

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

**A INFLUÊNCIA DO GENE *CHRNA5* NO TRANSTORNO POR USO DE  
CRACK/COCAÍNA**

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

**ANGELITA PURPER AROCHE**

Orientador: Prof. Dr. Claiton Henrique Dotto Bau

Co-orientadora: Dra. Jaqueline Bohrer Schuch

Porto Alegre, 30 de abril de 2018.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética Humana Molecular do Departamento de Genética do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A aluna recebeu bolsa de estudos concedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

**Instituições Financiadoras:**

CNPq

FIPE-HCPA

CAPES

FAPERGS-DECIT-PPSUS

SENAD

## **AGRADECIMENTOS**

---

Há 4 anos eu ingressava no PPGBM da UFRGS como acadêmica de iniciação científica. Vazia de conhecimentos técnicos, mas completamente preenchida pelo amor à genética e vontade de aprender, fui recebida de braços abertos pelo grupo do professor Claiton Bau. As “viagens” praticamente diárias de Novo Hamburgo até o Campus do Vale, concomitante aos desafios que tive que vencer, não me fizeram desistir. Hoje, encerro as minhas atividades no PPGBM como Mestre em genética e biologia molecular. Além de sair preenchida de conhecimentos técnicos, amor à genética e vontade de aprender cada vez mais, carregarei comigo um crescimento pessoal enorme plantado por tantos professores dos quais tive a oportunidade de aprender.

Agradeço ao professor Claiton e todos os colegas de pesquisa da nossa salinha 109 por terem me ajudado (Bruna, Djenifer... e em especial Diana, Cibele e Renata pelas contribuições na minha dissertação). Ao Diego que me trouxe para cá e foi meu co-orientador em praticamente todos os trabalhos desenvolvidos. Me ensinou muito! À Jaqueline que assumiu minha co-orientação no Mestrado e sempre foi minuciosa nas suas correções.

A todos os pacientes e voluntários que doam o seu tempo e atenção para que façamos pesquisa. A todas as instituições e profissionais que tornam isso possível.

Aos meus pais, Waldir e Elisa que com seu apoio e suporte me fizeram chegar até aqui. A todos os amigos e familiares que torceram por mim e me motivaram a seguir em frente mesmo nos momentos mais difíceis.

Me sinto privilegiada por ter tido a oportunidade de me tornar Mestre em um programa de excelência como o PPGBM da UFRGS. Foi uma caminhada árdua, mas que fez com que eu saísse daqui mais forte e consciente.

A todos, muito obrigada!

# SUMÁRIO

---

Lista de abreviaturas .....	4
Resumo .....	6
Abstract.....	8
<b>Capítulo 1</b> .....	10
1.1 Introdução .....	10
1.2 Efeito do uso de substâncias sobre o cérebro .....	12
1.3 nAChRs.....	14
1.3.1 <i>Os nAChRs sob a modulação da liberação dopaminérgica e a ação da cocaína</i> ...	17
1.4 Genética do TUS .....	18
1.4.1 <i>O papel do CHRNA5 no TUS</i> .....	19
<b>Capítulo 2</b> .....	23
2.1 Justificativa.....	23
2.2 Objetivo Geral .....	24
2.3 Objetivos Específicos.....	24
<b>Capítulo 3</b> .....	25
3.1 Artigo.....	25
<b>Capítulo 4</b> .....	42
4.1 Discussão Geral.....	42
Referências.....	47
Anexos.....	57
Anexo 1 - Produção científica adicional durante Mestrado.....	57

## Lista de abreviaturas

---

ACh	Acetilcolina
<i>ADH1B</i>	Gene codificador da Álcool Desidrogenase 1B
<i>ADH1C</i>	Gene codificador da Álcool Desidrogenase 1C
<i>ALDH2</i>	Gene codificador da Aldeído-Desidrogenase 2
Asn	Aspargina
Asp	Aspartato
ATV	Área Tegmental Ventral
<i>CHRNA3</i>	<i>Cholinergic Receptor Nicotinic Alpha 3 Subunit</i>
<i>CHRNA5</i>	<i>Cholinergic Receptor Nicotinic Alpha 5 Subunit</i>
<i>CHRNB4</i>	<i>Cholinergic Receptor Nicotinic Beta 4 Subunit</i>
<i>CSMD1</i>	<i>CUB and Sushi multiple domains 1</i>
CSSA	<i>Cocaine selective severity assessment</i>
<i>CYP2A6</i>	Gene codificador da enzima de metabolização da nicotina
DRD1	Receptor de dopamina D1
DRD2	Receptor de dopamina D2
DSM	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais
<i>FAM53B</i>	<i>Family with sequence similarity 53, member B</i>
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GWAS	<i>Genome-Wide Association Study</i>
INPAD	Instituto de Pesquisa em Álcool e Drogas
LENAD	Levantamento Nacional de Álcool e Drogas
MINI	<i>Mini international neuropsychiatric interview</i>
MMSE	<i>Mini mental state examination</i>
mRNA	RNA mensageiro
nAChR	Receptor Nicotínico de Acetilcolina
<i>NCOR2</i>	<i>Nuclear receptor corepressor 2</i>
SCID	<i>Structured clinical interview for DSM</i>
<i>SLC35G1</i>	<i>Solute carrier family 35 member G1</i>
SNc	Substância negra

SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SYT1	Gene codificador da Sinaptotagmina 1
TDAH	Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade
TUS	Transtorno por uso de substâncias
UNODC	<i>United Nations Office on Drugs and Crime</i>

## Resumo

---

O transtorno por uso de cocaína é um problema de saúde pública mundial e está associado com criminalidade e violência. Por ser de natureza hidrossolúvel, a cocaína pode ser administrada por diferentes vias, sendo o crack a forma da cocaína fumada. Os receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) são mediadores importantes do sistema de recompensa e podem modular a liberação de dopamina. Eles são canais iônicos, formados por 5 subunidades homólogas onde diferentes combinações dessas subunidades influenciam as propriedades do receptor. Os receptores contendo  $\alpha 5$  possuem permeabilidade aumentada ao cálcio e são considerados mais responsivos. A subunidade auxiliar  $\alpha 5$ , codificada pelo gene *CHRNA5*, compõe receptores funcionais apenas na presença de uma subunidade primária e uma complementar. Variantes no *CHRNA5*, principalmente o rs16969968, têm sido associadas à dependência de diferentes substâncias, como nicotina, cocaína e álcool. Diversos trabalhos têm associado o alelo de menor frequência (alelo A) ao risco para dependência de nicotina e proteção contra a dependência de cocaína. Entretanto, este SNP e demais variantes presentes no *CHRNA5* não foram avaliadas na susceptibilidade à dependência de crack. Por ser administrado na forma fumada, é sugerido que o crack poderia produzir maior efeito de reforço comparado à cocaína, que é administrada de forma inalada ou intravenosa. Neste trabalho, nosso objetivo foi avaliar se variantes do *CHRNA5* influenciam a dependência de crack e se essas influências são similares à observada para a dependência de cocaína (inalada ou intravenosa) ou à nicotina, que também é uma droga fumada. Foram avaliados 3 SNPs no gene *CHRNA5* (rs16969968, rs588765, rs514743). Observamos que o alelo G do rs16969968 foi associado com risco para a dependência de crack, corroborando estudos prévios que avaliaram a dependência de cocaína. Também reportamos, pela primeira vez, uma associação do rs588765 com dependência de crack. Este SNP, capaz de promover alterações nos níveis de RNA mensageiro, foi associado previamente com dependência de nicotina e de álcool. Dados promissores também foram encontrados na avaliação de haplótipos, corroborando os resultados obtidos na análise de polimorfismos individuais. Além destas

análises genéticas, nós formulamos uma hipótese relacionada ao efeito paradoxal do rs16969968 sobre as dependências de nicotina e crack/cocaína. Nós sugerimos que o alelo G promoveria proteção contra a dependência de nicotina devido ao seu papel sobre a regulação positiva e risco para dependência de crack/cocaína devido ao seu papel sobre a relação dopaminérgica fásico/tônica, que permite uma diferença substancial de liberação dopaminérgica extracelular entre níveis basais e sob uso da droga. O conjunto de dados reforça o complexo papel da variabilidade genética em receptores nicotínicos sobre diferentes transtornos por uso de substâncias, apontando para a necessidade de mais estudos que contribuam para o detalhamento destes mecanismos. O avanço desse tipo de abordagem pode levar a novas perspectivas para a prevenção e manejo deste grave problema de saúde pública.



## Abstract

---

The cocaine use disorder is a global public health problem and it is associated with both crime and violence. Since cocaine has water-soluble properties, it can be administered by different routes, with crack being the smoked one. The dopaminergic release may be modulated by nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs), which are important mediators of the reward system. These receptors are ion channels with different properties according to the combinations of the 5 homologous subunits that compose them. Receptors containing  $\alpha 5$  subunit present increased calcium permeability and are more responsive. Such subunit is encoded by the *CHRNA5* gene, variants in this gene, mostly rs16969968, have been associated with addiction of different substances, such as nicotine, cocaine and alcohol. Several studies have associated the minor allele (A) with risk for nicotine addiction and protection against cocaine addiction. However, this SNP and other variants in the *CHRNA5* were not evaluated specifically regarding susceptibility to crack dependence. Since it is administered in the smoked form, it is suggested that crack might produce a greater stimulant effect compared to cocaine, which is administered by snorted or intravenous form. This study evaluated 3 SNPs in the *CHRNA5* gene (rs16969968, rs588765, rs514743) was aiming in order to appraise its influence on crack addiction susceptibility and if this effect is similar to cocaine addiction or nicotine addiction, another smoked drug. The rs16969968 G allele was associated with risk to crack addiction, corroborating previous studies that evaluated cocaine addiction. We also reported, for the first time, an association of rs588765 with crack addiction. This SNP, can affect mRNA levels, and it was previously associated with nicotine and alcohol addiction. Moreover, haplotype findings are in agreement with those in the single markers analyses. In addition to these genetic analyses, we formulated a hypothesis related to the paradoxical effect of rs16969968 on nicotine and crack cocaine addictions. It is important to note that although this hypothesis has not been tested experimentally, it was formulated based on previous literature. Our findings highlight the complex role of genetic variability regarding nicotinic receptors in different substance use disorders, pointing to the need of further studies to explore

in more details these mechanisms. The improvement of this approach may lead to new perspectives for the prevention and management of these serious public health problems.

# Capítulo 1

---

## 1.1 Introdução

O transtorno por uso de substâncias (TUS) é caracterizado pelo conjunto de sintomas cognitivos, comportamentais e fisiológicos decorrentes do uso contínuo de substâncias pelo indivíduo. As alterações nos circuitos cerebrais promovidas pelo uso de substâncias podem ser persistentes mesmo após o período de desintoxicação, e os efeitos comportamentais decorrentes dessas alterações, podem se manifestar durante as recaídas (APA 2013).

Dentre os critérios de diagnóstico do TUS encontram-se os domínios: baixo controle sobre o uso da substância (esforços malsucedidos para diminuir ou descontinuar o uso), prejuízo social (uso recorrente que pode resultar no fracasso em cumprir tarefas de trabalho) e uso arriscado da substância (o indivíduo continua utilizando mesmo estando ciente dos problemas físicos ou psicológicos que lhe causam). De acordo com o número de sintomas apresentados, o transtorno pode ser classificado como leve, moderado ou grave (APA 2013).

O uso destas substâncias frequentemente tem início na adolescência, o que torna o transtorno especialmente relevante. Em 2010, dados oriundos de levantamentos realizados em capitais brasileiras demonstraram que 25,5% dos estudantes já tinha feito uso de alguma droga, sem considerar as substâncias legais álcool e tabaco (Carlini et al. 2010). De modo geral, dentre as substâncias mais utilizadas estão álcool e tabaco, maconha e crack/cocaína (APA 2013).

O uso de cocaína é considerado um problema de saúde pública mundial e está fortemente relacionado com criminalidade e violência (UNODC 2015). No Brasil existe um grande mercado de consumidores, o que parece contribuir para a colocação do país entre um dos mais violentos do mundo (Abdalla et al. 2018).

A cocaína é obtida através das folhas da planta *Erythroxylum*, encontrada na América do Sul, México, Indonésia e Índias Ocidentais (Altman 1985 et al). Após a obtenção do alcaloide ocorre a mistura com ácido clorídrico, dando origem

ao cloridrato de cocaína, que tem a aparência de pó branco (Shanti 2003 et al). A cocaína em pó (cloridrato de cocaína) pode ser administrada via nasal ou injetada, enquanto o crack – encontrado em formato de pedra - é a forma da cocaína fumada. O crack é obtido através do hidróclorido de cocaína que é dissolvido em água, misturado com uma base forte e aquecido (Shanti 2003 et al). A sua produção permite diferenças quanto aos níveis de pureza, podendo conter outras substâncias tóxicas. Além disso esse formato aumenta o risco da potencialidade aditiva e efeitos tóxicos (Crespo-Fernández et al. 2007). O crack, por ser fumado, chega ao cérebro em maior concentração e em menor tempo que a cocaína aspirada, possuindo assim um efeito ainda mais devastador (Crespo-Fernández et al. 2007; Scheidweiler et al. 2003). Seu pico de ação ocorre entre 1 e 3 minutos e sua duração entre 5 e 15 minutos. Já a cocaína aspirada possui um pico de ação entre 15 e 20 minutos, com duração 60 e 90 minutos (Goldstein et al. 2009).

A via de administração da cocaína está relacionada não apenas a diferenças na farmacocinética, mas também na coadministração de diferentes substâncias (Stewart et al. 2014). Isso reforça a possibilidade de que, embora a cocaína aspirada e o crack tenham a mesma substância ativa, possa existir diferenças importantes entre os usuários das diferentes vias de administração.

No Brasil, a prevalência do uso de cocaína em algum momento da vida foi estimada em 3,9% enquanto que a prevalência da dependência de cocaína em 0,6% (LENAD 2012). Entre adolescentes essa estimativa foi de 3,6% para cocaína e 1,5% para crack (Abdalla et al. 2014; INPAD 2014). Entre os anos de 2012 e 2014, a prevalência anual do uso de cocaína aumentou na América do Sul de 1,2% para 1,5%, estimativa mais alta que a prevalência mundial do ano de 2014 que foi de 0,4% (UNODC 2016). O Brasil apresenta uma forte contribuição para a alta prevalência anual na América do Sul, estimada em 1,7% no ano de 2013 (UNODC 2015).

Dados mais recentes mostram que a prevalência do uso de cocaína vem aumentando na América do Norte e Europa. Entre 2011 e 2016 houve um aumento de 30% na prevalência Europeia. Além disso, a quantidade de cocaína

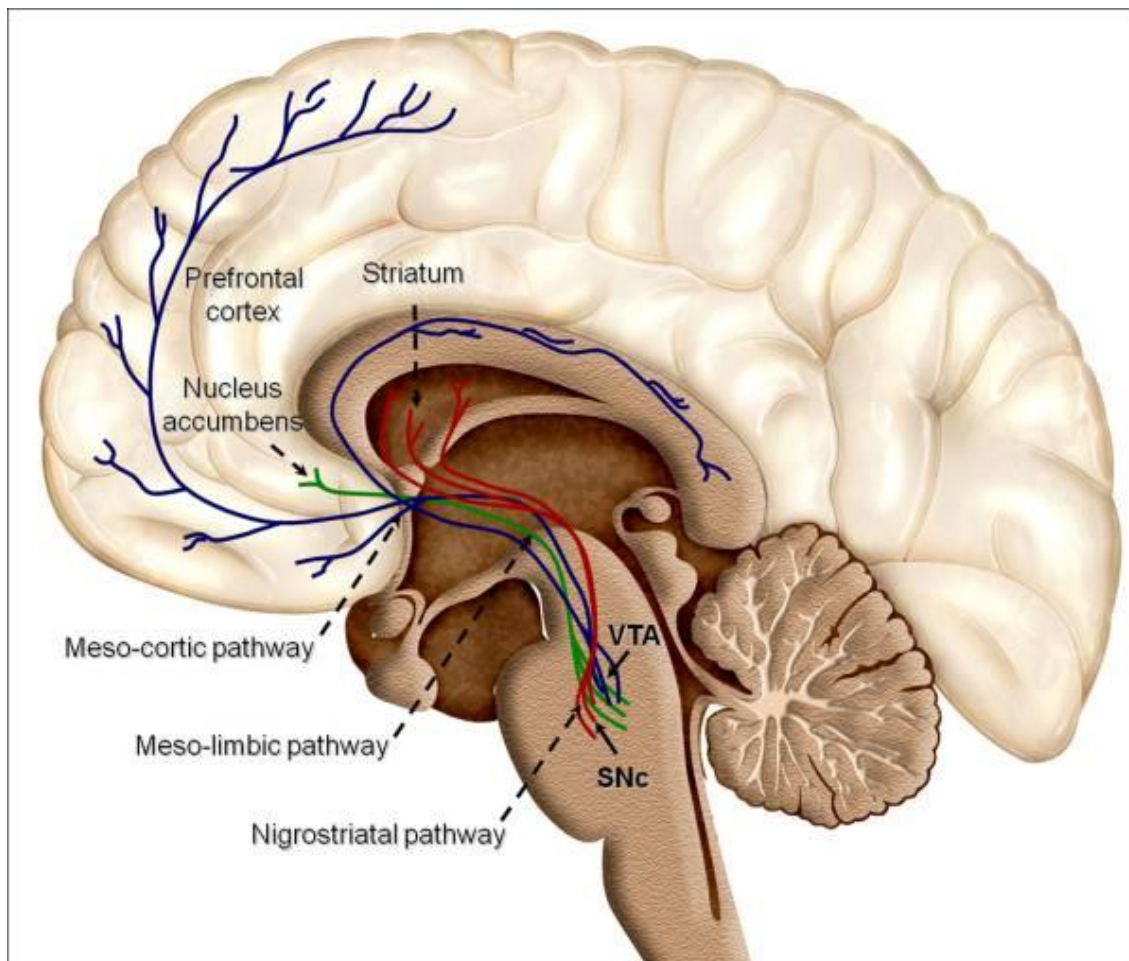
apreendida mundialmente aumentou 30% em 2015, chegando aos níveis mais altos já relatados (864 toneladas). Só na Europa, o aumento foi de 35%, chegando a 84 toneladas apreendidas (UNODC 2017).

## **1.2 Efeito do uso de substâncias sobre o cérebro**

O mecanismo biológico da dependência envolve o circuito neuronal relacionado com a memória e o aprendizado (Dackis & O'Brien 2001; Williams & Adinoff 2008). Nesse sentido o uso de cocaína ao longo do tempo provoca prejuízos cognitivos em diversos domínios como atenção, memória, tomada de decisão baseada em recompensa e desempenho psicomotor (Spronk et al. 2013; Vonmoos et al. 2013). Esses prejuízos parecem diferir quanto ao status do usuário (usuário ativo ou em abstinência). Dependentes de cocaína no período de abstinência apresentaram melhor desempenho cognitivo e aumento na densidade de tecido cortical, quando comparados aos usuários ativos (Hanlon et al. 2011). Indivíduos que apresentaram prejuízos cognitivos após exposição moderada à cocaína tiveram melhora cognitiva após um ano de abstinência, o que sugere que pelo menos em parte, alguns domínios cognitivos podem ser reestabelecidos após o abandono da droga (Vonmoos et al. 2014).

O sistema dopaminérgico, um dos principais envolvidos no sistema de recompensa, está fortemente envolvido no mecanismo da dependência (Nutt et al. 2015; Vijayraghavan et al. 2007). Este envolvimento é corroborado por estudos de neuroimagem que indicam um aumento nos níveis de dopamina induzido por drogas como cocaína e metanfetamina em regiões que incluem o núcleo accumbens, assim como diminuição na expressão do receptor de dopamina D2 (DRD2), sendo que ambas alterações permanecem mesmo após algum tempo de desintoxicação (Volkow et al. 2009; Volkow et al. 2011). O núcleo accumbens parece ser o sítio principal para a ação da cocaína, uma vez que as células dessa região, ao serem estimuladas por dopamina, promovem sensação de recompensa (Figura 1). Esse aumento da concentração dopaminérgica ocorre através da sua ação inibitória sobre os transportadores de dopamina. Dessa forma a dopamina que seria recaptada, permanece em ação, se acumula e superativa os receptores.

Essa experiência fica registrada de forma que essas memórias ao serem carregadas provocam o desejo de repeti-la (Hyman et al. 2006; Nestler 2005).



**Figura 1: Visão geral de estruturas do sistema dopaminérgico:** os neurônios dopaminérgicos estão localizados nas estruturas do mesencéfalo na substância negra (SNc) e área tegmental ventral (ATV). Os seus axônios se projetam para o estriado (núcleo caudado, putâmen e estriado ventral, incluindo núcleo accumbens), o córtex pré-frontal dorsal e ventral. Striatum (estriado), prefrontal cortex (córtex pré-frontal), nucleus accumbens (núcleo accumbens), meso-cortic pathway (via mesocortical), meso-limbic pathway (via mesolímbica), nigrostriatal pathway (via nigroestriatal). (Fonte: (Arias-Carrion et al. 2010)).

O sistema dopaminérgico não atua sozinho sobre a dependência, e dentre os seus mediadores, destacam-se os receptores nicotínicos de acetilcolina

(nAChRs) que têm sido bastante estudados nesse sentido (Albuquerque et al. 2009; Buhler et al. 2015; Sherva et al. 2010; Williams & Adinoff 2008). A nicotina age como agonista dos nAChRs, promovendo o aumento na liberação de dopamina em regiões cerebrais importantes para o desenvolvimento do abuso de substâncias (Jasinska et al. 2014). Já a cocaína eleva os níveis de dopamina no núcleo accumbens, através do bloqueio de sua recaptação mediada por seu transportador, prolongando o tempo que a dopamina permanece na fenda sináptica (Nestler 2005) e através do bloqueio dos nAChRs que promove aumento da relação dopaminérgica fásica em relação à tônica, que por sua vez, está relacionada a maiores níveis extracelulares dopaminérgicos (Ver item 1.3.1). A cocaína inibe os transportadores de dopamina, nAChRs e canais de sódio de uma maneira dose-dependente (Acevedo-Rodriguez 2014 et al). Por ser administrada por vias diferentes, a cocaína aspirada, intravenosa e fumada (crack), poderia apresentar diferenças quanto ao mecanismo de dependência.

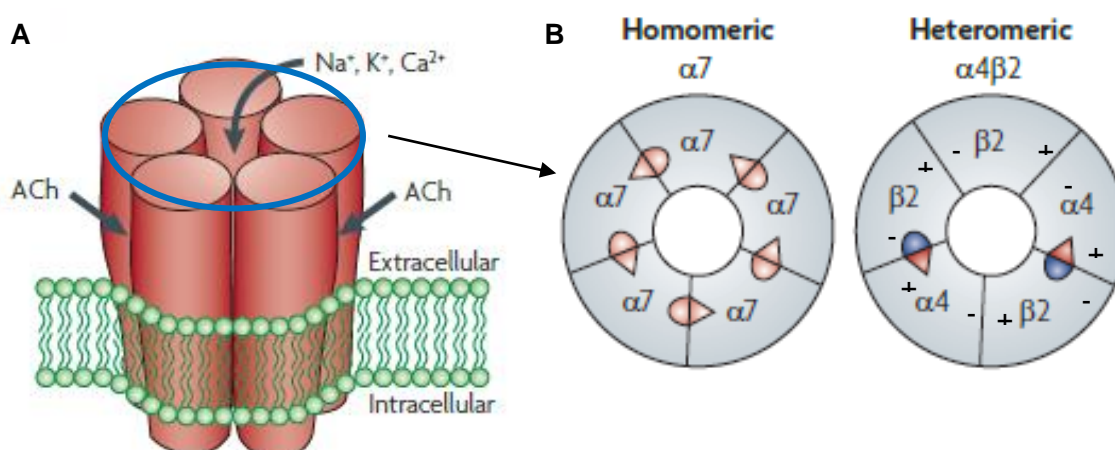
A neurotransmissão dopaminérgica e colinérgica parecem coordenar o sistema de recompensa de forma complementar no estriado, uma vez que a ativação do receptor de dopamina D1 (DRD1) estimula a liberação de acetilcolina, enquanto o receptor DRD2 a inibe. Por outro lado, as projeções dopaminérgicas aferentes no núcleo accumbens ativam a acetilcolina no estriado, iniciando a sua liberação (Williams & Adinoff 2008). Ainda, a nicotina e a cocaína parecem exercer efeitos em direções distintas, onde a nicotina modula a liberação de dopamina por ativação dos nAChRs e a cocaína por inibição.

### **1.3 nAChRs**

Os nAChRs são canais iônicos transmembrana distribuídos amplamente no sistema nervoso central, sistema nervoso periférico, podendo também ser encontrados em tecidos não neuronais. No sistema nervoso central a ativação dos nAChRs regula a liberação de neurotransmissores e a excitabilidade celular. Essa ativação ocorre pela ligação de um agonista endógeno, como a acetilcolina, ou exógeno, como a nicotina, promovendo fluxo iônico que induz à resposta celular (Figura 2a) (Gotti & Clementi 2004).

Esses receptores são formados por 5 subunidades homólogas organizadas em combinações que podem ser homopentaméricas (formadas por um único tipo de subunidade) ou heteropentaméricas que compreendem um componente primário (subunidades  $\alpha$ , exceto  $\alpha 5$  e  $\alpha 10$ ) e um componente complementar (subunidades  $\beta 2$ ,  $\beta 4$ ,  $\alpha 7$ - $\alpha 10$ ) (Figura 2b). Algumas subunidades são auxiliares (p.ex.:  $\alpha 5$  e  $\beta 3$ ) e são capazes de formar receptores funcionais apenas na presença de uma subunidade primária e uma complementar (Gotti et al. 2009; Hogg et al. 2003; Schlaepfer et al. 2008; Williams & Adinoff 2008; Albuquerque et al. 2009).

Os sítios de ligação de acetilcolina se formam entre as interfaces das subunidades. Nos nAChRs homoméricos formados por 5 subunidades  $\alpha 7$ , há um sítio de ligação de acetilcolina para cada interface, já nos receptores heteroméricos, os locais de ligação se formam entre a interface primária (+) de uma subunidade  $\alpha$  e uma interface complementar (-) de uma subunidade  $\beta 2$  ou  $\beta 4$  (Figura 2b) (Gotti et al. 2007). As subunidades auxiliares  $\alpha 5$  e  $\beta 3$  não formam sítios de ligação ao agonista entre as suas interfaces pois não possuem os resíduos necessários. Mesmo assim a presença dessas subunidades em pentâmeros heteroméricos tem um importante papel sobre a funcionalidade dos nAChRs (Gotti & Clementi 2004).



**Figura 2: Estrutura dos nAChRs.** A. nAChRs são receptores transmembrana formados por 5 subunidades homólogas. As setas representam os sítios de



ligação da acetilcolina (ACh), que ao se ligar, promove uma mudança na conformação do receptor, abrindo o poro central e permitindo o fluxo iônico que induz à resposta celular. B. Ilustração de um nAChRs homomérico, formado por 5 subunidades  $\alpha 7$  (à esquerda) e um heteromérico formado por 2 subunidades  $\alpha 4$  e 3 subunidades  $\beta 2$  (à direita). As pequenas estruturas representadas entre as interfaces das subunidades são os locais de ligação do receptor. Note que no receptor homomérico existem 5 sítios de ligação, enquanto que no receptor heteromérico representado por  $\alpha 4\beta 2$ , existe apenas 2 sítios de ligação. Adaptado de (Changeux 2010).

Os nAChRs do tipo  $\alpha 4\beta 2^*$  (\* indica a possibilidade da presença de estruturas auxiliares) são os de maior afinidade à nicotina no cérebro de mamíferos, estando presentes tanto em neurônios dopaminérgicos quanto GABAérgicos (Flores et al. 1992). A subunidade  $\alpha 5$  participa da montagem desses receptores pré-sinápticos no sistema nervoso central formando  $\alpha 4\beta 2\alpha 5$ , representando até 37% do total de  $\alpha 4\beta 2^*$  (Brown et. al 2007; Mao et al. 2008). Comparado com o receptor  $\alpha 4\beta 2$ , este nAChR contendo  $\alpha 5$  tem a funcionalidade aumentada (alta sensibilidade para ativação por nicotina e maior permeabilidade ao cálcio) (Brown et al. 2007; Kuryatov & Lindstrom 2011). Outra peculiaridade é que os receptores  $\alpha 4\beta 2$  sofrem *regulação positiva* (aumento no número de receptores) após exposição crônica à nicotina (Melroy-Greif et al. 2016), e este mecanismo está relacionado à tolerância e dependência de nicotina (Govind et al. 2009). Entretanto, receptores  $\alpha 4\beta 2\alpha 5$  não sofrem *regulação positiva*, o que sugere um mecanismo regulatório desta subunidade. No estudo de Mao et al (2008), a administração crônica de nicotina em ratos aumentou o número de nAChRs imunoprecipitados pelos anticorpos  $\alpha 4$  e  $\beta 2$  em 37-85% nas quatro regiões cerebrais examinadas. Já a subunidade  $\alpha 5$  não sofreu qualquer alteração.

Além do receptor  $\alpha 4\beta 2\alpha 5$ , a subunidade  $\alpha 5$  compõe outros tipos de nAChRs, como  $\alpha 3\beta 4^*$  e  $\alpha 3\beta 2^*$ , que são raros no cérebro mas predominantes em nAChRs pós-sinápticos no sistema nervoso autônomo (Kuryatov et al. 2011). Nessas subunidades, a inserção  $\alpha 5$  também aumenta a permeabilidade ao cálcio (Yu & Role 1998) e parece influenciar o consumo de nicotina. Por exemplo, em camundongos, a superexpressão da subunidade  $\beta 4$  promoveu um aumento de

aversão à nicotina, e essa aversão foi eliminada quando  $\alpha 5$  também foi superexpressa na habenula medial (Frahm et al. 2011). Em contrapartida, camundongos *knockout* para subunidade  $\alpha 5$  apresentam sensibilidade reduzida à nicotina, precisando administrar duas vezes mais nicotina para obter o mesmo efeito que camundongos do tipo selvagem (Salas et al. 2003).

### 1.3.1 Os nAChRs sob a modulação da liberação dopaminérgica e a ação da cocaína

Os neurônios dopaminérgicos apresentam descargas espontâneas que ocorrem em diferentes níveis de atividade. No mesencéfalo, esses neurônios descarregam de duas formas: tônica (forma regular, lenta, em baixas frequências e com potenciais de ação individuais sem disparo (Grace & Bunney 1984), e fásica (disparos de 20Hz ou mais) (Hyland et al. 2002; Robinson et al. 2004) que induzem a uma maior liberação extracelular dopaminérgica (Floresco et al. 2003). Em ratos anestesiados e não tratados, o padrão típico da maioria dos neurônios dopaminérgicos se caracteriza por descarga tônica (Floresco et al. 2003; Grace & Bunney 1984).

Os nAChRs têm a capacidade de alterar o padrão e regular a frequência da liberação de dopamina (Faure et al. 2014; Zhanget al. 2009b). Nesse sentido, a subunidade  $\beta 2$  parece ter um papel importante. Injeções de nicotina induzem a perda da atividade espontânea dos neurônios dopaminérgicos (fásica) na ATV em camundongos  $\beta 2$  *knockout*. Entretanto, após restauração da subunidade  $\beta 2$ , essa atividade é reestabelecida (Mameli-Engvall et al. 2006; Maskos et al. 2005). Ainda, a inibição dos nAChRs contendo a subunidade  $\beta 2$  promove alteração do padrão de liberação dopaminérgica, favorecendo a liberação fásica em relação à liberação tônica (Zhanget. al 2009a). Esse mecanismo parece ter um importante papel para a dependência de cocaína, uma vez que o favorecimento da liberação dopaminérgica fásica em relação à tônica ocorre também após a ação antagonista que a cocaína exerce sobre os nAChRs, principalmente do tipo  $\alpha 4\beta 2^*$ , e está relacionado a maiores níveis de liberação dopaminérgica extracelular (Floresco et al. 2003). Nesse tipo de receptor, a inibição ocorre de

forma não competitiva através da ligação da cocaína a um sítio alostérico (Acevedo-Rodriguez et al. 2014; Damaj et al. 1999; Francis et al. 2000).

Estudos em modelo animal têm demonstrado que a inativação do nAChRs promove alterações na sensibilidade aos efeitos da cocaína. Em camundongos, a inibição dos nAChRs por mecamilamina (bloqueador de nAChRs) se mostrou capaz de suprimir a autoadministração de cocaína (Blokhina et al. 2005). Além disso, o condicionamento do local de preferência para o uso de cocaína foi interrompido após inativação dos nAChRs. Nesse estudo, 5 mg/kg foi a dose mais baixa de cocaína capaz de promover condicionamento de local de preferência. Quando coadministrada com 0,2 mg/kg de nicotina, 3 mg/kg de cocaína foram suficientes para condicionar o local de preferência (Zachariou et al. 2001).

## 1.4 Genética do TUS

A susceptibilidade ao TUS sofre influência de fatores genéticos e ambientais que podem ser comuns a diferentes substâncias (Palmer et al. 2012). Em relação à influência genética, a estimativa de herdabilidade para a dependência de diferentes substâncias, incluindo álcool, nicotina, maconha e cocaína, varia de 50% a 75% (Ducci & Goldman 2012; Kendler et al. 2015; Lynskey et al. 2012; Verhulst et al. 2015; Vink et al. 2005). Especificamente em relação à cocaína, a herdabilidade é de aproximadamente 70% (Ducci & Goldman 2012; Kendler et al. 2000; Kendler & Prescott 1998).

Considerando doenças multifatoriais, como é o caso do TUS, o método de estudo de varredura genômica (GWAS - *Genome-Wide Association Study*), tem sido bastante utilizado. Esta ferramenta permite a busca por associações envolvendo polimorfismos de nucleotídeo único (SNP – *single nucleotide polymorphism*) em todo o genoma. Os principais achados de GWAS para alcoolismo incluem genes codificadores da enzima álcool desidrogenase *ADH1B* (Gelernter et al. 2014a; Park et al. 2013), região entre os genes *ADH1B* e *ADH1C* (Frank et al. 2012) e o gene que codifica a enzima aldeído desidrogenase *ALDH2* (Quillen et al. 2014). Em relação ao tabagismo, os resultados mais robustos de GWAS tem mostrado associações com o gene codificador da enzima de

metabolização da nicotina, *CYP2A6* (Furberg et al. 2010; Kumasaka et al. 2012) e os genes codificadores das subunidades que compõe os nAChRs, principalmente incluindo o cluster *CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4* (Buhler et al. 2015; Caporaso et al. 2009; Liu et al. 2010; Thorgeirsson et al. 2008; Thorgeirsson et al. 2010).

Quanto a drogas ilícitas, não há GWAS até o presente momento avaliando especificamente a dependência de crack. Em relação a cocaína, existe apenas um estudo. A dependência de cocaína foi associada com polimorfismos nos genes *FAM53B* (*family with sequence similarity 53, member B*, relacionado a proliferação celular) e *NCOR2* (*nuclear receptor corepressor 2*, associado a alguns tipos de câncer) (Gelernter et al. 2014b). Para dependência de maconha, um GWAS encontrou associações para risco de dependência em polimorfismos nos genes *SLC35G1* (*solute carrier family 35 member G1*, envolvido com fluxo de cálcio) e *CSMD1* (*CUB and Sushi multiple domains 1*, anteriormente associado a esquizofrenia) (Sherva et al. 2016).

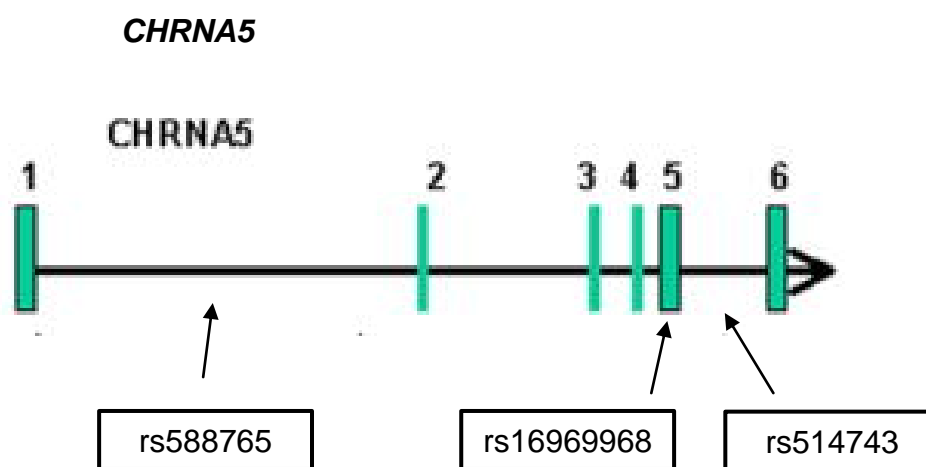
Até o momento foi publicada apenas uma meta-análise incluindo genes do sistema colinérgico, dopaminérgico e endocanabinoide, com enfoque na dependência de cocaína. Os dados obtidos demonstraram uma associação do cluster *CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4*, especificamente de uma variante no gene *CHRNA5*, com dependência para cocaína (Buhler et al. 2015).

Em suma, entre os poucos resultados genéticos robustos para TUS encontra-se o cluster dos nAChRs *CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4*. Estes genes têm mostrado associações significativas tanto em GWAS quanto em estudos de associação de gene candidato e meta-análises para uso de nicotina, alcoolismo e cocaína (Buhler et al. 2015; Chen et al. 2015; Saccone et al. 2010; Stephens et al. 2013).

#### 1.4.1 O papel do *CHRNA5* no TUS

Considerando os resultados envolvendo o cluster dos nAChRs *CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4*, tanto GWAS quanto meta-análises e estudos de gene candidato envolvendo a dependência de nicotina têm predominantemente destacado polimorfismos no *CHRNA5* (Broms et al. 2012; Caporaso et al. 2009;

Erlich et al. 2010; Liu et al. 2010; Polina et al. 2014; Sherva et al. 2010). Localizado no cromossomo 15 (15q25.1), esse gene é composto por 6 éxons (Figura 3). SNPs neste gene têm sido associados ao câncer de pulmão (Shen et al. 2013), doença pulmonar obstrutiva (Zhao et al. 2015), índice de massa corporal e pressão arterial (Kaakinen et al.2012), transtorno de estresse pós traumático (Kimbrel et al. 2015), dependência de cocaína (Grucza et al. 2008; Saccone et al. 2008; Sherva et al. 2010), dependência de álcool (Wang et al. 2009), entre outras substâncias (Buhler et al. 2015; Lubke et al.2012).



**Figura 3: Representação esquemática do gene *CHRNA5*.** As barras verdes representam os éxons e as regiões entre as barras, representadas apenas pela linha preta, representam as regiões intrônicas. Os SNPs estudados na presente dissertação estão identificados ao longo do gene em suas respectivas localizações (rs588765 íntron 1, rs16969968 éxon 5 e rs514743 íntron 5). Adaptado de (Schlaepfer et al. 2008).

A variante mais estudada do *CHRNA5* é o rs16969968 (Figura 3). Este polimorfismo consiste de uma substituição de G por A no éxon 5, promovendo uma troca de aminoácidos de aspartato (Asp) para asparagina (Asn) na posição 398. Esta troca está distante do local de ligação da acetilcolina, portanto acredita-se que não influencie a sensibilidade de ligação ao agonista. Por outro lado, Asp nessa região é carregado negativamente, permitindo a permeabilidade ao cálcio, já a Asn (variante) possui um grupo amida em vez de um grupo carboxílico que

pode inibir essa permeabilidade ao cálcio (Wen et al.2016). A variante Asn promove alterações funcionais nos nAChRs. Em receptores do tipo  $\alpha 3\beta 4\alpha 5$ , a resposta máxima de cálcio induzida pelo agonista é menor nas células que expressam a variante  $\alpha 3\beta 4\alpha 5$  Asn (Tammimaki et al. 2012). Em  $\alpha 4\beta 2\alpha 5$ ,  $\alpha 4\beta 2\alpha 5$  Asn quando comparada a  $\alpha 4\beta 2\alpha 5$  Asp, apresenta diminuição da resposta de cálcio intracelular evocada por agonista, redução da permeabilidade ao cálcio e melhor dessensibilização de curto prazo (Bierut et al. 2008; Kuryatov et al. 2011).

Diversos trabalhos têm associado o alelo de menor frequência (A – que promove a variação de Asp para Asn) à dependência de nicotina (Buhler et al.2015; Grucza et al. 2008; Sherva et al. 2010), em contrapartida, o mesmo alelo já foi associado à proteção na dependência de cocaína (Buhler et al. 2015; Grucza et al. 2008; Saccone et al. 2008). O mecanismo responsável pelo efeito distinto deste SNP sobre a dependência de nicotina e de cocaína ainda não está bem estabelecido. Grucza et al. (2008) sugeriram uma hipótese para explicar este efeito oposto baseada em mecanismos dopaminérgicos diretos e indiretos. Na presença de um receptor menos responsivo (alelo A), a estimulação dopaminérgica indireta promovida pela nicotina sobre os neurônios GABA levaria a uma sinalização dopaminérgica desinibida, aumentando a resposta da dopamina à nicotina. Por outro lado, o mesmo receptor menos responsivo em neurônios dopaminérgicos (efeito direto), poderia ser protetor contra dependência de cocaína por promover uma função dopaminérgica diminuída. Outra peculiaridade interessante deste SNP é a discrepante frequência alélica entre diferentes etnias. O alelo A possui frequência de ~36% em europeus e ~2% em africanos (Genomes Project et al. 2015). Até o presente momento dois estudos avaliaram este polimorfismo em amostra de Americanos Afrodescendentes. Não houve associação significativa nas análises de caso-controle (Saccone et al. 2008; Sherva et al. 2010). Entretanto em um desses estudos foi feita uma análise de caso-controle com amostras combinadas (Americanos Eurodescendentes com Americanos Afrodescendentes), e a associação foi significativa na mesma direção das análises que incluíram somente Americanos Eurodescendentes (Saccone et al 2008).

Embora em um menor número de estudos, os SNPs rs514743 e rs588765, também no gene *CHRNA5*, já foram associados com dependência a substâncias. O rs514743 (31366A>T) até o momento não têm efeitos funcionais descritos, contudo já foi associado com uso de álcool (Lubke et al. 2012; Schlaepfer et al. 2008) e tabagismo (Polina et al. 2014; Schlaepfer et al. 2008). O rs588765 (12564C>T) possui um efeito funcional, em que o alelo T parece aumentar a expressão do RNAm (Wang et al. 2009). Este SNP já foi associado com tabagismo (Saccone et al. 2010), e com idade de início para doença de Parkinson apenas em indivíduos expostos à nicotina (Greenbaum et al. 2013) (Figura 3).

Recentemente, nosso grupo publicou artigos demonstrando a influência de variantes do *CHRNA5* na dependência de nicotina. Os polimorfismos rs16969968, rs514743 e rs588765 foram incluídos nas análises. Observou-se que os SNPs rs514743 e rs588765 foram nominalmente associados com tabagismo em uma amostra de indivíduos com transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) (Polina et al. 2014). Além disso, em análises subsequentes foi observado que os mesmos polimorfismos influenciam o desempenho cognitivo em indivíduos com TDAH, onde os SNP rs588765 e rs514743 foram nominalmente associados com quociente de inteligência (Schuch et al. 2016). Em um modelo animal, o gene *CHRNA5* também já se mostrou associado com cognição, como no estudo de Bailey et al. (2010), onde camundongos *knockout* para este gene, apresentaram redução no desempenho cognitivo relacionado à atenção.

## Capítulo 2

---

### 2.1 Justificativa

A dependência de crack/cocaína é um problema de saúde pública. Na América do Sul, a prevalência do uso de cocaína é quase três vezes maior quando comparada à prevalência ao redor do mundo, e o Brasil contribui consideravelmente para essa alta estimativa.

O mecanismo biológico da dependência de substâncias envolve principalmente o sistema dopaminérgico. Entretanto, o sistema colinérgico apresenta um importante papel na mediação da liberação de dopamina o que torna os seus componentes (incluindo os nAChRs) candidatos importantes em pesquisas sobre fatores genéticos e TUS.

O gene *CHRNA5* tem sido estudado em transtornos relacionados a muitas substâncias. Curiosamente, o alelo G do seu SNP rs16969968 está associado com proteção contra dependência de nicotina e risco para dependência de cocaína. Ainda, outros polimorfismos (rs514743 e rs588765) nesse mesmo gene têm sido associados com dependência de substâncias. Nosso grupo recentemente avaliou estes e demais SNPs nos genes codificadores de nAChRs, encontrando associações com tabagismo em pacientes com TDAH.

Os resultados genéticos mais robustos para TUS incluem variantes do *CHRNA5*. Contudo, em relação a dependência de crack/cocaína, o mecanismo biológico envolvido nestas associações ainda tem sido pouco explorado. Ainda, estudos genéticos não têm avaliado se diferentes formas de administração da cocaína poderiam apresentar efeitos distintos no cérebro, considerando diferenças na farmacocinética da droga. Por exemplo, até o presente momento, não foi avaliado se polimorfismos do *CHRNA5* influenciam a dependência de crack (cocaína em formato de pedra que é fumada) de forma similar à dependência de cocaína (administrada de forma intravenoso ou cheirada), ou à nicotina, que é uma droga fumada.



## 2.2 Objetivo Geral

Avaliar o papel dos polimorfismos rs588765, rs16969968 e rs514743 do gene *CHRNA5* sobre a susceptibilidade e gravidade do transtorno por uso de crack cocaína.

## 2.3 Objetivos Específicos

- ✓ Investigar a influência dos polimorfismos rs514743, rs588765 e rs16969968 do gene *CHRNA5* sobre o transtorno por uso de crack cocaína;
- ✓ Investigar a influência dos haplótipos formados pelos polimorfismos supracitados sobre o transtorno por uso de crack cocaína;
- ✓ Investigar a influência destes polimorfismos sobre características específicas em usuários de crack cocaína – como gravidade da dependência.

## Capítulo 3

---

### **3.1 Artigo**

A ser submetido na revista:

Addiction Biology

Fator de Impacto:

4,603

## **CHRNA5 VARIANTS ON CRACK COCAINE ADDICTION SUGGEST AN IMPORTANT ROLE OF THIS AUXILIARY SUBUNIT**

Angelita P. Aroche<sup>1</sup>, Diego L. Rovaris<sup>1</sup>, Anderson R. Stolf<sup>2</sup>, Breno Sanvicente-Vieira<sup>3</sup>, Eugenio H. Grevet<sup>4</sup>, Felix H. P. Kessler<sup>2</sup>, Lisia von Diemen<sup>2</sup>, Rodrigo Grassi-Oliveira<sup>3</sup>, Claiton H. D. Bau<sup>1,a</sup>, Jaqueline B. Schuch<sup>2,5,a,\*</sup>

### **Author affiliations:**

<sup>1</sup>Department of Genetics, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

<sup>2</sup>Center for Drug and Alcohol Research, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

<sup>3</sup>Developmental Cognitive Neuroscience Lab, Biomedical Research Institute, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

<sup>4</sup>Department of Psychiatry, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; ADHD Outpatient Program, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

<sup>5</sup>Laboratory of Immunosenescence, Graduate Program in Biomedical Gerontology, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

<sup>a</sup>Co-senior authors

### **Correspondence to:**

Jaqueline B. Schuch, Ph.D

Laboratory of Immunosenescence

Graduate Program in Biomedical Gerontology

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

E-mail: jaqbs.bio@gmail.com

## ABSTRACT

**Introduction:** The nicotinic acetylcholine receptor (nAChR)  $\alpha 5$  (*CHRNA5*) is an auxiliary subunit, highly distributed on dopaminergic neurons, that enhance the responsiveness of nAChRs. The *CHRNA5* has been associated with nicotine (with genome-wide significance), alcohol and cocaine addictions. So far, this gene was not evaluated in smoked (crack) cocaine. **Aim:** To evaluate the influence of *CHRNA5* variants in crack addiction susceptibility and severity. **Methods:** 300 crack-addicted patients and 769 non-addicted individuals were enrolled in this study. *CHRNA5* SNPs evaluated were rs588765, rs16969968 and rs514743. **Results:** Homozygosity for rs16969968 and rs588765 major alleles was associated with risk to crack addiction (GG,  $p_{corr}=0.046$ ; CC,  $p_{corr}=0.046$ , respectively). Haplotype findings corroborate and further detail the main effects observed in individual SNP analyses, suggesting a major role for rs16969968. **Discussion:** We showed an influence of rs16969968 in crack addiction, corroborating previous findings described in cocaine addiction, in the opposite direction of significant GWAS findings for nicotine susceptibility. These results are strengthened by the first report of association of rs588765 with crack addiction, and by haplotype findings. **Conclusion:** Our study highlights the relevance of the  $\alpha 5$  subunit on crack cocaine addiction, reinforcing previous finding relating *CHRNA5* with addiction of different drugs.

**Key words:** crack, cocaine, dependence, nicotinic receptor, nAChR  $\alpha 5$ , substance use disorder.

## Introduction

The gene that encodes the nicotinic acetylcholine receptor (nAChR)  $\alpha 5$  subunit, also known as *CHRNA5*, has been highly associated with addiction of different substances, mainly nicotine (Buhler et al. 2015; Hancock et al. 2017; Hubacek et al. 2017; Leung et al. 2015; Pandey et al. 2017; Saccone et al. 2017; Zuo et al. 2016); alcohol (Haller et al. 2014; Hallfors et al. 2013; Lubke et al. 2012; Wang et al. 2009), and cocaine (Buhler et al. 2015; Grucza et al. 2008; Saccone et al. 2008). nAChRs are assembled from five homologous subunits which form a pentameric ion channel. These subunits are classified as  $\alpha$  and  $\beta$ , where  $\alpha 5$  is an auxiliary subunit that modulates the functionality of nAChRs and dopamine release (Albuquerque et al. 2009).

The  $\alpha 4\beta 2^*$  nAChRs (the \* means the possibility of an accessory subunit, as  $\alpha 5$ ) are highly expressed on dopaminergic neurons (McGranahan et al. 2011). On the presence of  $\alpha 5$ , forming  $\alpha 4\beta 2\alpha 5$ , there is an increase of calcium permeability that turns the receptor more responsive to its ligand (Brown et al. 2007; Tapia et al. 2007). An important genetic variant in the coding region of  $\alpha 5$  subunit, the rs16969968 (G>A) promotes a change of Aspartic Acid to Asparagine amino acid that decreases the calcium permeability and turns the receptor less responsive (Bierut et al. 2008; Kuryatov et al. 2011). This variant has been frequently associated with smoking behavior (Pandey et al. 2017; Sherva et al. 2010), including findings from genome-wide association studies (GWAS) (Furberg et al. 2010; Saccone et al. 2017). Moreover, this SNP has opposite effects on the susceptibility to nicotine and cocaine addiction (Buhler et al. 2015; Grucza et al. 2008; Sherva et al. 2010). Grucza et al. (2008) suggested a hypothesis to explain this contradictory effect based on direct and indirect dopaminergic mechanisms. In the presence of a less responsive receptor (rs16969968 A allele), the indirect dopaminergic stimulation promoted by nicotine on GABA neurons would lead to a disinhibited dopamine signaling, enhancing dopamine response to nicotine. On the other hand, the same less responsive receptor in the context of dopaminergic neurons (direct effect) would be protective for cocaine addiction since it could promote a diminished dopamine effect (Grucza et al. 2008). However, no study has evaluated the influence of this SNP, not even other *CHRNA5* variants, on crack addiction.

Furthermore, the *CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4* gene cluster has been consistently associated with alcohol and nicotine addictions. However, few studies have evaluated the influence of genetic variants on cocaine addiction (Buhler et al. 2015). It is suggested that the administration route of cocaine (intranasal, intravenous and smoked) could present distinct effects in the brain related to its pharmacokinetic, where smoking cocaine (crack) would produce a higher reinforcement effect (Verebey & Gold 1988; Volkow et al. 2000). Considering these findings, our aim is to evaluate if there is influence of *CHRNA5* variants on crack addiction and if its influence is similar to cocaine addiction (snorted and or intravenous) or nicotine addiction, which is a smoked drug.

## **Methods**

### Sample and diagnostic procedures

This study enrolled 300 crack addicted patients from public and voluntary detoxification services from Southern Brazil. Crack addiction diagnosis followed the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders fourth edition (DSM-IV) criteria (APA, 1994) using the structured clinical interviews. The control sample comprised 769 non-addicted individuals from either the general population or blood donors from the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. All individuals are Brazilians of European descent at least 18 years old. The sample characteristics are shown in Table 1.

Cases were admitted in units of the public system and were diagnosed after detailed interviews conducted by trained clinical psychologists and psychiatrists. Addiction and other problems were evaluated by the Addiction Severity Index – 6 (ASI-6), a multidimensional semi-structured interview that evaluates patient's lifetime as well as recent status in nine functional areas of life including medical and drug use (Cacciola et al. 2011; Kessler et al. 2012). This instrument also evaluates other variables, such as age of first crack and cocaine use and years of regular crack and cocaine use. Cases were excluded if they present schizophrenia, psychotic symptoms, severe cognitive impairment resulting in alterations of consciousness and psychomotor agitation, diagnosis

of a neurologic infectious or metabolic disease and Mini-Mental State Examination (MMSE) score <18.

The control group was evaluated to psychiatric disorders and substance use by DSM-IV screening module – SCID-I (First & Gibbon 2004), or using the Alcohol, Smoking and Substance Involvement Screening test (ASSIST) for the first screening of drug use. Individuals were excluded if they showed any confusion status as well as presence of psychotic disorders or severe intellectual disability that could interfere in the correct use of research instruments. A more extensive sample description as well as the protocol applied in this study can be assessed in previous publications (Rovaris et al. 2017; Stolf et al. 2014).

This study is in accordance with the Declaration of Helsinki. All participants signed the consent form approved by the participants institutional review boards (IRB).

#### SNP selection and genotyping

The SNP selection criteria for this study were minor allele frequency higher than 20%, possible functional effect and previous associations with substance use disorders (SUD). The rs588765 (12564C>T) modifies RNAm levels (Wang, Grucza, et al. 2009) and rs16969968 (30064G>A, D398N) alters the receptor responsivity (Bierut et al. 2008). Although rs514743 (31366A>T) does not present known functional effect, its frequent association reports involving SUD led to its inclusion (Lubke et al. 2012; Polina et al. 2014).

DNA was extracted from peripheral blood by the salting out method (Lahiri & Nurnberger 1991) or from saliva by Oragene DNA kit according to the manufacturer's instructions (Oragene DNA kit, DNA genotec, Canada). SNPs were genotyped using predesigned and validated TaqMan SNP genotyping assays (StepOnePlus, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). We re-genotyped 20% of the sample randomly, and no divergence was detected. All SNPs are in Hardy Weinberg Equilibrium in cases and controls (cases  $p = 0.22-1.0$ ; controls  $p = 0.19-0.58$ ).

#### Statistical analyses

Logistic regression analyses were performed to evaluate the effect of each individual SNP on the susceptibility to crack cocaine addiction. To assess the effect of each SNP on severity of crack cocaine addiction as well as age of first use and years of regular crack and cocaine use through ASI-6, we conducted linear regression models. We performed the dominant (carrier of minor allele versus homozygous for the major allele) and genotypic models and all analyses were adjusted for age and sex. Analyses were performed using Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 18. Linkage disequilibrium (LD) and haplotype analyses were performed using PLINK program (<http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/>; (Purcell et al. 2007). Multiple testing correction was performed using FDR.

## Results

In the case-control analyses, homozygosity for the rs16969968 and rs588765 major alleles was associated with risk to crack addiction in the genotypic model (GG,  $p=0.029/p_{corr}=0.046$ , OR=1.689; CC,  $p=0.031/p_{corr}=0.046$ , OR=1.735, respectively). rs514743 was not associated with crack addiction (Table 2).

All polymorphisms analyzed were in strong LD (rs588765 and rs16969968  $D'=0.994$ ,  $R=0.252$ ; rs16969968 and rs514743  $D'=0.992$ ,  $R=0.206$ ; rs588765 and rs514743  $D'=0.997$ ,  $R=0.819$ ). Global haplotype analyses revealed significant results among the three SNPs: rs588765|rs1696996  $p=9.51 \times 10^{-5}$ ; rs16969968|rs514743  $p=2.53 \times 10^{-4}$  and rs588765|rs16969968|rs514743  $p=8.69 \times 10^{-5}$ . Individual analyses of each haplotype block revealed that the A allele (protection) of rs16969968 in the presence of any allele of rs588765 and rs514743 was associated with protection against crack addiction, while the G allele (risk) of rs16969968 was associated with risk to crack addiction only in the presence of C allele (risk) of rs588765 or/and in the presence of A allele of rs514743 (Table 3).

Regarding addiction severity, none of *CHRNA5* SNPs and haplotypes were associated with the outcomes analyzed (ASI drug score, ASI psychiatric score, age of first crack and cocaine use, and years of regular crack and cocaine use).



## Discussion

Nicotinic receptor genes, including *CHRNA5*, may be included in a relatively small list of genes with consistent and replicated effects in candidate gene and genome-wide studies, especially in this case for nicotine addiction. The present study is the first analysis of *CHRNA5* nAChR auxiliary subunit variants in the susceptibility to crack addiction. The findings confirm the influence of rs16969968 G allele, previously associated with snorted or intravenous cocaine addiction (Buhler et al. 2015; Grucza et al. 2008; Saccone et al. 2008), suggesting the same alleles are associated with different routes of cocaine use. We also report for the first time the association of an additional *CHRNA5* variant (rs588765), as well as corresponding haplotype findings. Interestingly, the consistently replicated effect of rs16969968 on nicotine addiction (Buhler et al. 2015; Pandey et al. 2017) is in the opposite direction, where the A allele confers risk. This opposite effect related to the same *CHRNA5* SNP may represent an opportunity to understand apparently contradictory genetic findings, including a GWAS hit, in light of the different impacts of agonist and antagonist drugs.

Mao et al. (2008) suggested that *CHRNA5* variants could promote more or less upregulation of  $\alpha 4\beta 2$  after exposure to nicotine (Mao et al. 2008). Chronic administration of nicotine promotes  $\alpha 4\beta 2$  nAChRs desensitization and upregulation (increased number of receptors) (Melroy-Greif et al. 2016), leading to nicotine tolerance and addiction (Govind et al. 2009). However, nicotine does not promote upregulation on the more responsive  $\alpha 4\beta 2\alpha 5$  nAChRs (Mao et al. 2008). We hypothesize that the presence of rs16969968 G allele – associated with a more responsive receptor – could prevent upregulation of  $\alpha 4\beta 2$  due to compensation mechanisms, leading to a lower susceptibility to nicotine addiction. On the other hand, in the presence of A allele, which is associated with risk to nicotine addiction,  $\alpha 4\beta 2\alpha 5$  would not be more responsive than  $\alpha 4\beta 2$ , therefore permitting upregulation of  $\alpha 4\beta 2$ .

In addition to the well-known inhibition of dopamine reuptake (Ritz et al. 1987), cocaine administration also inhibits nAChRs, leading to increased phasic to tonic dopamine ratio (Acevedo-Rodriguez et al. 2014). Dopaminergic release can promote two distinct timescales, which are balanced. The tonic timescale is

characterized by low frequencies consisting of individual action potentials without bursts (Grace & Bunney 1984), whereas the phasic timescale is characterized by bursts and higher extracellular dopamine release (Hyland et al. 2002; Robinson et al. 2004).

Acevedo-Rodriguez et al. (2014) demonstrated that the phasic to tonic dopamine ratio is balanced in wild type mice. However, in  $\beta$ 2-subunit knockout mice this dopamine ratio is unbalanced, with higher phasic timescale. Besides that, cocaine administration in  $\beta$ 2-subunit knockout mice did not alter the phasic to tonic dopamine ratio as occurred in wild mice (Acevedo-Rodriguez et al. 2014). We hypothesize that the inhibition of a more responsive  $\alpha$ 5 receptor – presence of rs16969968 G allele – after cocaine administration would promote a switch of the dopamine ratio, with a higher phasic timescale compared to tonic timescale. The phasic timescale induces higher extracellular dopamine release, increasing reward. On the other hand, the dopamine ratio would be unbalanced in less responsive nAChRs (rs16969968 A allele), with a naturally higher phasic timescale. In this scenario, cocaine administration would not promote a switch of phasic to tonic dopamine ratio, not leading to a substantial change in dopamine release or reward.

In relation to rs588765, we demonstrated for the first time an association with crack addiction, reinforcing previous associations of this SNP with addiction, especially in nicotine dependence. Furthermore, functional studies demonstrated that presence of C allele promotes lower mRNA levels. Nonetheless, more studies are needed to understand the impact of changes in the mRNA levels on SUD. Additionally, our haplotype findings corroborate the main effects observed in individual SNP analyses. Although others studies did not investigate these haplotype blocks in crack or cocaine addictions, results from Wang et al (2009) might support our associations. The haplotype block encompassing rs588765 and rs16969968 was associated with nicotine addiction in patients with lung cancer. While the C-G haplotype was associated with risk to crack addiction by our study, Wang et al. (2009) showed that this same haplotype was related to protection against nicotine addiction. Similar results were observed with the C-A haplotype. In both studies, haplotype findings appear to be carried by the effect of rs16969968.

Taking into account all candidate gene and GWAS findings previously reported and the results presented here, the relationship between nAChRs and addiction is strong and corroborated by several studies. The functionality of these receptors seems to be very important to elucidate the mechanism of addiction. In particular, the role of the  $\alpha 5$  subunit on crack cocaine addiction is very promising being directly linked to the nAChRs responsiveness. However, this study has some limitations that should be addressed. Although the new rationale proposed regarding the opposite effects of rs16969968 in nicotine and crack cocaine addiction was based on several evidence already published, functional studies are necessary to confirm such hypothesis. In addition, co-administration of nicotine and crack cocaine is very common among addicted individuals, hindering the individual assessment of these substances in the context of molecular mechanisms. Nonetheless, previous studies have also not considered the use of multiple substances in their analyses (Grucza et al. 2008; Saccone et al. 2008). Our sample is similar to the other samples of association studies between rs16969968 and cocaine addiction, where the vast majority of individuals had also a history of smoking. Much larger sample sizes would be needed in order to study “pure” crack or cocaine addiction, without smoking.

In conclusion, our study corroborates previous findings, showing that the same allele of rs16969968 is associated with cocaine addiction and also with crack addiction. These results reinforce the important role of accessory or auxiliary subunits in psychiatric disorders, as have been seen in studies from our research group (Cupertino et al. 2017; da Silva et al. 2017). If confirmed, these results indicate a pivotal role of the genetic variability of  $\alpha 5$  subunit on smoking and crack cocaine addiction.

#### **Conflict of interest**

The authors declare no conflict of interest.

#### **Role of funding source**

This study was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, 476529/2012-3, 466722/2014-1, 466802/2014-5 and 424041/2016-2), Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas (SENAD, 82264/2015) and FIPE-HCPA.

## Acknowledgments

We are thankful to the staff of the participating psychiatric units for all their support with data collection.

**Table 1: Sample characterization**

	<b>Cases</b>	<b>Controls</b>
	<b>N=300</b>	<b>N=769</b>
	<i>N (%)</i>	<i>N (%)</i>
Men	165 (55.0)	440 (57.2)
Presence of any mood disorder*	228 (82.0)	222 (28.9)
	<i>Mean (SD)</i>	<i>Mean (SD)</i>
Age	30.73 (8.3)	29.21 (8.63)
ASI Drugs	50.83 (8.97)	-
ASI Psychiatric	47.60 (9.94)	-
Age of first cocaine use	18.41 (5.63)	-
Age of first crack use	22.98 (8.33)	-
Years of cocaine use	5.73 (6.18)	-
Years of crack use	5.46 (4.76)	-

\*Major depression disorder, bipolar disorder and dysthymia

**Table 2:** Case-control analyses

		<b>Genotypic and Dominant model</b>				
		<b>Genotypes</b>	<b>Cases (n=300)</b>	<b>Controls (n=769)</b>	<b>OR (IC 95%)</b>	<b>P value</b>
<b>rs514743</b>		TT (reference)	16(5.3)	63(8.2)		
	<b>Genotypic model</b>	AT	123(41)	340(44.2)	1.480 (0.822-2.667)	0.191
		AA	161(53.6)	366(47.6)	1.785 (0.998-3.192)	0.051
	<b>Dominant model</b>	AT+TT (reference)			1.272 (0.972-1.663)	0.079
<b>rs588765</b>		TT (reference)	23(7.6)	88(11.4)		
	<b>Genotypic model</b>	CT	132(44)	356(46.3)	1.472(0.890-2.433)	0.132
		CC	145(48.3)	325(42.3)	1.735 (1.052-2.862)	0.031 <sup>a</sup>
	<b>Dominant model</b>	CT+TT (reference)			1.262 (0.964-1.651)	0.090
<b>rs16969968</b>		AA (reference)	27(9)	100(13)		
	<b>Genotypic model</b>	AG	126(42)	343(44.6)	1.390 (0.866-2.232)	0.172
		GG	147(49)	326(42.4)	1.689 (1.057-2.699)	0.029 <sup>b</sup>
	<b>Dominant model</b>	AG+AA (reference)			1.298 (0.992-.1698)	0.057

All analyses were adjusted for age and sex. Multiple testing correction (FDR): <sup>a</sup> p= 0.0456 and <sup>b</sup> p= 0.0456.

Table 3

				<i>CHRNA5</i> individual haplotypes							
NHAP	STAT	P-value (gl/gl corr*)	Window	rs588765	rs16969968	rs514743	Frequency	b	STAT	P-value (ind/ind corr*)	
<i>CHRNA5</i>				1	C	A		0.337	0.791	5.14	0.0233/0.0328*
			1	T	G		0.331	0.798	4.55	0.0328/0.0328*	
	3	18.5	9.51e-005	1	C	G		0.33	1.53	18.5	1.68e-005/5.04e-005*
	3	16.6	0.000253	2		G	T	0.29	0.793	4.33	0.0374/0.0374*
	3	18.7	8.69e-005	2		A	A	0.337	0.791	5.14	0.0233/0.0349*
				2		G	A	0.372	1.49	16.5	4.76e-005/14.280 e-005*
				3	T	G	T	0.289	0.795	4.21	0.0402/0.0402*
				3	C	A	A	0.337	0.791	5.12	0.0237/0.0355*
				3	C	G	A	0.33	1.53	18.7	1.53e-005/4.59 e-005*

NHAP = Number of individual haplotypes in that window. All analyses were adjusted for age and sex. \*P global (gl) corrected (corr). The frequency threshold of 5 % was determined using the '--mhf 0.05' command.

## References

- Acevedo-Rodriguez, A. Zhang, L. Zhou, F. Gong, S. Gu, H. De Biasi, M. . . . Dani, J. A. (2014). Cocaine inhibition of nicotinic acetylcholine receptors influences dopamine release. *Front Synaptic Neurosci*, 6, 19. doi: 10.3389/fnsyn.2014.00019
- Albuquerque, E. X. Pereira, E. F. Alkondon, M. & Rogers, S. W. (2009). Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol Rev*, 89(1), 73-120. doi: 10.1152/physrev.00015.2008
- Bierut, L. J. Stitzel, J. A. Wang, J. C. Hinrichs, A. L. Grucza, R. A. Xuei, X. . . . Goate, A. M. (2008). Variants in nicotinic receptors and risk for nicotine dependence. *Am J Psychiatry*, 165(9), 1163-1171. doi: 10.1176/appi.ajp.2008.07111711
- Brown, R. W. Collins, A. C. Lindstrom, J. M. & Whiteaker, P. (2007). Nicotinic alpha5 subunit deletion locally reduces high-affinity agonist activation without altering nicotinic receptor numbers. *J Neurochem*, 103(1), 204-215. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.04700.x
- Buhler, K. M. Gine, E. Echeverry-Alzate, V. Calleja-Conde, J. de Fonseca, F. R. & Lopez-Moreno, J. A. (2015). Common single nucleotide variants underlying drug addiction: more than a decade of research. *Addict Biol*, 20(5), 845-871. doi: 10.1111/adb.12204
- Cacciola, J. S. Alterman, A. I. Habing, B. & McLellan, A. T. (2011). Recent status scores for version 6 of the Addiction Severity Index (ASI-6). *Addiction*, 106(9), 1588-1602. doi: 10.1111/j.1360-0443.2011.03482.x
- Cupertino, R. B. Schuch, J. B. Bandeira, C. E. da Silva, B. S. Rovaris, D. L. Kappel, D. B. . . . Mota, N. R. (2017). Replicated association of Synaptotagmin (SYT1) with ADHD and its broader influence in externalizing behaviors. *Eur Neuropsychopharmacol*, 27(3), 239-247. doi: 10.1016/j.euroneuro.2017.01.007
- da Silva, B. S. Cupertino, R. B. Rovaris, D. L. Schuch, J. B. Kappel, D. B. Muller, D. . . . Bau, C. H. D. (2017). Exocytosis-related genes and response to methylphenidate treatment in adults with ADHD. *Mol Psychiatry*. doi: 10.1038/mp.2017.90
- First, M. B. & Gibbon, M. (2004). The Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders (SCID-I) and the Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis II Disorders (SCID-II).
- Furberg, H. Kim, Y. Dackor, J. Boerwinkle, E. Franceschini, N. Ardissino, D. . . . Merlini, P. A. (2010). Genome-wide meta-analyses identify multiple loci associated with smoking behavior. *Nat Genet*, 42(5), 441.
- Govind, A. P. Vezina, P. & Green, W. N. (2009). Nicotine-induced upregulation of nicotinic receptors: underlying mechanisms and relevance to nicotine addiction. *Biochem Pharmacol*, 78(7), 756-765. doi: 10.1016/j.bcp.2009.06.011
- Grace, A. A. & Bunney, B. S. (1984). The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: single spike firing. *J Neurosci*, 4(11), 2866-2876.

- Grucza, R. A. Wang, J. C. Stitzel, J. A. Hinrichs, A. L. Saccone, S. F. Saccone, N. L. . . . Bierut, L. J. (2008). A risk allele for nicotine dependence in CHRNA5 is a protective allele for cocaine dependence. *Biol Psychiatry*, 64(11), 922-929. doi: 10.1016/j.biopsych.2008.04.018
- Haller, G. Kapoor, M. Budde, J. Xuei, X. Edenberg, H. Nurnberger, J. . . . Goate, A. (2014). Rare missense variants in CHRNA3 and CHRNB3 are associated with risk of alcohol and cocaine dependence. *Hum Mol Genet*, 23(3), 810-819. doi: 10.1093/hmg/ddt463
- Hallfors, J. Loukola, A. Pitkaniemi, J. Broms, U. Mannisto, S. Salomaa, V. . . . Kaprio, J. (2013). Scrutiny of the CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 smoking behavior locus reveals a novel association with alcohol use in a Finnish population based study. *Int J Mol Epidemiol Genet*, 4(2), 109-119.
- Hancock, D. B. Guo, Y. Reginsson, G. W. Gaddis, N. C. Lutz, S. M. Sherva, R. . . . Johnson, E. O. (2017). Genome-wide association study across European and African American ancestries identifies a SNP in DNMT3B contributing to nicotine dependence. *Mol Psychiatry*. doi: 10.1038/mp.2017.193
- Hubacek, J. A. Pankova, A. Stepankova, L. Zvolaska, K. Adamkova, V. Lanska, V. & Kralikova, E. (2017). SNPs within CHRNA5-A3-B4 and CYP2A6/B6 are associated with smoking dependence but not with tobacco dependence treatment outcomes in the Czech population. *Gene*, 606, 35-38. doi: 10.1016/j.gene.2017.01.005
- Hyland, B. I. Reynolds, J. N. Hay, J. Perk, C. G. & Miller, R. (2002). Firing modes of midbrain dopamine cells in the freely moving rat. *Neuroscience*, 114(2), 475-492.
- Kessler, F. Cacciola, J. Alterman, A. Faller, S. Souza-Formigoni, M. L. Cruz, M. S. . . . Pechansky, F. (2012). Psychometric properties of the sixth version of the Addiction Severity Index (ASI-6) in Brazil. *Rev Bras Psiquiatr*, 34(1), 24-33.
- Kuryatov, A. Berrettini, W. & Lindstrom, J. (2011). Acetylcholine receptor (AChR) alpha5 subunit variant associated with risk for nicotine dependence and lung cancer reduces (alpha4beta2)(2)alpha5 AChR function. *Mol Pharmacol*, 79(1), 119-125. doi: 10.1124/mol.110.066357
- Lahiri, D. K. & Nurnberger, J. I. Jr. (1991). A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res*, 19(19), 5444.
- Leung, T. Bergen, A. Munafo, M. R. De Ruyck, K. Selby, P. & De Luca, V. (2015). Effect of the rs1051730-rs16969968 variant and smoking cessation treatment: a meta-analysis. *Pharmacogenomics*, 16(7), 713-720. doi: 10.2217/pgs.15.34
- Lubke, G. H. Stephens, S. H. Lessem, J. M. Hewitt, J. K. & Ehringer, M. A. (2012). The CHRNA5/A3/B4 gene cluster and tobacco, alcohol, cannabis, inhalants and other substance use initiation: replication and new findings using mixture analyses. *Behav Genet*, 42(4), 636-646. doi: 10.1007/s10519-012-9529-y



- Mao, D. Perry, D. C. Yasuda, R. P. Wolfe, B. B. & Kellar, K. J. (2008). The alpha4beta2alpha5 nicotinic cholinergic receptor in rat brain is resistant to up-regulation by nicotine in vivo. *J Neurochem*, *104*(2), 446-456. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.05011.x
- McGranahan, T. M. Patzlaff, N. E. Grady, S. R. Heinemann, S. F. & Booker, T. K. (2011). alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors on dopaminergic neurons mediate nicotine reward and anxiety relief. *J Neurosci*, *31*(30), 10891-10902. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0937-11.2011
- Melroy-Greif, W. E. Stitzel, J. A. & Ehringer, M. A. (2016). Nicotinic acetylcholine receptors: upregulation, age-related effects and associations with drug use. *Genes Brain Behav*, *15*(1), 89-107. doi: 10.1111/gbb.12251
- Pandey, N. Pal, S. Sharma, L. K. Guleria, R. Mohan, A. & Srivastava, T. (2017). SNP rs16969968 as a Strong Predictor of Nicotine Dependence and Lung Cancer Risk in a North Indian Population. *Asian Pac J Cancer Prev*, *18*(11), 3073-3079. doi: 10.22034/APJCP.2017.18.11.3073
- Polina, E. R. Rovaris, D. L. de Azeredo, L. A. Mota, N. R. Vitola, E. S. Silva, K. L. . . . Bau, C. H. (2014). ADHD diagnosis may influence the association between polymorphisms in nicotinic acetylcholine receptor genes and tobacco smoking. *Neuromolecular Med*, *16*(2), 389-397. doi: 10.1007/s12017-013-8286-2
- Purcell, S. Neale, B. Todd-Brown, K. Thomas, L. Ferreira, M. A. Bender, D. . . . Sham, P. C. (2007). PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet*, *81*(3), 559-575. doi: 10.1086/519795
- Ritz, M. C. Lamb, R. J. Goldberg, S. R. & Kuhar, M. J. (1987). Cocaine receptors on dopamine transporters are related to self-administration of cocaine. *Science*, *237*(4819), 1219-1223.
- Robinson, S. Smith, D. M. Mizumori, S. J. & Palmiter, R. D. (2004). Firing properties of dopamine neurons in freely moving dopamine-deficient mice: effects of dopamine receptor activation and anesthesia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(36), 13329-13334. doi: 10.1073/pnas.0405084101
- Rovaris, D. L. Schuch, J. B. Grassi-Oliveira, R. Sanvicente-Vieira, B. da Silva, B. S. Walss-Bass, C. . . . Bau, C. H. D. (2017). Effects of crack cocaine addiction and stress-related genes on peripheral BDNF levels. *J Psychiatr Res*, *90*, 78-85. doi: 10.1016/j.jpsychires.2017.02.011
- Saccone, N. L. Emery, L. S. Sofer, T. Gogarten, S. M. Becker, D. M. Bottinger, E. P. . . . Kaplan, R. C. (2017). Genome-wide association study of heavy smoking and daily/nondaily smoking in the Hispanic Community Health Study / Study of Latinos (HCHS/SOL). *Nicotine Tob Res*. doi: 10.1093/ntr/ntx107
- Saccone, N. L. Saccone, S. F. Goate, A. M. Grucza, R. A. Hinrichs, A. L. Rice, J. P. & Bierut, L. J. (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

- Sherva, R. Kranzler, H. R. Yu, Y. Logue, M. W. Poling, J. Arias, A. J. . . . Gelernter, J. (2010). Variation in nicotinic acetylcholine receptor genes is associated with multiple substance dependence phenotypes. *Neuropsychopharmacology*, 35(9), 1921-1931. doi: 10.1038/npp.2010.64
- Stolf, A. R. Szobot, C. M. Halpern, R. Akutagava-Martins, G. C. Muller, D. Guimaraes, L. S. . . . 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(1), 44-51. doi: 10.1159/000365992
- Tapia, L. Kuryatov, A. & Lindstrom, J. (2007). Ca<sup>2+</sup> permeability of the (alpha4)3(beta2)2 stoichiometry greatly exceeds that of (alpha4)2(beta2)3 human acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol*, 71(3), 769-776. doi: 10.1124/mol.106.030445
- Verebey, K. & Gold, M. S. (1988). From Coca Leaves to Crack: The Effects of Dose and Routes of Administration in Abuse Liability. *Psychiatric Annals*, 18(9), 513-520.
- Volkow, N. D. Wang, G. J. Fischman, M. W. Foltin, R. Fowler, J. S. Franceschi, D. . . . Pappas, N. (2000). Effects of route of administration on cocaine induced dopamine transporter blockade in the human brain. *Life Sci*, 67(12), 1507-1515.
- Wang, J. C. Cruchaga, C. Saccone, N. L. Bertelsen, S. Liu, P. Budde, J. P. . . . collaborators, G. (2009). Risk for nicotine dependence and lung cancer is conferred by mRNA expression levels and amino acid change in CHRNA5. *Hum Mol Genet*, 18(16), 3125-3135. doi: 10.1093/hmg/ddp231
- Wang, J. C. Grucza, R. Cruchaga, C. Hinrichs, A. L. Bertelsen, S. Budde, J. P. . . . Goate, A. M. (2009). Genetic variation in the CHRNA5 gene affects mRNA levels and is associated with risk for alcohol dependence. *Mol Psychiatry*, 14(5), 501-510. doi: 10.1038/mp.2008.42
- Zuo, L. Garcia-Milian, R. Guo, X. Zhong, C. Tan, Y. Wang, Z. . . . Luo, X. (2016). Replicated Risk Nicotinic Cholinergic Receptor Genes for Nicotine Dependence. *Genes (Basel)*, 7(11). doi: 10.3390/genes7110095

## Capítulo 4

---

### 4.1 Discussão Geral

A função da subunidade  $\alpha 5$  ressalta a complexidade dos nAChRs. Ao mesmo tempo em que ela é definida como uma subunidade auxiliar, a sua presença é um potencializador dos nAChRs. Além disso, variantes no gene *CHRNA5* têm sido associadas com fenótipos bastante distintos, desde câncer de pulmão, índice de massa corporal até TUS. Uma hipótese que tem sido avaliada no nosso grupo é a de que proteínas auxiliares em sistemas de neurotransmissão apresentam maior tolerância à variabilidade genética com repercussões funcionais importantes. Nesse sentido, temos verificado resultados muito interessantes envolvendo o gene codificador de uma proteína acessória Sinaptotagmina 1 (*SYT1*) em um sistema envolvido na exocitose de neurotransmissores (Cupertino et al. 2017; da Silva et al. 2017). Especificamente no caso da subunidade  $\alpha 5$ , além de não formar sítios de ligação, a sua presença exige uma combinação específica envolvendo outros dois tipos de subunidade ( $\alpha$  e  $\beta$ ) para a formação de receptores nicotínicos funcionais.

O SNP mais estudado do *CHRNA5* é o rs16969968. O efeito distinto de cada um dos alelos deste SNP sobre a dependência de cocaína e nicotina tem sido consistentemente replicado, o que pode representar uma oportunidade para entender achados genéticos aparentemente contraditórios à luz de diferentes impactos sobre diferentes substâncias. Os primeiros relatos sobre esse efeito oposto envolvendo as dependências de nicotina e cocaína promoveram surpresa entre os pesquisadores, pois sua hipótese *a priori* era de que o alelo A, já associado com risco para nicotina em diversos estudos, também fosse associado com risco para dependência de cocaína (Grucza et al. 2008; Saccone et al. 2008). Entretanto, parece ser lógico pensarmos que substâncias com mecanismos de ação distintos possam promover efeitos distintos sobre o mesmo *background* genético. Nesse contexto se enquadra a nicotina e a cocaína. A nicotina é um agonista dos nAChRs, enquanto que a cocaína é um antagonista. Por mecanismos opostos, pelo menos quanto aos

nAChRs, ambas as substâncias promovem aumento de liberação dopaminérgica e dependência (Acevedo-Rodriguez et al. 2014; Jasinska et al. 2014).

A complexidade dos circuitos neuronais torna um desafio a previsão dos mecanismos neurobiológicos sob determinada situação, pois conta com uma infinidade de componentes que interagem em diferentes vias. Concomitante a isso, os nAChRs são amplamente distribuídos no cérebro e possuem diversos subtipos que modificam suas propriedades. A subunidade  $\alpha 5$  está relacionada com um aumento da funcionalidade dos nAChRs aos seus ligantes, onde receptores com essa molécula apresentam maior influxo de cálcio. A presença do alelo A do rs16969968 “retira” essa propriedade, fazendo com que os nAChRs, mesmo com a presença do  $\alpha 5$ , tenham influxo de cálcio reduzido (Kuryatov et al. 2011). A subunidade  $\alpha 5$  compõe quase 40% dos receptores  $\alpha 4\beta 2^*$  (Mao et al. 2008), que são aqueles de maior afinidade à nicotina, estando presentes tanto em neurônios excitatórios dopaminérgicos quanto em neurônios inibitórios GABAérgicos (Flores et al. 1992). A partir daí podemos questionar se o efeito do rs16969968 teria um peso maior em um desses sistemas (dopaminérgico e GABAérgico). Grucza et al. (2008) sugerem que para a ação da nicotina, os nAChRs  $\alpha 4\beta 2^*$  presentes nos neurônios GABAérgicos teriam um maior impacto, enquanto que para a ação da cocaína, seriam mais relevantes os nAChRs  $\alpha 4\beta 2^*$  presentes nos neurônios dopaminérgicos. Nesta linha, a ação da nicotina sobre receptores menos responsivos ( $\alpha 4\beta 2\alpha 5$  na presença do alelo A do rs16969968), em neurônios GABAérgicos, promoveria uma sinalização dopaminérgica desinibida, sendo risco para dependência de nicotina. Já a administração de cocaína sob o mesmo receptor em neurônios dopaminérgicos, promoveria uma ação dopaminérgica diminuída, sendo protetora contra dependência de cocaína. Esta hipótese é bastante elegante e tem sido constantemente citada, porém não foi mais discutida ou aprofundada.

Nesta presente dissertação nós sugerimos uma nova hipótese, levando em consideração mecanismos diferentes, ainda não discutidos em relação ao efeito oposto da nicotina e cocaína no *background* genético promovido pelo rs16969968. Em relação à nicotina, tomamos por base um mecanismo de

*regulação positiva* que ocorre nas subunidades  $\alpha 4\beta 2$  e não na  $\alpha 4\beta 2\alpha 5$  e está relacionado à tolerância e dependência de nicotina. Segundo Mao et al. (2008), variantes no *CHRNA5* podem promover maior ou menor regulação positiva em  $\alpha 4\beta 2$  após exposição à nicotina. Nós sugerimos que a presença do alelo G do rs16969968 – associado com maior funcionalidade do receptor – poderia prevenir a regulação positiva de  $\alpha 4\beta 2$  devido a um mecanismo compensatório, levando a uma menor susceptibilidade à dependência de nicotina. Por outro lado, na presença do alelo A – associado com risco para dependência de nicotina –  $\alpha 4\beta 2\alpha 5$  não seria mais responsivo que  $\alpha 4\beta 2$ , logo não evitaria a regulação positiva de  $\alpha 4\beta 2$ , ou até mesmo o próprio  $\alpha 4\beta 2\alpha 5$  poderia sofrer regulação positiva. Assim, o alelo G do rs16969968 conferiria proteção contra dependência de nicotina e o alelo A seria de risco.

Na maioria dos estudos, considerando a associação da dependência de nicotina com o alelo A, atribui-se o resultado oposto envolvendo a cocaína a um efeito protetor. Consideramos mais intuitivo considerar como referência o alelo G sendo risco para dependência de cocaína do que o alelo A sendo proteção. Também consideramos um mecanismo que ainda não foi explorado em relação ao *CHRNA5*, que é a ação inibitória da cocaína sobre os nAChRs. Esta ação antagonista leva ao favorecimento da liberação dopaminérgica fásica em relação à tônica (Acevedo-Rodriguez et al. 2014) que está relacionada à maior liberação dopaminérgica extracelular (Hyland et al. 2002; Robinson et al. 2004). Acevedo-Rodriguez et al. (2014) demonstraram que a relação dopaminérgica fásico/tônica é balanceada em camundongos do tipo selvagem. Entretanto em camundongos *knockout* para a subunidade  $\beta 2$ , esta relação dopaminérgica é desbalanceada, com maior liberação dopaminérgica fásica em relação à tônica. Além disso, a administração de cocaína em camundongos *knockout* para  $\beta 2$  não alterou a relação dopaminérgica fásico/tônica como ocorreu com camundongos do tipo selvagem. Vale ressaltar que a liberação dopaminérgica fásica induz a maior liberação dopaminérgica extracelular, aumentando a sensação de recompensa. Por outro lado, a relação dopaminérgica fásico/tônica poderia ser naturalmente desbalanceada em um receptor menos responsivo (alelo A do rs16969968), como foi relatada em camundongos *knockout* para subunidade  $\beta 2$ , com natural maior liberação

dopaminérgica fásica. Neste cenário, a administração de cocaína não promoveria troca da relação fásico/tônica, não levando a modificações substanciais na liberação dopaminérgica ou recompensa, como também ocorreu em camundongos *knockout* para subunidade  $\beta 2$  após administração de cocaína. Seguindo esta linha de raciocínio nós sugerimos que, na presença de um receptor mais responsivo contendo  $\alpha 5$  – presença do alelo G do rs16969968 –, a administração de cocaína poderia promover uma troca de relação dopaminérgica, com maiores níveis de liberação dopaminérgica fásica em relação à tônica e assim promovendo uma estimulação e sensação de recompensa muito superior àquela presente sem a cocaína.

Outro fator que parece ser importante para dependência de cocaína e também está associado com rs16969968 é a personalidade. Dependentes de cocaína, na presença de pelo menos um alelo A desse SNP, apresentam maior autocontrole, determinação e organização (Zayats et al. 2013), sugerindo que a homozigose para o alelo G poderia estar relacionada com impulsividade e desinibição comportamental.

Além de mecanismos genéticos, modificações farmacológicas nos nAChRs parecem contribuir para o mecanismo de reforço da cocaína, e a ativação dos nAChRs de alta afinidade à nicotina sugere uma interação entre as duas drogas. Em camundongos, em um modelo de condicionamento de preferência de lugar para administração de cocaína, a coadministração de nicotina diminuiu a dosagem de cocaína necessária para promover condicionamento de local de preferência, enquanto a coadministração de mecamilamina (antagonista de nAChRs) aumentou a quantidade de cocaína necessária para condicionar preferência de lugar (Zachariou et al. 2001). Este achado sugere que a nicotina aumenta a sensibilidade à cocaína, e uma vez que o rs16969968 está associado a essas duas dependências, e a grande maioria os dependentes de crack cocaína são tabagistas, seria interessante analisar se existe diferença na gravidade da dependência de crack cocaína entre tabagistas e não tabagistas. Infelizmente neste trabalho não foi possível avaliar essas diferenças devido ao nosso pequeno tamanho amostral concomitante com o alto número de tabagistas (~80%).

Considerando todos esses achados na literatura, e até a falta deles em relação a experimentos com modelos animais e *in vitro* envolvendo  $\alpha 5$  e a dependência de crack cocaína, talvez tenhamos mais perguntas do que respostas. Justamente por esta razão, devemos nos motivar a elucidar esses mecanismos em diferentes frentes, criando novas hipóteses que devem ser questionadas e testadas de forma experimental. Por consequência, caminhamos e evoluímos rumo a descobertas significativas que possam contribuir para o entendimento e quem sabe melhor manejo de tão grave problema de saúde pública.

## Referências

---

- Abdalla, R. R. Madruga, C. S. Ribeiro, M. Pinsky, I. Caetano, R. & Laranjeira, R. (2014). Prevalence of cocaine use in Brazil: data from the II Brazilian national alcohol and drugs survey (BNADS). *Addict Behav*, 39(1), 297-301.
- Abdalla, R. R., Massaro, L., Miguel, A. D. Q. C., Laranjeira, R., Caetano, R., & Madruga, C. S. (2018). Association between drug use and urban violence: Data from the II Brazilian National Alcohol and Drugs Survey (BNADS). *Addictive Behaviors Reports*, 7, 8-13.
- Acevedo-Rodriguez, A. Zhang, L. Zhou, F. Gong, S. Gu, H. De Biasi, M. . . . Dani, J. A. (2014). Cocaine inhibition of nicotinic acetylcholine receptors influences dopamine release. *Front Synaptic Neurosci*, 6, 19. doi: 10.3389/fnsyn.2014.00019
- Albuquerque, E. X. Pereira, E. F. Alkondon, M. & Rogers, S. W. (2009). Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol Rev*, 89(1), 73-120. doi: 10.1152/physrev.00015.2008
- Altman AJ, Albert DM, Fournier GA: Cocaine's use in ophthalmology: our 100 year heritage. *Surv Ophthalmol* 29:300-307, 1985
- American Psychiatric Association. (2013). Diagnostic and statistical manual of mental disorders (5th ed.). Arlington, VA: American Psychiatric Publishing.
- Arias-Carrion, O. Stamelou, M. Murillo-Rodriguez, E. Menendez-Gonzalez, M. & Poppel, E. (2010). Dopaminergic reward system: a short integrative review. *Int Arch Med*, 3, 24. doi: 10.1186/1755-7682-3-24
- Bailey CD, De Biasi M, Fletcher PJ, Lambe EK (2010). The nicotinic acetylcholine receptor alpha5 subunit plays a key role in attention circuitry and accuracy. *J Neurosci* 30: 9241–9252.
- Bierut, L. J. Stitzel, J. A. Wang, J. C. Hinrichs, A. L. Grucza, R. A. Xuei, X. . . . Goate, A. M. (2008). Variants in nicotinic receptors and risk for nicotine dependence. *Am J Psychiatry*, 165(9), 1163-1171. doi: 10.1176/appi.ajp.2008.07111711
- Blokhina, E. A. Kashkin, V. A. Zvartau, E. E. Danysz, W. & Bespalov, A. Y. (2005). Effects of nicotinic and NMDA receptor channel blockers on intravenous cocaine and nicotine self-administration in mice. *Eur Neuropsychopharmacol*, 15(2), 219-225. doi: 10.1016/j.euroneuro.2004.07.005
- Broms, U. Wedenoja, J. Largeau, M. R. Korhonen, T. Pitkaniemi, J. Keskitalo-Vuokko, K. . . . Loukola, A. (2012). Analysis of detailed phenotype



- profiles reveals CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 gene cluster association with several nicotine dependence traits. *Nicotine Tob Res*, 14(6), 720-733. doi: 10.1093/ntr/ntr283
- Brown, R. W. Collins, A. C. Lindstrom, J. M. & Whiteaker, P. (2007). Nicotinic alpha5 subunit deletion locally reduces high-affinity agonist activation without altering nicotinic receptor numbers. *J Neurochem*, 103(1), 204-215. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.04700.x
- Buhler, K. M. Gine, E. Echeverry-Alzate, V. Calleja-Conde, J. de Fonseca, F. R. & Lopez-Moreno, J. A. (2015). Common single nucleotide variants underlying drug addiction: more than a decade of research. *Addict Biol*, 20(5), 845-871. doi: 10.1111/adb.12204
- 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. doi: 10.1371/journal.pone.0004653
- Carlini, E. L. d. A. Noto, A. R. Sanchez, Z. v. d. M. Carlini, C. M. d. A. Locatelli, D. P. Abeid, L. R. . . . Moura, Y. G. d. (2010). *VI Levantamento Nacional sobre o Consumo de Drogas Psicotrópicas entre Estudantes do Ensino Fundamental e Médio das Redes Pública e Privada de Ensino nas 27 Capitais Brasileiras* (CEBRID Ed. 1 ed. Vol. 2016).
- Changeux, J. P. (2010). Nicotine addiction and nicotinic receptors: lessons from genetically modified mice. *Nat Rev Neurosci*, 11(6), 389-401. doi: 10.1038/nrn2849
- Chen, L. S. Hung, R. J. Baker, T. Horton, A. Culverhouse, R. Saccone, N. . . . Bierut, L. J. (2015). CHRNA5 risk variant predicts delayed smoking cessation and earlier lung cancer diagnosis--a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*, 107(5). doi: 10.1093/jnci/djv100
- Crespo-Fernández, J. A., & Armida Rodríguez, C. (2007). Bases neuroanatómicas, neurobiológicas y del aprendizaje de la conducta de adicción a la cocaína. *Revista latinoamericana de psicología*, 39(1).
- Cupertino, R. B. Schuch, J. B. Bandeira, C. E. da Silva, B. S. Rovaris, D. L. Kappel, D. B. . . . Mota, N. R. (2017). Replicated association of Synaptotagmin (SYT1) with ADHD and its broader influence in externalizing behaviors. *Eur Neuropsychopharmacol*, 27(3), 239-247. doi: 10.1016/j.euroneuro.2017.01.007
- da Silva, B. S. Cupertino, R. B. Rovaris, D. L. Schuch, J. B. Kappel, D. B. Muller, D. . . . Bau, C. H. D. (2017). Exocytosis-related genes and response to methylphenidate treatment in adults with ADHD. *Mol Psychiatry*. doi: 10.1038/mp.2017.90
- Dackis, C. A. & O'Brien, C. P. (2001). Cocaine dependence: a disease of the brain's reward centers. *J Subst Abuse Treat*, 21(3), 111-117.
- Damaj, M. I. Slemmer, J. E. Carroll, F. I. & Martin, B. R. (1999). Pharmacological characterization of nicotine's interaction with cocaine and cocaine analogs. *J Pharmacol Exp Ther*, 289(3), 1229-1236.

- Ducci, F., & Goldman, D. (2012). The Genetic Basis of Addictive Disorders. *The Psychiatric Clinics of North America*, 35(2), 495–519. <http://doi.org/10.1016/j.psc.2012.03.010>
- Erlich, P. M. Hoffman, S. N. Rukstalis, M. Han, J. J. Chu, X. Linda Kao, W. H. . . . Boscarino, J. A. (2010). Nicotinic acetylcholine receptor genes on chromosome 15q25.1 are associated with nicotine and opioid dependence severity. *Hum Genet*, 128(5), 491-499. doi: 10.1007/s00439-010-0876-6
- Faure, P. Tolu, S. Valverde, S.& Naude, J. (2014). Role of nicotinic acetylcholine receptors in regulating dopamine neuron activity. *Neuroscience*, 282, 86-100. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.05.040
- Flores, C. M. Rogers, S. W. Pabreza, L. A. Wolfe, B. B.& Kellar, K. J. (1992). A subtype of nicotinic cholinergic receptor in rat brain is composed of alpha 4 and beta 2 subunits and is up-regulated by chronic nicotine treatment. *Mol Pharmacol*, 41(1), 31-37.
- Floresco, S. B. West, A. R. Ash, B. Moore, H.& Grace, A. A. (2003). Afferent modulation of dopamine neuron firing differentially regulates tonic and phasic dopamine transmission. *Nat Neurosci*, 6(9), 968-973. doi: 10.1038/nn1103
- Frahm, S. Slimak, M. A. Ferrarese, L. Santos-Torres, J. Antolin-Fontes, B. Auer, S. . . . Ibanez-Tallon, I. (2011). Aversion to nicotine is regulated by the balanced activity of beta4 and alpha5 nicotinic receptor subunits in the medial habenula. *Neuron*, 70(3), 522-535. doi: 10.1016/j.neuron.2011.04.013
- Francis, M. M. Vazquez, R. W. Papke, R. L.& Oswald, R. E. (2000). Subtype-selective inhibition of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by cocaine is determined by the alpha4 and beta4 subunits. *Mol Pharmacol*, 58(1), 109-119.
- Frank, J. Cichon, S. Treutlein, J. Ridinger, M. Mattheisen, M. Hoffmann, P. . . . Rietschel, M. (2012). Genome-wide significant association between alcohol dependence and a variant in the ADH gene cluster. *Addict Biol*, 17(1), 171-180. doi: 10.1111/j.1369-1600.2011.00395.x
- Furberg, H., Kim, Y., Dackor, J., Boerwinkle, E., Franceschini, N., Ardissino, D., . . . Merlini, P. A. (2010). Genome-wide meta-analyses identify multiple loci associated with smoking behavior. *Nat Genet*, 42(5), 441-447. doi: 10.1038/ng.571
- Gelernter, J. Kranzler, H. R. Sherva, R. Almasy, L. Koesterer, R. Smith, A. H. . . . Farrer, L. A. (2014a). Genome-wide association study of alcohol dependence: significant findings in African- and European-Americans including novel risk loci. *Mol Psychiatry*, 19(1), 41-49. doi: 10.1038/mp.2013.145
- Gelernter, J. Sherva, R. Koesterer, R. Almasy, L. Zhao, H. Kranzler, H. R.& Farrer, L. (2014b). Genome-wide association study of cocaine dependence and related traits: FAM53B identified as a risk gene. *Mol Psychiatry*, 19(6), 717-723. doi: 10.1038/mp.2013.99

- Genomes Project, C. Auton, A. Brooks, L. D. Durbin, R. M. Garrison, E. P. Kang, H. M. . . . Abecasis, G. R. (2015). A global reference for human genetic variation. *Nature*, *526*(7571), 68-74. doi: 10.1038/nature15393
- Goldstein, R. A., DesLauriers, C., & Burda, A. M. (2009). Cocaine: history, social implications, and toxicity—a review. *Disease-a-Month*, *55*(1), 6-38.
- Gotti, C. & Clementi, F. (2004). Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog Neurobiol*, *74*(6), 363-396. doi: 10.1016/j.pneurobio.2004.09.006
- Gotti, C. Moretti, M. Gaimarri, A. Zanardi, A. Clementi, F. & Zoli, M. (2007). Heterogeneity and complexity of native brain nicotinic receptors. *Biochem Pharmacol*, *74*(8), 1102-1111. doi: 10.1016/j.bcp.2007.05.023
- Govind, A. P. Vezina, P. & Green, W. N. (2009). Nicotine-induced upregulation of nicotinic receptors: underlying mechanisms and relevance to nicotine addiction. *Biochem Pharmacol*, *78*(7), 756-765. doi: 10.1016/j.bcp.2009.06.011
- Grace, A. A. & Bunney, B. S. (1984). The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: single spike firing. *J Neurosci*, *4*(11), 2866-2876.
- Greenbaum, L. Rigbi, A. Lipshtat, N. Cilia, R. Tesei, S. Asselta, R. . . . Lerer, B. (2013). Association of nicotine dependence susceptibility gene, CHRNA5, with Parkinson's disease age at onset: gene and smoking status interaction. *Parkinsonism Relat Disord*, *19*(1), 72-76. doi: 10.1016/j.parkreldis.2012.07.007
- Grucza, R. A. Wang, J. C. Stitzel, J. A. Hinrichs, A. L. Saccone, S. F. Saccone, N. L. . . . Bierut, L. J. (2008). A risk allele for nicotine dependence in CHRNA5 is a protective allele for cocaine dependence. *Biol Psychiatry*, *64*(11), 922-929. doi: 10.1016/j.biopsych.2008.04.018
- Hanlon, C. A. Dufault, D. L. Wesley, M. J. & Porrino, L. J. (2011). Elevated gray and white matter densities in cocaine abstainers compared to current users. *Psychopharmacology (Berl)*, *218*(4), 681-692. doi: 10.1007/s00213-011-2360-y
- Hogg, R. C., Raggenbass, M., & Bertrand, D. (2003). Nicotinic acetylcholine receptors: from structure to brain function. In *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* (pp. 1-46). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Hyland, B. I. Reynolds, J. N. Hay, J. Perk, C. G. & Miller, R. (2002). Firing modes of midbrain dopamine cells in the freely moving rat. *Neuroscience*, *114*(2), 475-492.
- Hyman, S. E. Malenka, R. C. & Nestler, E. J. (2006). Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. *Annu Rev Neurosci*, *29*, 565-598. doi: 10.1146/annurev.neuro.29.051605.113009
- 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/wpcontent/uploads/2014/03/Lenad-II-Relatório.pdf>. Acessado em 23 Feb 2018
- Jasinska, A. J. Zorick, T. Brody, A. L. & Stein, E. A. (2014). Dual role of nicotine in addiction and cognition: a review of neuroimaging studies in humans.

*Neuropharmacology*, 84, 111-122. doi:  
10.1016/j.neuropharm.2013.02.015

- Kaakinen, M. Ducci, F. Sillanpaa, M. J. Laara, E. & Jarvelin, M. R. (2012). Associations between variation in CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4, body mass index and blood pressure in the Northern Finland Birth Cohort 1966. *PLoS One*, 7(9), e46557. doi: 10.1371/journal.pone.0046557
- Kendler, K. S. Karkowski, L. M. Neale, M. C. & Prescott, C. A. (2000). Illicit psychoactive substance use, heavy use, abuse, and dependence in a US population-based sample of male twins. *Arch Gen Psychiatry*, 57(3), 261-269.
- Kendler, K. S. Ohlsson, H. Maes, H. H. Sundquist, K. Lichtenstein, P. & Sundquist, J. (2015). A population-based Swedish Twin and Sibling Study of cannabis, stimulant and sedative abuse in men. *Drug Alcohol Depend*, 149, 49-54. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2015.01.016
- Kendler, K. S. & Prescott, C. A. (1998). Cocaine use, abuse and dependence in a population-based sample of female twins. *Br J Psychiatry*, 173, 345-350.
- Kimbrel, N. A. Garrett, M. E. Dennis, M. F. Liu, Y. Patanam, I. Workgroup, V. M. . . . Beckham, J. C. (2015). Effect of genetic variation in the nicotinic receptor genes on risk for posttraumatic stress disorder. *Psychiatry Res*, 229(1-2), 326-331. doi: 10.1016/j.psychres.2015.07.002
- Kumasaka, N. Aoki, M. Okada, Y. Takahashi, A. Ozaki, K. Mushirola, 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. doi: 10.1371/journal.pone.0044507
- Kuryatov, A. Berrettini, W. & Lindstrom, J. (2011). Acetylcholine receptor (AChR) alpha5 subunit variant associated with risk for nicotine dependence and lung cancer reduces (alpha4beta2)(2)alpha5 AChR function. *Mol Pharmacol*, 79(1), 119-125. doi: 10.1124/mol.110.066357
- 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. *Nat Genet*, 42(5), 436-440. doi: 10.1038/ng.572
- Lubke, G. H. Stephens, S. H. Lessem, J. M. Hewitt, J. K. & Ehringer, M. A. (2012). The CHRNA5/A3/B4 gene cluster and tobacco, alcohol, cannabis, inhalants and other substance use initiation: replication and new findings using mixture analyses. *Behav Genet*, 42(4), 636-646. doi: 10.1007/s10519-012-9529-y
- Lynskey, M. T. Agrawal, A. Henders, A. Nelson, E. C. Madden, P. A. & Martin, N. G. (2012). An Australian twin study of cannabis and other illicit drug use and misuse, and other psychopathology. *Twin Res Hum Genet*, 15(5), 631-641. doi: 10.1017/thg.2012.41

- Mameli-Engvall, M. Evrard, A. Pons, S. Maskos, U. Svensson, T. H. Changeux, J. P. & Faure, P. (2006). Hierarchical control of dopamine neuron-firing patterns by nicotinic receptors. *Neuron*, *50*(6), 911-921. doi: 10.1016/j.neuron.2006.05.007
- Mao, D. Perry, D. C. Yasuda, R. P. Wolfe, B. B. & Kellar, K. J. (2008). The  $\alpha 4\beta 2\alpha 5$  nicotinic cholinergic receptor in rat brain is resistant to up-regulation by nicotine in vivo. *J Neurochem*, *104*(2), 446-456. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.05011.x
- Maskos, U. Molles, B. E. Pons, S. Besson, M. Guiard, B. P. Guilloux, J. P. . . . Changeux, J. P. (2005). Nicotine reinforcement and cognition restored by targeted expression of nicotinic receptors. *Nature*, *436*(7047), 103-107. doi: 10.1038/nature03694
- Melroy-Greif, W. E. Stitzel, J. A. & Ehringer, M. A. (2016). Nicotinic acetylcholine receptors: upregulation, age-related effects and associations with drug use. *Genes Brain Behav*, *15*(1), 89-107. doi: 10.1111/gbb.12251
- Nestler, E. J. (2005). The neurobiology of cocaine addiction. *Sci Pract Perspect*, *3*(1), 4-10.
- Nutt, D. J. Lingford-Hughes, A. Erritzoe, D. & Stokes, P. R. (2015). The dopamine theory of addiction: 40 years of highs and lows. *Nat Rev Neurosci*, *16*(5), 305-312. doi: 10.1038/nrn3939
- Palmer, R. H. Button, T. M. Rhee, S. H. Corley, R. P. Young, S. E. Stallings, M. C. . . . Hewitt, J. K. (2012). Genetic etiology of the common liability to drug dependence: evidence of common and specific mechanisms for DSM-IV dependence symptoms. *Drug Alcohol Depend*, *123* Suppl 1, S24-32. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2011.12.015
- Park, B. L. Kim, J. W. Cheong, H. S. Kim, L. H. Lee, B. C. Seo, C. H. . . . Choi, I. G. (2013). Extended genetic effects of ADH cluster genes on the risk of alcohol dependence: from GWAS to replication. *Hum Genet*, *132*(6), 657-668. doi: 10.1007/s00439-013-1281-8
- Polina, E. R. Rovaris, D. L. de Azeredo, L. A. Mota, N. R. Vitola, E. S. Silva, K. L. . . . Bau, C. H. (2014). ADHD diagnosis may influence the association between polymorphisms in nicotinic acetylcholine receptor genes and tobacco smoking. *Neuromolecular Med*, *16*(2), 389-397. doi: 10.1007/s12017-013-8286-2
- Quillen, E. E. Chen, X. D. Almasy, L. Yang, F. He, H. Li, X. . . . Gelernter, J. (2014). ALDH2 is associated to alcohol dependence and is the major genetic determinant of "daily maximum drinks" in a GWAS study of an isolated rural Chinese sample. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, *165B*(2), 103-110. doi: 10.1002/ajmg.b.32213
- Robinson, S. Smith, D. M. Mizumori, S. J. & Palmiter, R. D. (2004). Firing properties of dopamine neurons in freely moving dopamine-deficient mice: effects of dopamine receptor activation and anesthesia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(36), 13329-13334. doi: 10.1073/pnas.0405084101
- Saccone, N. L. Culverhouse, R. C. Schwantes-An, T. H. Cannon, D. S. Chen, X. Cichon, S. . . . Bierut, L. J. (2010). Multiple independent loci at

- chromosome 15q25.1 affect smoking quantity: a meta-analysis and comparison with lung cancer and COPD. *PLoS Genet*, 6(8). doi: 10.1371/journal.pgen.1001053
- Saccone, N. L. Saccone, S. F. Goate, A. M. Grucza, R. A. Hinrichs, A. L. Rice, J. P. & Bierut, L. J. (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
- Salas, R. Orr-Urtreger, A. Broide, R. S. Beaudet, A. Paylor, R. & De Biasi, M. (2003). The nicotinic acetylcholine receptor subunit alpha 5 mediates short-term effects of nicotine in vivo. *Mol Pharmacol*, 63(5), 1059-1066.
- Shanti CM, Lucas CE: Cocaine and the critical care challenge. *Crit Care Med* 31:1851-1859, 2003
- Scheidweiler, K. B. Plessinger, M. A. Shojaie, J. Wood, R. W. & Kwong, T. C. (2003). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of methylecgonidine, a crack cocaine pyrolyzate. *J Pharmacol Exp Ther*, 307(3), 1179-1187. doi: 10.1124/jpet.103.055434
- Schlaepfer, I. R. Hoft, N. R. Collins, A. C. Corley, R. P. Hewitt, J. K. Hopfer, C. J. . . . Ehringer, M. A. (2008). The CHRNA5/A3/B4 gene cluster variability as an important determinant of early alcohol and tobacco initiation in young adults. *Biol Psychiatry*, 63(11), 1039-1046. doi: 10.1016/j.biopsych.2007.10.024
- Schuch, J. B. Polina, E. R. Rovaris, D. L. Kappel, D. B. Mota, N. R. Cupertino, R. B. . . . Bau, C. H. (2016). Pleiotropic effects of Chr15q25 nicotinic gene cluster and the relationship between smoking, cognition and ADHD. *J Psychiatr Res*, 80, 73-78. doi: 10.1016/j.jpsychires.2016.06.002
- Shen, B. Zhu, Q. Zheng, M. Q. Chen, J. Shi, M. Q. & Feng, J. F. (2013). CHRNA5 polymorphism and susceptibility to lung cancer in a Chinese population. *Braz J Med Biol Res*, 46(1), 79-84.
- Sherva, R. Kranzler, H. R. Yu, Y. Logue, M. W. Poling, J. Arias, A. J. . . . Gelernter, J. (2010). Variation in nicotinic acetylcholine receptor genes is associated with multiple substance dependence phenotypes. *Neuropsychopharmacology*, 35(9), 1921-1931. doi: 10.1038/npp.2010.64
- Sherva, R. Wang, Q. Kranzler, H. Zhao, H. Koesterer, R. Herman, A. . . . Gelernter, J. (2016). Genome-wide Association Study of Cannabis Dependence Severity, Novel Risk Variants, and Shared Genetic Risks. *JAMA Psychiatry*, 73(5), 472-480. doi: 10.1001/jamapsychiatry.2016.0036
- Spronk, D. B. van Wel, J. H. Ramaekers, J. G. & Verkes, R. J. (2013). Characterizing the cognitive effects of cocaine: a comprehensive review. *Neurosci Biobehav Rev*, 37(8), 1838-1859. doi: 10.1016/j.neubiorev.2013.07.003
- Stephens, S. H. Hartz, S. M. Hoft, N. R. Saccone, N. L. Corley, R. C. Hewitt, J. K. . . . Ehringer, M. A. (2013). Distinct loci in the CHRNA5/CHRNA3/CHRNA4 gene cluster are associated with onset of

- regular smoking. *Genet Epidemiol*, 37(8), 846-859. doi: 10.1002/gepi.21760
- Stewart, M. J., Fulton, H. G., & Barrett, S. P. (2014). Powder and crack cocaine use among opioid users: is all cocaine the same?. *Journal of addiction medicine*, 8(4), 264-270.
- Tammimaki, A. Herder, P. Li, P. Esch, C. Laughlin, J. R. Akk, G. & Stitzel, J. A. (2012). Impact of human D398N single nucleotide polymorphism on intracellular calcium response mediated by alpha3beta4alpha5 nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology*, 63(6), 1002-1011. doi: 10.1016/j.neuropharm.2012.07.022
- 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. doi: 10.1038/nature06846
- 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. *Nat Genet*, 42(5), 448-453. doi: 10.1038/ng.573
- UNODC (2015) United Nations Office on Drugs and Crime, World Drug Report 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) United Nations Office on Drugs and Crime,World Drug Report 2016 (United Nations publication, Sales No. E.16.XI.7).[http://www.unodc.org/doc/wdr2016/WORLD\\_DRUG\\_REPORT\\_2016\\_web.pdf](http://www.unodc.org/doc/wdr2016/WORLD_DRUG_REPORT_2016_web.pdf)
- UNODC (2017) United Nations Office on Drugs and Crime,World Drug Report 2016 (ISBN: 978-92-1-148291-1, eISBN: 978-92-1-060623-3, United Nations publication, Sales No. E.17.XI.6).  
[https://www.unodc.org/wdr2017/field/Booklet\\_1\\_EXSUM.pdf](https://www.unodc.org/wdr2017/field/Booklet_1_EXSUM.pdf).
- Verhulst, B. Neale, M. C. & Kendler, K. S. (2015). The heritability of alcohol use disorders: a meta-analysis of twin and adoption studies. *Psychol Med*, 45(5), 1061-1072. doi: 10.1017/S0033291714002165
- Vijayraghavan, S. Wang, M. Birnbaum, S. G. Williams, G. V. & Arnsten, A. F. (2007). Inverted-U dopamine D1 receptor actions on prefrontal neurons engaged in working memory. *Nat Neurosci*, 10(3), 376-384. doi: 10.1038/nn1846
- Vink, J. M. Willemsen, G. & Boomsma, D. I. (2005). Heritability of smoking initiation and nicotine dependence. *Behav Genet*, 35(4), 397-406. doi: 10.1007/s10519-004-1327-8
- Volkow, N. D. Fowler, J. S. Wang, G. J. Baler, R. & Telang, F. (2009). Imaging dopamine's role in drug abuse and addiction. *Neuropharmacology*, 56 Suppl 1, 3-8. doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.05.022

- Volkow, N. D. Wang, G. J. Fowler, J. S. Tomasi, D. & Telang, F. (2011). Addiction: beyond dopamine reward circuitry. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(37), 15037-15042. doi: 10.1073/pnas.1010654108
- Vonmoos, M. Hulka, L. M. Preller, K. H. Jenni, D. Baumgartner, M. R. Stohler, R. . . . Quednow, B. B. (2013). Cognitive dysfunctions in recreational and dependent cocaine users: role of attention-deficit hyperactivity disorder, craving and early age at onset. *Br J Psychiatry*, 203(1), 35-43. doi: 10.1192/bjp.bp.112.118091
- Vonmoos, M. Hulka, L. M. Preller, K. H. Minder, F. Baumgartner, M. R. & Quednow, B. B. (2014). Cognitive impairment in cocaine users is drug-induced but partially reversible: evidence from a longitudinal study. *Neuropsychopharmacology*, 39(9), 2200-2210. doi: 10.1038/npp.2014.71
- Wang, J. C. Grucza, R. Cruchaga, C. Hinrichs, A. L. Bertelsen, S. Budde, J. P. . . . Goate, A. M. (2009). Genetic variation in the CHRNA5 gene affects mRNA levels and is associated with risk for alcohol dependence. *Mol Psychiatry*, 14(5), 501-510. doi: 10.1038/mp.2008.42
- Wen, L. Jiang, K. Yuan, W. Cui, W. & Li, M. D. (2016). Contribution of Variants in CHRNA5/A3/B4 Gene Cluster on Chromosome 15 to Tobacco Smoking: From Genetic Association to Mechanism. *Mol Neurobiol*, 53(1), 472-484. doi: 10.1007/s12035-014-8997-x
- Williams, M. J. & Adinoff, B. (2008). The role of acetylcholine in cocaine addiction. *Neuropsychopharmacology*, 33(8), 1779-1797. doi: 10.1038/sj.npp.1301585
- Yu, C. R. & Role, L. W. (1998). Functional contribution of the alpha5 subunit to neuronal nicotinic channels expressed by chick sympathetic ganglion neurones. *J Physiol*, 509 ( Pt 3), 667-681.
- Zachariou, V. Caldarone, B. J. Weathers-Lowin, A. George, T. P. Elsworth, J. D. Roth, R. H. . . . Picciotto, M. R. (2001). Nicotine receptor inactivation decreases sensitivity to cocaine. *Neuropsychopharmacology*, 24(5), 576-589. doi: 10.1016/S0893-133X(00)00224-4
- Zayats, T. Yang, B. Z. Xie, P. Poling, J. Farrer, L. A. & 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(1), e49368. doi: 10.1371/journal.pone.0049368
- Zhang, L. Doyon, W. M. Clark, J. J. Phillips, P. E. & Dani, J. A. (2009a). Controls of tonic and phasic dopamine transmission in the dorsal and ventral striatum. *Mol Pharmacol*, 76(2), 396-404. doi: 10.1124/mol.109.056317
- Zhang, T. Zhang, L. Liang, Y. Siapas, A. G. Zhou, F. M. & Dani, J. A. (2009b). Dopamine signaling differences in the nucleus accumbens and dorsal striatum exploited by nicotine. *J Neurosci*, 29(13), 4035-4043. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0261-09.2009
- Zhao, Z. Peng, F. Zhou, Y. Hu, G. He, H. He, F. . . . Ran, P. (2015). Éxon sequencing identifies a novel CHRNA3-CHRNA5-CHRNA4 variant that



increases the risk for chronic obstructive pulmonary disease.  
*Respirology*, 20(5), 790-798. doi: 10.1111/resp.12539

## Anexos

## Anexo 1 - Produção científica adicional durante Mestrado

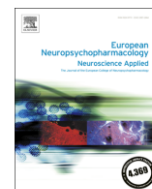
ARTICLE IN PRESS

European Neuropsychopharmacology (■■■■) ■, ■■■-■■■



ELSEVIER

www.elsevier.com/locate/euroneuro



## Glucocorticoid receptor gene modulates severity of depression in women with crack cocaine addiction

Diego L. Rovaris<sup>a,1</sup>, Angelita P. Aroche<sup>a,b,1</sup>, Bruna S. da Silva<sup>a</sup>,  
Djenifer B. Kappel<sup>a</sup>, Júlio C. Pezzi<sup>c</sup>, Mateus L. Levandowski<sup>d</sup>,  
Adriana R.B. Hess<sup>e</sup>, Jaqueline B. Schuch<sup>a</sup>, Rosa M.M. de Almeida<sup>e</sup>,  
Rodrigo Grassi-Oliveira<sup>d,2</sup>, Claiton H.D. Bau<sup>a,\*,2</sup>

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

<sup>b</sup>Health Sciences Institute, Universidade Feevale, Novo Hamburgo, Brazil

<sup>c</sup>Postgraduate Program in Health Sciences, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Brazil

<sup>d</sup>Developmental Cognitive Neuroscience Lab (DCNL), Post-Graduate Program in Psychology, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Brazil

<sup>e</sup>Institute of Psychology, Laboratory of Experimental Psychology, Neuroscience and Behavior (LPNeC), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Received 20 January 2016; received in revised form 3 May 2016; accepted 18 June 2016

### KEYWORDS

Major depressive disorder;  
Addiction;  
Glucocorticoid receptor;  
NR3C1;  
CRHR1;  
FKBP5

### Abstract

Crack cocaine addicted inpatients that present more severe withdrawal symptoms also exhibit higher rates of depressive symptoms. There is strong evidence that the identification of genetic variants in depression is potentialized when reducing phenotypic heterogeneity by studying selected groups. Since depression has been associated to dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, this study evaluated the effects of SNPs in stress-related genes on depressive symptoms of crack cocaine addicts at early abstinence and over the detoxification treatment (4th, 11th and 18th day post admission). Also, the role of these SNPs on the re-hospitalization rates after 2.5 years of follow-up was studied. One hundred eight-two women were enrolled and eight SNPs in four genes (*NR3C2*, *NR3C1*, *FKBP5* and *CRHR1*) were genotyped. A significant main effect of *NR3C1*-rs41423247 was found, where the C minor allele increased depressive symptoms at early abstinence. This effect remained significant after 10,000 permutations to account for multiple SNPs tested ( $P=0.0077$ ). There was no effect of

\*Corresponding author. Fax: +5551 3308 7311.

E-mail address: [claiton.bau@ufrgs.br](mailto:claiton.bau@ufrgs.br) (C.H.D. Bau).

<sup>1</sup>These authors contributed equally to this work.

<sup>2</sup>Senior authors.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.euroneuro.2016.06.010>

0924-977X/© 2016 Elsevier B.V. and ECNP. All rights reserved.

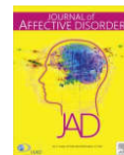
Please cite this article as: Rovaris, D.L., et al., Glucocorticoid receptor gene modulates severity of depression in women with crack cocaine addiction. *European Neuropsychopharmacology* (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.euroneuro.2016.06.010>



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Affective Disorders

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jad](http://www.elsevier.com/locate/jad)

Research paper

## Effects of corticotropin-releasing hormone receptor 1 SNPs on major depressive disorder are influenced by sex and smoking status



Bruna S. da Silva<sup>a</sup>, Diego L. Rovaris<sup>a</sup>, Jaqueline B. Schuch<sup>a</sup>, Nina R. Mota<sup>a</sup>,  
Renata B. Cupertino<sup>a</sup>, Angelita P. Aroche<sup>a</sup>, Guilherme P. Bertuzzi<sup>a</sup>, Rafael G. Karam<sup>b</sup>,  
Eduardo S. Vitola<sup>b</sup>, Luciana Tovo-Rodrigues<sup>c</sup>, Eugenio H. Grevet<sup>b,d</sup>, Claiton H.D. Bau<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Genetics, Institute of Biosciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

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

<sup>c</sup> Postgraduate Program in Epidemiology, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brazil

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

### ARTICLE INFO

**Article history:**  
Received 26 January 2016  
Received in revised form  
10 July 2016  
Accepted 11 August 2016  
Available online 13 August 2016

**Keywords:**  
Depression  
Smoking  
Stress  
Gender  
Genetics  
CRHR1

### ABSTRACT

**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 ( $P_{\text{corr}}=0.034$ ) and rs878886 in men ( $P_{\text{corr}}=0.013$ ). 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.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Major Depressive Disorder (MDD) is characterized by depressed mood and decreased interest or pleasure in daily activities in addition to cognitive and physiological symptoms, leading to impaired function (American Psychiatric Association, 2013). The lifetime prevalence of MDD in the general population is approximately 15% (Kessler et al., 2003; Hasin et al., 2005), with a female:male ratio of 2:1 (Kessler, 2003).

MDD heritability has been estimated at 31–42% (Sullivan et al., 2000); however, the identification of specific genes involved in the

etiology of MDD has remained a challenge. Most genome-wide association studies (GWAS) have not provided significant findings (Ripke et al., 2013). However, a recent study from the CONVERGE consortium observed two loci associated with MDD, one close to *SIRT1* and the other in an intron of the *LHPP* gene (CONVERGE consortium, 2015). These genes had previously been implicated in MDD using candidate gene approaches (Neff et al., 2009; Kishi et al., 2010; Kovanen et al., 2015). Additional genes are expected to play a role in such a complex disorder. One approach to identify such genes is to complement GWAS data with the most robust pathophysiological findings to design hypothesis-driven studies.

For the etiology of MDD, several lines of evidence point towards genes encoding components of the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis (for review, see Wardenaar et al., 2011). There is evidence that the pathophysiology of MDD involves hyperactivity

\* Correspondence to: Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UFRGS, Caixa Postal: 15053, CEP 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil.  
E-mail address: [claiton.bau@ufrgs.br](mailto:claiton.bau@ufrgs.br) (C.H.D. Bau).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jad.2016.08.008>

0165-0327/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.