, M., Cox, O., Maher, B. S., ... Kaminsky, Z. A. (2014). Identification and replication of a combined epigenetic and genetic biomarker predicting suicide and suicidal behaviors. *The American Journal of Psychiatry*, 171(12), 1287–1296. <http://dx.doi.org/10.1176/appi.ajp.2014.140100081892819>.
- Harris, A. P., Holmes, M. C., de Kloet, E. R., Chapman, K. E., & Seckl, J. R. (2013). Mineralocorticoid and glucocorticoid receptor balance in control of HPA axis and behaviour. *Psychoneuroendocrinology*, 38(5), 648–658. <http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2012.08.007>. pii:S0306-4530(12)00298-3.
- Ho, M. K., Goldman, D., Heinz, A., Kaprio, J., Kreek, M. J., Li, M. D., ... Tyndale, R. F. (2010). Breaking barriers in the genomics and pharmacogenetics of drug addiction. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 88(6), 779–791. <http://dx.doi.org/10.1038/clpt.2010.175>.
- Joels, M., Karst, H., DeRijk, R., & de Kloet, E. R. (2008). The coming out of the brain mineralocorticoid receptor. *Trends in Neuroscience*, 31(1), 1–7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2007.10.005>. pii:S0166-2236(07)00296-2.
- de Jong, I. E., & de Kloet, E. R. (2004). Glucocorticoids and vulnerability to psychostimulant drugs: toward substrate and mechanism. *Annals of the New York Academy Sciences*, 1018, 192–198. <http://dx.doi.org/10.1196/annals.1296.022>.
- Kassahn, K. S., Ragan, M. A., & Funder, J. W. (2011). Mineralocorticoid receptors: evolutionary and pathophysiological considerations. *Endocrinology*, 152(5), 1883–1890. <http://dx.doi.org/10.1210/en.2010-1444>.
- Kino, T., Manoli, I., Kelkar, S., Wang, Y., Su, Y. A., & Chrousos, G. P. (2009). Glucocorticoid receptor (GR) beta has intrinsic, GRalpha-independent transcriptional activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 381(4), 671–675. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.02.110>. pii:S0006-291X(09)00394-5.



- Kino, T., Su, Y. A., & Chrousos, G. P. (2009). Human glucocorticoid receptor isoform beta: recent understanding of its potential implications in physiology and pathophysiology. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(21), 3435–3448. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-009-0098-z>.
- Kumasaka, N., Aoki, M., Okada, Y., Takahashi, A., Ozaki, K., Mushiroda, T., ... Kubo, M. (2012). Haplotypes with copy number and single nucleotide polymorphisms in CYP2A6 locus are associated with smoking quantity in a Japanese population. *PLoS One*, 7(9), e44507. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0044507> [pii].
- Kumsta, R., Entringer, S., Koper, J. W., van Rossum, E. F., Hellhammer, D. H., & Wust, S. (2007). Sex specific associations between common glucocorticoid receptor gene variants and hypothalamus-pituitary-adrenal axis responses to psychosocial stress. *Biological Psychiatry*, 62(8), 863–869. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2007.04.013>. pii:S0006-3223(07)00331-9.
- Kumsta, R., Moser, D., Streit, F., Koper, J. W., Meyer, J., & Wust, S. (2009). Characterization of a glucocorticoid receptor gene (GR, *NR3C1*) promoter polymorphism reveals functionality and extends a haplotype with putative clinical relevance. *American Journal of Medical Genetics: Part B, Neuropsychiatric Genetics*, 150B(4), 476–482. <http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.b.30837>.
- Kuningas, M., de Rijk, R. H., Westendorp, R. G., Jolles, J., Slagboom, P. E., & van Heemst, D. (2007). Mental performance in old age dependent on cortisol and genetic variance in the mineralocorticoid and glucocorticoid receptors. *Neuropsychopharmacology*, 32(6), 1295–1301. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.npp.1301260>.
- Lander, E. S. (2011). Initial impact of the sequencing of the human genome. *Nature*, 470(7333), 187–197. <http://dx.doi.org/10.1038/nature09792>.
- Le Menuet, D., & Lombes, M. (2014). The neuronal mineralocorticoid receptor: from cell survival to neurogenesis. *Steroids*, 91. <http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2014.05.018> pii:S0039-128X(14)00131-7.
- Le Menuet, D., Viengchareun, S., Penfornis, P., Walker, F., Zennaro, M. C., & Lombes, M. (2000). Targeted oncogenesis reveals a distinct tissue-specific utilization of alternative promoters of the human mineralocorticoid receptor gene in transgenic mice. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(11), 7878–7886.
- van Leeuwen, N., Bellingrath, S., de Kloet, E. R., Zitman, F. G., DeRijk, R. H., Kudielka, B. M., & Wust, S. (2011). Human mineralocorticoid receptor (MR) gene haplotypes modulate MR expression and transactivation: implication for the stress response. *Psychoneuroendocrinology*, 36(5), 699–709. <http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2010.10.003>. pii:S0306-4530(10)00262-3.
- van Leeuwen, N., Kumsta, R., Entringer, S., de Kloet, E. R., Zitman, F. G., DeRijk, R. H., & Wust, S. (2010). Functional mineralocorticoid receptor (MR) gene variation influences the cortisol awakening response after dexamethasone. *Psychoneuroendocrinology*, 35(3), 339–349. <http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2009.07.006>. pii:S0306-4530(09)00219-4.
- Lewis-Tuffin, L. J., & Cidlowski, J. A. (2006). The physiology of human glucocorticoid receptor beta (hGRbeta) and glucocorticoid resistance. *Annals of the New York Academy Sciences*, 1069, 1–9. <http://dx.doi.org/10.1196/annals.1351.001>.
- Lewis-Tuffin, L. J., Jewell, C. M., Bienstock, R. J., Collins, J. B., & Cidlowski, J. A. (2007). Human glucocorticoid receptor beta binds RU-486 and is transcriptionally active. *Molecular and Cellular Biology*, 27(6), 2266–2282. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.01439-06>.
- Listwak, S. J., Gold, P. W., & Whitfield, H. J., Jr. (1996). The human mineralocorticoid receptor gene promoter: its structure and expression. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 58(5–6), 495–506.
- Liu, Y. Z., Pei, Y. F., Guo, Y. F., Wang, L., Liu, X. G., Yan, H., ... Deng, H. W. (2009). Genome-wide association analyses suggested a novel mechanism for smoking behavior regulated by IL15. *Molecular Psychiatry*, 14(7), 668–680. <http://dx.doi.org/10.1038/mp.2009.3>. mp20093 [pii].
- Liu, J. Z., Tozzi, F., Waterworth, D. M., Pillai, S. G., Muglia, P., Middleton, L., ... Marchini, J. (2010). Meta-analysis and imputation refines the association of 15q25 with smoking quantity. *Nature Genetics*, 42(5), 436–440. <http://dx.doi.org/10.1038/ng.572>. ng.572 [pii].
- Liu, W., Wang, J., Sauter, N. K., & Pearce, D. (1995). Steroid receptor heterodimerization demonstrated in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 92(26), 12480–12484.
- Loukola, A., Wedenoja, J., Keskitalo-Vuokko, K., Broms, U., Korhonen, T., Ripatti, S., ... Kaprio, J. (2014). Genome-wide association study on detailed profiles of smoking behavior and nicotine dependence in a twin sample. *Molecular Psychiatry*, 19(5), 615–624. <http://dx.doi.org/10.1038/mp.2013.72>. mp201372 [pii].
- Lutfy, K., Aimiwu, O., Mangubat, M., Shin, C. S., Nerio, N., Gomez, R., ... Friedman, T. C. (2012). Nicotine stimulates secretion of corticosterone via both CRH and AVP receptors. *Journal of Neurochemistry*, 120(6), 1108–1116. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07633.x>.
- Martinerie, L., Munier, M., Le Menuet, D., Meduri, G., Viengchareun, S., & Lombes, M. (2013). The mineralocorticoid signaling pathway throughout development: expression, regulation and pathophysiological implications. *Biochimie*, 95(2), 148–157. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2012.09.030>. pii:S0300-9084(12)00390-2.
- McGue, M., Zhang, Y., Miller, M. B., Basu, S., Vrieze, S., Hicks, B., ... Iacono, W. G. (2013). A genome-wide association study of behavioral disinhibition. *Behavior Genetics*, 43(5), 363–373. <http://dx.doi.org/10.1007/s10519-013>.
- Meijsing, S. H., Pufall, M. A., So, A. Y., Bates, D. L., Chen, L., & Yamamoto, K. R. (2009). DNA binding site sequence directs glucocorticoid receptor structure and activity. *Science*, 324(5925), 407–410. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1164265>.
- Mendelson, J. H., Goletiani, N., Sholar, M. B., Siegel, A. J., & Mello, N. K. (2008). Effects of smoking successive low- and high-nicotine cigarettes on hypothalamic-pituitary-adrenal axis hormones and mood in men. *Neuropsychopharmacology*, 33(4), 749–760. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.npp.1301455>.
- Monahan, P. J., & Kelly, J. K. (2015). Epistasis is a major determinant of the additive genetic variance in *mimulus guttatus*. *PLoS Genetics*, 11(5), e1005201. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1005201>. PGENETICS-D-15-00240 [pii].
- Oakley, R. H., & Cidlowski, J. A. (2013). The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 132(5), 1033–1044. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2013.09.007>. pii:S0091-6749(13)01388-2.
- Oitzl, M. S., Champagne, D. L., van der Veen, R., & de Kloet, E. R. (2010). Brain development under stress: hypotheses of glucocorticoid actions revisited. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 34(6), 853–866. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2009.07.006>. pii:S0149-7634(09)00103-1.
- Panarelli, M., Holloway, C. D., Fraser, R., Connell, J. M., Ingram, M. C., Anderson, N. H., & Kenyon, C. J. (1998). Glucocorticoid receptor polymorphism, skin vasoconstriction, and other metabolic intermediate phenotypes in normal human subjects. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 83(6), 1846–1852. <http://dx.doi.org/10.1210/jcem.83.6.4828>.

- Pascual-Le Tallec, L., Demange, C., & Lombes, M. (2004). Human mineralocorticoid receptor A and B protein forms produced by alternative translation sites display different transcriptional activities. *European Journal of Endocrinology*, *150*(4), 585–590.
- Pascual-Le Tallec, L., & Lombes, M. (2005). The mineralocorticoid receptor: a journey exploring its diversity and specificity of action. *Molecular Endocrinology*, *19*(9), 2211–2221. <http://dx.doi.org/10.1210/me.2005-0089>.
- Prager, E. M., & Johnson, L. R. (2009). Stress at the synapse: signal transduction mechanisms of adrenal steroids at neuronal membranes. *Science Signaling*, *2*(86), re5. <http://dx.doi.org/10.1126/scisignal.286re5>.
- Rice, J. P., Hartz, S. M., Agrawal, A., Almasy, L., Bennett, S., Breslau, N., ... Bierut, L. J. (2012). CHRN3 is more strongly associated with Fagerstrom test for cigarette dependence-based nicotine dependence than cigarettes per day: phenotype definition changes genome-wide association studies results. *Addiction*, *107*(11), 2019–2028. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1360-0443.2012.03922.x>.
- Richards, J. M., Stipelman, B. A., Bornovalova, M. A., Daughters, S. B., Sinha, R., & Lejuez, C. W. (2011). Biological mechanisms underlying the relationship between stress and smoking: state of the science and directions for future work. *Biological Psychology*, *88*(1), 1–12. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsycho.2011.06.009>. pii:S0301-0511(11)00153-0.
- Robinson, S. F., Grun, E. U., Pauly, J. R., & Collins, A. C. (1996). Changes in sensitivity to nicotine and brain nicotinic receptors following chronic nicotine and corticosterone treatments in mice. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, *54*(3), 587–593. pii:0091-3057(95)02281-3.
- Rogausch, A., Kochen, M. M., Meineke, C., & Hennig, J. (2007). Association between the BclII glucocorticoid receptor polymorphism and smoking in a sample of patients with obstructive airway disease. *Addiction Biology*, *12*(1), 93–99. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1369-1600.2006.00045.x>.
- Rosmond, R., Chagnon, Y. C., Chagnon, M., Perusse, L., Bouchard, C., & Bjorntorp, P. (2000). A polymorphism of the 5'-flanking region of the glucocorticoid receptor gene locus is associated with basal cortisol secretion in men. *Metabolism*, *49*(9), 1197–1199. <http://dx.doi.org/10.1053/meta.2000.7712>. pii:S0026-0495(00)90112-4.
- van Rossum, E. F., & Lamberts, S. W. (2004). Polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene and their associations with metabolic parameters and body composition. *Recent Progress in Hormone Research*, *59*, 333–357.
- Rouge-Pont, F., Deroche, V., Le Moal, M., & Piazza, P. V. (1998). Individual differences in stress-induced dopamine release in the nucleus accumbens are influenced by corticosterone. *The European Journal of Neuroscience*, *10*(12), 3903–3907.
- Rovaris, D. L., Mota, N. R., Bertuzzi, G. P., Aroche, A. P., Callegari-Jacques, S. M., Guimaraes, L. S., ... Grassi-Oliveira, R. (2015). Corticosteroid receptor genes and childhood neglect influence susceptibility to crack/cocaine addiction and response to detoxification treatment. *Journal of Psychiatric Research*, *68*, 83–90. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpsychires.2015.06.008>. S0022-3956(15)00179-X [pii].
- Rovaris, D. L., Mota, N. R., Callegari-Jacques, S. M., & Bau, C. H. (2013). Approaching “phantom heritability” in psychiatry by hypothesis-driven gene-gene interactions. *Frontiers in Human Neuroscience*, *7*, 210. <http://dx.doi.org/10.3389/fnhum.2013.00210>.
- Rovaris, D. L., Mota, N. R., de Azeredo, L. A., Cupertino, R. B., Bertuzzi, G. P., Polina, E. R., ... Bau, C. H. (2013). MR and GR functional SNPs may modulate tobacco smoking susceptibility. *Journal of Neural Transmission*, *120*(10), 1499–1505. <http://dx.doi.org/10.1007/s00702-013-1012-2>.
- Saif, Z., Hodyl, N. A., Hobbs, E., Tuck, A. R., Butler, M. S., Osei-Kumah, A., & Clifton, V. L. (2014). The human placenta expresses multiple glucocorticoid receptor isoforms that are altered by fetal sex, growth restriction and maternal asthma. *Placenta*, *35*(4), 260–268. <http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2014.01.012>. pii:S0143-4004(14)00033-2.
- dos Santos, V. A., Chatkin, J. M., Bau, C. H., Paixao-Cortes, V. R., Sun, Y., Zamel, N., & Siminovich, K. (2012). Glutamate and synaptic plasticity systems and smoking behavior: results from a genetic association study. *PLoS One*, *7*(6), e38666. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0038666>. pii:PONE-D-11-13216.
- Sapolsky, R. M., Romero, L. M., & Munck, A. U. (2000). How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrine Reviews*, *21*(1), 55–89. <http://dx.doi.org/10.1210/edrv.21.1.0389>.
- Savory, J. G., Prefontaine, G. G., Lamprecht, C., Liao, M., Walther, R. F., Lefebvre, Y. A., & Hache, R. J. (2001). Glucocorticoid receptor homodimers and glucocorticoid-mineralocorticoid receptor heterodimers form in the cytoplasm through alternative dimerization interfaces. *Molecular and Cellular Biology*, *21*(3), 781–793. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.21.3.781-793.2001>.
- Schoneveld, O. J., Gaemers, I. C., & Lamers, W. H. (2004). Mechanisms of glucocorticoid signalling. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1680*(2), 114–128. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbaexp.2004.09.004>. pii:S0167-4781(04)00179-4.
- Siiskonen, S. J., Visser, L. E., Tiemeier, H., Hofman, A., Lamberts, S. W., Uitterlinden, A. G., & Stricker, B. H. (2009). BclII glucocorticoid receptor polymorphism and smoking in the general population. *Addiction Biology*, *14*(3), 349–355. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1369-1600.2009.00154.x>.
- Sinclair, D., Fullerton, J. M., Webster, M. J., & Shannon Weickert, C. (2012). Glucocorticoid receptor 1B and 1C mRNA transcript alterations in schizophrenia and bipolar disorder, and their possible regulation by GR gene variants. *PLoS One*, *7*(3), e31720. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0031720>. pii:PONE-D-11-22200.
- Sinha, R. (2008). Chronic stress, drug use, and vulnerability to addiction. *Annals of the New York Academy Sciences*, *1141*, 105–130. <http://dx.doi.org/10.1196/annals.1441.030>.
- Stevens, A., Ray, D. W., Zeggini, E., John, S., Richards, H. L., Griffiths, C. E., & Donn, R. (2004). Glucocorticoid sensitivity is determined by a specific glucocorticoid receptor haplotype. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *89*(2), 892–897. <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2003-031235>.
- Sutton, R. E., Koob, G. F., Le Moal, M., Rivier, J., & Vale, W. (1982). Corticotropin releasing factor produces behavioural activation in rats. *Nature*, *297*(5864), 331–333.
- TAG Consortium. (2010). Genome-wide meta-analyses identify multiple loci associated with smoking behavior. *Nature Genetics*, *42*(5), 441–447. <http://dx.doi.org/10.1038/ng.571>. ng.571 [pii].
- Thorgeirsson, T. E., Geller, F., Sulem, P., Rafnar, T., Wiste, A., Magnusson, K. P., ... Stefansson, K. (2008). A variant associated with nicotine dependence, lung cancer and peripheral arterial disease. *Nature*, *452*(7187), 638–642. <http://dx.doi.org/10.1038/nature06846>. nature06846 [pii].
- Thorgeirsson, T. E., Gudbjartsson, D. F., Surakka, I., Vink, J. M., Amin, N., Geller, F., ... Stefansson, K. (2010). Sequence variants at CHRN3-CHRNA6 and CYP2A6 affect smoking behavior. *Nature Genetics*, *42*(5), 448–453. <http://dx.doi.org/10.1038/ng.573>. ng.573 [pii].

- Trapp, T., Rupprecht, R., Castren, M., Reul, J. M., & Holsboer, F. (1994). Heterodimerization between mineralocorticoid and glucocorticoid receptor: a new principle of glucocorticoid action in the CNS. *Neuron*, *13*(6), 1457–1462. pii:0896-6273(94)90431-6.
- Turner, J. D., Alt, S. R., Cao, L., Vernocchi, S., Trifonova, S., Battello, N., & Muller, C. P. (2010). Transcriptional control of the glucocorticoid receptor: CpG islands, epigenetics and more. *Biochemical Pharmacology*, *80*(12), 1860–1868. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2010.06.037>. pii:S0006-2952(10)00471-5.
- Uhl, G. R., Drgon, T., Johnson, C., Ramoni, M. F., Behm, F. M., & Rose, J. E. (2010a). Genome-wide association for smoking cessation success in a trial of precessation nicotine replacement. *Molecular Medicine*, *16*(11–12), 513–526. <http://dx.doi.org/10.2119/molmed.2010.00052>. molmed.2010.00052 [pii].
- Uhl, G. R., Drgon, T., Johnson, C., Walther, D., David, S. P., Aveyard, P., ... Munafo, M. R. (2010b). Genome-wide association for smoking cessation success: participants in the patch in practice trial of nicotine replacement. *Pharmacogenomics*, *11*(3), 357–367. <http://dx.doi.org/10.2217/pgs.09.156>.
- Uhl, G. R., Liu, Q. R., Drgon, T., Johnson, C., Walther, D., & Rose, J. E. (2007). Molecular genetics of nicotine dependence and abstinence: whole genome association using 520,000 SNPs. *BMC Genetics*, *8*, 10. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2156-8-10>. 1471-2156-8-10 [pii].
- Uhl, G. R., Liu, Q. R., Drgon, T., Johnson, C., Walther, D., Rose, J. E., ... Lerman, C. (2008). Molecular genetics of successful smoking cessation: convergent genome-wide association study results. *Archives of General Psychiatry*, *65*(6), 683–693. <http://dx.doi.org/10.1001/archpsyc.65.6.683>. 65/6/683 [pii].
- Viengchareun, S., Le Menuet, D., Martinerie, L., Munier, M., Pascual-Le Tallec, L., & Lombes, M. (2007). The mineralocorticoid receptor: insights into its molecular and (patho)physiological biology. *Nuclear Receptor Signaling*, *5*, e012. <http://dx.doi.org/10.1621/nrs.05012>.
- Vink, J. M., Smit, A. B., de Geus, E. J., Sullivan, P., Willemsen, G., Hottenga, J. J., ... Boomsma, D. I. (2009). Genome-wide association study of smoking initiation and current smoking. *American Journal of Human Genetics*, *84*(3), 367–379. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.02.001>. S0002-9297(09)00062-7 [pii].
- Wand, G. S., Oswald, L. M., McCaul, M. E., Wong, D. F., Johnson, E., Zhou, Y., ... Kumar, A. (2007). Association of amphetamine-induced striatal dopamine release and cortisol responses to psychological stress. *Neuropsychopharmacology*, *32*(11), 2310–2320. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.npp.1301373>.
- Wang, K. S., Liu, X., Zhang, Q., & Zeng, M. (2012). ANAPC1 and SLCO3A1 are associated with nicotine dependence: meta-analysis of genome-wide association studies. *Drug and Alcohol Dependence*, *124*(3), 325–332. <http://dx.doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2012.02.003>. S0376-8716(12)00045-2 [pii].
- Wust, S., Van Rossum, E. F., Federenko, I. S., Koper, J. W., Kumsta, R., & Hellhammer, D. H. (2004). Common polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene are associated with adrenocortical responses to psychosocial stress. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *89*(2), 565–573. <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2003-031148>.
- Yoon, D., Kim, Y. J., Cui, W. Y., Van der Vaart, A., Cho, Y. S., Lee, J. Y., ... Park, T. (2012). Large-scale genome-wide association study of Asian population reveals genetic factors in FRMD4A and other loci influencing smoking initiation and nicotine dependence. *Human Genetics*, *131*(6), 1009–1021. <http://dx.doi.org/10.1007/s00439-011-1102-x>.
- Zennaro, M. C., Farman, N., Bonvalet, J. P., & Lombes, M. (1997). Tissue-specific expression of alpha and beta messenger ribonucleic acid isoforms of the human mineralocorticoid receptor in normal and pathological states. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *82*(5), 1345–1352. <http://dx.doi.org/10.1210/jcem.82.5.3933>.
- Zhou, Y., Proudnikov, D., Yuferov, V., & Kreek, M. J. (2010). Drug-induced and genetic alterations in stress-responsive systems: implications for specific addictive diseases. *Brain Research*, *1314*, 235–252. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2009.11.015>. pii:S0006-8993(09)02407-X.
- Zuk, O., Hechter, E., Sunyaev, S. R., & Lander, E. S. (2012). The mystery of missing heritability: genetic interactions create phantom heritability. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, *109*(4), 1193–1198. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1119675109>.

# 3

## Justificativa e Objetivos

### 3.1 Justificativa

O Brasil ultrapassou recentemente os Estados Unidos e se tornou o maior consumidor de crack no mundo. Essa epidemia é preocupante, pois o impacto da dependência de crack nos níveis individual e comunitário é devastador, estando essa droga relacionada com prostituição, violência urbana, marginalização social e morte precoce. Dessa forma, a identificação de fatores sociodemográficos e biológicos envolvidos no desenvolvimento e curso desse transtorno é uma demanda de saúde pública emergente no Brasil.

Como já mencionado no Capítulo 1 da presente Tese, há um grande número de evidências que colocam o estresse como um mecanismo biológico envolvido na DCC. Alterações na liberação de CRH, ACTH e cortisol geradas por hiper ou hipo-reatividade do eixo HPA parecem ter um papel fundamental tanto na iniciação, quanto na manutenção e recaída ao uso de drogas, incluindo cocaína e crack.

Além disso, o funcionamento do eixo HPA pode ser diferente em cada indivíduo, pois os genes que codificam proteínas que atuam nesse sistema são altamente polimórficos. Sendo assim, são necessárias investigações que busquem aprofundar a compreensão sobre o papel do sistema de estresse na neurobiologia da DCC, considerando polimorfismos com efeito funcional conhecido.

A grande maioria dos estudos genéticos da DCC investigam genes relacionados com a transmissão dopaminérgica, noradrenérgica, serotoninérgica e colinérgica. Por outro lado, estudos genéticos de associação envolvendo variações nos genes que codificam proteínas do eixo HPA,

como o GR, MR, CRHR1 e FKBP5, são escassos. Além disso, variações nesses genes podem estar envolvidas na modulação de marcadores biológicos investigados na DCC, como, por exemplo, os níveis periféricos de BDNF. Ainda, é possível que eventos traumáticos sofridos na infância mediem ou moderem os efeitos de polimorfismos do eixo HPA sobre o encurtamento dos telômeros, um evento biológico que é considerado uma marca (ou assinatura) do estresse.

Dessa forma, a avaliação das variantes genéticas do eixo HPA pode ajudar a explorar melhor o papel do estresse na DCC, tornando possível uma compreensão maior dos mecanismos biológicos envolvidos na etiologia, gravidade e resposta ao tratamento desse transtorno. No futuro, espera-se que a aplicação desse conhecimento na prática clínica poderá identificar os pacientes que estão em risco mais elevado de iniciação ao uso ou de recaída, contribuindo com medidas de intervenção personalizadas de acordo com o perfil genético dos pacientes.

## 3.2 Objetivo geral

Avaliar os efeitos de SNPs em genes que codificam proteínas do eixo HPA, trauma precoce, marcas moleculares do estresse e suas potenciais interações na dependência de crack.

### 3.2.1 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos de polimorfismos funcionais nos genes *NR3C2* (rs5522) e *NR3C1* (rs6198, rs41423247 e rs10052957) na susceptibilidade e gravidade da dependência de crack considerando efeitos de interação gene-gene (**Capítulo 4**).
- Avaliar os efeitos de polimorfismos funcionais nos genes *NR3C2* (rs5522) e *NR3C1* (rs6198, rs41423247 e rs10052957) na susceptibilidade e gravidade da dependência de crack considerando efeitos de interação gene-trauma precoce (**Capítulo 4**).
- Avaliar os efeitos de polimorfismos funcionais nos genes *NR3C2* (rs5522), *NR3C1* (rs6198, rs41423247 e rs10052957), *FKBP5* (rs1360780) e *CRHR1* (rs12944712, rs110402 e rs878886) na gravidade dos sintomas de depressão em dependentes de crack durante a abstinência precoce e tardia (**Capítulo 5**).
- Avaliar os efeitos de polimorfismos funcionais nos genes *NR3C2* (rs5522), *NR3C1* (rs6198, rs41423247 e rs10052957), *FKBP5* (rs1360780) e *CRHR1* (rs12944712, rs110402 e rs878886) na frequência de re-hospitalizações dos dependentes de crack durante um período de 2.5 anos de seguimento (**Capítulo 5**).

- Avaliar os efeitos de polimorfismos funcionais nos genes *NR3C1* (rs6198, rs41423247 e rs10052957), *BDNF* (rs6265) e *CRHR1* (rs12944712, rs110402 e rs878886) na susceptibilidade à dependência de crack, bem como suas influências sobre os níveis de BDNF de dependentes e indivíduos saudáveis (**Capítulo 6**).
- Avaliar os efeitos de polimorfismos funcionais nos genes *NR3C1* (rs6198, rs41423247 e rs10052957), *BDNF* (rs6265) e *CRHR1* (rs12944712, rs110402 e rs878886) nos níveis de BDNF de dependentes ao longo do tratamento de desintoxicação (**Capítulo 6**).
- Avaliar os efeitos de polimorfismos funcionais nos genes *NR3C2* (rs5522), *NR3C1* (rs6198, rs41423247 e rs10052957), *FKBP5* (rs1360780) e *CRHR1* (rs12944712, rs110402 e rs878886) sobre o tamanho de telômeros de dependentes de crack, bem como potenciais efeitos de mediação ou moderação entre trauma precoce e tamanho de telômeros no diagnóstico de depressão e gravidade dos sintomas de depressão ao longo do tratamento de desintoxicação (**Capítulo 7 e Capítulo 8**).
- Avaliar correlações entre polimorfismos funcionais nos genes *NR3C1* (rs6198, rs41423247 e rs10052957), *BDNF* (rs6265) e *CRHR1* (rs12944712, rs110402 e rs878886) e trauma precoce em dependentes de crack (**Capítulo 9**).
- Propor a criação de um consórcio nacional, chamado *COllaborative Case-Control INitiative (COCCaINE) in crack addiction*, para estudar a biologia da dependência de crack a partir da execução de varreduras genômica e epigenômica (**Capítulo 10**).

# Seção III

*“Os cultos sabem muito sobre os livros, mas não sabem nada sobre a vida”  
Príncipe Tochtli*

# 11

## Discussão geral

Avanços científicos recentes deixaram muito claro que a DCC é uma doença cerebral adquirida a partir de uma confluência de fatores genéticos, neurodesenvolvimentais e socioculturais. Dentro do modelo neurobiológico envolvido nos transtornos por uso de substâncias, o estresse tem uma posição bem definida, tendo implicações clínicas relevantes, como por exemplo, no *craving* por drogas (Volkow e Morales 2015; Castilla-Ortega et al. 2016; Volkow et al. 2016).

Embora a DCC represente um gravíssimo problema social e de saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento como o Brasil, a pesquisa sobre seus aspectos genéticos e moleculares ainda apresenta enormes lacunas. Dessa forma, a presente Tese de Doutorado pretende dar contribuições relevantes ao tema, além de tentar apontar para novas perspectivas de estudo. De uma maneira geral, os dados apresentados na Seção II mostraram que variantes genéticas do sistema de estresse e o trauma precoce parecem estar envolvidas em diversos aspectos clínicos da dependência de crack. Além disso, os resultados obtidos sugerem que a dependência atenua a resposta de biomarcadores, como níveis periféricos de BDNF e tamanho de telômeros, tanto aos efeitos da variabilidade genética em componentes do eixo HPA, como também da própria variação do humor, representada pelos sintomas de depressão dos pacientes. Em outras palavras, a dependência de crack parece colocar os indivíduos em uma situação de estresse crônico, tornando imperceptível os efeitos de outros elementos envolvidos na resposta ao estresse e/ou moduláveis pelo estresse, como variantes em genes do eixo HPA e marcas



moleculares, como o encurtamento dos telômeros. É importante ressaltar, que mesmo após o tratamento de desintoxicação, os resultados obtidos para os níveis de BDNF, por exemplo, mostraram que a dependência de crack pode estar vinculada a uma dissociação do esperado para uma resposta fisiológica normal do sistema de estresse. A partir daí emergem pontos fundamentais, como, por exemplo, a necessidade de um seguimento mais longo dos pacientes para tentar identificar se poderia (e quando poderia) ocorrer uma volta dos parâmetros biológicos aos correlatos típicos observados em indivíduos não dependentes de substâncias. Esta perspectiva também poderia ser acompanhada por estudos farmacológicos e bioquímicos, tanto em modelos animais como em humanos, tentando entender de que forma esse possível retorno a um padrão normal de referência se daria. Para melhor contextualizar as contribuições da presente Tese no contexto geral da literatura pré-existente, segue abaixo uma discussão geral.

### **11.1 Uma síntese dos resultados encontrados**

A proposição inicial de que a desregulação do sistema de estresse associada ao trauma precoce e ao componente genético contribui para a susceptibilidade e gravidade da dependência de cocaína e crack (DCC) foi construída a partir de uma série de evidências já descritas no Capítulo 1. Mais especificamente, a desregulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) parece ser um fator fundamental envolvido em todas as etapas do processo de dependência (Sinha 2013; Manetti et al. 2014). Como a herdabilidade da DCC é uma das mais elevadas dentre os transtornos por uso de substâncias, sendo estimada em 70% (Ducci e Goldman 2012), foi levantada a hipótese de que variantes funcionais em genes que codificam as proteínas envolvidas nas ações do eixo HPA poderiam estar implicadas na susceptibilidade e aspectos clínicos da DCC. Dessa forma, SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) funcionais localizados nos genes que codificam o receptor de mineralocorticoide (*NR3C2*), o receptor de glicocorticoide (*NR3C1*), a chaperona FK506 (*FKBP5*) e o receptor do hormônio liberador de corticotrofina (*CRHR1*) foram avaliados na presente Tese de Doutorado. As análises que exploraram os efeitos desses SNPs demonstraram influências significativas em variáveis relacionadas à gravidade da dependência de crack, como sintomas de abstinência e de depressão, além de associações com trauma precoce.

Além disso, foi demonstrado que SNPs nos genes *NR3C1* e *CRHR1* modulam os níveis de BDNF somente em indivíduos que não são dependentes, sugerindo que o impacto gerado pela dependência de crack nos níveis periféricos de BDNF torna essas associações indetectáveis nos indivíduos que são dependentes. Um padrão similar foi observado quando a associação entre

tamanho dos telômeros e depressão foi avaliada em pacientes dependentes de crack. Embora a relação de causalidade ainda não tenha sido determinada em análises de randomização mendeliana<sup>16</sup> (Wium-Andersen et al. 2017), a literatura aponta para uma associação significativa entre essa marca molecular do estresse e depressão (Schutte e Malouff 2015; Darrow et al. 2016; Lin et al. 2016; Ridout et al. 2016). Da mesma forma que para os níveis de BDNF, o impacto gerado pela dependência de crack no envelhecimento celular (Levandowski et al. 2016) parece tornar essa associação entre tamanho de telômeros e depressão indetectável nos dependentes.

Em relação à susceptibilidade, nenhum efeito significativo dos SNPs investigados foi observado. De qualquer forma, essas análises do tipo caso-controle puderam ser conduzidas somente em uma amostra de homens (280 casos *versus* 240 controles), limitando o poder estatístico do nosso estudo. Como já mencionado no Capítulo 4, coletar um grupo controle para uma amostra de dependentes de crack não é uma tarefa simples, já que, em um cenário ideal, os controles deveriam ser coletados nos mesmos bairros onde os casos vivem. Dessa forma, o projeto que envolveu mulheres foi desenhado para incluir somente casos e para acompanhá-las durante o tratamento de desintoxicação, enquanto que o projeto que coletou homens foi desenhado para também incluir controles coletados em locais de fácil exposição ao crack.

É importante ressaltar que o único estudo em paralelo que avaliou o efeito de SNPs do sistema de estresse na DCC encontrou associações nominais, incluindo para um SNP localizado no gene *NR3C2* (Levrant et al. 2014). O tamanho amostral investigado nesse estudo também foi pequeno e considerando-se o grande número de polimorfismos avaliados, fez-se necessária uma correção para múltiplos testes bem rigorosa. Por outro lado, em um grande estudo de associação por varredura genômica (GWAS), que incluiu  $\approx 12$  mil casos e controles, algumas associações significativas em nível genômico foram reveladas, incluindo para um SNP no gene *NCOR2* (*nuclear receptor corepressor 2*) (Gelernter et al. 2014), codificante de uma proteína que regula a função de receptores nucleares, incluindo os receptores de mineralocorticoide e de glicocorticoide (Yang e Young 2009; Glass e Saijo 2010). Assim, não é possível descartar o envolvimento do sistema de estresse na susceptibilidade à DCC. Análises em amostras maiores, incluindo outras abordagens estatísticas, como, por exemplo, *gene set* e escores de risco poligênico, poderão ajudar a refutar ou não envolvimento de variantes em genes do sistema de estresse na etiologia da DCC.

## 11.2 As interações gene-gene, o tabagismo e a cocaína fumada

Como descrito no Capítulo 2, os genes avaliados na presente Tese codificam proteínas que obrigatoriamente interagem durante a realização de suas ações. Dessa forma, interações entre

SNPs nos genes que codificam essas proteínas são eventos plausíveis. De fato, esse trabalho reportou uma interação entre SNPs nos genes *NR3C2* (rs5522) e *NR3C1* (rs6198), associada com a gravidade dos sintomas de abstinência medidos ao longo do tratamento de desintoxicação das dependentes de crack. De acordo com essa interação, a presença concomitante dos alelos de risco dos dois SNPs confere menores sintomas de abstinência. Além disso, um padrão similar de associação foi encontrado em um estudo prévio, na qual essa mesma combinação genotípica foi associada com proteção contra o tabagismo na população geral (Rovaris et al. 2013).

É importante ressaltar que a frequência de tabagismo atual nas amostras investigadas é extremamente alta, ultrapassando 85%. Dessa forma, esses dados de interação gene-gene levantam algumas perguntas: o efeito observado na dependência de crack é carregado pela alta prevalência de tabagismo? No Capítulo 1 algumas diferenças sociodemográficas e clínicas entre dependentes de cocaína em pó e de crack foram descritas. Será que existe uma biologia diferente entre a dependência de cocaína aspirada e a dependência de crack? Considerando que na dependência de crack a cocaína é fumada, será que há uma “genética da via de administração”?

Um fato interessante envolve o único SNP que tem sido consistentemente replicado em estudos de associação do tipo gene candidato na dependência de cocaína. Como descrito no Capítulo 1, esse SNP, localizado no gene de uma subunidade do receptor nicotínico colinérgico (rs16969968), foi associado com dependência de cocaína em pó em três estudos (Grucza et al. 2008; Saccone et al. 2008; Sherva et al. 2010), gerando um valor-P combinado de  $7,64 \times 10^{-5}$  (Bühler et al. 2015). Embora o alelo menos frequente desse SNP (alelo A) apresente um efeito protetor contra a dependência de cocaína em pó, ele está fortemente associado com risco para o desenvolvimento de tabagismo (17 estudos, valor-P combinado =  $1,6 \times 10^{-31}$ ) (Bühler et al. 2015).

Nenhum estudo avaliou o efeito do rs16969968 em uma amostra composta somente por dependentes de crack, podendo essa análise ser usada como uma ferramenta para explorar a possibilidade de uma genética da via de administração ou de uma biologia diferenciada entre a dependência de cocaína em pó e a dependência de crack. Em outras palavras, esse SNP poderia estar associado com risco para dependência de crack e não com proteção, fortalecendo o efeito derivado da “via fumada”, ou a até mesmo do tabagismo. Entretanto, dados preliminares obtidos nas nossas amostras vão contra essa possibilidade, já que um efeito significativo para o genótipo AA desse SNP, conferindo proteção contra a dependência de crack, foi encontrado.

Uma possibilidade a ser investigada nessa relação entre o tabagismo e a dependência de crack é se essa frequência extremamente alta de tabagismo observada nos dependentes de crack está mais relacionada com um contexto ambiental da dependência de crack do que com o

*background* genético. É possível que antes que a DCC se estabeleça, a frequência de tabagismo nesse grupo de indivíduos seja similar a de amostras de indivíduos com comportamentos externalizadores, ou até mesmo mais próxima da população geral. Assim, o efeito do rs16969968 sobre o tabagismo seria irrelevante na dependência de crack e a interação descrita entre os genes *NR3C2* e *NR3C1* poderia estar relacionada com dependência química em geral.

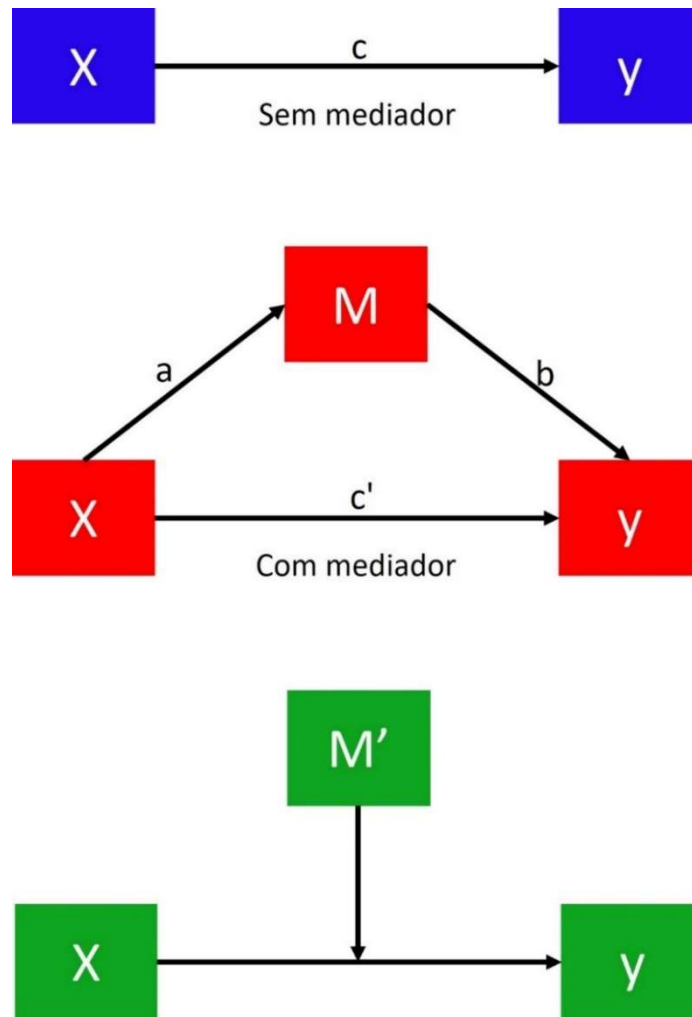
### 11.3 As interações gene-ambiente e a não existência delas

Como descrito no Capítulo 1, interações gene-ambiente podem estar envolvidas no mistério da herdabilidade perdida dos transtornos mentais, podendo responder por uma fração significativa da lacuna observada entre a herdabilidade estimada a partir de estudos com gêmeos e a herdabilidade molecular estimada a partir de SNPs. No Capítulo 4, uma possível interação entre o gene *NR3C2* e a negligência sofrida na infância foi associada, na amostra de mulheres, com susceptibilidade para a dependência de crack. De qualquer forma, essa análise foi realizada a partir de uma abordagem *case-only*. Como descrito nos métodos do Capítulo 4, uma premissa básica para que uma análise de interação gene-ambiente do tipo *case-only* seja confiável diz respeito a ausência de associação entre o fator genético e o fator de exposição, nesse caso a negligência. Como não há na literatura achados que mostrem associações diretas entre os SNPs investigados e negligência sofrida na infância, os resultados foram discutidos como sendo um desvio da linearidade, ou seja, uma interação. De qualquer forma, a possibilidade de que isso represente uma correlação em vez de uma interação gene-ambiente não pode ser descartada.

Assim, no Capítulo 9, essas análises foram revisitadas, dessa vez em uma amostra maior, além de serem realizadas análises adicionais e inclusão de SNPs no gene *CRHR1*. Os resultados mostrados no capítulo 4 se mantiveram significativos e novos achados foram obtidos com a amostra maior. A partir disso, a possibilidade de que esses dados representem correlações gene-ambiente do tipo evocativa foi melhor discutida (Jaffee e Price 2008). De fato, a literatura mostra que a desregulação do sistema de estresse está associada com comportamentos externalizadores em crianças, como, por exemplo, impulsividade, hiperatividade e agressividade (McBurnett et al. 2000; Kariyawasam et al. 2002; Isaksson et al. 2013; Kohrt et al. 2015), que, por sua vez, poderiam estar relacionados a uma incidência maior de maus-tratos na infância.

Esses dados têm implicações muito relevantes nas pesquisas que avaliam o impacto dos maus-tratos sofridos na infância sobre o curso clínico da DCC (e de outras dependências químicas). Levando em consideração que a propensão de reportar eventos traumáticos sofridos na infância tem uma estimativa de herdabilidade moderada (0.36; Kendler e Baker 2007), é

possível que os efeitos dos maus-tratos sejam confundidos pelo *background* genético e, dessa forma, modelos de mediação seriam mais explicativos do que modelos de interação gene-ambiente (Figura 5). Além disso, estudos que tenham como objetivo avaliar o efeito do trauma precoce sobre características clínicas ou marcadores biológicos da DCC só conseguirão isolar os efeitos diretos do trauma, quando efeitos indiretos dos genótipos forem removidos nas análises.



**Figura 5** – Modelos estatísticos que consideram o efeito de uma terceira variável. No esquema em azul, a variável *X* está associada diretamente com a variável *Y*. No esquema em vermelho, o efeito de *X* em *Y* é parcialmente explicado por uma terceira variável *M* (mediadora). Já no esquema em verde, o efeito de *X* em *Y* é modificado por uma variável terceira variável *M'* (moderadora). Uma breve revisão sobre os conceitos de mediação e interação/moderação pode ser encontrada em Hinshaw (2007).

### 11.3 As marcas moleculares do estresse

A presente Tese de Doutorado teve como objetivos explorar relações entre marcas moleculares do estresse e os desfechos clínicos da dependência de crack. Dois parâmetros foram selecionados, o tamanho dos telômeros, medido a partir de leucócitos, e a estimativa de

metilação global do DNA, também medida a partir de leucócitos totais. Por questões de padronização da técnica, a estimativa de metilação global do DNA não pôde ser incluída na Tese.

No caso do tamanho dos telômeros, além dos resultados negativos de associação entre essa marca molecular e depressão apresentados no Capítulo 7, e já mencionados no início da discussão, resultados adicionais relevantes apresentados no Capítulo 8 mostram que a relação entre trauma precoce e tamanho dos telômeros parece ser muito complexa. Como mencionado no Capítulo 1, a literatura aponta que o trauma precoce está associado com essa marca molecular (Shalev et al. 2013; Ridout et al. 2015). De qualquer forma, nossos dados mostram que fatores genéticos podem adicionar complexidade nessa relação, algo esperado, já que a herdabilidade do tamanho dos telômeros é bastante alta, sendo estimada em 70% (Broer et al. 2013).

No capítulo 8, uma interação significativa entre o rs41423247 no gene *NR3C1* e negligência sofrida na infância foi associada com tamanho dos telômeros na amostra de mulheres dependentes de crack. Curiosamente, o efeito de envelhecimento celular acelerado associado com trauma precoce descrito na literatura só foi observado no grupo de portadores do alelo C, enquanto que para homozigotos GG, o efeito foi o oposto. Cabe lembrar que no Capítulo 9, o genótipo GG do rs41423247 foi associado com abuso físico. Embora a interação descrita no Capítulo 8 tenha sido com negligência, principalmente, negligência física sofrida na infância, não se pode descartar a hipótese de que esse resultado de telômeros maiores observado em pacientes homozigotos GG com histórico de negligência na infância esteja sendo influenciado pela presença concomitante de abuso físico em uma fração de pacientes desse subgrupo. Além disso, é importante destacar que a falta de associação direta do rs41423247 com tamanho de telômeros descarta a possibilidade de um efeito de mediação (Hinshaw 2007).

## 11.4 As perspectivas e os próximos passos

Como mencionado no Capítulo 1, poucos estudos avaliaram a influência de fatores genéticos especificamente na dependência de crack, embora, um número considerável de trabalhos tenha focado na dependência de cocaína em pó. No caso de variantes em genes do sistema de estresse, a escassa literatura disponível até o momento é fruto da presente Tese de Doutorado. Ainda assim, as análises, abordagens e resultados aqui apresentados representam poucas peças de um grande quebra-cabeças de associações e relações entre variáveis que estão envolvidas na etiologia e curso clínico da dependência de crack. Embora o primeiro grande GWAS na DCC (Gelernter et al. 2014) tenha trazido alguns *insights* em termos de caminhos biológicos, ainda estamos longe de entender mais profundamente a herdabilidade desse transtorno.

Como descrito no Capítulo 10, um consórcio chamado *COllaborative Case-Control INitiative in crack addiction* (COCCaINE) pretende contribuir na compreensão dos fatores ambientais e biológicos envolvidos na dependência de crack. O COCCaINE surgiu durante a execução da presente Tese e já teve sua aprovação concedida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (Apêndice 1). A partir de colaborações entre grupos brasileiros focados em estudar a dependência de crack, esse projeto pretende, nos próximos anos, alcançar um tamanho amostral suficientemente grande que possibilite a realização de análises em uma escala genômica.

Esse projeto colaborativo terá como objetivo principal explorar de que modo variáveis ambientais, incluindo o trauma precoce, modulam juntamente com a genética o curso clínico da dependência de crack. Muitas abordagens poderão ser realizadas a partir da obtenção dos dados propostos pelo COCCaINE, como, por exemplo, a investigação em larga escala de variantes genéticas associadas com trauma em casos e controles. Esse tipo de análise será fundamental para entender como as relações entre trauma precoce e genética devem ser modeladas, já que, a partir dos dados da presente Tese, pode-se concluir que essas relações são muito complexas.

Por fim, é importante reconhecer que as contribuições que a ciência pode oferecer a um tema tão complexo e relevante como a dependência de crack implica esforços de colaboração e internacionalização nas mais variadas linhas de pesquisa clínica e biológica a serem seguidas. Dessa forma, as investigações que serão realizadas no futuro pelo nosso grupo e por outros grupos parceiros poderão explorar ainda mais o papel do ambiente e da genética na dependência de crack. Isso contribuirá para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas e planos de terapia individualizados, fazendo com que pacientes que sofrem as consequências negativas desse transtorno possam receber o acompanhamento adequado, que ao final, é o maior objetivo.

## Referências

Broer L, Codd V, Nyholt DR, Deelen J, Mangino M, Willemsen G, Albrecht E, Amin N, Beekman M, de Geus EJC et al. (2013) Meta-analysis of telomere length in 19,713 subjects reveals high heritability, stronger maternal inheritance and a paternal age effect. *Eur J Hum Genet* 21:1163–8. doi: 10.1038/ejhg.2012.303

Bühler K-M, Giné E, Echeverry-Alzate V, Calleja-Conde J, de Fonseca FR and López-Moreno JA (2015) Common single nucleotide variants underlying drug addiction: more than a decade of research. *Addict Biol* 20:845–71. doi: 10.1111/adb.12204

Castilla-Ortega E, Serrano A, Blanco E, Araos P, Suárez J, Pavón FJ, Rodríguez de Fonseca F and Santín LJ (2016) A place for the hippocampus in the cocaine addiction circuit: Potential roles for adult hippocampal neurogenesis. *Neurosci Biobehav Rev* 66:15–32. doi: 10.1016/j.neubiorev.2016.03.030

Darrow SM, Verhoeven JE, Révész D, Lindqvist D, Penninx BWJH, Delucchi KL, Wolkowitz OM and Mathews CA (2016) The Association Between Psychiatric Disorders and Telomere Length: A Meta-Analysis Involving 14,827 Persons. *Psychosom Med* 78:776–87. doi: 10.1097/PSY.0000000000000356

Ducci F and Goldman D (2012) The genetic basis of addictive disorders. *Psychiatr Clin North Am* 35:495–519. doi: 10.1016/j.psc.2012.03.010

Gelernter J, Sherva R, Koesterer R, Almasy L, Zhao H, Kranzler HR and Farrer L (2014) Genome-wide association study of cocaine dependence and related traits: FAM53B identified as a risk gene. *Mol Psychiatry* 19:717–23. doi: 10.1038/mp.2013.99

Glass CK and Saijo K (2010) Nuclear receptor transrepression pathways that regulate inflammation in macrophages and T cells. *Nat Rev Immunol* 10:365–76. doi: 10.1038/nri2748

Grucza RA, Wang JC, Stitzel JA, Hinrichs AL, Saccone SF, Saccone NL, Bucholz KK, Cloninger CR, Neuman RJ, Budde JP et al. (2008) A risk allele for nicotine dependence in CHRNA5 is a protective allele for cocaine dependence. *Biol Psychiatry* 64:922–9. doi: 10.1016/j.biopsych.2008.04.018

Hinshaw SP (2007) Moderators and Mediators of Treatment Outcome for Youth With ADHD: Understanding for Whom and How Interventions Work. *J Pediatr Psychol* 32:664–675. doi: 10.1093/jpepsy/jsl055

Isaksson J, Nilsson KW and Lindblad F (2013) Early psychosocial adversity and cortisol levels in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Eur Child Adolesc Psychiatry*



22:425–432. doi: 10.1007/s00787-013-0383-0

Jaffee SR and Price TS (2008) Genotype-environment correlations: implications for determining the relationship between environmental exposures and psychiatric illness.

*Psychiatry* 7:496–499. doi: 10.1016/j.mppsy.2008.10.002

Kariyawasam SH, Zaw F and Handley SL (2002) Reduced salivary cortisol in children with comorbid Attention deficit hyperactivity disorder and oppositional defiant disorder. *Neuro Endocrinol Lett* 23:45–8.

Kendler KS and Baker JH (2007) Genetic influences on measures of the environment: a systematic review. *Psychol Med* 37:615–26. doi: 10.1017/S0033291706009524

Kohrt BA, Hruschka DJ, Kohrt HE, Carrion VG, Waldman ID and Worthman CM (2015) Child abuse, disruptive behavior disorders, depression, and salivary cortisol levels among institutionalized and community-residing boys in Mongolia. *Asia-Pacific Psychiatry* 7:7–19. doi: 10.1111/appy.12141

Levandowski ML, Tractenberg SG, de Azeredo LA, De Nardi T, Rovaris DL, Bau CHD, Rizzo LB, Maurya PK, Brietzke E, Tyrka AR et al. (2016) Crack cocaine addiction, early life stress and accelerated cellular aging among women. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 71:83–89. doi: 10.1016/j.pnpbp.2016.06.009

Levrán O, Randesi M, Li Y, Rotrosen J, Ott J, Adelson M and Kreek MJ (2014) Drug addiction and stress-response genetic variability: association study in African Americans. *Ann Hum Genet* 78:290–8. doi: 10.1111/ahg.12064

Lin P-Y, Huang Y-C and Hung C-F (2016) Shortened telomere length in patients with depression: A meta-analytic study. *J Psychiatr Res* 76:84–93. doi: 10.1016/j.jpsychires.2016.01.015

Manetti L, Cavagnini F, Martino E and Ambrogio A (2014) Effects of cocaine on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Endocrinol Invest* 37:701–8. doi: 10.1007/s40618-014-0091-8

McBurnett K, Lahey BB, Rathouz PJ and Loeber R (2000) Low salivary cortisol and persistent aggression in boys referred for disruptive behavior. *Arch Gen Psychiatry* 57:38–43.

Ridout KK, Ridout SJ, Price LH, Sen S and Tyrka AR (2016) Depression and telomere length: A meta-analysis. *J Affect Disord* 191:237–47. doi: 10.1016/j.jad.2015.11.052

Ridout SJ, Ridout KK, Kao H-T, Carpenter LL, Philip NS, Tyrka AR and Price LH (2015) Telomeres, early-life stress and mental illness. *Adv Psychosom Med* 34:92–108. doi: 10.1159/000369088

Rovaris DL, Mota NR, de Azeredo LA, Cupertino RB, Bertuzzi GP, Polina ER, Contini V, Kortmann GL, Vitola ES, Grevet EH et al. (2013) MR and GR functional SNPs may modulate tobacco smoking susceptibility. *J Neural Transm* 120:1499–505. doi: 10.1007/s00702-013-1012-2

Saccone NL, Saccone SF, Goate AM, Gruzca RA, Hinrichs AL, Rice JP and Bierut LJ (2008) In search of causal variants: refining disease association signals using cross-population contrasts. *BMC Genet* 9:58. doi: 10.1186/1471-2156-9-58

Schutte NS and Malouff JM (2015) The association between depression and leukocyte telomere length: a meta-analysis. *Depress Anxiety* 32:229–38. doi: 10.1002/da.22351

Shalev I, Entringer S, Wadhwa PD, Wolkowitz OM, Puterman E, Lin J and Epel ES (2013) Stress and telomere biology: a lifespan perspective. *Psychoneuroendocrinology* 38:1835–42. doi: 10.1016/j.psyneuen.2013.03.010

Sherva R, Kranzler HR, Yu Y, Logue MW, Poling J, Arias AJ, Anton RF, Oslin D, Farrer LA and Gelernter J (2010) Variation in nicotinic acetylcholine receptor genes is associated with multiple substance dependence phenotypes. *Neuropsychopharmacology* 35:1921–31. doi: 10.1038/npp.2010.64

Sinha R (2013) Chapter 23 – Stress and Addiction. *Principles of Addiction*. pp 223–234

Volkow ND, Koob GF and McLellan AT (2016) Neurobiologic Advances from the Brain Disease Model of Addiction. *N Engl J Med* 374:363–371. doi: 10.1056/NEJMra1511480

Volkow ND and Morales M (2015) The Brain on Drugs: From Reward to Addiction. *Cell* 162:712–725. doi: 10.1016/j.cell.2015.07.046

Wium-Andersen MK, Ørsted DD, Rode L, Bojesen SE and Nordestgaard BG (2017) Telomere length and depression: prospective cohort study and Mendelian randomisation study in 67 306 individuals. *Br J Psychiatry* 210:31–38. doi: 10.1192/bjp.bp.115.178798

Yang J and Young MJ (2009) The mineralocorticoid receptor and its coregulators. *J Mol Endocrinol* 43:53–64. doi: 10.1677/JME-09-0031

12

Glossário

## **1. Sistema dopaminérgico mesocorticolímbico**

O sistema mesocorticolímbico é o cerne do sistema de recompensa, sendo rico em neurônios que liberam dopamina, localizados na área tegmental ventral. As projeções dopaminérgicas desse sistema conectam a área tegmental ventral ao córtex pré-frontal e ao núcleo accumbens (Figura 6). A cocaína e outras drogas psicoativas potencializam a transmissão dopaminérgica no sistema mesocorticolímbico a partir dos seus efeitos no transportador de dopamina (Kelley e Berridge 2002; Castilla-Ortega et al. 2016).

## **2. Modulador alostérico negativo**

É uma substância que se liga em um sítio diferente (alostérico) do sítio ao qual se liga o agonista (ortostérico), resultando na inibição dos efeitos do ligante ortostérico (Schwartz and Holst 2007). A dopamina é o modulador ortostérico do transportador de dopamina, enquanto que a cocaína é o modulador alostérico que inibe esse transportador.

## **3. Atividade locomotora**

O teste de atividade locomotora avalia a reação natural de ratos e camundongos a espaços abertos. É um experimento muito utilizado na área de dependência química, pois muitas drogas psicoativas afetam diretamente a atividade motora (Curzon et al. 2009).

## **4. Núcleo accumbens**

O núcleo accumbens participa do processamento cognitivo da aversão, motivação e recompensa. Assim, essa estrutura está envolvida com o prazer e o reforço positivo. O núcleo accumbens recebe projeções dopaminérgicas da área tegmental ventral e alterações nessa estrutura ocorrem durante o estabelecimento da dependência de cocaína, estando também envolvido na recaída ao uso da droga (Korpi et al. 2015).

## **5. Preferência condicionada por lugar**

O teste de preferência condicionada por lugar é utilizado para estudar em roedores as propriedades de recompensa e efeitos aversivos de drogas. As características básicas deste experimento envolvem a associação de um ambiente particular com uma droga, seguida da associação de um ambiente diferente com a ausência dela (Prus et al. 2009).

## 6. Terapia cognitiva e comportamental

A terapia cognitiva e comportamental consiste em um grupo de intervenções baseadas em evidências utilizadas no tratamento de transtornos mentais. Essas intervenções têm a premissa básica de que as doenças mentais são mantidas por fatores cognitivos. Dessa forma, esse tratamento usa estratégias terapêuticas para mudar as “cognições desajustadas” que resultaram em comportamentos problemáticos (Hofmann et al. 2012). O manejo de contingências, por exemplo, é uma abordagem da terapia cognitiva e comportamental que visa modificar o comportamento do indivíduo ao reforçar comportamentos desejados e punir comportamentos indesejáveis. Tem sido empregado na tentativa de manter a abstinência em usuários de drogas (Kolling et al. 2011).

## 7. Psicoterapia interpessoal

A psicoterapia interpessoal é fundamentada em um modelo biopsicossocial para compreensão dos transtornos mentais, estabelecendo que a doença é o resultado da interação de fatores biológicos e interpessoais. Esse tipo de tratamento tem como objetivo aliviar o sofrimento a partir da melhora do funcionamento interpessoal (Mello et al. 2011).

## 8. Amígdala

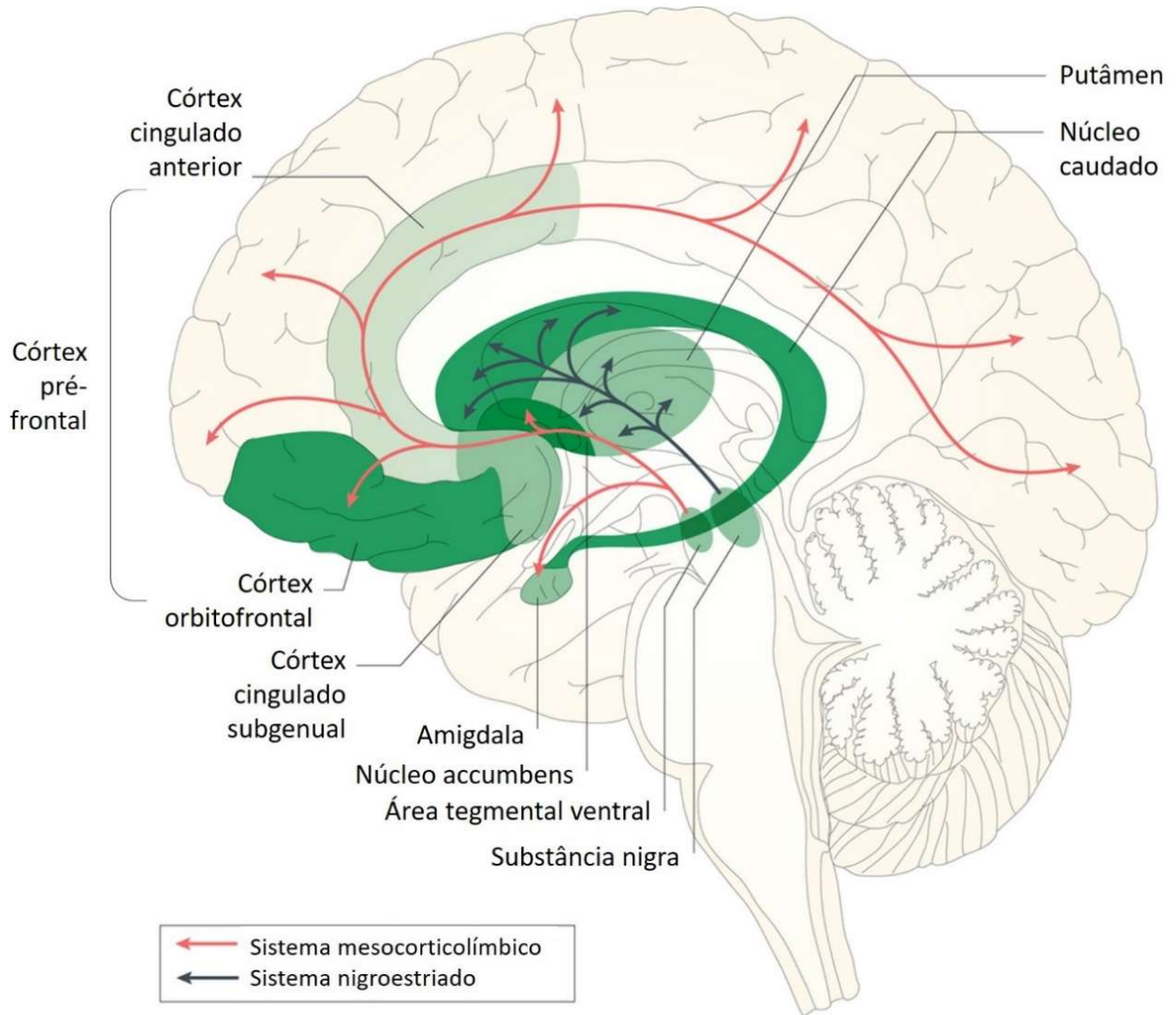
A amígdala (Figura 6) participa dos processos de formação de memórias, tomada de decisões e geração de emoções. Essa estrutura está envolvida na consolidação de memórias relacionadas às drogas de abuso (Goodman e Packard 2016).

## 9. Hipocampo

O hipocampo é uma estrutura fundamental para a consolidação de memórias de curto prazo em memórias de longo prazo, estando envolvido no *craving* por cocaína, na aquisição do comportamento de busca pela droga e na manutenção e extinção desse comportamento depois que ele é aprendido (Castilla-Ortega et al. 2016).

## 10. Córtex pré-frontal

O córtex pré-frontal (Figura 6) é essencial para o desenvolvimento de funções executivas. A literatura aponta que a cocaína pode induzir uma hipoexcitabilidade em áreas corticais frontais envolvidas com cognição e gerar deficiências no controle inibitório em indivíduos dependentes dessa droga (Korpi et al. 2015; Bisagno et al. 2016).



Nature Reviews | Neuroscience

**Figura 6** – O sistema dopaminérgico mesocorticolímbico. Adaptado de Teicher et al. (2016).

## 11. Corpo estriado dorsal

O estriado é uma região cerebral que contém o núcleo caudado, putâmen e o núcleo accumbens, sendo subdividido em corpo estriado ventral (contendo o núcleo accumbens) e corpo estriado dorsal (contendo o núcleo caudado e o putâmen) (Figura 6). Essas estruturas fazem parte do sistema de recompensa e, por conta disso, são bastante estudadas na dependência de cocaína. O estriado dorsal tem um papel importante na transição do consumo voluntário para o consumo involuntário de drogas, já que ele está envolvido na formação de hábitos (Korpi et al. 2015; Castilla-Ortega et al. 2016).

## 12. Área tegmental ventral

A área tegmental ventral (Figura 6) está envolvida em uma série de funções, incluindo o processamento de informações emocionais e sensoriais, controle do comportamento

motivacional e humor. Como essa estrutura é rica em neurônios dopaminérgicos que se projetam para outras áreas cerebrais (ex. amígdala, hipocampo e córtex pré-frontal) e ela está envolvida nos efeitos de recompensa gerados pelos psicoestimulantes, ela é muito estudada na dependência de cocaína (Sanchez-Catalan et al. 2014; Korpi et al. 2015).

### **13. Sensibilização comportamental**

A exposição repetida a drogas de abuso aumenta a resposta a estas drogas, um fenômeno chamado de sensibilização comportamental (Steketee e Kalivas 2011).

### **14. Incubação de *craving***

A síndrome de *craving* de início tardio desenvolve ou "incuba" durante os primeiros meses de abstinência de cocaína (Pickens et al. 2011)

### **15. Exposoma**

O exposoma abrange a totalidade das exposições ambientais humanas, isto é, não genéticas. Dessa forma, o exposoma interage com o genoma (Blackburn et al. 2015).

### **16. Randomização mendeliana**

O princípio básico utilizado na randomização mendeliana é que variantes genéticas que alteram o nível ou refletem os efeitos biológicos de uma exposição ambiental (ex. SNPs associados com tabagismo) devem estar relacionadas ao risco de doença (ex. depressão) na medida prevista pela sua influência no fator ambiental (Smith e Ebrahim 2008).

## Referências

Bisagno V, González B and Urbano FJ (2016) Cognitive enhancers versus addictive psychostimulants: The good and bad side of dopamine on prefrontal cortical circuits. *Pharmacol Res* 109:108–118. doi: 10.1016/j.phrs.2016.01.013

Blackburn EH, Epel ES and Lin J (2015) Human telomere biology: A contributory and interactive factor in aging, disease risks, and protection. *Science* 350:1193–8. doi: 10.1126/science.aab3389

Castilla-Ortega E, Serrano A, Blanco E, Araos P, Suárez J, Pavón FJ, Rodríguez de Fonseca F and Santín LJ (2016) A place for the hippocampus in the cocaine addiction circuit: Potential roles for adult hippocampal neurogenesis. *Neurosci Biobehav Rev* 66:15–32. doi: 10.1016/j.neubiorev.2016.03.030

Curzon P, Zhang M, Radek RJ and Fox GB (2009) *The Behavioral Assessment of Sensorimotor Processes in the Mouse: Acoustic Startle, Sensory Gating, Locomotor Activity, Rotarod, and Beam Walking*. CRC Press/Taylor & Francis

Goodman J and Packard MG (2016) Memory Systems and the Addicted Brain. *Front Psychiatry* 7:24. doi: 10.3389/fpsy.2016.00024

Hofmann SG, Asnaani A, Vonk IJJ, Sawyer AT and Fang A (2012) The Efficacy of Cognitive Behavioral Therapy: A Review of Meta-analyses. *Cognit Ther Res* 36:427–440. doi: 10.1007/s10608-012-9476-1

Kelley AE and Berridge KC (2002) The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs. *J Neurosci* 22:3306–11. doi: 20026361

Kolling N de M, Petry M and Melo WV (2011) Outras abordagens no tratamento da dependência do crack. *Rev Bras Ter Cogn* 7:7–14.

Korpi ER, den Hollander B, Farooq U, Vashchinkina E, Rajkumar R, Nutt DJ, Hyttiä P and Dawe GS (2015) Mechanisms of Action and Persistent Neuroplasticity by Drugs of Abuse. *Pharmacol Rev* 67:872–1004. doi: 10.1124/pr.115.010967

Mello RAC, Pupo MC and Feijó M (2011) Terapia interpessoal: teoria, formação e prática clínica em um serviço de pesquisa e atendimento em violência. *Rev Bras Psicoter* 13:14–25.

Pickens CL, Airavaara M, Theberge F, Fanous S, Hope BT and Shaham Y (2011) Neurobiology of the incubation of drug craving. *Trends Neurosci* 34:411–420. doi: 10.1016/j.tins.2011.06.001

Prus AJ, James JR and Rosecrans JA (2009) *Conditioned Place Preference*. CRC Press/Taylor & Francis



Sanchez-Catalan MJ, Kaufling J, Georges F, Veinante P and Barrot M (2014) The antero-posterior heterogeneity of the ventral tegmental area. *Neuroscience* 282:198–216. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.09.025

Schwartz TW and Holst B (2007) Allosteric enhancers, allosteric agonists and ago-allosteric modulators: where do they bind and how do they act? *Trends Pharmacol Sci* 28:366–373. doi: 10.1016/j.tips.2007.06.008

Smith GD and Ebrahim S (2008) Mendelian Randomization: Genetic Variants as Instruments for Strengthening Causal Inference in Observational Studies.

Steketee JD and Kalivas PW (2011) Drug wanting: behavioral sensitization and relapse to drug-seeking behavior. *Pharmacol Rev* 63:348–65. doi: 10.1124/pr.109.001933

Teicher MH, Samson JA, Anderson CM and Ohashi K (2016) The effects of childhood maltreatment on brain structure, function and connectivity. *Nat Rev Neurosci* 17:652–666. doi: 10.1038/nrn.2016.111

13

Outras produções científicas

**Publicado como:** Silva KL, **Rovaris DL**, Guimarães-da-Silva PO, Victor MM, Salgado CA, Vitola ES, Contini V, Bertuzzi G, Picon FA, Karam RG, Belmonte-de-Abreu P, Rohde LA, Grevet EH, Bau CH. Could comorbid bipolar disorder account for a significant share of executive function deficits in adults with attention-deficit hyperactivity disorder? *Bipolar Disord.* 2014 May; 16 (3):270-6. DOI: 10.1111/bdi.12158. Fator de impacto: 4,882 (*Journal Citation Reports* 2015).

**Objective:** The frequent comorbidity between attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD) and bipolar disorder (BD) represents a challenge for disentangling specific impairments of each disorder in adulthood. Their functional impairments seem to be mediated by executive function deficits. However, little is known about the extent to which each executive function deficit might be disorder specific or explained by the comorbidity. The aim of the present study was to determine if comorbid BD could account for a significant share of executive function deficits when measured by the Wisconsin Card Sorting Test (WCST) in adults with ADHD. **Methods:** Adult patients with ADHD and healthy subjects were evaluated in the ADHD outpatient Program at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Psychiatric diagnoses were based on DSM-IV criteria. WCST scores were compared by multivariate analysis of covariance among three groups: ADHD with BD (n = 51), ADHD without BD (n = 278), and healthy subjects (n = 91). **Results:** When compared to patients without BD and healthy subjects, patients with ADHD and comorbid BD showed lower scores in total correct answers (p = 0.003); higher scores in total errors (p = 0.004) and non-persistent errors (p = 0.002); and completed fewer categories (p = 0.009). Patients with ADHD without BD did not differ from healthy subjects. **Conclusions:** WCST impairments among patients with ADHD seem to be to a large extent attributable to comorbid BD. Although other executive function deficits (e.g., in the inhibitory control domain) have been demonstrated to accompany ADHD, the present findings suggest that set-shifting deficits are strongly related to comorbid BD.

**Publicado como:** Polina ER, **Rovaris DL**, de Azeredo LA, Mota NR, Vitola ES, Silva KL, Guimarães-da-Silva PO, Picon FA, Belmonte-de-Abreu P, Rohde LA, Grevet EH, Bau CH. ADHD diagnosis may influence the association between polymorphisms in nicotinic acetylcholine receptor genes and tobacco smoking. *Neuromolecular Med.* 2014 Jun; 16(2):389-97. DOI: 10.1007/s12017-013-8286-2. Fator de impacto: 3,692 (*Journal Citation Reports* 2015).

Polymorphisms in the *CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4* gene cluster have been shown to be involved in tobacco smoking susceptibility. Considering that attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD) not only increases the risk but may also influence the molecular mechanisms of tobacco smoking, we analyzed the association between polymorphisms in the nicotinic acetylcholine receptor genes and tobacco smoking among individuals with or without ADHD. The sample included 1,118 subjects divided into four groups according to smoking status and ADHD diagnosis. Our results demonstrate that the minor alleles of two polymorphisms (rs578776 and rs3743078) in the *CHRNA3* gene are associated with an increased risk of tobacco smoking only among patients with ADHD. These alleles have been shown in previous studies to be protective factors for smoking in subjects without ADHD. These findings add to existing evidence that ADHD may exert an important modifying effect on the genetic risk of smoking and should be considered in tobacco smoking association studies.

**Publicado como:** de Azeredo LA, **Rovaris DL**, Mota NR, Polina ER, Marques FZ, Contini V, Vitola ES, Belmonte-de-Abreu P, Rohde LA, Grevet EH, Bau CH. Further evidence for the association between a polymorphism in the promoter region of SLC6A3/DAT1 and ADHD: findings from a sample of adults. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2014 Aug; 264 (5):401-8. DOI: 10.1007/s00406-014-0486-8. Fator de impacto: 4,113 (*Journal Citation Reports* 2015).

The dopamine transporter (*SLC6A3/DAT1*) plays a key role in the regulation of dopaminergic neurotransmission and is the major site of action for methylphenidate, a first-line medication for attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). Most genetic association studies with ADHD have investigated a 40-bp variable number of tandem repeats (VNTR) polymorphism in the 3'-untranslated region (UTR) of the *DAT1*, but these investigations have reported heterogeneous findings. The few studies focused on the 5' region have reported promising results. Despite rs2652511 not being included, nor having any proxy SNP available in GWAS, the few candidate gene studies that analyzed it suggested an association with ADHD and schizophrenia. Here, we analyzed the -839 C/T (rs2652511) promoter variant and the 3'-UTR and intron 8 (Int8) VNTR polymorphisms in 522 adults with ADHD and 628 blood donor controls. The diagnostic procedures followed the DSM-IV criteria. A significant association was detected ( $P = 0.002$ ) between the rs2652511 C-allele with ADHD. In addition, the 6-repeat allele of Int8 VNTR was associated with higher inattention scores ( $P = 0.034$ ). The haplotype analysis including *DAT1* 3'-UTR and Int8 VNTR polymorphisms did not reveal associations with ADHD susceptibility or severity dimensions. These findings extend to adult samples previous findings from children samples on the role of the rs2652511 polymorphism in the promoter region of *DAT1* as a risk factor for ADHD susceptibility.

**Publicado como:** Victor MM, **Rovaris DL**, Salgado CA, Silva KL, Karam RG, Vitola ES, Picon FA, Contini V, Guimarães-da-Silva PO, Blaya-Rocha P, Belmonte-de-Abreu PS, Rohde LA, Grevet EH, Bau CH. Severity but not comorbidities predicts response to methylphenidate in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder: results from a naturalistic study. *J Clin Psychopharmacol*. 2014 Apr; 34(2):212-7. DOI: 10.1097/JCP.0000000000000091. Fator de impacto: 3,000 (*Journal Citation Reports 2015*).

Although the identification of reliable predictors of methylphenidate response in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) is necessary to guide treatment decisions, very few data exist on this issue. Here, we assessed the predictors of clinical response to immediate-release methylphenidate hydrochloride (IR-MPH) in a naturalistic setting by analyzing the influence of demographic factors, severity, and a wide range of comorbid psychiatric disorders. Two hundred fifty adult patients with ADHD were evaluated and completed a short-term treatment with IR-MPH. Mental health diagnoses were based on Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition, criteria through the use of standard structured interviews. The Swanson, Nolan, and Pelham Rating Scale, version 4, adapted to adults was used to assess the severity of ADHD. In the linear regression model, only higher severity of ADHD was associated to a better IR-MPH response ( $b = 0.770$ ;  $P < 0.001$ ). Treatment of comorbidities in a subsample ( $n = 62$ ) did not modify this pattern. Our findings suggest that in clinical settings, patients with more severe ADHD symptoms have a good response to treatment independently from the presence of mild or stabilized comorbidities and their treatments. For adults with ADHD, differently from other common psychiatric disorders such as depression and anxiety, higher severity is associated with better treatment response.

**Publicado como:** Rovaris DL, Mota NR, da Silva BS, Girardi P, Victor MM, Grevet EH, Bau CH, Contini V. Should we keep on? Looking into pharmacogenomics of ADHD in adulthood from a different perspective. *Pharmacogenomics*. 2014 Jul;15(10):1365-81. DOI: 10.2217/pgs.14.95. Fator de impacto: 2,710 (*Journal Citation Reports 2015*).

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.

**Publicado como:** Karam RG, Breda V, Picon FA, **Rovaris DL**, Victor MM, Salgado CA, Vitola ES, Silva KL, Guimarães-da-Silva PO, Mota NR, Caye A, Belmonte-de-Abreu P, Rohde LA, Grevet EH, Bau CH. Persistence and remission of ADHD during adulthood: a 7-year clinical follow-up study. *Psychol Med.* 2015 Jul;45(10):2045-56. DOI: 10.1017/S0033291714003183. Fator de impacto: 5,491 (*Journal Citation Reports* 2015).

**BACKGROUND:** Course and predictors of persistence of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) in adults are still largely unknown. Neurobiological and clinical differences between child and adult ADHD raise the need for follow-up studies of patients diagnosed during adulthood. This study investigates predictors of ADHD persistence and the possibility of full remission 7 years after baseline assessment. **METHOD:** A 7-year follow-up study of adults with ADHD (n = 344, mean age 34.1 years, 49.9% males) was conducted. Variables from different domains (social demographics, co-morbidities, temperament, medication status, ADHD measures) were explored with the aim of finding potential predictors of ADHD persistence. **RESULTS:** Retention rate was 66% (n = 227). Approximately a third of the sample (n = 70, 30.2%) did not maintain ADHD criteria and 28 (12.4%) presented full remission (<4 symptoms), independently of changes in co-morbidity or cognitive demand profiles. Baseline predictors of diagnostic persistence were higher number of inattention symptoms [odds ratio (OR) 8.05, 95% confidence interval (CI) 2.54-25.45, p < 0.001], number of hyperactivity/impulsivity symptoms (OR 1.18, 95% CI 1.04-1.34, p = 0.01), oppositional defiant disorder (OR 3.12, 95% CI 1.20-8.11, p = 0.02), and social phobia (OR 3.59, 95% CI 1.12-11.47, p = 0.03). **CONCLUSIONS:** Despite the stage of brain maturation in adults suggests stability, approximately one third of the sample did not keep full DSM-IV diagnosis at follow-up, regardless if at early, middle or older adulthood. Although full remission is less common than in childhood, it should be considered as a possible outcome among adults.



**Publicado como:** Mota NR, **Rovaris DL**, Kappel DB, Picon FA, Vitola ES, Salgado CA, Karam RG, Rohde LA, Grevet EH, Bau CH. *NCAM1-TTC12-ANKK1-DRD2* gene cluster and the clinical and genetic heterogeneity of adults with ADHD. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2015 Sep;168(6):433-434. DOI: 10.1002/ajmg.b.32317. Fator de impacto: 3,391 (*Journal Citation Reports* 2015).

Dysfunctions of the dopaminergic system have been implicated on the etiology of Attention Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD). Meta-analyses addressing the association of the dopamine receptor D2 (*DRD2*) gene and ADHD were inconclusive due to excessive heterogeneity across studies. Both the great phenotypic heterogeneity of ADHD and the complexity of the genomic region where *DRD2* is located could contribute to the inconsistent findings. Most previous *DRD2* studies focused on the well-known Taq1A (rs1800497) SNP, which is actually placed in a neighbor gene (*ANKK1*). These two genes, together with *NCAM1* and *TTC12*, form the NTAD gene cluster on Chr11q22-23. In order to address the reasons for the high heterogeneity previously reported on *DRD2* effects on ADHD, this study investigates the role of *NTAD* variants on ADHD susceptibility in adults and on the modulation of comorbidity and personality profiles in these patients. Functional polymorphisms from *NTAD* were analyzed, both individually and in haplotypes, on a sample of 520 adults with ADHD and 630 non-ADHD controls. No direct association of *NTAD* variants with ADHD susceptibility itself was observed. However, different *NTAD* polymorphisms and haplotypes were associated to various phenotypes relevant to the clinical heterogeneity of ADHD, including Major Depressive Disorder, Generalized Anxiety Disorder, and Harm Avoidance and Persistence temperament scores. Therefore, these findings represent a possible explanation for the multiple conflicting findings regarding polymorphisms in this genomic region in psychiatry. The *NTAD* cluster may comprise a variety of independent molecular influences on various brain and behavior characteristics eventually associated with ADHD comorbidities and personality traits.

**Publicado como:** Marchiori RC, Pereira LA, Naujorks AA, **Rovaris DL**, Meinerz DF, Duarte MM, Rocha JB. Improvement of blood inflammatory marker levels in patients with hypothyroidism under levothyroxine treatment. *BMC Endocr Disord*. 2015 Jun 23;15:32. DOI: 10.1186/s12902-015-0032-3. Fator de impacto: 1,690 (*Journal Citation Reports* 2015).

**BACKGROUND:** There are several specific inflammatory and oxidative correlates among patients with hypothyroidism, but most studies are cross-sectional and do not evaluate the change in parameters during the treatment. The aim of this study was to investigate the effect of levothyroxine replacement therapy on biomarkers of oxidative stress (OS) and systemic inflammation in patients with hypothyroidism. **METHODS:** In this prospective open-label study, 17 patients with recently diagnosed primary hypothyroidism due to Hashimoto's thyroiditis who were not taking levothyroxine were included. The following parameters were measured before and at 6 and 12 months of levothyroxine treatment with an average dose of 1.5 to 1.7  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ : thyroid-stimulating hormone (TSH), free thyroxine (FT4), high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP), interleukin 1 (IL-1), IL-6, IL-10, interferon gamma (INF- $\gamma$ ), tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS), activity of aminolevulinic acid dehydratase ( $\delta$ -ALA-D), nonprotein and total thiol (NP-SH and T-SH) groups, total cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and triglycerides (TG). Generalized estimating equation (GEE) modeling was used to analyze the effects of LRT (at pre-treatment, 6 months and 12 months) on those variables. The hypothyroidism status (i.e., overt or subclinical hypothyroidism) was included as a confounder in all analyses. An additional GEE post hoc analysis was made to compare time points. **RESULTS:** There was a significant decrease in TSH over time ( $P < 0.0001$ ), (initial levels were on average 32.4  $\mu\text{IU}/\text{mL}$  and 10.5  $\mu\text{IU}/\text{mL}$  at 12 months). There was a significant increase in FT4 ( $P < 0.0001$ ) (initial levels were on average 0,8 ng/dL and 2.7 ng/dL at 12 months). There were significant changes in interleukin levels over time, with a significant increase in IL-10 ( $P < 0.0001$ ) and significant decreases in IL-1 ( $P < 0.0001$ ), IL-6 ( $P < 0.0001$ ), INF- $\gamma$  ( $P < 0.0001$ ) and TNF- $\alpha$  ( $P < 0.0001$ ). No significant difference in hs-CRP over time was observed ( $P < 0.284$ ). There was a significant reduction in NP-SH ( $P < 0.0001$ ). **CONCLUSIONS:** This study observed significant changes in the inflammatory profile in hypothyroid patients under treatment, with reduction of pro-inflammatory cytokines and elevation of anti-inflammatory cytokine. In these patients, a decrease in low-grade chronic inflammation may have clinical relevance due to the known connection between chronic inflammation, atherosclerosis and cardiovascular events.

**Publicado como:** Jacovas VC, **Rovaris DL**, Peréz O, de Azevedo S, Macedo GS, Sandoval JR, Salazar-Granara A, Villena M, Dugoujon JM, Bisso-Machado R, Petzl-Erler ML, Salzano FM, Ashton-Prolla P, Ramallo V, Bortolini MC. Genetic Variations in the TP53 Pathway in Native Americans Strongly Suggest Adaptation to the High Altitudes of the Andes. *PLoS One*. 2015 Sep 18;10(9):e0137823. DOI: 10.1371/journal.pone.0137823. Fator de impacto: 3,057 (*Journal Citation Reports* 2015).

The diversity of the five single nucleotide polymorphisms located in genes of the TP53 pathway (*TP53*, rs1042522; *MDM2*, rs2279744; *MDM4*, rs1563828; *USP7*, rs1529916; and *LIF*, rs929271) were studied in a total of 282 individuals belonging to Quechua, Aymara, Chivay, Cabanaconde, Yanke, Taquile, Amantani, Anapia, Uros, Guarani Ñandeva, and Guarani Kaiowá populations, characterized as Native American or as having a high level (> 90%) of Native American ancestry. In addition, published data pertaining to 100 persons from five other Native American populations (Surui, Karitiana, Maya, Pima, and Piapoco) were analyzed. The populations were classified as living in high altitude ( $\geq 2,500$  m) or in lowlands (< 2,500 m). Our analyses revealed that alleles *USP7-G*, *LIF-T*, and *MDM2-T* showed significant evidence that they were selected for in relation to harsh environmental variables related to high altitudes. Our results show for the first time that alleles of classical TP53 network genes have been evolutionary co-opted for the successful human colonization of the Andes.

**Publicado como:** Breda V, **Rovaris DL**, Vitola ES, Mota NR, Blaya-Rocha P, Salgado CA, Victor MM, Picon FA, Karam RG, Silva KL, Rohde LA, Bau CH, Grevet EH. Does collateral retrospective information about childhood attention-deficit/hyperactivity disorder symptoms assist in the diagnosis of attention-deficit/hyperactivity disorder in adults? Findings from a large clinical sample. *Aust N Z J Psychiatry*. 2016 Jun;50(6):557-65. DOI: 10.1177/0004867415609421. Fator de impacto: 3,536 (*Journal Citation Reports* 2015).

**OBJECTIVES:** In accordance with consolidated clinical practice, Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th edition suggests a key role of collateral information in the evaluation of retrospective childhood attention-deficit/hyperactivity disorder symptoms in adults despite poor evidence supporting its use. This study aims to assess the incremental value of collateral information on the presence of childhood attention-deficit/hyperactivity disorder symptoms when evaluating adults with attention-deficit/hyperactivity disorder. **METHODS:** Adult patients with attention-deficit/hyperactivity disorder (n = 449) and non-attention-deficit/hyperactivity disorder subjects (n = 143) underwent an extensive clinical assessment based on Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th edition criteria. For patients, retrospective collateral information regarding childhood attention-deficit/hyperactivity disorder was obtained and used to sort them into two groups: agreement (n = 277) and disagreement (n = 172) between self- and collateral reports. We compared demographic, clinical and response to treatment profiles among groups to test the relevance of collateral information on the specific issue of childhood attention-deficit/hyperactivity disorder symptoms. **RESULTS:** Both attention-deficit/hyperactivity disorder groups had higher rates of several comorbidities (oppositional defiant, conduct, substance use and bipolar disorders; all  $p < 0.001$ ) and impairments than controls. Disagreement between self- and collateral reports on childhood attention-deficit/hyperactivity disorder symptoms occurred in 38% of patients. Overall, attention-deficit/hyperactivity disorder disagreement and agreement groups had similar profiles in response to treatment and comorbidity, and the few differences detected in impairment measures were of small magnitude ( $\eta^2 < 0.05$ ). **CONCLUSION:** Although collateral report has an important role for diagnosing attention-deficit/hyperactivity disorder in children, it has no incremental value in the evaluation of childhood attention-deficit/hyperactivity disorder symptoms in adults with a self-reported history of attention-deficit/hyperactivity disorder assessed in clinical settings.

**Publicado como:** Salatino-Oliveira A, Akutagava-Martins GC, Bruxel EM, Genro JP, Polanczyk GV, Zeni C, Kieling C, Karam RG, **Rovaris DL**, Contini V, Cupertino RB, Mota NR, Grevet EH, Bau CH, Rohde LA, Hutz MH. NOS1 and SNAP25 polymorphisms are associated with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder symptoms in adults but not in children. *J Psychiatr Res.* 2016 Apr;75:75-81. DOI: 10.1016/j.jpsychires.2016.01.010. Fator de impacto: 4,465 (*Journal Citation Reports* 2015).

Several investigations documented that Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD) is better conceptualized as a dimensional disorder. At the same time, the disorder seems to have different neurobiological underpinnings and phenotypic presentation in children compared to adults. Neurodevelopmental genes could explain, at least partly these differences. The aim of the present study was to examine possible associations between polymorphisms in *SNAP25*, *MAP1B* and *NOS1* genes and ADHD symptoms in Brazilian samples of children/adolescents and adults with ADHD. The youth sample consisted of 301 patients whereas the adult sample comprises 485 individuals with ADHD. Diagnoses of ADHD and comorbidities were based on the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-4th edition criteria. The Swanson, Nolan and Pelham Scale-Version IV (SNAP-IV) was applied by psychiatrists blinded to genotype. The total SNAP-IV scores were compared between genotypes. Impulsivity SNAP-IV scores were also compared according to *NOS1* genotypes. Adult patients homozygous for the C allele at *SNAP25* rs8636 showed significantly higher total SNAP-IV scores ( $F = 11.215$ ; adjusted  $P$ -value = 0.004). Impulsivity SNAP-IV scores were also significantly different according to *NOS1* rs478597 polymorphisms in adults with ADHD ( $F = 6.282$ ; adjusted  $P$ -value = 0.026). These associations were not observed in children and adolescents with ADHD. These results suggest that *SNAP25* and *NOS1* genotypes influence ADHD symptoms only in adults with ADHD. Our study corroborates previous evidences for differences in the genetic contribution to adult ADHD compared with childhood ADHD.

**Publicado como:** Schuch JB, Polina ER, **Rovaris DL**, Kappel DB, Mota NR, Cupertino RB, Silva KL, Guimarães-da-Silva PO, Karam RG, Salgado CA, White MJ, Rohde LA, Grevet EH, Bau CH. Pleiotropic effects of Chr15q25 nicotinic gene cluster and the relationship between smoking, cognition and ADHD. *J Psychiatr Res.* 2016 Sep;80:73-8. DOI: 10.1016/j.jpsychires.2016.06.002. Fator de impacto: 4,465 (*Journal Citation Reports* 2015).

Polymorphisms in the *CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4* gene cluster (Chr15q25) have been robustly associated with nicotine dependence, including genome-wide studies, as well as with cognitive and neuropsychological measures. In addition, cognitive processes can be influenced by nicotine use through nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs). Here, we evaluated the effect of polymorphisms in *CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4* gene cluster and their interaction with tobacco smoking status on cognition in patients with Attention Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD). Eight SNPs from the *CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4* gene cluster were evaluated on a clinical sample of 403 adults with ADHD. Cognitive performance was assessed using the Wechsler Adult Intelligence Scale-Revised (WAIS-R). Analyses of covariance were used to assess the influence of single markers and their interaction with smoking status in the Vocabulary and Block Design subtests of WAIS-R. Correction for multiple comparisons was applied. Lifetime smoking was associated to Vocabulary subtest. The TT genotypes of *CHRNA5* SNPs rs588765 and rs514743 showed a trend towards association with, respectively, higher and lower scores on the Vocabulary subtest. There was a significant interaction between intergenic SNP rs8023462 and smoking on Vocabulary scores. Our results are consistent with an influence of variants in the *CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4* gene cluster on cognitive measures. The overall scenario suggests a pleiotropic role of Chr15q25 nicotinic gene cluster with complex influences in ADHD, tobacco smoking and cognitive performance, characteristics that can be partially interdependent and may share underlying genetic factors.

**Publicado como:** Levandowski ML, Tractenberg SG, de Azeredo LA, De Nardi T, **Rovaris DL**, Bau CH, Rizzo LB, Maurya PK, Brietzke E, Tyrka AR, Grassi-Oliveira R. Crack cocaine addiction, early life stress and accelerated cellular aging among women. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2016 Nov 3;71:83-9. DOI: doi: 10.1016/j.pnpbp.2016.06.009. Fator de impacto: 4,361 (*Journal Citation Reports* 2015).

**BACKGROUND:** Early life stress (ELS) and addiction are related to age-related diseases and telomere shortening. However, the role of telomere length (TL) in crack cocaine addiction remains unknown. The purpose of this study was to investigate the TL in a sample of crack cocaine dependent-women who reported an ELS history and in a community-based sample of elderly women as a reference group for senescence. **METHODS:** This study included treatment seeking crack cocaine dependents women (n=127) and elderly women without a psychiatric diagnosis (ELD, n=49). The crack cocaine sample was divided in two groups according to their Childhood Trauma Questionnaire (CTQ) scores: presence of history of childhood abuse and neglect (CRACK-ELS) and absence of ELS history (CRACK). TL was assessed by T/S ratio obtained from peripheral blood DNA using quantitative PCR assay. **RESULTS:** CRACK and CRACK-ELS subjects exhibited shortened TL in comparison to the ELD group, despite their younger age. Among crack cocaine sample, CRACK-ELS group had significantly shorter telomeres than the CRACK group. Correlation analysis within crack cocaine group indicated that TL was negatively correlated with emotional abuse scores. **CONCLUSIONS:** These results support previous findings associating telomere shortening with both ELS and drug addiction. This study suggests new evidence of a distinct biological phenotype for drug-dependent women with ELS. The results support the biological senescence hypothesis underpinning ELS experience.

**Publicado como:** da Silva BS, **Rovaris DL**, Schuch JB, Mota NR, Cupertino RB, Aroche AP, Bertuzzi GP, Karam RG, Vitola ES, Tovo-Rodrigues L, Grevet EH, Bau CH. Effects of corticotropin-releasing hormone receptor 1 SNPs on major depressive disorder are influenced by sex and smoking status. *J Affect Disord.* 2016 Nov 15;205:282-288. DOI: 10.1016/j.jad.2016.08.008. Fator de impacto: 3,570 (*Journal Citation Reports* 2015).

**BACKGROUND:** The corticotropin-releasing hormone receptor 1 (*CRHR1*) gene has been repeatedly implicated in Major Depressive Disorder (MDD) in humans and animal models; however, the findings are not absolutely convergent. Since recent evidence from genome-wide association studies suggests that narrowing the phenotypic heterogeneity may be crucial in genetic studies of MDD, the aim of this study was to evaluate the effects of *CRHR1* polymorphisms on MDD while addressing the influence of sex and smoking status. **METHODS:** The association of the *CRHR1* SNPs rs12944712, rs110402, and rs878886 with MDD was evaluated in 629 Brazilian adults of European descent recruited from the general population [180 (28.6%) with lifetime MDD]. The sample was subdivided according to sex and smoking status. **RESULTS:** Among nonsmokers, there were nominal associations between MDD and all tested SNPs (rs12944712,  $P=0.042$ ; rs110402,  $P=0.031$ , and rs878886,  $P=0.040$ ), regardless of sex. In addition, there were significant effects of rs110402 in women ( $P_{corr}=0.034$ ) and rs878886 in men ( $P_{corr}=0.013$ ). Among lifetime smokers, there were no significant associations between *CRHR1* SNPs and MDD. **LIMITATIONS:** The lack of a depression rating scale; scarcity of information on the functionality of the *CRHR1* SNPs; and relatively small sample sizes in some subgroups. **CONCLUSIONS:** Our results strengthen the evidence for the role of *CRHR1* SNPs in MDD susceptibility and suggest that their effects may be modulated by sex and smoking status. These findings suggest the perspective that reducing phenotypic heterogeneity is warranted in genetic studies of MDD.



**Publicado como:** Grave N, Tovo-Rodrigues L, da Silveira J, **Rovaris DL**, Dal Bosco SM, Contini V, Genro JP. A vitamin D pathway gene-gene interaction affects low-density lipoprotein cholesterol levels. *J Nutr Biochem*. 2016 Dec;38:12-17. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2016.08.002. Fator de impacto: 4,668 (*Journal Citation Reports* 2015).

Much evidence suggests an association between vitamin D deficiency and chronic diseases such as obesity and dyslipidemia. Although genetic factors play an important role in the etiology of these diseases, only a few studies have investigated the relationship between vitamin D-related genes and anthropometric and lipid profiles. The aim of this study was to investigate the association of three vitamin D-related genes with anthropometric and lipid parameters in 542 adult individuals. We analyzed the rs2228570 polymorphism in the vitamin D receptor gene (*VDR*), rs2134095 in the retinoid X receptor gamma gene (*RXRG*) and rs7041 in the vitamin D-binding protein gene (*GC*). Polymorphisms were genotyped by TaqMan allelic discrimination. Gene-gene interactions were evaluated by the general linear model. The functionality of the polymorphisms was investigated using the following predictors and databases: SIFT (Sorting Intolerant from Tolerant), PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2) and Human Splicing Finder 3. We identified a significant effect of the interaction between *RXRG* (rs2134095) and *GC* (rs7041) on low-density lipoprotein cholesterol (LDL-c) levels ( $P=.005$ ). Furthermore, our in silico analysis suggested a functional role for both variants in the regulation of the gene products. Our results suggest that the vitamin D-related genes *RXRG* and *GC* affect LDL-c levels. These findings are in agreement with other studies that consistently associate vitamin D and lipid profile. Together, our results corroborate the idea that analyzing gene-gene interaction would be helpful to clarify the genetic component of lipid profile.

**Publicado como:** Zai G, Alberry B, Arloth J, Bánlaki Z, Bares C, Boot E, Camilo C, Chadha K, Chen Q, Cole CB, Cost KT, Crow M, Ekpor I, Fischer SB, Flatau L, Gagliano S, Kirli U, Kukshal P, Labrie V, Lang M, Lett TA, Maffioletti E, Maier R, Mihaljevic M, Mittal K, Monson ET, O'Brien NL, Østergaard SD, Ovenden E, Patel S, Peterson RE, Pouget JG, **Rovaris DL**, Seaman L, Shankarappa B, Tsetsos F, Vereczkei A, Wang C, Xulu K, Yuen RK, Zhao J, Zai CC, Kennedy JL. Rapporteur summaries of plenary, symposia, and oral sessions from the XXIIIrd World Congress of Psychiatric Genetics Meeting in Toronto, Canada, 16-20 October 2015. *Psychiatr Genet.* 2016 Dec;26(6):229-257. DOI: 10.1097/YPG.000000000000148. Fator de impacto: 1,736 (*Journal Citation Reports* 2015).

The XXIIIrd World Congress of Psychiatric Genetics meeting, sponsored by the International Society of Psychiatric Genetics, was held in Toronto, ON, Canada, on 16-20 October 2015. Approximately 700 participants attended to discuss the latest state-of-the-art findings in this rapidly advancing and evolving field. The following report was written by trainee travel awardees. Each was assigned one session as a rapporteur. This manuscript represents the highlights and topics that were covered in the plenary sessions, symposia, and oral sessions during the conference, and contains major notable and new findings.

**Publicado como:** Caye A, Spadini AV, Karam RG, Grevet EH, **Rovaris DL**, Bau CH, Rohde LA, Kieling C. Predictors of persistence of ADHD into adulthood: a systematic review of the literature and meta-analysis. *Eur Child Adolesc Psychiatry*. 2016 Nov;25(11):1151-1159. DOI: 10.1007/s00787-016-0831-8. Fator de impacto: 3,339 (*Journal Citation Reports* 2015).

Attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) is traditionally conceptualized as a neurodevelopmental disorder that continues into adulthood in up to half of diagnosed cases. In light of current evidence, factors associated with the course of the disorder remain unknown. We performed a systematic review of the literature searching for risk markers from childhood that predicted the persistence of ADHD into adulthood. We reviewed 26,168 abstracts and selected 72 for full-text review. We identified data from 16 studies, comprising 6 population-based retrospective samples and 10 clinical follow-ups. We performed meta-analyses of factors evaluated by at least three studies. Severity of ADHD (OR 2.33, 95 % CI = 1.6-3.39,  $p < 0.001$ ), treatment for ADHD (OR 2.09, 95 % CI = 1.04-4.18,  $p = 0.037$ ), comorbid conduct disorder (OR 1.85, 95 % CI = 1.06-3.24,  $p = 0.030$ ), and comorbid major depressive disorder (OR 1.8, 95 % CI = 1.1-2.95,  $p = 0.019$ ) emerged as predictors already presented in childhood for ADHD persistence into adulthood. Further, we suggest that cohort studies should be designed to clarify such an important question for research and clinical practice.

**Publicado como:** Fontanari AM, **Rovaris DL**, Costa AB, Pasley A, Cupertino RB, Soll BM, Schwarz K, da Silva DC, Borba AO, Mueller A, Bau CH, Lobato MI. Childhood Maltreatment Linked with a Deterioration of Psychosocial Outcomes in Adult Life for Southern Brazilian Transgender Women. *J Immigr Minor Health*. 2016 Nov 12. [Epub ahead of print]. DOI: 10.1007/s00787-016-0831-8  
Fator de impacto: 1,579 (*Journal Citation Reports* 2015).

A history of childhood maltreatment (HCM) has been associated with detrimental psychiatric outcomes. This is particularly true for transgender, for whom there is initial evidence that HCM may be associated with psychiatric morbidity. Our study aimed to further characterize the relationship between HCM and the development of mental disorder in adult life, based on a sample of Brazilian transgender women. Cross-sectional data were collected from a consecutive sample of 289 transgender women who attended the Hospital Clínicas clinic for gender dysphoria, in Porto Alegre, between 1998 and 2014. Our results demonstrated a greater risk of deteriorating mental health amongst participants who had experienced HCM. Given the disproportionately high rate of HCM in transgender persons, we advocate for greater assistance for transgender persons.

**Publicado como:** Cupertino RB, Schuch JB, Bandeira CE, da Silva BS, **Rovaris DL**, Kappel DB, Contini V, Salatino-Oliveira A, Vitola ES, Karam RG, Hutz MH, Rohde LA, Grevet EH, Bau CH, Mota NR. Replicated association of Synaptotagmin (SYT1) with ADHD and its broader influence in externalizing behaviors. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2017 Jan 24. DOI: 10.1016/j.euroneuro.2017.01.007. Fator de impacto: 4,409 (*Journal Citation Reports* 2015).

Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD) is a common psychiatric disorder, affecting both children and adults. The Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor Attachment REceptors (SNARE) complex has been implicated in ADHD pathophysiology since it is a key component of neurotransmitter release events and neurodevelopment processes, and SNPs in this complex have been associated with ADHD. Here we aim to analyze the effects of SNARE complex variants on ADHD susceptibility and its clinical heterogeneity in affected adults. We tested the association between ADHD and polymorphisms on the SNARE genes *STX1A* (rs2228607), *SYT1* (rs1880867 and rs2251214), *VAMP2* (26bp Ins/Del) and *SNAP25* (rs6108461 and rs8636) on a sample comprised of 548 adults with ADHD and 644 non-affected controls. Regarding clinical heterogeneity, we further investigated the effects of associated SNPs on age at onset of impairment due to ADHD and on relevant externalizing behaviors (i.e. school suspensions/expulsions and problems with law/authority) and comorbidities (i.e. Substance Use Disorder, Oppositional Defiant Disorder, Conduct Disorder and Antisocial Personality Disorder). We replicated a previously reported association between *SYT1*-rs2251214 and ADHD in adulthood. This SNP was also associated with age at onset of impairment due to ADHD symptoms and with a range of externalizing phenotypes. These findings involving *SYT1* suggest that variation in neurotransmitter exocytosis mechanisms may represent an underlying genetic factor shared by a spectrum of externalizing behaviors and disorders, including - but not restricted to - ADHD.

**Publicado como:** Teche SP, **Rovaris DL**, Aguiar BW, Hauck S, Vitola ES, Bau CH, Freitas LH, Grevet EH. Resilience to traumatic events related to urban violence and increased IL10 serum levels. *Psychiatry Res.* 2017 Jan 25;250:136-140. DOI: 10.1016/j.psychres.2017.01.072. Fator de impacto: 2,466 (*Journal Citation Reports* 2015).

The exposition to traumatic events related to urban violence is epidemic in Brazil, with rate of 80% in the general population, and is becoming a major cause of post-traumatic stress disorder (PTSD). The objective of the study was to compare serum levels of pro-inflammatory interleukin-6 (IL-6) and anti-inflammatory interleukin-10 (IL-10) in PTSD and resilient individuals. We hypothesized that resilient individuals present an attenuated pro-inflammatory and enhanced anti-inflammatory state. We conducted a case-control study comparing 30 resilient individuals and 30 PTSD patients exposed to traumatic events related to urban violence. The groups were evaluated using Self-Report Questionnaire (SRQ-20), Mini-International Neuropsychiatric Interview (MINI) and the Davidson Trauma Scale. For all individuals, blood samples were collected to determine IL-6, IL-10 and cortisol serum levels. All samples were frozen at -80°C until the assay and were analyzed with the same immunoassay kit and in duplicates. The resilient group presented higher IL-10 levels than PTSD patients [mean (CI95%); 1.03 (0.52-2.08) pg/mL vs. 0.29 (0.20-0.43) pg/mL; P=0.002]. There were no differences in terms of IL-6 or cortisol levels. The results provided evidence for increased levels of IL-10 in resilient individuals when compared to PTSD patients, probably conferring them a better anti-inflammatory response after exposition.

**Aceito como:** da Silva BS, Cupertino RB, **Rovaris DL**, Schuch JB, Kappel DB, Müller D, Bandeira CE, Victor MM, Karam RG, Mota NR, Rohde LA, Contini V, Grevet EH, Bau CHD. Exocytosis-related genes and response to methylphenidate treatment in adults with ADHD. *Mol Psychiatry*. Fator de impacto: 13,314 (*Journal Citation Reports* 2015).

Experimental studies have demonstrated that methylphenidate (MPH) modulates the synaptic vesicle trafficking and synaptotagmin-1 (Syt1) mRNA levels. Syt1 is a regulatory protein of the SNARE complex, a neurotransmitter exocytosis mediator. Despite this evidence, most SNARE complex-related genes have never been evaluated in ADHD pharmacogenetics. This study evaluates, for the first time, polymorphisms on the SNARE complex-related genes *STX1A* (rs2228607), *VAMP2* (26bp Ins/Del), and *SYT1* (rs1880867 and rs2251214) on the response to immediate-release methylphenidate (IR-MPH) in a naturalistic sample of adults with ADHD. The sample comprised 433 subjects, of which 272 (62.8%) have completed the short-term IR-MPH treatment (at least 30 days). The main outcome measure was the categorical variable of short-term response to IR-MPH based on the Swanson, Nolan, and Pelham Rating Scale-version 4 (SNAP-IV), and on the clinical global impression-improvement scale. Additional analyses evaluated the percentage of SNAP-IV symptom reduction for each dimension as well as short- and long- (7 years) term treatment persistence. *SYT1*-rs2251214 was associated with the categorical short-term response to IR-MPH ( $P=0.006$ ,  $P_{FDR}=0.028$ ), and with the percentage of inattention and oppositional defiant disorder symptoms reduction ( $P=0.007$ ,  $P_{FDR}=0.028$  and  $P=0.017$ ,  $P_{FDR}=0.048$ , respectively). *SYT1*-rs2251214 was also associated with short-term treatment persistence ( $P=0.018$ ,  $P_{FDR}=0.048$ ), and with months of treatment ( $P=0.002$ ,  $P_{FDR}=0.016$ ) in the long-term protocol. Our findings suggest that *SYT1*-rs2251214 presents a broad influence in IR-MPH response variability in adults with ADHD, being involved with both symptom response and treatment persistence. If such findings are replicated, Syt1 could represent a key element in MPH pharmacodynamics in adults with ADHD.

**Submetido como:** Karam RG, **Rovaris DL**, Breda V, Picon FA, Victor MM, Salgado CAI, Vitola ES, Mota NR, Silva KL, Guimarães-da-Silva PO, Martin Meller, Rohde LA, Grevet EH, Bau CHD. Trajectories of attention-deficit/hyperactivity disorder dimensions in adults. **Segundo round de revisão** na *Acta Psychiatr Scand*. Fator de impacto: 6,128 (*Journal Citation Reports* 2015).

**Objective:** The study of the trajectories of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) dimensions throughout the lifespan may help to elucidate the recent controversy regarding the nature of adult ADHD. This study investigates the course and the predictors of change for each ADHD domain during adulthood. **Method:** Adults with ADHD (n = 344) were followed up for 7 years. Trajectories of inattention, hyperactivity, and impulsivity and their potential predictors were examined. **Results:** On average, the symptoms declined in all ADHD dimensions during follow-up. Despite this, increased inattentive, hyperactive and impulsive symptoms were observed in approximately 13%, 25%, and 17% of the patients, respectively. Different predictors influenced the trajectory of each dimension. Oppositional defiant disorder and social phobia were associated with the maintenance of the symptoms, while alcohol use disorder was associated with both the maintenance and the rise of the symptoms. **Conclusion:** Unexpectedly, a rise in the symptoms was not uncommon in adults with ADHD. Prevalent comorbidities have the potential to influence the neurodevelopment and the trajectory of ADHD. Therefore, such predictors should be investigated in population cohorts with the aim to understand the nature of late-onset ADHD. Additionally, these findings may be relevant in prevention studies and in strategies for ADHD treatment.



**Submetido como:** Parreiras-e-Silva LT, Vargas-Pinilla P, Duarte DA, Longo D, Pardo GVE; Finkler AD, Paixão-Côrtés VR, Pará P, **Rovaris DL**, Oliveira EB, Caceres R, Gonçalves G, Bouvierg M, Salzano FM, Lucion AB, Costa-Neto CM, Bortolini MC. Functional New World Monkey oxytocin forms elicit an altered signaling profile and promote parental care in rats. **Segundo round de revisão** na *P Natl Acad Sci Usa*. Fator de impacto: 9,423 (*Journal Citation Reports* 2015).

Experimental studies have demonstrated that methylphenidate (MPH) modulates the synaptic vesicle trafficking and synaptotagmin-1 (Syt1) mRNA levels. Syt1 is a regulatory protein of the SNARE complex, a neurotransmitter exocytosis mediator. Despite this evidence, most SNARE complex-related genes have never been evaluated in ADHD pharmacogenetics. This study evaluates, for the first time, polymorphisms on the SNARE complex-related genes *STX1A* (rs2228607), *VAMP2* (26bp Ins/Del), and *SYT1* (rs1880867 and rs2251214) on the response to immediate-release methylphenidate (IR-MPH) in a naturalistic sample of adults with ADHD. The sample comprised 433 subjects, of which 272 (62.8%) have completed the short-term IR-MPH treatment (at least 30 days). The main outcome measure was the categorical variable of short-term response to IR-MPH based on the Swanson, Nolan, and Pelham Rating Scale-version 4 (SNAP-IV), and on the clinical global impression-improvement scale. Additional analyses evaluated the percentage of SNAP-IV symptom reduction for each dimension as well as short- and long- (7 years) term treatment persistence. *SYT1*-rs2251214 was associated with the categorical short-term response to IR-MPH ( $P=0.006$ ,  $P_{FDR}=0.028$ ), and with the percentage of inattention and oppositional defiant disorder symptoms reduction ( $P=0.007$ ,  $P_{FDR}=0.028$  and  $P=0.017$ ,  $P_{FDR}=0.048$ , respectively). *SYT1*-rs2251214 was also associated with short-term treatment persistence ( $P=0.018$ ,  $P_{FDR}=0.048$ ), and with months of treatment ( $P=0.002$ ,  $P_{FDR}=0.016$ ) in the long-term protocol. Our findings suggest that *SYT1*-rs2251214 presents a broad influence in IR-MPH response variability in adults with ADHD, being involved with both symptom response and treatment persistence. If such findings are replicated, Syt1 could represent a key element in MPH pharmacodynamics in adults with ADHD.

**Submetido como:** Kappel DJ, Schuch JB, **Rovaris DL**, Cupertino RB, da Silva BS, Winkler C, Teche SP, Vitola ES, Karam RG, Rohde LA, Bau CHD, Grevet EH, Mota NH. Further replication of *LPHN3*-NTAD gene cluster interactions on ADHD and its clinical course throughout adulthood.

Background: Among the few genetic findings repeatedly associated with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD) susceptibility, the interaction between the *LPHN3* gene and the NTAD gene cluster (*NCAM1-TTC12-ANKK1-DRD2*) is noteworthy considering the strength of the supporting evidence derived from both linkage and association studies. In order to extend this characterization, we examined such well-known effects in a 7-year follow-up of a clinical sample of adults with ADHD, addressing associations with susceptibility, symptomatology and stability of diagnosis. Methods: Sample comprises 548 cases and 643 controls. Entropy-based analysis was used to indicate potential interactions, followed by in-depth analyses of covariance and logistic regression to assess the effects of interactions on ADHD-related outcomes. Results: Entropy-based analysis indicated a potential interaction between *LPHN3*-rs6551665 and *TTC12*-rs2303380 SNPs influencing ADHD symptomatology. Further analyses revealed significant interaction effects on ADHD total ( $p=0.002$ ) and hyperactivity/impulsivity symptom counts ( $p=0.005$ ). In the predominantly hyperactive/impulsive and combined presentation group, the presence of *LPHN3*-rs6551665 G-allele was associated to increased ADHD risk only in individuals carrying the *TTC12*-rs2303380 AA-genotype ( $p=0.026$ ). Also, this allelic constellation is involved in the maintenance of ADHD in a predominantly hyperactive/impulsive or combined presentation after a 7-year follow-up ( $p=0.008$ ). Conclusions: These observations reinforce and replicate previous evidence suggesting interactions between *LPHN3* and the NTAD cluster as part of the genetic substrate of ADHD also in adults, adding also new evidence regarding its role in a phenotype with higher presence of hyperactivity/impulsivity symptoms that is maintained throughout adulthood.

**Submetido como:** Viscardi LH, Paixão-Côrtes VR, Comas D, Salzano FM, **Rovaris DL**, Bau CHD, Amorim CEG, Bortolini MC. Ancient balanced polymorphisms and the evolution of behavior in the genus *Homo*.

The genus *Homo* is characterized by greater cognitive sophistication and a more complex behavioral repertoire compared to other primates. The importance of these and related traits for the adaptive success of *Homo* is well known, suggesting an important genetic background for such phenotypes. Recently, the immune system has been proposed as an important modulator of psychiatric disorders. There is evidence that some genes underlying immune system function may be the target of balancing selection; however, to which extent this phenomenon plays a role in behavior, and whether it is of relevance for the evolutionary trajectory of the genus *Homo* is unknown. Here, by using a novel approach based on evaluating the excess of polymorphisms shared between *Homo sapiens* and *Homo neanderthalensis*, we show that genes of the immune system have a significant portion of long-term shared polymorphisms possibly maintained by balancing selection. Interestingly, several of these shared polymorphisms of the immune system have been linked to psychiatric disease, suggesting that a genetic repertoire common to immune and behavioral systems could have been maintained by balancing selection since before the split between archaic and modern humans. These genes may have had a role in *Homo* creative thinking, making them part of a genetic pathway through which natural selection might have maintained both immunological and behavioral plasticities in *Homo*.

**Submetido como:** Reales G, **Rovaris DL**, Jacovas VC, Hünemeier T, Sandoval JR, Salazar-Granara AA, Demarchi DA, Tarazona-Santos E, Felkl AB, Serafini MA, Salzano FM, Bisso-Machado R, Comas D, Paixão-Côrtes VR, Bortolini MC. A Tale of Agriculturalists and Hunter-gatherers: Exploring the Thrifty Genotype Hypothesis in Native South Americans.

**Objectives:** To determine genetic differences between agriculturalist and hunter-gatherer southern Native American populations for selected metabolism-related markers and to test whether Neel's thrifty genotype hypothesis (TGH) could explain the genetic patterns observed in these populations. **Materials and methods:** 375 Native South American individuals from 17 populations were genotyped using six markers (*APOE* rs429358 and rs7412; *APOA2* rs5082; *CD36* rs3211883; *TCF7L2* rs11196205; and *IGF2BP2* rs11705701). Additionally, *APOE* genotypes from 39 Aymara individuals were obtained from the literature. AMOVA, main effects, and gene-gene interaction tests were performed. **Results:** We observed differences in allele distribution patterns between agriculturalists and hunter-gatherers for some markers. For instance, between-groups component of genetic variance (FCT) for *APOE* rs429358 showed strong differences in allelic distributions between hunter-gatherers and agriculturalists ( $P = 0.00196$ ). Gene-gene interaction analysis indicated that the *APOE* E4/*CD36* TT and *APOE* E4/*IGF2BP2* A carrier combinations occur at a higher frequency in hunter-gatherers, but this combination is not replicated in archaic (Neanderthal and Denisovan) and ancient (Anzick, Saqqaq, UstIshim, Mal'ta) hunter-gatherer individuals. **Discussion:** A complex scenario explains the observed frequencies of the tested markers in hunter-gatherers. Different factors, such as pleiotropic alleles, rainforest selective pressures, and population dynamics, may be collectively shaping the observed genetic patterns. We conclude that although TGH seems a plausible hypothesis to explain part of the data, other factors may be important in our tested populations.

# APÊNDICES

## COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



### PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Fatores genéticos e ambientais de risco para a dependência de crack (COCCaINE)

**Pesquisador:** Rodrigo Grassi de Oliveira

**Área Temática:** Genética Humana:

(Haverá envio para o exterior de material genético ou qualquer material biológico humano para obtenção de material genético, salvo nos casos em que houver cooperação com o Governo Brasileiro;);

**Versão:** 3

**CAAE:** 57370016.0.1001.5336

**Instituição Proponente:** UNIAO BRASILEIRA DE EDUCACAO E ASSISTENCIA

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.858.586

#### Apresentação do Projeto:

##### INTRODUÇÃO

A partir da descoberta de remanescentes de folhas de coca em tumbas da Bolívia e do Peru, o uso de Cocaína pôde ser datado aproximadamente desde 5000 a.C. Durante séculos, os nativos do Peru mascaram folhas de coca enquanto trabalhavam nas plantações, pois os efeitos vasoconstrictores e broncodilatadores ajudavam a suportar a hipóxia causada pela altitude. A coca teve um papel fundamental no império Inca, onde era considerada uma planta sagrada. Os Incas não distinguiram os poderes curativos da coca de seus supostos poderes mágicos, o que levou a planta a ser usada na América do Sul, durante longo período, também como medicação. Embora usada no período colonial, somente no início do século passado, quando passou a fazer parte da composição de tônicos e elixires utilizados no tratamento de diversas doenças, a Cocaína na forma de cloridrato se tornou uma droga de abuso. Atualmente, há uma relação clara entre o uso da Cocaína, criminalidade e violência, e a dependência dessa substância já é reconhecida no mundo inteiro como um grande problema social e de saúde pública. No mercado de drogas, a Cocaína pode ser encontrada em duas apresentações principais: o já mencionado cloridrato de Cocaína e

**Endereço:** SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde

**Bairro:** Asa Norte

**CEP:** 70.750-521

**UF:** DF

**Município:** BRASILIA

**Telefone:** (61)3315-5878

**E-mail:** conep@saude.gov.br

## COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.858.586

as pedras de Crack. A primeira consiste em um pó solúvel em água, que pode ser cheirado ou injetado. Já o Crack, é uma versão alcalina em formato de pequenas pedras, que pode ser fumado utilizando um "cachimbo". Este último, apresenta um efeito muito mais rápido e devastador do que o cloridrato de Cocaína, já que a fumaça inalada atinge rapidamente a circulação sanguínea. Devido ao caráter epidêmico do uso do Crack e ao grande impacto gerado na saúde pública, o governo brasileiro criou o Plano Integrado de Enfrentamento ao Crack e outras Drogas (decreto nº 7.426) que, desde 2010, vem trabalhando na tentativa de criar ações de prevenção, tratamento e reinserção social dos dependentes, além de fortalecer as ações contra o narcotráfico em todo o território nacional. Dessa forma, um maior entendimento sobre fatores genéticos envolvidos na Dependência de Crack, resposta ao tratamento de desintoxicação e recaída ao uso da droga pode contribuir de forma substancial para ações futuras do plano integrado proposto pelo governo federal.

Epidemiologia da dependência de Cocaína e Crack (DCC) O último World Drug Report do United Nations Office on Drugs and Crime (WDR 2015) aponta que, apesar de uma leve queda de 10% no cultivo de folhas de coca, a prevalência anual de uso de Cocaína no mundo se manteve estável em 0,3-0,4% em 2013, totalizando 17.000.000 de usuários. Na América do Sul, a prevalência anual aumentou de 0,7% em 2010 (1.800.000 de usuários) para 1,2% (3.340.000 de usuários), mantendo-se estável em 2013. O relatório ainda salienta que essa alta observada na América do Sul é explicada pelo aumento da prevalência no Brasil, que foi estimada em 1,75%. Devido a sua extensão geografia e grande população urbana, o Brasil se tornou muito vulnerável ao tráfico e consumo da droga. Os dados do WDR 2015 corroboram as estimativas elevadas obtidas no II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas (LENAD) no ano de 2012. De acordo com o LENAD, as prevalências lifetime de uso de Cocaína e de Crack no Brasil são 3,9% e 1,5%, respectivamente, enquanto que a prevalência de DCC foi de 0,6% na população geral. Entre os adolescentes, 0,8% já usaram pelo menos uma vez na vida Crack e outras formas de cocaína fumada, sendo a prevalência lifetime de uso de Cocaína estimada em 3,6%. A maioria dos dependentes de Crack, tanto no Brasil quanto em outros países, vivem em uma situação de muita marginalização, apresentando alta prevalência de doenças infecciosas crônicas, envolvimento em crimes com violência, falta de moradia fixa e altos níveis de mortalidade, o que resulta em uma carga de doença importante. A partir do último Global Burden of Diseases (GBD 2013), que avalia a prevalência de transtorno por uso de substâncias (TUS) e não o número de usuários estimou-se que 7.385.000 de pessoas ao redor do mundo foram afetadas pelo transtorno por uso de Cocaína em 2013, resultando em 1.200.400 anos de vida perdidos ajustados por incapacidade. Além disso,

**Endereço:** SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde

**Bairro:** Asa Norte

**CEP:** 70.750-521

**UF:** DF

**Município:** BRASÍLIA

**Telefone:** (61)3315-5878

**E-mail:** conep@saude.gov.br

## COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.858.586

o GBD estimou que 4.305 mortes foram atribuídas diretamente a esse transtorno, um número que pode estar muito subestimado, provavelmente devido a problemas de notificação, ou notificações de mortes por outras causas associadas com DCC, como, por exemplo, doenças infecciosas e mortes relacionadas ao crime e violência.

**Neurobiologia: o papel da genética.** Até o momento, nenhum estudo avaliou especificamente a herdabilidade da Dependência de Crack, entretanto, os trabalhos que estimaram o papel da genética no abuso/dependência de Cocaína mostram que esses fenótipos, tanto em homens quanto em mulheres, são substancialmente influenciados por fatores genéticos. Nos três estudos com gêmeos conduzidos até o momento, as estimativas de herdabilidade variam de 42 a 79%, com uma média ponderada de 72%, considerada a mais alta entre os TUS. Embora as estimativas de herdabilidade apontem para um papel relevante da genética na DCC, a identificação de fatores genéticos de predisposição tem encontrado como principal obstáculo a complexidade do modo de herança multifatorial, além da heterogeneidade clínica relacionada ao abuso simultâneo de outras substâncias. De qualquer forma, pelo menos uma centena de estudos de associação já foram conduzidos, avaliando uma gama muito grande de polimorfismos em diversos genes. Destacam-se genes que codificam proteínas dos sistemas de neurotransmissão dopaminérgico, serotoninérgico e colinérgico, além dos sistemas opioide, endocanabinoide e de estresse. Alguns estudos também avaliaram genes codificadores de proteínas implicadas na plasticidade sináptica, liberação de neurotransmissores e transdução de sinais. Destacam-se também alguns trabalhos que avaliaram o papel de variantes em genes dos sistemas citados anteriormente sobre endofenótipos, gravidade e subtipos da Dependência de Cocaína, além da função cerebral de dependentes e controles a partir de exames de imagem, resposta à administração de Cocaína e farmacogenética. Outros trabalhos, ainda, avaliaram o papel de variantes raras no risco de desenvolvimento desse transtorno. No Brasil, alguns estudos genéticos de associação caso-controle foram conduzidos em duas amostras distintas, uma que incluiu pacientes oriundos de São Paulo e a outra do Rio Grande do Sul. Algumas associações significativas, principalmente para polimorfismos no gene que codifica o transportador de dopamina (SLC6A3), foram demonstradas. Enquanto a amostra de São Paulo recrutou pacientes que usavam Cocaína pelas duas principais vias de administração, fumada e inalada, somente o estudo realizado no Rio Grande do Sul foi desenhado para incluir somente dependentes de Crack, sendo que na literatura internacional isso é visto em um único estudo. Embora, até o momento, ainda não exista nenhum variante consolidada como fator de risco para DCC e as meta-análises não tenham mostrado resultados muito fortes, um polimorfismo no gene que codifica um receptor nicotínico colinérgico

**Endereço:** SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde

**Bairro:** Asa Norte

**CEP:** 70.750-521

**UF:** DF

**Município:** BRASÍLIA

**Telefone:** (61)3315-5878

**E-mail:** [conep@saude.gov.br](mailto:conep@saude.gov.br)



## COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.858.586

(rs16969968-CHRNA5) foi associado com Dependência de Cocaína em estudos independentes, gerando um valor-P combinado de  $7.64E-5$ . Interessantemente, o alelo A desse SNP apresenta um efeito protetor contra a Dependência de Cocaína, mas está fortemente associado com risco para Dependência de Nicotina (valor-P combinado =  $1,16E-31$ ). Tratando-se de estudos em larga escala, alguns estudos de associação por varredura genômica (GWAS) se preocuparam em avaliar desfechos compostos por diferentes TUS (por exemplo: anydep, quantidep, general dep), o que possibilita análises com tamanhos amostrais maiores, mas pode introduzir alta heterogeneidade clínica e fenotípica. O único GWAS, que avaliou especificamente dependentes de Cocaína, abriu novas perspectivas para o estudo da etiologia da DCC. Nesse trabalho, que incluiu mais de 12.000 casos e controles, com ancestralidade africana ou europeia, algumas associações significativas em nível de varredura genômica foram reveladas para SNPs nos genes FAM53B (family with sequence similarity 53, member B), NCOR2 (nuclear receptor corepressor 1) e CDK1 (cyclin-dependent kinase 1). Como praticamente toda a herdabilidade da DCC ainda é considerada perdida e/ou fantasma, há a necessidade de mais estudos genéticos, principalmente no nível de larga escala, para que novos genes candidatos possam ser revelados. Espera-se que, a partir de colaborações internacionais, o entendimento da genética da DCC avance como a da Esquizofrenia, que atualmente é um exemplo de sucesso. A partir de um consórcio internacional envolvendo pesquisadores do mundo todo, mais de 100 regiões do genoma foram associadas à Esquizofrenia, resultando na descoberta de novos caminhos biológicos envolvidos nesse transtorno, o que possibilitará o desenvolvimento, por exemplo, de terapias farmacológicas mais efetivas. Consideramos de extrema importância para o Brasil a colaboração com o NIDA, iniciada a partir de resultados já obtidos pela equipe de pesquisa que está propondo o presente projeto. O NIDA, o qual fomentará o projeto que está sendo descrito aqui, é uma instituição de prestígio internacional, que tem como missão o avanço da ciência sobre as causas e consequências do uso e dependência de drogas aplicando esse conhecimento na melhoria da saúde individual e pública em âmbito internacional. Como mencionado anteriormente, as evidências de estudos com gêmeos apontam para uma contribuição substancial da genética. A partir disso, a identificação de SNPs que modulam a susceptibilidade a esse transtorno é de fundamental importância não só para aumentar o número de fatores de risco conhecidos, mas também para o desenvolvimento novas terapias farmacológicas e intervenções terapêuticas mais personalizadas. Dessa forma, os resultados de um GWAS poderão contribuir para um amplo planejamento de estudos futuros, além de aumentar o potencial daqueles já em andamento. Nesse sentido, os dados obtidos a partir da genotipagem em larga escala poderiam contribuir na resolução de problemas de estratificação

**Endereço:** SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde

**Bairro:** Asa Norte

**CEP:** 70.750-521

**UF:** DF

**Município:** BRASÍLIA

**Telefone:** (61)3315-5878

**E-mail:** conep@saude.gov.br

## COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.858.586

populacional que frequentemente são encontrados na interpretação de resultados, além de estimular o uso de abordagens mais amplas, como o gene-based. Além disso, esse será o primeiro GWAS conduzido em uma amostra composta exclusivamente por dependentes de Crack. O Crack, embora derivado da Cocaína, possui maior e muito mais rápida absorção e ação, além de uma breve duração de seus efeitos, o que aumenta muito o craving (desejo) pela droga e o potencial para dependência dessa substância quando comparado com o cloridrato de Cocaína usado pela via inalada.

### HIPÓTESE

Embora estudos em larga escala sejam considerados livres de hipóteses prévias, no sentido de que esses estudos são geradores de novas perguntas de pesquisa, espera-se que associações já apontadas em outros estudos sejam replicadas no presente projeto. Além disso, há a possibilidade de que novas associações sejam detectadas e que o estudo de interações gene-ambiente possa revelar padrões de interações específicos da população brasileira.

### METODOLOGIA

Trata-se, primariamente, de um estudo transversal do tipo caso-controle. Análises de gravidade da dependência serão realizadas em uma subamostra a partir de uma abordagem longitudinal. Participantes e variáveis do estudo: A amostra será proveniente de três projetos de pesquisa distintos (detalhados abaixo), aprovados por comitês de ética em pesquisa (CEP) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) e também pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). Esses projetos receberam aprovação para coleta de sangue para análise de DNA. A unificação desses projetos dará origem a uma grande amostra de um consórcio nacional, chamado de COCCAinE Project - Collaborative Case Control Analysis Effort. Como esses projetos continuam em andamento, estima-se que o COCCAinE Project atinja um tamanho amostral de 1000 casos e de 1000 controles, incluindo homens e mulheres. Os bancos que formarão o conglomerado chamado de COCCAinE Project:

#### PROJETO 1 (PUCRS nº 10/05214):

Estilos parentais, negligência na infância e o craving em usuárias de Crack: relação com funções executivas, comportamento agressivo e marcadores biológicos" Coordenador: Prof. Dr. Rodrigo Grassi de Oliveira. Situação atual: em andamento. Esse projeto foi desenhado para avaliar o impacto de possíveis interações entre maus-tratos na infância com SNPs em genes envolvidos na

**Endereço:** SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde  
**Bairro:** Asa Norte **CEP:** 70.750-521  
**UF:** DF **Município:** BRASÍLIA  
**Telefone:** (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

## COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.858.586

ação do cortisol sobre parâmetros clínicos de dependentes de Crack. O banco de dados é composto por marcadores biológicos, dados cognitivos e comportamentais de mulheres dependentes de Crack que foram internadas em uma unidade psiquiátrica feminina especializada – Unidade São Rafael do Sistema de Saúde Mãe de Deus. Os dados de 250 mulheres já fazem parte da amostra.

### PROJETO 2 (HCPA nº 100002):

Avaliação de usuários e filhos de mulheres usuárias de Crack e estudos de eficácia de novos tratamentos. Coordenador: Prof. Dr. Félix Henrique Paim Kessler – UFRGS. Situação atual: em andamento. Esse projeto foi desenhado para avaliar o impacto do uso de Crack em dependentes e filhos de dependentes que buscaram (e ainda buscam) tratamento em Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Da mesma forma que para o projeto 1, o banco de dados do projeto 2 é composto por marcadores biológicos, dados cognitivos e comportamentais de dependentes de Crack que foram avaliados em diferentes centros especializados no tratamento de TUS na região metropolitana de Porto Alegre. Uma amostra populacional de indivíduos controles também foi obtida, sendo que os dados de 400 pacientes e de 200 controles já fazem parte da amostra.

### PROJETO 3 (HCPA nº 01-321):

Estudo das bases moleculares do transtorno de déficit de atenção/hiperatividade em adultos. Coordenador: Prof. Dr. Claiton Henrique Dotto Bau – UFRGS. Situação atual: em andamento. Esse projeto foi desenhado para identificar fatores genéticos de suscetibilidade para o transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) e suas comorbidades, incluindo TUS. Sabe-se que o TDAH, o qual é associado com Transtorno de Oposição Desafiante e Transtorno de Conduta, aumenta o risco para TUS. Autores, em uma metanálise, reuniram estudos longitudinais que acompanharam prospectivamente crianças com e sem TDAH até a vida adulta. Os autores mostraram que as crianças com TDAH são significativamente mais propensas a desenvolver abuso e dependência de Cocaína quando adolescentes ou adultos do que crianças sem TDAH. A partir desse projeto, será unificado ao COCCaInE Project um grupo controle de 630 indivíduos. Esses indivíduos foram recrutados no banco de sangue do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, onde passaram por uma avaliação psiquiátrica.

**Endereço:** SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde

**Bairro:** Asa Norte

**CEP:** 70.750-521

**UF:** DF

**Município:** BRASILIA

**Telefone:** (61)3315-5878

**E-mail:** conep@saude.gov.br

# COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.858.586

## Objetivo da Pesquisa:

### OBJETIVO PRIMÁRIO

Identificar variações genéticas que modulem o risco para DCC a partir de um GWAS em uma amostra composta por dependentes de crack e controles.

### OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

1. Colaborar com o National Institute on Drug Abuse (NIDA) para que a amostra brasileira, junto com amostras de outros países, fortaleça um consórcio internacional que visa desvendar a neurobiologia envolvida na DCC;
2. Participar de uma mega-análise de GWAS e de futuras metaanálises focadas em variantes genéticas específicas;
3. A partir de estudos longitudinais, usar os dados gerados pelo GWAS na identificação de fatores genéticos envolvidos na resposta ao tratamento de desintoxicação e recaída ao uso da droga;
4. Avaliar o papel de interações gene-gene, gene-ambiente e de escores poligênicos sobre o risco e gravidade da DCC;
5. Identificar novas trajetórias genético-moleculares envolvidas na predisposição e resposta terapêutica que possam subsidiar respectivamente novos alvos de pesquisa em prevenção e terapêutica;
6. Capacitar novos alunos de mestrado e doutorado para trabalhar com análise genômica em larga escala.

## Avaliação dos Riscos e Benefícios:

### RISCOS

Não existem riscos diretos aos participantes, pois as amostras de DNA e entrevistas já foram coletadas nos projetos anteriores. Esse é um projeto que visa à utilização de bancos de dados e material genético de outros projetos.

### BENEFÍCIOS

Os benefícios são apenas indiretos, pois a identificação de SNPs que modulam a susceptibilidade a esse transtorno pode ser de fundamental importância para aumentar o número de fatores de risco conhecidos, além do desenvolvimento de novas terapias farmacológicas e intervenções terapêuticas mais personalizadas.

**Endereço:** SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde

**Bairro:** Asa Norte

**CEP:** 70.750-521

**UF:** DF

**Município:** BRASÍLIA

**Telefone:** (61)3315-5878

**E-mail:** conep@saude.gov.br

## COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.858.586

### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de um estudo transversal, caso-controle, com o objetivo de buscar novos marcadores genéticos que podem estar envolvidos com suscetibilidade e gravidade da dependência de Crack.

As amostras serão provenientes de três projetos de pesquisa distintos anteriormente aprovados por comitês de ética. Os projetos são:

PROJETO 1 (PUCRS nº 10/05214): “Estilos parentais, negligência na infância e o craving em usuárias de Crack: relação com funções executivas, comportamento agressivo e marcadores biológicos”.

PROJETO 2 (HCPA nº 100002): “Avaliação de usuários e filhos de mulheres usuárias de Crack e estudos de eficácia de novos tratamentos”.

PROJETO 3 (HCPA nº 01-321): “Estudo das bases moleculares do transtorno de déficit de atenção/hiperatividade em adultos”.

Esses projetos receberam aprovação para coleta de sangue para análise de DNA. A unificação desses projetos dará origem a uma grande amostra de um consórcio nacional, chamado de COCCAinE Project - Collaborative Case-Control Analysis Effort.

### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Verificar item "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

### **Recomendações:**

Caso seja obtido um novo financiador, informar ao CEP através de emenda.

### **Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

RESPOSTA AO PARECER CONSUBSTANCIADO CONEP nº 1.714.463:

1. Solicita-se que seja submetida na Plataforma Brasil a tradução dos documentos intitulados "unificadocrack.pdf" e "BraziliansampleNIDA.pdf".

RESPOSTA: Esses documentos foram removidos, pois nós perdemos o prazo para apresentar ao Dr. Jonathan D. Pollock a aprovação do CONEP.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

**Endereço:** SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde

**Bairro:** Asa Norte

**CEP:** 70.750-521

**UF:** DF

**Município:** BRASÍLIA

**Telefone:** (61)3315-5878

**E-mail:** conep@saude.gov.br

## COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.858.586

2. A Folha de Rosto é um documento que dá consistência jurídica ao projeto e representa, portanto, o compromisso assumido pelo responsável legal em nome da Instituição e do patrocinador. Por isso, deve estar preenchido, uma vez que, em momento futuro, aquele poderá não ser mais o responsável e isso dará maior respaldo às partes envolvidas, caso seja necessário. Não consta na folha de rosto submetida para apreciação ética o devido preenchimento do campo Patrocinador. No documento intitulado "ProjetoGWASPUC.pdf", página 7 de 47, lê-se: "O NIDA, o qual fomentará o projeto que está sendo descrito aqui [...]". Sendo assim, solicita-se apresentar folha de rosto com o campo Patrocinador devidamente preenchido e assinado. Solicita-se adequação.

RESPOSTA: Como nós perdermos o prazo para apresentar ao Dr. Jonathan D. Pollock a aprovação do CONEP, o financiamento será buscado junto ao NIDA, em um próximo edital, a ser apresentado em conjunto com a Dra. Consuelo Walss-Bass da Univeristy of Texas – Houston. Por esse motivo não há como indicar patrocinador nesse momento. No momento que isso for definido, os autores informarão o CEP/CONEP para atualização desse item. Cabe ressaltar que o NIDA somente aprovará o repasse ao Brasil se o projeto estiver aprovado pelo Ministério das Relações Exteriores do Brasil, e essa aprovação depende da aprovação do protocolo pela CONEP.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

3. Solicita-se que seja adequada na Folha de Rosto, assim como em qualquer outro documento aplicável (incluindo os campos da Plataforma Brasil), a origem do financiamento (patrocinador), uma vez que, segundo informação contida no projeto detalhado, a instituição NIDA fomentará o projeto (vide documento intitulado "ProjetoGWASPUC.pdf", página 7 de 47) e não haverá financiamento próprio.

RESPOSTA: Como nós perdermos o prazo para apresentar ao Dr. Jonathan D. Pollock a aprovação do CONEP, o financiamento será buscado junto ao NIDA, em um próximo edital, a ser apresentado em conjunto com a Dra. Consuelo Walss-Bass da Univeristy of Texas – Houston. Por conta de não termos esse financiamento do NIDA aprovado ainda, os autores, nesse momento, estão assumindo o financiamento próprio.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

4. Quanto ao Projeto Detalhado, intitulado "ProjetoGWASPUC.pdf":

4.1 Na página 14 de 47, item Isolamento de DNA, lê-se: "O armazenamento e o transporte das

**Endereço:** SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde

**Bairro:** Asa Norte

**CEP:** 70.750-521

**UF:** DF

**Município:** BRASÍLIA

**Telefone:** (61)3315-5878

**E-mail:** conep@saude.gov.br

## COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.858.586

amostras estão de acordo com os requisitos das resoluções do CNS 196 de 1996 e 441 de 2011". Conforme o item XIV (DAS DISPOSIÇÕES FINAIS) da Resolução CNS nº 466 de 2012, "ficam revogadas as Resoluções CNS Nos 196/96, 303/2000 e 404/2008". Sendo assim, uma vez que a Resolução CNS nº 196 de 1996 está revogada, solicita-se adequação dos documentos substituindo "Resolução CNS nº 196 de 1996" por "Resolução CNS nº 466 de 2012".

RESPOSTA: Os autores do projeto fizeram as modificações solicitadas no subitem "5.4.1 Isolamento de DNA" conforme segue:

"O armazenamento e o transporte das amostras estão de acordo com os requisitos das resoluções do CNS 466/12 e 441/11. A equipe de pesquisa inclui pessoas capacitadas para coleta e manipulação do sangue. Para o armazenamento dos tubos contendo DNA isolado, dispõe-se de um freezer -80 °C, sob responsabilidade do Prof. Rodrigo Grassi-Oliveira. Toda manipulação será realizada dentro do Neurociência Cognitiva do Desenvolvimento da PUCRS. Todos os procedimentos seguiram (e continuarão seguindo) as normas da resolução 340/04 da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)."

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

4.2 Todos os aspectos relativos à formação de biorrepositório ao longo da execução de uma pesquisa deverão ser seguidos conforme explicitado na Resolução CNS 441/11 e na Portaria MS 2201/11, ainda que o armazenamento do material biológico seja temporário, sem previsão de uso futuro. Solicita-se revisar as referidas normativas e atender às pendências abaixo:

i. No cadastro do Protocolo de Pesquisa na Plataforma Brasil ("PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_661445.pdf" de 24/06/2016) foi informado que não haverá retenção de amostras para armazenamento em banco. O termo "banco" é equivocadamente interpretado como "biobanco", quando, na realidade, aplica-se tanto a biobanco quanto a biorrepositório. Assim, sempre que houver coleta e/ou uso de material biológico em uma pesquisa, este campo da Plataforma Brasil deverá ser assinalado com a opção "SIM". Solicita-se adequação.

RESPOSTA: Os autores do projeto anexaram o documento solicitado na Plataforma Brasil.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

ii. Deve-se apresentar Termo de Acordo em pesquisas envolvendo mais de uma instituição, contemplando formas de operacionalização, compartilhamento e utilização do material biológico

**Endereço:** SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde

**Bairro:** Asa Norte

**CEP:** 70.750-521

**UF:** DF

**Município:** BRASÍLIA

**Telefone:** (61)3315-5878

**E-mail:** conep@saude.gov.br

## COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.858.586

humano armazenado no Biorrepositório, inclusive a possibilidade de dissolução futura da parceria e a consequente partilha e destinação dos dados e materiais armazenados (Resolução CNS 441/2011, item 13; Portaria MS 2.201/11, Capítulo IV, seção II, artigo 19). Solicita-se adequação.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

iii. Solicita-se apresentar compromisso das instituições e dos pesquisadores no exterior quanto à vedação do patenteamento e da utilização comercial do material biológico humano armazenado em Biorrepositório no exterior (Item 16 da Resolução CNS nº 441 de 2011).

RESPOSTA: Os autores do projeto anexaram o documento solicitado na Plataforma Brasil.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

5. Quanto ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, intitulado "TCLE.pdf":

5.1 O TCLE é um documento no qual o pesquisador comunica, ao possível participante ou responsável, como será a pesquisa para a qual **ESTÁ SENDO CONVIDADO**, fornecendo a ele (a) todos os esclarecimentos necessários para decidir livremente se quer participar ou não. Solicita-se que o TCLE seja redigido **EM FORMA DE CONVITE**, uma vez que se entende por processo de Consentimento Livre e Esclarecido todas as etapas a serem necessariamente observadas para que o convidado a participar de uma pesquisa possa se manifestar, de forma autônoma, consciente, livre e esclarecida (Item IV da Resolução CNS nº 466 de 2012).

RESPOSTA: Os autores do projeto fizeram a modificação solicitada no TCLE como segue abaixo:

“Gostaríamos de convidá-lo(a) para participar da pesquisa “Estudo de associação por varredura genômica na dependência de crack e fenótipos relacionados - COllaborative Case-Control INItiativE in crack addiction (COCCaINE)”, que está sendo realizada pela Faculdade de Psicologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, coordenada pelo Prof. Dr. Rodrigo Grassi de Oliveira.”

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

5.2 Solicita-se que o termo "sujeito" seja substituído pelo termo "participante da pesquisa", em todo o texto do TCLE, conforme definição disposta no item II.10 da Resolução CNS nº 466 de 2012.

RESPOSTA: Os autores do projeto fizeram a modificação solicitada no TCLE.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

**Endereço:** SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde

**Bairro:** Asa Norte

**CEP:** 70.750-521

**UF:** DF

**Município:** BRASÍLIA

**Telefone:** (61)3315-5878

**E-mail:** conep@saude.gov.br



## COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.858.586

5.3 O TCLE não apresenta a numeração das páginas. Para garantir a integridade do documento, solicita-se que sejam inseridos os números de cada página, bem como a quantidade total delas, como por exemplo: "1 de 2" ou "1/2" e assim sucessivamente.

RESPOSTA: Os autores fizeram as adequações e pintaram em amarelo no TCLE.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

5.4 Solicita-se informar que o TCLE será elaborado em duas vias, RUBRICADAS EM TODAS AS SUAS PÁGINAS e assinadas, ao seu término, PELO CONVIDADO A PARTICIPAR DA PESQUISA, ou por seu representante legal, assim como pelo PESQUISADOR RESPONSÁVEL, ou membro da equipe. Salienta-se que os campos de assinatura, ao final do documento, DEVEM ESTAR NA MESMA PÁGINA (item IV.5.d da Resolução CNS nº 466 de 2012).

RESPOSTA: Essas informações foram incluídas no TCLE conforme abaixo:

“Este termo foi elaborado em duas vias. Todas as páginas devem ser rubricadas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável.”

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

5.5 Solicita-se incluir no TCLE o nome e o endereço (cidade e país) do laboratório onde as amostras biológicas dos participantes de pesquisa serão armazenadas (Item 9 da Resolução CNS nº 441 de 2011).

RESPOSTA: Essas informações foram incluídas no TCLE conforme abaixo: “A sua amostra de DNA está armazenada no Laboratório Neurociência Cognitiva do Desenvolvimento, Av Ipiranga, nº 6690, 2o andar, sala 14, Porto Alegre, Rio Grande do Sul.”

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

5.6 Solicita-se descrever no TCLE os exames que serão realizados com as amostras biológicas do participante (Item IV.3.a da Resolução CNS nº 466 de 2012).

RESPOSTA: Essas informações foram incluídas no TCLE conforme abaixo:

“O exame molecular que será realizado no exterior consiste em uma genotipagem de marcadores genéticos a partir do uso de um biochip comercial, ou seja, seu DNA passará por um grande processo de identificação de pequenas regiões do DNA, chamadas marcadores, que podem variar de uma pessoa para outra.”

**Endereço:** SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde

**Bairro:** Asa Norte

**CEP:** 70.750-521

**UF:** DF

**Município:** BRASÍLIA

**Telefone:** (61)3315-5878

**E-mail:** conep@saude.gov.br

## COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.858.586

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

5.7 Lê-se: "Estes termos seguem as regulamentações do Conselho Nacional de Saúde na Resolução Nos 196/96 e 441/11 e 340/04 do Comissão Nacional de Ética em Pesquisa". Conforme o item XIV (DAS DISPOSIÇÕES FINAIS) da Resolução CNS nº 466 de 2012, "ficam revogadas as Resoluções CNS Nos 196/96, 303/2000 e 404/2008". Sendo assim, uma vez que a Resolução CNS nº 196 de 1996 está revogada, solicita-se adequação dos documentos, substituindo "Resolução CNS nº 196 de 1996" por "Resolução CNS nº 466 de 2012".

RESPOSTA: Os autores substituíram a resolução CNS 196/96 pela 466/12 no TCLE conforme abaixo:  
"Estes termos seguem as regulamentações do Conselho Nacional de Saúde na Resolução Nos 466/12 e 441/11 e 340/04 do Comissão Nacional de Ética em Pesquisa"

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

5.8 Sobre a questão de tornar públicos os dados dos participantes que consta:

i. No documento "ProjetoGWASPUC.pdf", no item "5.8 Análise dos dados", onde lê-se: "Após os passos iniciais de controle de qualidade e limpeza (realizados pela equipe do NIDA), os dados serão submetidos ao Database of Genotypes and Phenotypes (dbGaP), onde serão armazenados por um período de 6 meses antes da liberação para o uso público. O dbGaP foi desenvolvido para arquivar e distribuir os resultados de estudos que investigaram associações genótipo-fenótipo. O conteúdo de cada estudo submetido inclui documentos (protocolos, questionários, etc.), medidas fenotípicas, dados genéticos oriundos de abordagens de genotipagem em larga escala e detalhes de associações estatísticas entre os fenótipos e genótipos. Todo o conteúdo recebe códigos de identificação estáveis e únicos, permitindo que os dados ou estudos específicos sejam citados adequadamente em publicações. O acesso aos dados a nível individual requer autorização prévia do National Institute of Health, sendo uso dos dados limitado a atividades de pesquisa aprovados."

ii. No documento "BraziliansampleNIDA.pdf" (em e-mail ao pesquisador responsável) é informado que a NIDA possui um contrato com a empresa RUCDR Infinite Biologics ([www.rucdr.org](http://www.rucdr.org)) para realizar a genotipagem das amostras biológicas. A NIDA emitiu um aviso em Fevereiro de 2016 oferecendo este serviço gratuito aos investigadores da área: <http://grants.nih.gov/grants/guide/notice-files/NOT-DA-16-013.htm> (Notice of Information: NIDA offers Genotyping on Smokescreen® Genotyping Array to Substance Abuse Disorder Investigators), onde lê-se: "During that time submitting investigators will have the chance to analyze their own data."

**Endereço:** SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde

**Bairro:** Asa Norte

**CEP:** 70.750-521

**UF:** DF

**Município:** BRASÍLIA

**Telefone:** (61)3315-5878

**E-mail:** [conep@saude.gov.br](mailto:conep@saude.gov.br)

## COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.858.586

Once the data are released to the public there are no other time restrictions or embargo periods.” Nesse link também fica claro que o pedido de genotipagem (gratuita) das amostras biológicas DEVE ir acompanhado de várias informações associadas dos participantes, que se entende, também se tornarão de uso público, a saber:

- informações demográficas;
- informações sobre abuso de substâncias e medidas de adição;
- indicadores psicossociais comportamentais;
- medidas de dependência de nicotina, cannabis, cocaína e/ou opiáceos;
- medidas de dependência de drogas múltiplas;
- comorbidades

Ressalta-se que ao participante de pesquisa cabe autorizar ou não o armazenamento de dados genéticos no âmbito da pesquisa. Sendo assim, solicita-se REQUERER A AUTORIZAÇÃO OU NÃO do participante da pesquisa no TCLE para: armazenar os dados genéticos do estudo no exterior (poderá ser escrito em forma de alternativas excludentes entre si), informando o local (nome e endereço) onde os dados serão armazenados; tornar públicos esses dados; e disponibilizar a amostra para outras pesquisas (Item III.6 da Resolução CNS nº 340 de 2004)”.

RESPOSTA: Como pretende-se submeter a um novo edital do NIDA, entendemos que essas exigências sempre estarão presentes nos contratos de financiamento dessa agência. Dessa forma foram adicionadas essas informações no TCLE. Segue itens 12 e 13 do TCLE:

12. Você tem o direito de autorizar ou não que seus dados genéticos sejam armazenados no exterior, especificamente no Programa de Genética Psiquiátrica da Universidade do Texas na cidade de Houston (1941 East Rd, suite 3110, Houston, TX, 77054).

Para isso você precisa assinalar se autoriza ou não: ( ) SIM, AUTORIZO; ( ) NÃO AUTORIZO

13. Você tem o direito de autorizar ou não que seus dados genéticos se tornem públicos, de maneira que sua identidade seja mantida em anonimato e que esses dados possam ser usados para outras pesquisas. ( ) SIM, AUTORIZO; ( ) NÃO AUTORIZO

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

5.9. Solicita-se que seja informado no TCLE que a retirada do consentimento de guarda dos dados genéticos humanos armazenado deverá ser realizada POR ESCRITO E ASSINADA, e que dar-se-á a qualquer tempo, sem prejuízo ao participante da pesquisa, com validade a partir da data da comunicação da decisão (Itens III.6 e III.7 da Resolução CNS nº 340 de 2004 e Item 10.I da Resolução CNS nº 441 de 2011).

**Endereço:** SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde

**Bairro:** Asa Norte

**CEP:** 70.750-521

**UF:** DF

**Município:** BRASÍLIA

**Telefone:** (61)3315-5878

**E-mail:** conep@saude.gov.br

## COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.858.586

RESPOSTA: Essas informações foram incluídas no TCLE conforme item 11.

“A retirada do seu consentimento de guarda dos dados genéticos humanos armazenado deverá ser realizada por escrito e assinada, a qualquer tempo, sem qualquer prejuízo.”

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

6. O cronograma não está adequado, pois informa que o estudo já teve início. Solicitam-se esclarecimentos e, caso necessário, adequação do cronograma com relação à data de início do estudo, dado que ele ainda se encontra em análise no sistema CONEP/CEP até a presente data. Ressalta-se que a conduta do Sistema CEP/CONEP tem sido de NÃO EMITIR PARECER em pesquisas concluídas ou EM ANDAMENTO, baseando-se no fato de que o parecer não é algo burocrático, mas uma contribuição para a adequação do projeto de pesquisa às normas éticas vigentes, de modo a proteger os interesses dos participante e, conseqüentemente, de todos os envolvidos no processo: pesquisador, instituição, CEP e a própria CONEP (Item 3.3.f Norma Operacional CNS nº 001 de 2013).

RESPOSTA: O cronograma estava organizado na esperança de se obter a aprovação em tempo de enviar as amostras para o edital de 2016. Como não foi hábil esse prazo, mudamos o cronograma de maneira a considerar os prazos de aprovação na CONEP e busca de fomento em 2017.

Segue novo cronograma: (vide tabela apresentada no arquivo intitulado "cartaresposta.docx" datado em 10/11/2016).

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

### Considerações Finais a critério da CONEP:

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - Conep, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Protocolo aprovado.

### Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_661445.pdf	10/11/2016 21:32:51		Aceito

**Endereço:** SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde

**Bairro:** Asa Norte

**CEP:** 70.750-521

**UF:** DF

**Município:** BRASÍLIA

**Telefone:** (61)3315-5878

**E-mail:** conep@saude.gov.br

## COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.858.586

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEmodificado.pdf	10/11/2016 21:32:17	Rodrigo Grassi de Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEmodificado.docx	10/11/2016 21:30:45	Rodrigo Grassi de Oliveira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetomodificado.docx	10/11/2016 21:30:00	Rodrigo Grassi de Oliveira	Aceito
Outros	cartaresposta.docx	10/11/2016 21:16:33	Rodrigo Grassi de Oliveira	Aceito
Folha de Rosto	20161110111617064.pdf	10/11/2016 14:46:52	Rodrigo Grassi de Oliveira	Aceito
Declaração de Pesquisadores	cartaconsuelo.pdf	07/10/2016 12:16:44	Rodrigo Grassi de Oliveira	Aceito
Outros	cronogramacrack.docx	07/10/2016 12:00:11	Rodrigo Grassi de Oliveira	Aceito
Outros	CV.pdf	07/10/2016 11:53:21	Rodrigo Grassi de Oliveira	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Rodrigostatement.pdf	07/10/2016 11:51:49	Rodrigo Grassi de Oliveira	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Rodrigostatementtraducao.pdf	07/10/2016 11:51:19	Rodrigo Grassi de Oliveira	Aceito
Outros	termodeacordoentreasinstituicoesenvolvidas.pdf	07/10/2016 11:45:12	Rodrigo Grassi de Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEGWAS.pdf	07/10/2016 11:31:54	Rodrigo Grassi de Oliveira	Aceito
Outros	lattespesquisadores.docx	31/05/2016 11:19:54	Rodrigo Grassi de Oliveira	Aceito
Outros	Documento14634029504033.pdf	31/05/2016 11:11:56	Rodrigo Grassi de Oliveira	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TermoCompromissoGWAS.pdf	16/05/2016 12:24:07	Rodrigo Grassi de Oliveira	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CartaFelix.pdf	16/05/2016 12:23:01	Rodrigo Grassi de Oliveira	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CartaClaiton.pdf	16/05/2016 12:22:06	Rodrigo Grassi de Oliveira	Aceito

**Endereço:** SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde

**Bairro:** Asa Norte

**CEP:** 70.750-521

**UF:** DF

**Município:** BRASÍLIA

**Telefone:** (61)3315-5878

**E-mail:** conep@saude.gov.br

## COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.858.586

Outros	CartaComissaoCientifica.pdf	16/05/2016 12:21:08	Rodrigo Grassi de Oliveira	Aceito
Outros	unificadocrack.pdf	16/05/2016 12:19:47	Rodrigo Grassi de Oliveira	Aceito
Orçamento	orcamentoGWAS.pdf	16/05/2016 12:17:25	Rodrigo Grassi de Oliveira	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

BRASILIA, 10 de Dezembro de 2016

---

**Assinado por:**  
**Jorge Alves de Almeida Venancio**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde

**Bairro:** Asa Norte

**CEP:** 70.750-521

**UF:** DF

**Município:** BRASILIA

**Telefone:** (61)3315-5878

**E-mail:** conep@saude.gov.br

