

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

**INTERAÇÕES GENÉTICAS DO EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-ADRENAL
NO TRANSTORNO POR USO DE SUBSTÂNCIAS**

Diego Luiz Rovaris

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

Orientador: Prof. Dr. Claiton Henrique Dotto Bau
Co-orientador: Prof. Dr. Rodrigo Grassi de Oliveira

Porto Alegre, Fevereiro de 2013

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. O aluno recebeu bolsa de estudos concedida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Instituições Financiadoras:

CNPq

CAPES

FAPERGS-DECIT-PPSUS

AGRADECIMENTOS

Aos professores

Ao meu orientador, **Professor Claiton Bau**, por ser um cientista integral, por ter me ensinado muitas coisas nesses dois anos e por se tornar um grande amigo. Tenho certeza de que todas as discussões teóricas e as conversas ‘filosóficas’ ajudaram a construir este trabalho e o que está por vir nos próximos anos. À professora **Sidia Callegari-Jacques**, por ser a melhor docente e por ter me tornado um apaixonado ainda maior por estatística. Sei que o ‘tamanho de efeito’ foi enorme! Ao professor **Rodrigo Grassi**, por ter oportunizado a colaboração entre os grupos de pesquisa da UFRGS e da PUCRS e pela orientação, mesmo que lá no outro lado do mundo. À professora **Fabiana de Andrade**, por tudo! Por ter me deixado trabalhar na sala F da PROPI e pelo incentivo constante. Foi aí que a vontade de ser cientista surgiu!

Aos meus amigos da sala 109

À **Nina** pela amizade, caronas e conversas *in silico*! Não posso dizer que interagimos significativamente, pois isso não fica de acordo com o conceito matemático de epistasia descrito por R. A. Fisher em 1918. Entretanto, acredito que nosso trabalho segue um modelo puramente ‘aditivo’. À **Verônica**, pela amizade, corridas, e pela sociedade na ‘fábrica de papers’. A tua ajuda fez com que eu me sentisse várias vezes ‘Professor’ de verdade! À **Evelise**, também pela amizade e por ter sempre retornado os ‘*talk to me*’ constantes. Ao **Guilherme** e ao **Lucas**, pela parceria, amizade e pela ajuda em questões estritamente técnicas! À **Renata**, pela amizade, pelas caronas e por ser uma IC brilhante, na verdade, a ‘*gold standard*’ dos ICs! À **Katiane**, pela amizade estupenda, pelas corridas, por tornar as manhãs de quinta no campus sempre mais agradáveis e por ter me mostrado como a psicologia é linda! À **Gabriela**. Opa! Cadê a Gabriela? Ahh dando super aulas!

Aos meus amigos de ‘outrora’

À **Nessa, Jaque e Bia**, por deixarem a amizade construída na graduação cada vez mais forte e, claro, por terem me mostrado que existem outros PUBs tão interessantes quanto o PubMed! À **Carol Hillebrand** e ao **Ziggy**, pelos chimarrões, boas conversas e pelas ajudas na área de fisiologia das tais ‘isoformas’. Aos meus amigos praieiros **Sarô, Marcos Luz, Márcia Marka, Clara Lazzari** e tantos outros, por escutarem meus ‘causos biomédicos’ e por estarem sempre curiosos em relação ao meu trabalho. Ao **Marcel** e a **Tássia**, pela amizade e pelo convívio em Porto Alegre!

À minha família

Em especial aos meus pais **Juci** e **Mari**, aos meus irmãos **Jean** e **Gabriel**, e à **Silvana**. Essa é a parte mais difícil, pois não sei como dizer obrigado simplesmente por tudo! Meu pai é meu maior exemplo de força, simplicidade e honestidade. Sem a ajuda dele nada disso poderia ter acontecido. A minha mãe... continua ligando todos, mas todos os dias, desde que saí de casa, há quase oito anos. Só tenho que te agradecer por sentir tanta saudade! À Silvana não tenho palavras, pois em todas as ligações ela me chama de filho!

Obrigado a todos!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	5
RESUMO	6
ABSTRACT	7
Capítulo I INTRODUÇÃO GERAL	8
1.1 Considerações Iniciais	9
1.2 Nicotina.....	11
1.3 Cocaína/Crack.....	13
1.4 Ação dos Corticosteróides: o Papel dos Genes <i>NR3C1</i> e <i>NR3C2</i>	15
1.5 Herdabilidade Perdida, TUS e Interações Gene-Gene.....	19
Capítulo II JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	21
2.1 Justificativa	22
2.2 Objetivo Geral.....	23
2.3 Objetivos Específicos	23
Capítulo III ARTIGO #1	24
Capítulo IV ARTIGO #2	34
Capítulo V ARTIGO #3	57
Capítulo VI RESULTADOS ADICIONAIS	86
6.1 Tabagismo e Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade.....	87
Capítulo VII DISCUSSÃO GERAL	91
7.1 A Hipótese Inicial e os Resultados Encontrados	92
7.2 O Eixo HHA, Tabagismo e o TDAH.....	93
7.3 Interações Gene-Gene e Gene-Ambiente.....	94
7.4 Considerações Finais e Perspectivas Futuras.....	95
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
ANEXOS	114
Anexo 1 – Produção Científica Adicional no Período de Mestrado.....	114
Anexo 2 – Aprovação Comissão de Ética em Pesquisa do HCPA	115
Anexo 3 – Aprovação Comissão de Ética em Pesquisa da PUCRS	116
Anexo 4 – Teste de Dependência à Nicotina de Fagerström (FTND).....	117
Anexo 5 – Avaliação de Severidade Seletiva para Cocaína – CSSA	118
Anexo 6 – Questionário de Trauma na Infância (CTQ)	121

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
CRH	Hormônio Liberador de Corticotrofina
DSM-IV	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais 4º Ed
GR	Receptor de Glicocorticóide
GWAS	Estudo de Associação por Varredura Genômica
HHA	Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
MR	Receptor de Mineralocorticóide
nAChRs	Receptores Nicotínicos de Acetilcolina
<i>NR3C1</i>	Gene que codifica o Receptor de Glicocorticóide
<i>NR3C2</i>	Gene que codifica o Receptor de Mineralocorticóide
POMC	Pró-opiomelanocortina
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
TDAH	Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade
TDM	Transtorno Depressivo Maior
TB	Transtorno Bipolar
TICS	<i>Trier Inventory for the Assessment of Chronic Stress</i>
TSST	<i>Trier Social Stress Test</i>
TUS	Transtorno por Uso de Substâncias

RESUMO

O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) parece ter um papel fundamental na etiologia do transtorno por uso de substâncias (TUS). Mais especificamente, o estresse tem um efeito em vários aspectos do desenvolvimento do tabagismo e da dependência de cocaína, incluindo iniciação, manutenção e recaída. Os receptores de mineralocorticóide (MR) e glicocorticóide (GR) são expressos em diversas áreas cerebrais e exercem uma função chave na retroalimentação negativa do eixo HHA. Dessa forma, variações nos genes *NR3C2* e *NR3C1* (codificadores do MR e GR, respectivamente) passam a ser candidatas em estudos de associação no TUS. No presente trabalho, nós avaliamos o efeito de dois SNPs funcionais (*NR3C2*-rs5522 e *NR3C1*-rs6198) sobre o tabagismo e a dependência de cocaína na forma de *crack*. A amostra foi composta por 1271 indivíduos, incluindo tabagistas *lifetime* e não tabagistas da população geral, tabagistas *lifetime* e não tabagistas com um *background* de transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH), além de dependentes de *crack*. Regressão logística binária e multinomial, modelos lineares gerais e equações de estimativas generalizadas foram utilizadas na análise dos dados. Um efeito de interação gene-gene foi demonstrado na suscetibilidade ao tabagismo e na gravidade da dependência de *crack*. A presença simultânea dos alelos rs5522-Val e rs6198-G foi associada com proteção contra o tabagismo e com um número menor de sintomas de abstinência do *crack* durante 3 semanas de tratamento de desintoxicação. Interações gene-ambiente também foram detectadas. O trauma na infância (negligência física) interagiu com os alelos rs5522-Val e rs6198-G conferindo risco para a dependência de *crack*. Além disso, o alelo rs6198-G foi associado com risco aumentado para o tabagismo e a comorbidade com depressão maior em um *background* de TDAH. Nossos resultados são consistentes com um efeito do sistema de estresse sobre o tabagismo e a dependência de *crack*. Como o MR e o GR são cruciais na modulação da retroalimentação negativa do eixo HHA, é possível que alterações na reatividade do sistema de estresse, causadas por SNPs funcionais nos genes *NR3C2* e *NR3C1*, possam modificar os níveis de cortisol e, conseqüentemente, as propriedades de reforço e de recompensa da nicotina e da cocaína em circuitos dopaminérgicos.

ABSTRACT

The hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis seems to have an important role on the establishment of substance use disorders (SUD). More specifically, stress has an effect on various aspects of the development of tobacco smoking and cocaine addiction including initiation, maintenance and relapse. The mineralocorticoid (MR) and glucocorticoid (GR) receptors are expressed in several brain areas and play a key function in negative feedback of the HPA axis. Therefore, polymorphisms in both *NR3C2* and *NR3C1* genes (encoding the MR and GR, respectively) become candidates for association studies in SUD. Here, we evaluated the role of two functional SNPs in these genes (*NR3C2*-rs5522 and *NR3C1*-rs6198) on tobacco smoking and crack cocaine addiction. The sample comprised 1271 subjects including lifetime smokers and never smokers in a sample of the general population, lifetime smokers and never smokers with an attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) background, and crack cocaine addicts. Binary and multinomial logistic regression, general linear models and generalized estimating equations were used in the data analyses. A gene-gene interaction was found on tobacco smoking susceptibility, as well as on the severity of crack cocaine addiction. The simultaneous presence of the rs5522-Val and rs6198-G alleles was associated with protection against smoking and lower crack cocaine withdrawal symptoms during 3 weeks of detoxification treatment. The childhood maltreatment (physical neglect) interacted with the rs5522-Val and rs6198-G alleles conferring risk for crack cocaine addiction. Moreover, the rs6198-G allele was associated with increased risk for smoking with comorbid major depression in a background of ADHD. Our findings are consistent with the role of stress system on tobacco and crack cocaine addiction. Since MR and GR are crucial for the negative feedback of the HPA axis, it is possible that alterations in the stress system reactivity caused by functional SNPs in both *NR3C1* and *NR3C2* genes may change the cortisol levels and, consequently, the nicotine and cocaine reinforcement properties in dopaminergic pathways.

Capítulo I
INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Considerações Iniciais

Há muito tempo o estresse é considerado um fator envolvido no desenvolvimento e na manutenção do transtorno por uso de substâncias (TUS) (Sinha, 2001; Sinha, 2008). Mais especificamente, sabe-se que a desregulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) ocorre nas dependências de álcool, nicotina, cocaína e opióides (Sinha *et al.*, 2006; Sinha, 2008; Brady *et al.*, 2009; Richards *et al.*, 2011; Evans *et al.*, 2012). O eixo HHA é o principal sistema de resposta ao estresse, sendo o mais estudado no TUS (Zhou *et al.*, 2010). Os mediadores mais importantes desse circuito neuroendócrino são o hormônio liberador de corticotrofina (CRH), o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e o cortisol (Figura 1A). O cortisol é liberado pelo córtex das glândulas adrenais e, quando chega no sistema nervoso central, exerce múltiplos efeitos. Entre os efeitos cerebrais do cortisol estão a facilitação do alerta, excitação, vigilância, atenção e agressão, além da manutenção das funções cognitivas e da ativação das alças de retroalimentação negativa (Joels *et al.*, 2008; Chrousos, 2009).

O sistema de resposta ao estresse exerce suas funções em uma curva de dose-resposta em forma de ‘U’ invertido, na qual a homeostase é mantida quando a atividade do sistema é ótima. Entretanto, respostas inapropriadas podem resultar em estados de adaptação ineficientes, os quais aumentam o risco de desenvolvimento (e a manutenção) de doenças relacionadas ao estresse (Chrousos, 2009) (Figura 1B). Com o intuito de diminuir a atividade do eixo HHA, o receptor de glicocorticóide (GR) e o receptor de mineralocorticóide (MR) são ativados pelo cortisol (de Kloet *et al.*, 1998). O GR e o MR são fatores de transcrição dependentes de ligante distribuídos de forma ubíqua no cérebro e regulam uma série de processos neurofisiológicos, incluindo a excitabilidade e a plasticidade neuronais, bem como a adaptação aos agentes estressores (Sapolsky *et al.*, 2000; DeRijk e de Kloet, 2005; Joels *et al.*, 2008).

Estudos pré-clínicos e clínicos vêm melhorando o entendimento da relação entre o estresse e o TUS. Alguns trabalhos já demonstraram que os corticosteróides (cortisol em humanos e corticosterona em roedores) aumentam a liberação de dopamina em circuitos mesocorticolímbicos envolvidos na dependência química (Thierry *et al.*, 1976; Rouge-Pont *et al.*, 1998; Oswald *et al.*, 2005; Wand *et al.*, 2007). Além disso, evidências apontam para um papel de ‘estressor farmacológico’ de algumas drogas de abuso (Sinha, 2008), tais como a nicotina e a cocaína. Sabe-se que essas drogas estimulam a liberação de cortisol e

de corticosterona (Thierry *et al.*, 1976; Baumann *et al.*, 1995; Heesch *et al.*, 1995; Rouge-Pont *et al.*, 1998; Gilbert *et al.*, 2000; Oswald *et al.*, 2005; Wand *et al.*, 2007; Mendelson *et al.*, 2008; Mello, 2010; Lutfy *et al.*, 2012) e que o estresse, tanto agudo quanto crônico, está relacionado com os múltiplos estágios da drogadição, incluindo iniciação, manutenção e a recaída (al'Absi *et al.*, 2005; Falba *et al.*, 2005; Sinha *et al.*, 2006; McEwen *et al.*, 2008).

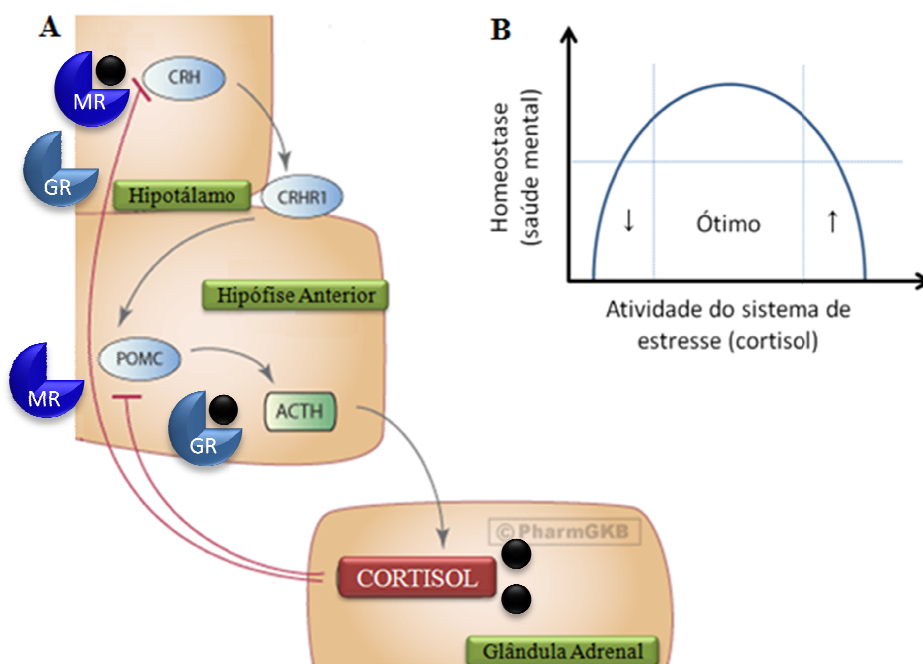


Figura 1 – A) Funcionamento do Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HHA) em humanos. Quando o indivíduo entra em contato com um agente estressor, seja ele de origem fisiológica (ex.: sintomas de parada de uma droga de abuso), psicológica (ex.: falecimento de um familiar) ou farmacológica (ex.: drogas de abuso, incluindo nicotina e cocaína), ocorre ativação do eixo HHA. A secreção de noradrenalina e serotonina estimula a produção do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) pelo hipotálamo. Na hipófise anterior o CRH ativa os receptores tipo 1 de CRH (CRHR1), resultando no aumento da expressão do gene codificador da pró-opiomelanocortina (POMC). A POMC é clivada, gerando beta-endorfina e hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). A partir de uma ação endócrina, o ACTH estimula a produção de cortisol no córtex das glândulas adrenais. O aumento na concentração do cortisol resulta em feedback negativo no hipotálamo e hipófise anterior via ativação dos receptores de mineralocorticóide (MR) e glicocorticóide (GR). Adaptado do PharmGKB [The Pharmacogenomics Knowledge Base], Pathway PA2026. **B) Curva de dose-resposta em forma de ‘U’ invertido.** Exposições inapropriadas e frequentes ao cortisol (deficiência ou excesso) podem ser consequência de respostas adaptativas ineficientes, o que está associado com o desenvolvimento de doenças relacionadas ao estresse, incluindo o transtorno por uso de substâncias (adaptado de Chrousos, 2009).

1.2 Nicotina

Há mais de 3000 anos algumas sociedades nativas da América Central utilizavam o tabaco em rituais mágico-religiosos. A partir do século XVI, o fumo chegou na Europa e rapidamente foi introduzido na Ásia e África (século XVII). Atualmente, o tabaco é cultivado em diversos países e o consumo de cigarros é considerado um grave problema de saúde pública, ultrapassando 1,2 bilhão de usuários em todo o mundo (World Health Organization, 2011). O tabagismo é associado com o desenvolvimento de cânceres, doenças cardiovasculares e respiratórias, diabetes e desordens reprodutivas (Benowitz, 2010), além de ser uma comorbidade frequente em pacientes com transtornos psiquiátricos (Lasser *et al.*, 2000; Grant *et al.*, 2004; Sousa *et al.*, 2011).

O cigarro contém aproximadamente 4000 componentes tóxicos, entretanto, a nicotina é apontada como a principal substância envolvida no desenvolvimento e na manutenção do TUS (Henningfield *et al.*, 1985). As estimativas de herdabilidade da dependência de nicotina variam entre 40-60% (Li *et al.*, 2003) e vários genes têm sido associados com o transtorno. Esses incluem genes do sistema dopaminérgico (Freire *et al.*, 2006), noradrenérgico (Prestes *et al.*, 2007; Polina *et al.*, 2009), serotoninérgico (Ishikawa *et al.*, 1999; Lerman *et al.*, 2001; Sullivan *et al.*, 2001) e, principalmente, do colinérgico (Bierut *et al.*, 2007; Saccone *et al.*, 2007; Bierut *et al.*, 2008; Schlaepfer *et al.*, 2008; Caporaso *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2009; Saccone *et al.*, 2009; Tobacco and Genetics Consortium, 2010; Liu *et al.*, 2010; Sherva *et al.*, 2010; Kapoor *et al.*, 2012).

Os achados com genes envolvidos na neurotransmissão são proeminentes na literatura, contudo, um grande número de evidências obtidas a partir de estudos epidemiológicos (Wills *et al.*, 2002; Falba *et al.*, 2005; Siahpush e Carlin, 2006; McEwen *et al.*, 2008), com modelos animais (Buczek *et al.*, 1999; Lutfy *et al.*, 2012) e com humanos submetidos a testes laboratoriais (Wilkins *et al.*, 1982; Gilbert *et al.*, 1992; al'Absi *et al.*, 2005; Mendelson *et al.*, 2005; Mendelson *et al.*, 2008; McKee *et al.*, 2011) suportam o fato de que o estresse é um fator etiológico principal na dependência de nicotina. O estresse, tanto agudo quanto crônico, facilita a iniciação do hábito tabágico, diminui a motivação de parada do uso da substância e aumenta o risco de recaída dos abstinentes (Richards *et al.*, 2011; Bruijnzeel, 2012).

Os dois principais sistemas de estresse, tanto o eixo HHA quanto o sistema nervoso autônomo, estão envolvidos no tabagismo, entretanto, há um grande número de estudos

mostrando que a desregulação na secreção de CRH, ACTH e cortisol desempenha um papel fundamental na dependência de nicotina. Sabe-se que os tabagistas apresentam níveis mais elevados de cortisol (Winternitz e Quillen, 1977; Wilkins *et al.*, 1982; Gilbert *et al.*, 1992; Steptoe e Ussher, 2006; Mendelson *et al.*, 2008) e que a nicotina ativa o eixo HHA de forma dose-dependente (Mendelson *et al.*, 2005; Lutfy *et al.*, 2012). Além disso, alguns trabalhos já demonstraram que o cortisol aumenta a liberação de dopamina em circuitos mesocorticolímbicos envolvidos nos efeitos de recompensa e de reforço das drogas de abuso (Thierry *et al.*, 1976; Rouge-Pont *et al.*, 1998; Wand *et al.*, 2007), e que o CRH, além de estimular a produção de ACTH e de cortisol, pode atuar de forma independente do eixo HHA, ativando o sistema nervoso simpático (Sutton *et al.*, 1982; Bruijnzeel, 2012).

Como quadro geral, os dados da literatura sugerem uma hiper-reatividade do eixo HHA no tabagismo, a qual influencia os efeitos cerebrais de recompensa e de reforço da nicotina. Inversamente, os estados de abstinência podem resultar em uma hipo-reatividade do eixo, com conseqüente diminuição da concentração de cortisol circulante (Bruijnzeel, 2012). A redução dos níveis de cortisol está associada com aumento das taxas de recaída (Frederick *et al.*, 1998; al'Absi *et al.*, 2004) e, possivelmente, isso está relacionado com a modulação dos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs). A nicotina leva à dessensibilização dos nAChRs e a abstinência resulta em ativação (Dani e Heinemann, 1996). Estudos com modelos animais já demonstraram que a corticosterona também dessensibiliza os nAChRs (Pauly *et al.*, 1988; Robinson *et al.*, 1996), e isso poderia explicar os sintomas de retirada, resultantes da redução brusca nos níveis de cortisol em abstinentes (Bruijnzeel, 2012).

Embora a desregulação do eixo HHA seja um fator relevante na dependência de nicotina, nenhum estudo de associação do tipo gene candidato analisou simultaneamente polimorfismos nos genes que codificam o MR e o GR. Até o momento, dois estudos avaliaram o papel de um SNP (*single nucleotide polymorphism*) no GR (rs41423247), sendo os resultados obtidos contraditórios (Rogausch *et al.*, 2007; Siiskonen *et al.*, 2009). Além disso, uma associação nominal de um polimorfismo no MR (rs5522) com número elevado de cigarros fumados por dia foi reportada em um estudo de associação por varredura genômica (GWAS) (Berrettini *et al.*, 2008).

1.3 Cocaína/Crack

Sob o ponto de vista histórico, o uso da cocaína teve suas raízes em civilizações pré-colombianas, que há 4500 anos já tinham o hábito de mascar e ingerir folhas do arbusto *Erythroxylum coca* (Ferreira e Martini, 2001). Entretanto, a cocaína na forma de cloridrato somente se tornou uma droga de abuso no início do século XX, quando passou a fazer parte da composição de tônicos e elixires utilizados no tratamento de diversas doenças (National Institute on Drug Abuse, 2011). Atualmente, há uma relação clara entre o uso da cocaína e a criminalidade, e a dependência dessa substância já é reconhecida, em diversos países, como um grande problema social e de saúde pública (United Nations Office on Drugs and Crime, 2012).

Comercialmente, a cocaína é encontrada em apresentações distintas. As duas principais são o cloridrato de cocaína e o *crack* (United Nations Office on Drugs and Crime, 2012). A primeira é a forma mais conhecida e consiste em um pó solúvel em água, que pode ser cheirado ou injetado. O *crack* é uma versão alcalina no formato de pedra, o qual pode ser fumado utilizando um ‘cachimbo’ (National Institute on Drug Abuse, 2011). A fumaça exalada pela queima da pedra apresenta um efeito mais intenso que o cloridrato de cocaína, pois é absorvida pelos pulmões e rapidamente enviada ao cérebro (Scheidweiler *et al.*, 2003). Devido ao caráter epidêmico do uso do *crack* e ao grande impacto gerado na saúde pública, o governo brasileiro criou o Plano Integrado de Enfrentamento ao *Crack* e outras Drogas (decreto nº 7.426, de 2010) que tem como principais objetivos criar ações de prevenção, tratamento e reinserção social dos dependentes, além de fortalecer as ações contra o narcotráfico em todo o território nacional.

A dependência de cocaína/*crack* é caracterizada por uma procura compulsiva pela droga a despeito das consequências adversas (Lohoff *et al.*, 2009). Até o momento, as opções de tratamento são limitadas, pois não há terapia farmacológica aprovada pelo FDA (*Food and Drug Administration*) e os resultados de metanálises não suportam a eficácia dos agonistas dopaminérgicos ou dos antidepressivos (Amato *et al.*, 2011; Pani *et al.*, 2011). Resultados de triagens clínicas randomizadas têm sugerido que a metirapona, um inibidor da síntese de corticosteróides, pode ser eficiente no tratamento de sintomas de abstinência (*craving*) por cocaína (Winhusen *et al.*, 2005; Kablinger *et al.*, 2012). O *craving*, de acordo com o DSM-IV (American Psychiatric Association, 1994), é entendido

como uma vontade irresistível de utilizar determinada droga. No caso de dependentes de cocaína/*crack*, associações do *craving* com o tempo e taxas de recaída foram demonstradas (Weiss *et al.*, 2003; Sinha *et al.*, 2006; Rohsenow *et al.*, 2007). Além disso, já foi observado que os episódios de *craving* são significativamente mais frequentes em usuários de *crack* do que em usuários de cocaína (da Silveira *et al.*, 2006).

Em relação ao componente biológico, foi demonstrado que a dependência de cocaína, tanto em homens quanto em mulheres, é substancialmente influenciada pela genética e que as estimativas de herdabilidade estão entre 65-79% (Kendler e Prescott, 1998; Kendler *et al.*, 2000). Entretanto, a identificação dos fatores genéticos de predisposição tem encontrado como obstáculo a complexidade do modo de herança, além da heterogeneidade clínica do transtorno (Bloch *et al.*, 2009). Polimorfismos em genes candidatos, principalmente aqueles envolvidos com neurotransmissão, têm sido investigados, mas até o momento não há consenso na literatura quanto a algum gene ou polimorfismo com grande efeito (Cigler *et al.*, 2001; Patkar *et al.*, 2002; Messas *et al.*, 2005; Guindalini *et al.*, 2006; Guindalini *et al.*, 2008; Lohoff *et al.*, 2008; Bloch *et al.*, 2009; Fernandez-Castillo *et al.*, 2010).

Como a etiologia da dependência de cocaína/*crack* é multifatorial, variáveis ambientais também contribuem para vulnerabilidade. Dentre os fatores já associados com uso de drogas em geral, encontram-se o trauma na infância e o cuidado parental. Vários trabalhos têm avaliado o impacto do abuso físico, emocional e sexual na infância e da relação com os pais no desenvolvimento da dependência química na vida adulta (Back *et al.*, 2008; Gerra, Leonardi, *et al.*, 2009; Gerra, Zaimovic, *et al.*, 2009; Pilowsky *et al.*, 2009; Spratt *et al.*, 2009; Moran-Santa Maria *et al.*, 2010; Schafer *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2010; Clarke *et al.*, 2011). Biologicamente, o trauma na infância e uma má percepção de cuidado parental aumentam a reatividade ao estresse (Gerra *et al.*, 2008; Gerra, Leonardi, *et al.*, 2009). Já foi demonstrado que alterações no eixo HHA provocadas pelo trauma na infância e/ou menor cuidado parental estão relacionadas com o uso de cocaína durante a vida adulta (Gerra, Leonardi, *et al.*, 2009; Moran-Santa Maria *et al.*, 2010). Sabe-se ainda que os níveis de CRH e de cortisol estão relacionados com escores elevados de *craving* e com maior taxa de recaída de dependentes de cocaína após o período de desintoxicação (Sinha *et al.*, 2006).

A avaliação em conjunto de fatores genéticos, como variações em componentes do eixo HHA, e variáveis ambientais, como o trauma na infância e o cuidado parental, pode

ajudar a compreender melhor a base da dependência de cocaína/*crack*. Entretanto, nota-se uma falta na literatura de trabalhos que investigaram esse ponto. Até o momento, somente Gerra *et al.* (2007), Gerra, Zaimovic, *et al.* (2009) e Enoch *et al.* (2010) avaliaram uma possível interação entre trauma na infância, comportamento parental percebido, genes e dependência de cocaína. Entretanto, não há trabalhos que analisaram o papel de variações genéticas nos componentes do eixo HHA e interações com esses fatores ambientais sobre parâmetros clínicos, como a gravidade da dependência e o *craving* por cocaína/*crack*. Até o momento, nenhum estudo de associação sobre a dependência de cocaína/*crack* incluiu polimorfismos nos genes que codificam o MR e o GR.

1.4 Ação dos Corticosteróides: o Papel dos Genes *NR3C1* e *NR3C2*

Após um desafio ou ameaça, há ativação do eixo HHA pela noradrenalina/adrenalina e serotonina e, conseqüentemente, aumento dos níveis de cortisol (DeRijk, 2009). Em resposta ao agente estressor, o hipotálamo secreta CRH, que na hipófise anterior estimula o gene que codifica a pró-opiomelanocortina (POMC). A POMC é processada gerando peptídeos importantes, incluindo o ACTH (Zhou *et al.*, 2010). Posteriormente, o ACTH é liberado na circulação sanguínea e, no córtex das adrenais, ele estimula as enzimas envolvidas na produção dos corticosteróides (DeRijk *et al.*, 2008). Todo esse sistema é controlado por retroalimentação negativa via ativação de GRs e MRs cerebrais pelo cortisol (DeRijk and de Kloet, 2005) (Figura 1A).

Classicamente, o GR e MR eram conhecidos como receptores nucleares, entretanto, nos últimos anos surgiram várias evidências que apontam para GRs e MRs ligados à membrana (receptores acoplados à proteína G), os quais medeiam ações não genômicas dos corticosteróides (Johnson *et al.*, 2005; Prager e Johnson, 2009; Prager *et al.*, 2010). Enquanto que o MR nuclear parece estar envolvido na manutenção da excitabilidade celular e no início da reação de estresse (Gass *et al.*, 2000; Nair *et al.*, 2004; Karst *et al.*, 2005), o MR de membrana amplifica esse sinal (Joels *et al.*, 2008). Ao mesmo tempo, o GR de membrana e o GR nuclear iniciam a contenção e a consolidação da reação de resposta ao estresse, permitindo o armazenamento dessas informações na memória (Sapolsky *et al.*, 2000; Morsink *et al.*, 2006; Oitzl *et al.*, 2010).

O GR e o MR (GenBank ID 2908 e 4306, respectivamente) são membros da subfamília 3 de receptores nucleares (*Nr3c1* e *Nr3c2*, respectivamente) e têm estrutura semelhante. Ambos apresentam três regiões funcionais: um domínio de ativação

transcricional na porção N-terminal, um domínio central de ligação ao DNA tipo dedo de zinco e um domínio de ligação ao ligante na porção C-terminal (DeRijk, 2009; de Iudicibus *et al.*, 2011). Esses receptores formam complexos heteroméricos com proteínas de choque térmico e chaperonas. Após a ligação com o corticosteróide, o complexo se desmonta e o receptor ativado entra no núcleo e interage com o DNA (Bruner *et al.*, 1997; Morishima *et al.*, 2003; Viengchareun *et al.*, 2007). No caso dos receptores ligados à membrana, a modulação dos genes alvo ocorre via translocação do complexo receptor-proteína G-proteínas acessórias até o núcleo (Prager e Johnson, 2009).

O GR é codificado pelo gene *NR3C1*, que está localizado no cromossomo 5q31-32. Já o gene do MR (*NR3C2*) está no cromossomo 4q31.1. Os dois genes são similares em relação à estrutura. Ambos apresentam primeiros exons alternativos que não são traduzidos e a região codificante é formada por 8 exons (Figura 2). Processos de *splicing* alternativo são responsáveis pela formação de isoformas (Viengchareun *et al.*, 2007; DeRijk *et al.*, 2008). Em relação ao GR, cinco isoformas de *splicing* já foram descritas - GR α , GR β , GR γ , GR-A e GR-P -, as quais diferem em suas extremidades C-terminal e possuem atividades distintas (Kino *et al.*, 2009; Oakley e Cidlowski, 2011). Além disso, variantes podem ser geradas de acordo com o códon de início utilizado. O exon 2 possui 8 códon de iniciação ATG, o que resulta em 8 variações do GR α (e possivelmente das outras isoformas) com extremidades N-terminal progressivamente mais curtas (GR α -A, GR α -B, GR α -C1, GR α -C2, GR α -C3, GR α -D1, GR α -D2 e GR α -D3) (Oakley e Cidlowski, 2011).

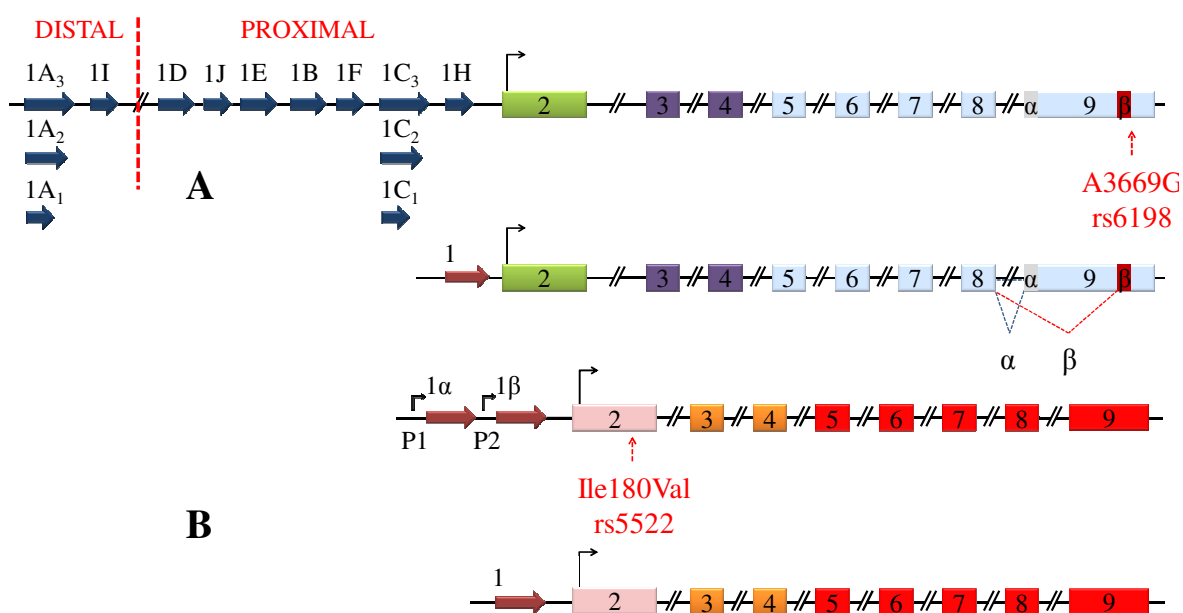


Figura 2 – Representação esquemática da estrutura do GR e MR humano. Os domínios de ativação transcricional na porção N-terminal (exon 2), de ligação ao DNA (exons 3-4) e de ligação ao ligante na porção C-terminal (exons 5-9) estão indicados em cores diferentes. **A)** O gene *NR3C1* tem 9 primeiros exons alternativos que podem ser transcritos, mas não são traduzidos. Variantes de mRNAs são geradas por splicing a partir da seleção do primeiro exon alternativo. A região promotora é formada por uma porção distal (controle dos exons 1A e 1I) e uma proximal (controle dos exons 1D, 1J, 1E, 1B, 1F, 1C e 1H). A seleção do primeiro exon está envolvida na determinação da isoforma do GR. Por exemplo, o uso do promotor 1C favorece a expressão do GR α (Russcher et al 2007). As isoformas mais comuns são a α e β . A primeira é gerada por um splicing alternativo entre o final do exon 8 e o início do exon 9, enquanto a GR β é formada pela junção do final do exon 8 com um sítio de splicing localizado a jusante no exon 9. O exon 2 possui 8 códons alternativos de início da tradução, o que possibilita a formação de diferentes variantes do GR com extremidades N-terminal mais curtas (não ilustrado). O rs6198 está indicado. **B)** O gene *NR3C2* apresenta 2 primeiros exons não traduzidos que são alternativamente transcritos. A região promotora é formada por duas sequências chamadas P1 e P2, que estão localizadas a montante dos exons 1 α e 1 β , respectivamente. Múltiplas isoformas e variantes também são formadas a partir de splicing alternativo e iniciação alternativa da tradução. O rs5522 está indicado [adaptado de Viengchareun et al. (2007), DeRijk et al. (2008), Turner et al. (2010), Oakley e Cidlowski (2011)].

O GR é expresso em muitos tecidos, e no cérebro é encontrado em quase todas as áreas, entretanto, altos níveis são observados no hipocampo (Reul e de Kloet, 1985). A variante GR β é encontrada no núcleo celular e não se liga aos corticosteróides como a clássica GR α . Entretanto, quando co-expressas, a GR β funciona como uma inibidora das isoformas clássicas do GR e do MR (Bamberger et al., 1997; Oakley e Cidlowski, 2011). A GR γ se liga aos corticosteróides, mas tem uma habilidade comprometida em estimular os genes responsivos a esses hormônios (Meijsing et al., 2009). Já as funções das variantes GR-A e GR-P ainda são pouco compreendidas.

O Gene *NR3C1* é bastante polimórfico e vários SNPs têm sido testados em relação à função do eixo HHA. Um dos polimorfismos mais estudados no *NR3C1* é o rs6198, que consiste em uma substituição de uma adenina por uma guanina no nucleotídeo 3669. A mudança ocorre no primeiro A de uma sequência ATTTA, responsável pela desestabilização do RNAm da isoforma GR β . A presença do alelo G do rs6198 nesse *motif* resulta em estabilidade e em um conseqüente aumento da expressão do GR β (DeRijk et al., 2001; Oakley e Cidlowski, 2011). Clinicamente, portadores do alelo G apresentam resposta de cortisol exacerbada quando estimulados por um estressor psicossocial (*Trier Social Stress Test*, TSST) ou após o teste de supressão com o corticosteróide sintético

dexametasona, uma vez que a retroalimentação negativa é menos eficiente (Kumsta *et al.*, 2007; Kumsta *et al.*, 2008). O alelo G já foi associado com risco aumentado de transtorno depressivo maior e predomínio de sintomas de depressão no curso clínico do transtorno bipolar (Szczepankiewicz *et al.*, 2011). Além disso, um efeito de proteção do alelo G contra os episódios maníacos e hipomaníacos do transtorno bipolar foi demonstrado (Spijker *et al.*, 2009; Spijker *et al.*, 2011). Nenhum estudo de associação, até o momento, avaliou o papel do alelo G nas dependências de nicotina e de cocaína/*crack*.

Assim como o gene *NR3C1*, o gene *NR3C2* codifica múltiplas isoformas do MR (Pascual-Le Tallec e Lombes, 2005). As isoformas de *splicing* MR α e MR β , as quais são expressas em vários tecidos, podem ser geradas a partir do *splicing* alternativo dos dois primeiros exons, 1 α e 1 β , respectivamente (Zennaro *et al.*, 1997). Além disso, eventos de *splicing* na região 3' e iniciação alternativa da tradução aumentam a diversidade de proteínas codificadas pelo *NR3C2* (Pascual-Le Tallec e Lombes, 2005). Pelo menos duas variantes de tradução alternativa, MRA e MRB, com capacidade transativacional diferente (MRA > MRB), são geradas a partir do uso de diferentes códons de início da tradução (Pascual-Le Tallec *et al.*, 2004).

O controle da transcrição do *NR3C2* é regulado por dois promotores, chamados de P1 e P2, que estão localizados exatamente a montante dos dois primeiros exons alternativos (Listwak *et al.*, 1996). Experimentos *in vivo* demonstraram um padrão de utilização tecido-específico desses promotores. Enquanto P1 é ativo em órgãos alvo da aldosterona, tais como rins, cólon, coração, cérebro, pulmões, tecido adiposo e fígado, a ativação de P2 é restrita em alguns estágios do desenvolvimento (Le Menuet *et al.*, 2000). No cérebro, o MR é expresso em estruturas envolvidas na manutenção do balanço de eletrólitos, tais como o órgão vascular da lâmina terminal, amígdala medial e outras regiões periventriculares (Funder, 1993). Altos níveis do MR também são observados no hipocampo e em outras estruturas límbicas, onde esse receptor liga ao cortisol e corticosterona, além de outros corticosteróides sintéticos e progesterona (Funder, 2005).

O gene *NR3C2* também é altamente polimórfico, entretanto, poucos SNPs foram testados em relação à reatividade do eixo HHA. Dentre esses, destaca-se o rs5522 (I180V), caracterizado por uma troca de uma citosina por uma timina no códon 180, o que resulta na mudança do aminoácido Isoleucina para Valina (DeRijk *et al.*, 2006; DeRijk, 2009). Ensaios *in vitro* já demonstraram que o alelo Val gera mudanças na atividade transativacional do MR quando o cortisol ou a dexametasona são usados como ligantes

(Arai *et al.*, 2003; DeRijk *et al.*, 2006; van Leeuwen *et al.*, 2010). Além disso, associações com mudanças nos níveis de cortisol plasmático e salivar e na supressão do eixo HHA estimulada pela dexametasona também já foram relatadas (DeRijk *et al.*, 2006; van Leeuwen *et al.*, 2009). Diferentes respostas ao TSST e TICS (*Trier Inventory for the Assessment of Chronic Stress*) foram encontradas por van Leeuwen *et al.* (2010), entretanto, Bouma *et al.* (2011) não obtiveram os mesmos resultados. O rs5522 já foi associado com valores elevados em uma escala geriátrica de depressão (Kuningas *et al.*, 2007) e com a gravidade dos sintomas do transtorno de déficit de atenção e hiperatividade persistente (TDAH) (Kortmann *et al.*, 2012). Em relação ao TUS, somente uma associação nominal do alelo Val com maior número de cigarros fumados por dia foi encontrada em um GWAS (Berrettini *et al.*, 2008).

1.5 Herdabilidade Perdida, TUS e Interações Gene-Gene

Muitos genes foram relacionados com o TUS a partir dos GWAS (Bierut *et al.*, 2007; Saccone *et al.*, 2007; Drgon *et al.*, 2009; Treutlein *et al.*, 2009; Bierut *et al.*, 2010; Edenberg *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2010; Nielsen *et al.*, 2010; Thorgeirsson *et al.*, 2010; Agrawal *et al.*, 2011). Entretanto, a replicação dessas associações não acontece em alguns casos, tornando difícil o entendimento dos resultados (Ho *et al.*, 2010). Além disso, o efeito de todas as variantes já associadas com os fenótipos multifatoriais, seja ele o TUS ou qualquer outro, explica somente uma parcela da herdabilidade (McClellan e King, 2010; Lander, 2011). Dessa forma, há uma contribuição genética remanescente ainda não descoberta, que tem sido chamada de ‘herdabilidade perdida’ (Manolio *et al.*, 2009). Algumas explicações para esse fenômeno vêm sendo propostas na literatura, incluindo a possibilidade de múltiplas interações entre os *loci* e interações gene-ambiente (Manolio *et al.*, 2009; Zuk *et al.*, 2012).

Embora o papel das interações genéticas nos fenótipos complexos seja reconhecido, elas vêm sendo negligenciadas na prática (Carlborg e Haley, 2004). A grande maioria dos GWAS e dos estudos de associação do tipo gene candidato testa as variações genéticas de forma isolada, tornando os efeitos epistáticos não detectáveis (Cordell, 2009). Além disso, a diferença entre interações estatísticas e biológicas é motivo de confusão na literatura. Muitos pesquisadores desconhecem que ‘interação estatística’ se refere à necessidade de incluir um termo de interação em um modelo estatístico para melhorar a qualidade do ajuste (Ahlbom e Alfredsson, 2005). Entretanto, as interações estatísticas são necessárias

na avaliação das ‘interações biológicas’, as quais devem ser formuladas a partir de conhecimento prévio com o intuito de reduzir eventuais falso-positivos.

Sob a perspectiva das interações gene-gene guiadas por hipóteses, nosso grupo publicou recentemente um artigo que demonstrou o efeito de uma interação entre os genes que codificam os receptores de dopamina D2 e D4 sobre a dependência de álcool (Mota *et al.*, 2012). A hipótese foi gerada a partir de estudos bioquímicos que confirmaram diferentes padrões de heterodimerização desses receptores de acordo com a presença de variantes proteicas geradas a partir de polimorfismos frequentemente avaliados em fenótipos psiquiátricos (Borroto-Escuela *et al.*, 2011; Gonzalez *et al.*, 2012).

No caso do sistema de estresse, o modo de atuação interdependente do GR e do MR reforça potenciais interações gene-gene. A hipótese de um balanço MR/GR vem sendo proposta na literatura devido ao fato de que esses receptores precisam obrigatoriamente atuar juntos na organização de todas as etapas da reação de estresse (Oitzl *et al.*, 2010). Dessa forma, uma operação inadequada tanto do MR quanto do GR poderia comprometer a resposta aos estressores, aumentando o risco de desenvolvimento de doenças relacionadas ao estresse (Joels *et al.*, 2008). Sob o ponto de vista bioquímico, a ideia do balanço MR/GR fica ainda mais forte. A interação dos corticosteróides com o MR e GR resulta em dimerização e mudanças conformacionais que aumentam a interação desses receptores com sequências específicas do DNA (Schoneveld *et al.*, 2004). O processo de dimerização pode resultar em dímeros MR/MR, GR/GR e MR/GR, os quais apresentam capacidades distintas de transativação (Trapp *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1995; Savory *et al.*, 2001). Além disso, o padrão pode ser modificado pela presença ou ausência do GR β , que atua como um inibidor das isoformas clássicas do MR e do GR (Bamberger *et al.*, 1997; Oakley e Cidlowski, 2011). De qualquer forma, nenhum estudo genético de associação testou potenciais interações entre os genes *NR3C2* e *NR3C1* sobre o TUS ou qualquer outro fenótipo psiquiátrico.

Capítulo II
JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

2.1 Justificativa

As dependências de nicotina e cocaína/*crack* apresentam altas taxas de prevalência. Como já mencionado anteriormente, há um grande número de evidências que colocam o estresse como um mecanismo chave no desenvolvimento desses transtornos. Alterações na liberação de CRH, ACTH e cortisol geradas por hiper ou hipo-reatividade do eixo HHA parecem ter um papel fundamental tanto na iniciação, quanto na manutenção e recaída ao uso de substâncias, incluindo a nicotina e a cocaína/*crack*. Além disso, o funcionamento do eixo HHA pode ser diferente em cada indivíduo devido às variantes genéticas dos genes que codificam as proteínas envolvidas nesse neurocircuito. Sendo assim, são necessárias investigações que tentem compreender o papel do estresse na neurobiologia do TUS, considerando polimorfismos com efeito funcional conhecido.

A grande maioria dos trabalhos de genética do TUS traz resultados envolvendo genes relacionados com neurotransmissores, incluindo dopamina, noradrenalina, serotonina e acetilcolina. Entretanto, nenhum estudo de associação do tipo gene candidato incluiu variações nos genes que codificam o MR e o GR e tampouco buscou testar interações gene-gene e gene-ambiente. O MR e o GR são duas proteínas chave na cascata de eventos necessária para o restabelecimento da homeostase após o contato com um agente estressor, seja ele de origem fisiológica, psicológica ou farmacológica. Além disso, os estudos de interações entre genes que codificam proteínas que interagem fisicamente e atuam de forma coordenada, tais como o MR e o GR, podem ajudar no entendimento da herdabilidade perdida das dependências de nicotina e cocaína/*crack*.

Dessa forma, a avaliação das variantes genéticas funcionais do eixo HHA pode ajudar a explorar melhor o papel do estresse nas dependências de nicotina e cocaína/*crack*, tornando possível uma compreensão maior dos mecanismos etiológicos envolvidos nesses transtornos. Como a gravidade da dependência e a intensidade do *craving* são relacionadas com taxas de recaída dos pacientes com TUS, faz-se necessário entender os fatores que exacerbam essas condições clínicas. No futuro, a aplicação desse conhecimento em triagens de rotina poderá identificar os pacientes que estão em risco mais elevado de iniciação ao uso da substância ou recaída, contribuindo com medidas de intervenção personalizadas de acordo com o genótipo.

2.2 Objetivo Geral

Analisar a possível associação entre polimorfismos funcionais em genes relacionados com o eixo HHA e as dependências de nicotina e *crack*, com a finalidade de explorar o papel do estresse no TUS.

2.3 Objetivos Específicos

- I. Avaliar o papel dos SNPs rs5522 e rs6198 dos genes *NR3C2* (MR) e *NR3C1* (GR), respectivamente, sobre a suscetibilidade ao tabagismo, bem como o efeito dessas variantes em parâmetros relacionados com a gravidade da dependência.
- II. Avaliar o efeito dos SNPs citados acima sobre parâmetros clínicos relacionados com a gravidade da dependência de *crack* em uma amostra de mulheres acompanhadas durante os 21 dias do tratamento de desintoxicação.
- III. Testar o impacto de interações gene-gene (*NR3C2-NR3C1*) sobre a suscetibilidade ao tabagismo, bem como de interações gene-gene e gene-ambiente (trauma na infância) sobre parâmetros clínicos relacionados com a gravidade da dependência de *crack*.

Capítulo III

ARTIGO #1

ACEITO – Frontiers in Human Neuroscience

General Commentary

Approaching ‘phantom heritability’ in psychiatry by hypothesis-driven gene-gene interactions

Diego Luiz Rovaris¹, Nina Roth Mota¹, Sidia Maria Callegari-Jacques^{1,2} and Claiton Henrique Dotto Bau¹

Author affiliations:

1. Department of Genetics, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil
2. Department of Statistics, Instituto de Matemática, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Correspondence to:

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

Email: claiton.bau@ufrgs.br

The so called ‘phantom heritability’ has been haunting the scientific community for quite some time and it is now subject of intense debate. Zuk et al (1) acknowledged that even if we identify all the genetic variants related to any trait, full understanding of its heritability will not be conquered if we do not face up to the epistatic effects. The authors pointed out that when estimating the explained additive heritability, obtained by $\pi_{\text{explained}} = \text{additive } h^2_{\text{known}} / \text{additive } h^2_{\text{all}}$, the denominator is estimated indirectly from phenotypic correlations in a population (apparent heritability, h^2_{pop}). In this sense, the ‘missing heritability’ ($1 - \pi_{\text{explained}}$) is calculated by assuming that $h^2_{\text{all}} = h^2_{\text{pop}}$. However, for traits with genetic and/or gene-environment interactions (which applies to practically all psychiatric phenotypes), h^2_{pop} significantly exceeds h^2_{all} . In this case, even when all variants that contribute to the phenotype are identified, the missing heritability will not be zero and will converge to $1 - h^2_{\text{all}}/h^2_{\text{pop}}$, phenomenon called ‘phantom heritability’.

The role of gene-gene interactions in several psychiatric phenotypes is well recognized, but the biological underpinnings of this concept have not been sufficiently discussed. We suggest that a major limitation involves the lack of data-driven hypotheses for the study of such epistatic effects. While hypothesis-free whole genome epistatic analyses would require an unrealistic sample size, hypothesis-driven gene-gene interaction studies require a reduced number of multiple tests and might help reducing the ‘phantom heritability’.

Several statistical methods for accessing epistatic effects in genome-wide association studies (GWAS) have been created or improved in the last years (2-7), but they still fail to provide biological interpretation. One option for this problem is to only test interactions with biological plausibility by implementing semi-exhaustive approaches in GWAS using experimental knowledge of biological networks. By applying this method to the Wellcome Trust Case-Control Consortium data sets, Emily et al (8) reduced the number of SNPs pairs inserted in the analysis (1.25×10^{11} to 3.5×10^6) and reported a significant case of epistasis between *PDGFR-B* and *KITLG* genes in susceptibility to bipolar disorder. However, this finding was not replicated yet and it is not supported by experimental data.

On the other hand, *in vitro* and *in vivo* experimental assays, as well as protein modeling and bioinformatic analyses of protein-protein interface are exciting sources of plausible hypothesis for the study of gene-gene interactions in candidate gene association studies. Excellent examples are given by González et al (9) and Borroto-Escuela et al (10).

These authors evaluated the heteromerization patterns between two dopamine receptors (DRD2 and DRD4) according to their different isoforms and were able to show that common variants may modulate this process. Based on these data, Mota et al (11) have demonstrated, in two independent samples, a significant epistatic effect on the susceptibility of alcohol dependence that may likely reflect the different heteromerization patterns previously described. Similarly, mineralocorticoid and glucocorticoid receptors (MR and GR) are physically interacting proteins with well characterized functional polymorphisms in their coding genes (*NR3C2* and *NR3C1*, respectively). A MR-GR epistatic effect on nicotine dependence susceptibility (12) is consistent with the findings of differential heteromerization according to the expression of GR-beta isoform, which is modified by the genetic variation examined.

Despite hypothesis-driven strategies being widely accepted and their advantages well recognized, few empirical studies have applied this approach to address gene-gene interactions. In an intent to clarify the extent to which this approach is neglected in psychiatric genetic studies, we conducted a search on recent MEDLINE-indexed literature (inclusion criteria are shown in Figure 1). This search was designed to sample relevant psychiatric phenotypes and was limited to the last 5 years, period where both GWAS data and functional evidence on genetic polymorphisms became widely available. Although thousands of molecular genetics studies on psychiatric disorders have been published, only 80 gene-gene interaction reports were eligible for analyses according to our inclusion criteria. From the selected 80 studies, 29 (~36%) tested interactions from *a priori* hypotheses and 8 (10%) used data on protein-protein physical interactions (Figure 1). These results suggest that hypothesis-driven gene-gene interaction studies remain a somewhat neglected in psychiatric genetic studies, despite their well recognized potential to increase the explained heritability of psychiatric traits.

The evaluation of hypothesis-driven gene-gene interactions in candidate gene association studies is a novel approach that should be increasingly pursued in neuroscience and psychiatric genetic studies. In this sense, this line of research could even help in the development and improvement of techniques (machine learning methods, for example) to be applied in GWAS analyses of gene-gene interactions. Some approaches have recently been implemented with this objective in cancer biology and cardiology (13-14). Interrelationships of computational statistics and modern molecular biology could help narrow the gap between ‘missing’ and ‘phantom’ heritabilities in psychiatric genetics.

Conflict of Interest

The authors have no biomedical financial interests or potential conflicts of interest to declare.

Acknowledgments

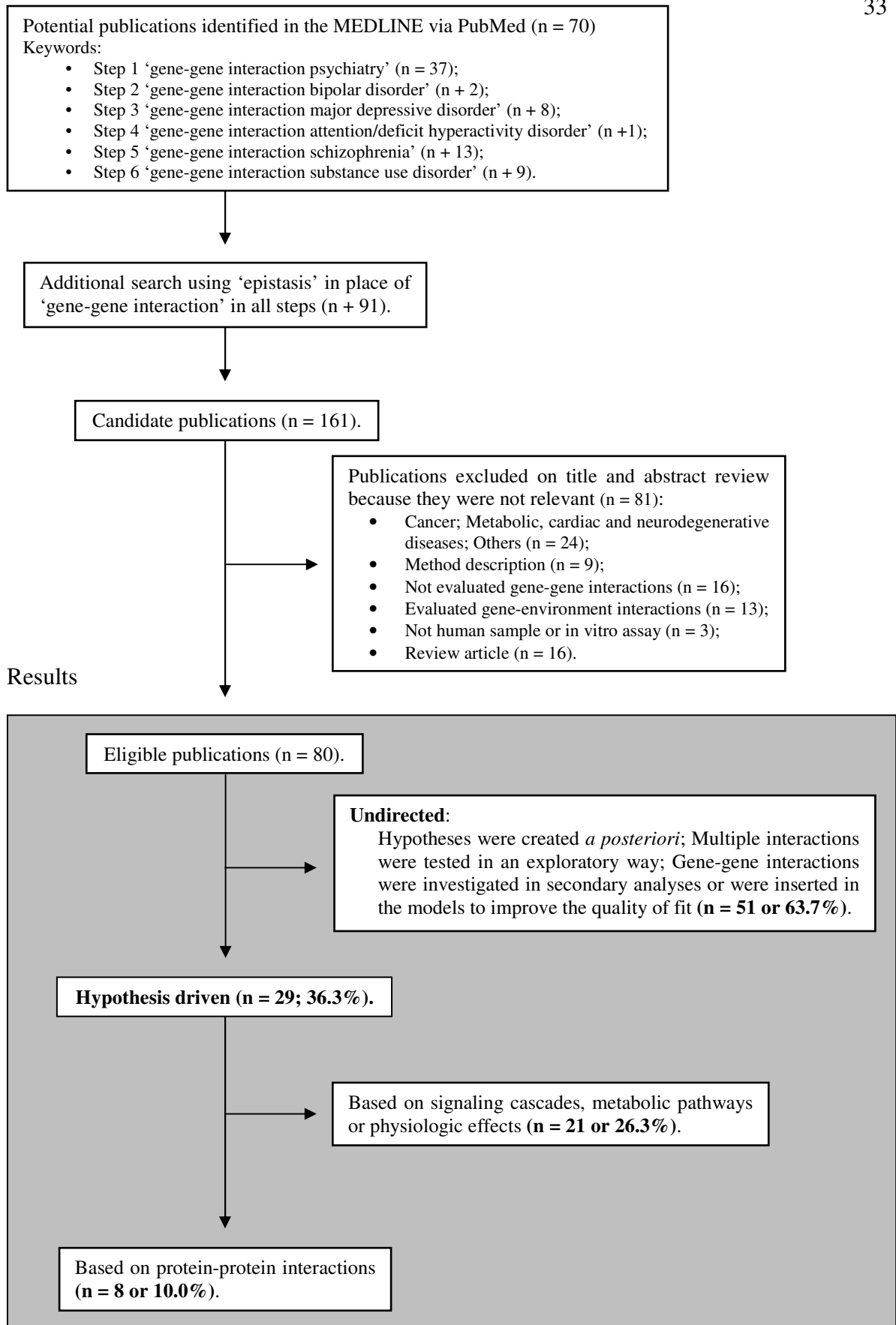
This work was supported by the following funding sources: CNPq, CAPES and FAPERGS-DECIT-PPSUS.

References

1. Zuk, O., Hechter, E., Sunyaev, S.R. & Lander, E.S. The mystery of missing heritability: Genetic interactions create phantom heritability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 1193-8 (2012).
2. Cowper-Salari, R., Cole, M.D., Karagas, M.R., Lupien, M. & Moore, J.H. Layers of epistasis: genome-wide regulatory networks and network approaches to genome-wide association studies. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 3, 513-26 (2011).
3. Gyenesei, A. et al. BiForce Toolbox: powerful high-throughput computational analysis of gene-gene interactions in genome-wide association studies. *Nucleic Acids Res* 40, W628-32 (2012).
4. Ma, L., Clark, A.G. & Keinan, A. Gene-based testing of interactions in association studies of quantitative traits. *PLoS Genet* 9, e1003321 (2013).
5. Pandey, A. et al. Epistasis network centrality analysis yields pathway replication across two GWAS cohorts for bipolar disorder. *Transl Psychiatry* 2, e154 (2012).
6. Pendergrass, S.A. et al. Next-generation analysis of cataracts: determining knowledge driven gene-gene interactions using biofilter, and gene-environment interactions using the phenx toolkit. *Pac Symp Biocomput*, 147-58 (2013).
7. Piriyaongsa, J. et al. iLOCi: a SNP interaction prioritization technique for detecting epistasis in genome-wide association studies. *BMC Genomics* 13 Suppl 7, S2 (2012).
8. Emily, M., Mailund, T., Hein, J., Schauer, L. & Schierup, M.H. Using biological networks to search for interacting loci in genome-wide association studies. *Eur J Hum Genet* 17, 1231-40 (2009).
9. Gonzalez, S. et al. Dopamine D4 receptor, but not the ADHD-associated D4.7 variant, forms functional heteromers with the dopamine D2S receptor in the brain. *Mol Psychiatry* 17, 650-62 (2012).
10. Borroto-Escuela, D.O. et al. Dopamine D2 and D4 receptor heteromerization and its allosteric receptor-receptor interactions. *Biochem Biophys Res Commun* 404, 928-34 (2011).
11. Mota, N.R. et al. DRD2/DRD4 heteromerization may influence genetic susceptibility to alcohol dependence. *Mol Psychiatry* 18, 401-402 (2013).

12. Rovaris, D.L. et al. MR and GR functional SNPs may modulate tobacco smoking susceptibility. *Journal of Neural Transmission* (2013). In Press, DOI: 10.1007/s00702-013-1012-2
13. Andrew AS, Hu T, Gu J, Gui J et al. HSD3Band Gene-Gene Interactions in a Pathway-Based Analysis of Genetic Susceptibility to Bladder Cancer. *PLoS One* 7, e51301 (2012).
14. Ma L, Brautbar A, Boerwinkle E, Sing CF *et al.* Knowledge-Driven Analysis Identifies a Gene–Gene Interaction Affecting High-Density Lipoprotein Cholesterol Levels in Multi-Ethnic Populations. *PLoS Genet* 8, e1002714 (2012).

Figure 1 – Selection of studies included in the review. The limits were: Publication in the last five years (published until January, 2013), humans, English language, full text available and MEDLINE. The list of included articles is available upon request.



Capítulo IV

ARTIGO #2

ACEITO – Journal of Neural Transmission

Dr. Andrea Pillmann

Editor, Journal of Neural Transmission

Ref.: Ms. JNT-D-13-00004

MR and GR functional SNPs may modulate tobacco smoking susceptibility

Dear Dr. Pillmann,

Please find attached the revised version of the above-indicated manuscript. We think that the manuscript has significantly improved after addressing the reviewers' comments and suggestions in this revision. Please let me know if any further modification is needed.

Sincerely yours,

Claiton H. D. Bau

Department of Genetics

Instituto de Biociências, UFRGS

91501-970 Porto Alegre, RS

Brazil

(55 51) 3308-6718

claiton.bau@ufrgs.br

Ref.: Ms. No. JNT-D-13-00004

MR and GR functional SNPs may modulate tobacco smoking susceptibility

Journal of Neural Transmission

REVIEWER #1:

Reviewer's comment

Which interviews had been used to assess the presence of the most common psychiatric comorbidities? Since the authors speculate on the influence of the Val allele of rs5522 in respect to ADHD and smoking behavior, it would be specifically important to point out how ADHD symptoms were assessed in their study sample.

Authors' answer

Thanks. We have now included more detailed information on the diagnostic process in the Sample heading - Methods section - pages 4 and 5.

Reviewer's comment

How does the never-smoking status influence the power of the analyses? The authors might like to discuss that never-smokers include a certain percentage of smoking susceptible subjects.

Authors' answer

We have now added to the Discussion section (page 9) this issue as a limitation of our study. We also point out that the latest survey on the smoking situation in Brazil (National Cancer Institute, 2011) showed that 80% of smokers start smoking behavior before 20 years old. As the average age of our group of never-smokers was 28 years old, we consider unlikely that these individuals represent a substantial fraction within this group.

Reviewer's comment

Multiple testing should be discussed.

Authors' answer

In the revised version of the manuscript we have added this discussion in the paragraph on study limitations - page 9.

Reviewer's comment

According to the author's knowledge, no association studies on smoking behavior and SNPs in the NR3C1 gene are available. I would like to point out two studies, published in 2009 and in 2007, both reporting on smoking behavior and association analysis of a single nucleotide polymorphism in the NR3C1 gene (Siiskonen et al., Addict Biol 2009. 14:349-355; Rogausch et al., Addict Biol 2007. 12:93-99).

Authors' answer

Thanks for your observation. Indeed, we did not identify these articles in our PubMed and SNP bank search, probably because the SNP nomenclature was different (instead of rs number, the authors only used the name of restriction enzyme: BclI). These studies are now mentioned in the third paragraph of Introduction section – page 4.

Reviewer's comment

Discussion, second paragraph, last sentence ("Nicotine has been established as an agent that directly affects...."): This sentence needs to be put in context, otherwise it should be deleted.

Authors' answer

This sentence was modified.

Reviewer's comment

Discussion, fourth paragraph, fourth sentence ("Our findings point to a protective effect of NR3C1...."): Please replace "consistently" with "consistent"

Authors' answer

This typo was corrected.

REVIEWER #2:

Reviewer's comment

In the laboratory methods section, assay IDs should be listed.

Authors' answer

The IDs were now listed.

Reviewer's comment

In the discussion authors refer to power estimates; how has the power been estimated, i.e. using which software and what were the settings for calculation (assumed effect size, etc.)?

Authors' answer

All these statistics are presented in the MANOVA/MANCOVA output of SPSS package. This was clarified in the fifth paragraph of Discussion section – page 9. The multivariate general linear model provides the ‘observed power’ which by rule of thumb should be equal or greater than 0.80 to accept with confidence that the chance of Type II error is low enough for a finding of non-significance by the F test.

Reviewer's comment

Abbreviations in all tables should be detailed in the legend.

Authors' answer

Abbreviations have now been detailed.

Reviewer's comment

Authors found a significant main effect of rs5522 on smoking but not for cigarettes per day; conversely, the latter was associated with rs6198, but this SNP does not show an association with smoking. This discordance should be outlined in the discussion.

Authors' answer

We agree that these findings are somewhat hard to interpret, but we still think that they are plausible. The association found by Berrettini et al (2008) with number of cigarettes smoked per day could indeed reflect a dimensional variable underlying nicotine dependence. Since their sample size was powerful (~7500 individuals), they probably could capture an effect that in our smaller sample only appeared with the stronger biological difference between smokers and never smokers. In addition, never-smokers were not included in the study of Berrettini et al, making impossible to rule out the possibility that they could find an association with smoking susceptibility.

Reviewer's comment

The authors discuss their results as partial replication of the nominal GWAS finding of Berrettini et al. 2008 (rs5522 associated with cigarettes per day); due to reasons outlined in point 4, calling this only a "partial replication" is more than justified. Although the authors described their results correctly, the deeper meaning may not be clear to the statistical layman: SNP associations from main effects come from a subsample that contains only "no-risk" genotypes of the other SNP; when in turn a contingency table for each SNP is derived from table 3, it becomes obvious, that there is no SNP association in the total sample at all. The main effect subset issue needs to be mentioned in the text to enable a more realistic interpretation by the reader.

Authors' answer

Thanks for your observation. The interpretation of main effects in the presence of interaction is confusing in many papers that used binary logistic regression. We think that our presentation of results was not clear and therefore we modified the section and excluded Table 3 to avoid misinterpretation. Indeed, there is no individual SNP association in the total sample, probably due the epistatic effect. We now demonstrated the (non significant) main effects in the total sample in Table 2. We have also rewritten the first paragraph of Discussion section.

Reviewer's comment

The number of examined smokers in table 4 is sums up to 102. The smoking sample subset should however contain 113 individuals. Why were 11 persons excluded?

Authors' answer

These individuals did not answer all the FTND questions and for this reason are missing in this analysis. The correct sample size was informed at the bottom of Table 3.

Original Article

MR and GR functional SNPs may modulate tobacco smoking susceptibility

Diego L. Rovaris¹, Nina R. Mota¹, Lucas A. de Azeredo¹, Renata B. Cupertino¹, Guilherme P. Bertuzzi¹, Evelise R. Polina¹, Verônica Contini³, Gustavo L. Kortmann¹, Eduardo S. Vitola², Eugenio H. Grevet², Rodrigo Grassi-Oliveira⁴, Sidia M. Callegari-Jacques^{1,5}, Claiton H. D. Bau¹.

Author affiliations:

1. Department of Genetics, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil
2. ADHD Outpatient Program, Adult Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil
3. National Institute of Developmental Psychiatry for Children and Adolescents, Brazil
4. Centre for Traumatic Stress Studies and Research (NEPTE), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brazil
5. Department of Statistics, Instituto de Matemática, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Correspondence to:

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

Email: claiton.bau@ufrgs.br

Acknowledgments

This work was supported by the following funding sources: CNPq, CAPES and FAPERGS-DECIT-PPSUS. We are thankful to Prof. Paulo Belmonte-de-Abreu and Prof. Luis A. Rohde for providing administrative support in the Psychiatry Service of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Conflict of interest

The authors have no biomedical financial interests or potential conflicts of interest to declare.

Abstract

A number of studies have demonstrated that stress is involved in all aspects of smoking behavior, including initiation, maintenance and relapse. The mineralocorticoid (MR) and glucocorticoid (GR) receptors are expressed in several brain areas and play a key role in negative feedback of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis. As nicotine increases the activation of the HPA axis, we wondered if functional SNPs (single nucleotide polymorphisms) in MR and GR coding genes (*NR3C2* rs5522 and *NR3C1* rs6198, respectively) may be involved in smoking susceptibility. The sample included 627 volunteers, of which 514 were never-smokers and 113 lifetime smokers. We report an interaction effect between rs5522 and rs6198 SNPs. The odds ratio (OR) for the presence of the *NR3C2* rs5522 Val allele in *NR3C1* rs6198 G carriers was 0.18 ($P = 0.007$), while in rs6198 G noncarriers the OR was 1.83 ($P = 0.027$). We also found main effects of the *NR3C1* rs6198 G allele on number of cigarettes smoked per day ($P = 0.027$) and in total score of the Fagerström Test for Nicotine Dependence ($P = 0.007$). These findings are consistent with a possible link between *NR3C2* and *NR3C1* polymorphisms and smoking behavior and provide a first partial replication for a nominally significant GWAS finding between *NR3C2* and tobacco smoking.

Keywords

Smoking; stress; mineralocorticoid receptor; glucocorticoid receptor; gene-gene interaction.

Introduction

Preclinical and neuroimaging studies showing that cortisol increases the release of dopamine in mesocorticolimbic pathways are consistent with a relationship between stress and addiction (Oswald et al. 2005; Sinha 2008; Wand et al. 2007). Although cortisol release is a way for the body to protect itself from a perceived stressor, prolonged or inappropriate exposure to this hormone may be a risk factor for several diseases, including substance use disorders (DeRijk 2009; Joels et al. 2008; Richards et al. 2011). In the case of tobacco smoking, acute and chronic stress are related with multiple stages of addiction including initiation (Wills et al. 2002), maintenance (McEwen et al. 2008) and relapse (al'Absi et al. 2005; Falba et al. 2005). It is well recognized that nicotine stimulates secretion of corticosteroids in a dose-dependent manner (Bruijnzeel 2012; Lutfy et al. 2012; Mendelson et al. 2005), but results of the association between smoking status and cortisol levels have been discrepant (Gilbert et al. 1992; Kirschbaum et al. 1992; Mendelson et al. 2005; Mendelson et al. 2008; Steptoe and Ussher 2006; Wilkins et al. 1982; Winternitz and Quillen 1977).

High levels of cortisol induce negative feedback in the brain by the activation of both mineralocorticoid (MR) and glucocorticoid receptors (GR). The MR and GR coding genes (*NR3C2* and *NR3C1*, respectively) are expressed in several brain areas and some of their single nucleotide polymorphisms (SNPs) have been intensively studied in relation to the HPA axis reactivity. One of the most studied SNP in the *NR3C2* gene is a G→A substitution in the second exon, which results in an amino acid change (Ile180Val; rs5522). The Val allele has been associated to lower efficiency in using cortisol as ligand (Arai et al. 2003; DeRijk et al. 2006; van Leeuwen et al. 2011) and increased salivary and plasma cortisol responses to a psychosocial stressor and dexamethasone suppression test (DeRijk et al. 2006; van Leeuwen et al. 2010). A nominal association between the Val allele and the number of smoked cigarettes per day was found through genome-wide association study (GWAS) (Berrettini et al. 2008).

GRs are expressed in two main isoforms, GR α and GR β , generated by alternative splicing of the *NR3C1* gene. The *NR3C1* rs6198 (A→G) is a well studied SNP that alters the rates of GR α /GR β expression, where G allele favors the expression of the GR β isoform. The GR β is unable to bind cortisol and acts as a dominant negative inhibitor of the classic GR α isoform (DeRijk et al. 2001; Oakley and Cidlowski 2011). G allele carriers

have shown significant higher cortisol responses following the psychological stressor and dexamethasone suppression test (Kumsta et al. 2007, 2008) and an association with major depressive disorder has already been demonstrated (Szczepankiewicz et al. 2011). However, as far as we know, no genetic association studies on smoking behaviors included the *NR3C1* rs6198 SNP. An association of another *NR3C1* SNP (rs41423247 - BclII) with susceptibility to nicotine dependence and heavy smoking was reported (Rogausch et al. 2007), but not replicated in a subsequent study (Siiskonen et al. 2009).

Taking into account the links between HPA axis and tobacco smoking and the evidence that the *NR3C2* rs5522 and the *NR3C1* rs6198 SNPs influence HPA axis reactivity, we hypothesized that these variants could play a significant role on smoking susceptibility. We also attempted to replicate the previous nominally significant association between rs5522 in smoking behavior found in a GWAS (Berrettini et al. 2008).

Methods

Sample

A total of 627 unrelated subjects (311 males) of European descent were recruited in the blood donation center of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Brazil. A protocol assessing sociodemographic data was applied for all subjects enrolled in this study. Attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) was evaluated with the Adult ADHD Self-Report Scale screener - ASRS-v1.1 (Kessler et al. 2005) and other psychiatric diagnoses with the Structured Clinical Interview for DSM-IV screening module - SCID-I/P for the Axis I psychiatric disorders (First et al. 2002). Since our group has several studies on the genetics of ADHD among adults (e.g. Contini et al. 2012), this sample was collected to be a control group for those studies and therefore ADHD diagnosis is an exclusion criteria, in addition to non-European descent.

The criterion for lifetime smoking was current or past daily use of tobacco for at least 1 month. Daily smoking is strongly related to nicotine dependence, since it usually starts when dependence is already established (Mayhew et al. 2000; Polina et al. 2009; Wellman et al. 2004). The Fagerström Test for Nicotine Dependence (FTND) that is widely used to evaluate the severity of nicotine dependence was applied. 113 participants were classified as lifetime smokers and 514 as never-smokers. All participants signed an informed consent approved by the Ethics Committee of the HCPA.

Laboratory methods

DNA was extracted from peripheral blood by the salting out method (Lahiri and Nurnberger 1991). The *NR3C2* rs5522 and *NR3C1* rs6198 SNPs (also known as Ile180Val and A3669G, respectively) were genotyped using the TaqMan SNP genotyping assays (C_12007869_20 and C_8951023_10, respectively) according to the manufacturer's recommended protocol (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Statistical analysis

Binary logistic regression was used to evaluate the effect of the presence of *NR3C2* rs5522 Val and *NR3C1* rs6198 G alleles on the susceptibility to tobacco smoking, considering also confounding effects. Categorical variables (such as gender, generalized anxiety disorder and major depression disorder) were tested through stratified analyses using the Mantel-Haenszel method. A confounding effect was considered when the difference between the $OR_{\text{Mantel-Haenszel}}$ and crude OR was greater than 20%. Interaction terms between independent categorical variables were incorporated in the logistic regression model if the P-value for homogeneity of ORs was less than 0.2 in the Mantel-Haenszel analyses. For continuous variables (such as age and years of schooling) the Mann-Whitney test was used and a P-value of 0.2 was established and utilized as threshold for inclusion as covariate in the model (association with the outcome and SNPs).

A multivariate analysis of covariance (MANCOVA) was used to test the SNPs influence on smoking severity, as measured by the number of smoked cigarettes per day and FTND score. A P-value ≤ 0.05 was considered statistically significant on two-tailed testing for all analyses.

Results

Genotypic, psychiatric and socio-demographic characteristics of the sample are presented in Table 1. The genotype distribution of SNPs was compatible with Hardy-Weinberg expectations and similar to those previously reported for other European or European-derived samples (Bouma et al. 2011; Klok et al. 2011).

The binary logistic regression tested the main effects of the *NR3C2* rs5522 and *NR3C1* rs6198 SNPs and an interaction term between them (test of homogeneity of the ORs, $P < 0.05$). Age was included in the models, but years of schooling, gender,

generalized anxiety disorder and major depression disorder did not reach the confounding effect threshold. Gender-SNP interaction terms were not included in the logistic regression since there was no significant heterogeneity of ORs ($P > 0.3$) in the stratified Mantel-Haenszel analyses.

The logistic regression (Table 2) revealed a significant interaction effect between the risk alleles of the *NR3C2* rs5522 and *NR3C1* rs6198 SNPs (Table 2). The presence of the *NR3C2* rs5522 Val allele in *NR3C1* rs6198 G carriers was associated with protection against tobacco smoking (OR = 0.18; 95% CI: 0.05-0.63; $P = 0.007$), while the presence of the *NR3C2* rs5522 Val allele in *NR3C1* rs6198 G noncarriers conferred risk to smoking (OR = 1.83; 95% CI: 1.07-3.15; $P = 0.027$). A risk trend was found for the presence of the *NR3C1* rs6198 G allele in *NR3C2* rs5522 Val noncarriers (OR = 1.61; 95% CI: 0.96-2.68; $P = 0.070$). In the total sample, no main effects of both rs5522 and rs6198 were detected (Table 2).

The MANCOVA analysis indicated that *NR3C1* rs6198 G allele carriers present a higher number of smoked cigarettes per day ($P = 0.024$) and a higher FTND score ($P = 0.007$) when compared to A homozygotes (Table 3). Since the FTND score distribution does not resemble a normal curve, a Mann-Whitney test was employed to confirm this effect ($Z = -2.58$; $P = 0.010$).

Discussion

The results of this study are in agreement with a role of HPA axis variation on lifetime smoking. A new and interesting finding was the interaction effect between the *NR3C2* and *NR3C1* genes. In addition, the G allele of *NR3C1* rs6198 was associated with severity of nicotine dependence. Although these SNPs have been consistently associated with psychiatric phenotypes (Fortier et al. 2012; Klok et al. 2011; Kortmann et al. 2012; Kuningas et al. 2007; Spijker et al. 2009; Spijker et al. 2011; Szczepankiewicz et al. 2011), there is only one previous nominal association signal between *NR3C2* rs5522 and smoking behavior (Berrettini et al. 2008).

Other psychiatric genetic findings should be considered in the interpretation of the role of *NR3C2* rs5522 and tobacco smoking. Carriers of the Val allele with ADHD demonstrated higher inattention, hyperactivity/impulsivity and impairment scores (Kortmann et al. 2012). It is well established that ADHD is a risk factor to smoking (Biederman et al. 2006; Kollins et al. 2005; Sousa et al. 2011). In this sense, our results

are suggestive of a pleiotropic effect of this polymorphism since none of the included individual had ADHD diagnoses. Additionally, Val carriers have shown reduced ability to modulate behavior as a function of reward when facing a stressor, while in no-stress conditions reward learning was enhanced (Bogdan et al. 2010). Several psychiatric phenotypes, including addiction, are characterized by reward dysfunction (Barr et al. 2008; Diekhof et al. 2008).

NR3C1 rs6198 SNP results in a remarkably well characterized functional effect (DeRijk et al. 2001; Oakley and Cidlowski 2011) and previous studies have already linked the G allele with altered cortisol response (Kumsta et al. 2007, 2008) and depression (Szczepankiewicz et al. 2011), that are risk factors to tobacco smoking (Jamal et al. 2011; Khaled et al. 2012; Richards et al. 2011). However, to our knowledge, this is the first report directly showing an association between the *NR3C1* rs6198 G allele and smoking behavior.

Our study also provided preliminary evidence for the interaction effect between two stress-response genes. At the molecular level, MR and GR may physically interact to form heteromers with distinct transactivation properties (Liu et al. 1995; Savory et al. 2001; Trapp et al. 1994). Furthermore, a MR/GR balance hypothesis suggests that inadequate operation of one of these receptors may influence the risk for stress-related diseases (Joels et al. 2008; Oitzl et al. 2010). Our findings point to a protective effect conferred by the simultaneous presence of *NR3C2* rs5522 Val and *NR3C1* rs6198 G alleles, consistent with the inhibiting effect of the GR β isoform (increased by the G allele) (Bamberger et al. 1997) over the HPA disruptive Val allele (DeRijk 2009).

Although the *NR3C2* rs5522 was nominally associated with the number of cigarettes smoked per day in a GWAS (Berrettini et al. 2008), we could partially replicate this finding only in terms of smoking status. The possibility of type 2 error cannot be discarded, since our sample size allowed for a power of only 40% in the MANCOVA analysis on severity of nicotine dependence (observed power of the general linear model output). Statistical power could also be an issue since presence of susceptible individuals in the group of never-smokers cannot be ruled out. However, the latest survey on the smoking situation in Brazil (INCA 2011) showed that 80% of smokers start smoking behavior before 20 years old. As the average age of our group of never-smokers was 28 years old, we consider unlikely that these individuals could represent a bias. In order to avoid the risk of false positive results due to multiple comparisons, we used multivariate analysis and

controlled the rate of experimental error by analyzing the number of cigarettes smoked per day and FTND scores simultaneously by MANCOVA. In addition, only a dominant genetic model was tested in the binary logistic regression analyses due the small frequency of Val/Val (rs5522) and GG (rs6198) homozygotes (~1.5%). Despite we acknowledge the limited sample size of our smoking group; we think this data should be considered for inclusion in future meta-analysis on the HPA axis genes and smoking behaviors. Another limitation of this study is that we did not evaluate ACTH and cortisol levels. Future studies might explore the relationships between SNPs related to HPA axis, cortisol response and severity of nicotine dependence.

In conclusion, several lines of evidence have addressed the association between stress and tobacco smoking, but to the best of our knowledge we are the first to demonstrate significant epistatic interaction between two stress-response genes on smoking susceptibility. These results point to the need for further studies specifically designed to clarify the suggested effects of *NR3C2* and *NR3C1* genes on addiction.

References

- al'Absi M, Hatsukami D, and Davis GL (2005) Attenuated adrenocorticotrophic responses to psychological stress are associated with early smoking relapse. *Psychopharmacology (Berl)*, 181(1), 107-117.
- Arai K, Nakagomi Y, Iketani M, Shimura Y, Amemiya S, Ohyama K et al (2003) Functional polymorphisms in the mineralocorticoid receptor and amiloride-sensitive sodium channel genes in a patient with sporadic pseudohypoaldosteronism. *Hum Genet*, 112(1), 91-97.
- Bamberger CM, Bamberger AM, Wald M, Chrousos GP, and Schulte HM (1997) Inhibition of mineralocorticoid activity by the beta-isoform of the human glucocorticoid receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 60(1-2), 43-50.
- Barr RS, Pizzagalli DA, Culhane MA, Goff DC, and Evins AE (2008) A single dose of nicotine enhances reward responsiveness in nonsmokers: implications for development of dependence. *Biol Psychiatry*, 63(11), 1061-1065.
- Berrettini W, Yuan X, Tozzi F, Song K, Francks C, Chilcoat H et al (2008) Alpha-5/alpha-3 nicotinic receptor subunit alleles increase risk for heavy smoking. *Mol Psychiatry*, 13(4), 368-373.
- Biederman J, Monuteaux MC, Mick E, Spencer T, Wilens TE, Silva JM et al (2006) Young adult outcome of attention deficit hyperactivity disorder: a controlled 10-year follow-up study. *Psychol Med*, 36(2), 167-179.
- Bogdan R, Perlis RH, Fagerness J, and Pizzagalli DA (2010) The impact of mineralocorticoid receptor ISO/VAL genotype (rs5522) and stress on reward learning. *Genes Brain Behav*, 9(6), 658-667.
- Bouma EM, Riese H, Nolte IM, Oosterom E, Verhulst FC, Ormel J et al (2011) No associations between single nucleotide polymorphisms in corticoid receptor genes and heart rate and cortisol responses to a standardized social stress test in adolescents: the TRAILS study. *Behav Genet*, 41(2), 253-261.
- Bruijnzeel AW (2012) Tobacco addiction and the dysregulation of brain stress systems. *Neurosci Biobehav Rev*, 36(5), 1418-1441.
- Contini V, Victor MM, Bertuzzi GP, Salgado CA, Picon FA, Grevet EH et al. (2012) No significant association between genetic variants in 7 candidate genes and response

- to methylphenidate treatment in adult patients with ADHD. *J Clin Psychopharmacol*, 32(6), 820-823.
- DeRijk RH (2009) Single nucleotide polymorphisms related to HPA axis reactivity. *Neuroimmunomodulation*, 16(5), 340-352.
- DeRijk RH, Schaaf MJ, Turner G, Datson NA, Vreugdenhil E, Cidlowski J et al (2001) A human glucocorticoid receptor gene variant that increases the stability of the glucocorticoid receptor beta-isoform mRNA is associated with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 28(11), 2383-2388.
- DeRijk RH, Wust S, Meijer OC, Zennaro MC, Federenko IS, Hellhammer DH et al (2006) A common polymorphism in the mineralocorticoid receptor modulates stress responsiveness. *J Clin Endocrinol Metab*, 91(12), 5083-5089.
- Diekhof EK, Falkai P, and Gruber, O. (2008) Functional neuroimaging of reward processing and decision-making: a review of aberrant motivational and affective processing in addiction and mood disorders. *Brain Res Rev*, 59(1), 164-184.
- Falba T, Teng HM, Sindelar JL, and Gallo WT (2005) The effect of involuntary job loss on smoking intensity and relapse. *Addiction*, 100(9), 1330-1339.
- First MB, Spitzer RL, Gibbon M, and Williams JBW (2002), *Structured Clinical Interview for DSM-IV-TR Axis I Disorders, Research Version, Patient Edition (SCID-I/P)* (New York: Biometrics Research, New York State Psychiatric Institute).
- Fortier ME, Sengupta SM, Grizenko N, Choudhry Z, Thakur G, and Joobar R (2012) Genetic Evidence for the Association of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) Axis with ADHD and Methylphenidate Treatment Response. *Neuromolecular Med*.
- Gilbert DG, Meliska CJ, Williams CL, and Jensen RA (1992) Subjective correlates of cigarette-smoking-induced elevations of peripheral beta-endorphin and cortisol. *Psychopharmacology (Berl)*, 106(2), 275-281.
- INCA (2011), *A situação do tabagismo no Brasil: dados dos inquéritos do Sistema Internacional de Vigilância, da Organização Mundial da Saúde, realizados no Brasil, entre 2002 e 2009 / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva* (Rio de Janeiro: INCA).
- Jamal M, Does AJ, Penninx BW, and Cuijpers P (2011) Age at smoking onset and the onset of depression and anxiety disorders. *Nicotine Tob Res*, 13(9), 809-819.

- Joels M, Karst H, DeRijk R, and de Kloet ER (2008) The coming out of the brain mineralocorticoid receptor. *Trends Neurosci*, 31(1), 1-7.
- Kessler RC, Adler L, Ames M, Demler O, Faraone S, Hiripi E et al. (2005) The World Health Organization Adult ADHD Self-Report Scale (ASRS): a short screening scale for use in the general population. *Psychol Med*, 35(2), 245-256.
- Khaled SM, Bulloch AG, Williams JV, Hill JC, Lavorato DH, and Patten SB (2012) Persistent heavy smoking as risk factor for major depression (MD) incidence--evidence from a longitudinal Canadian cohort of the National Population Health Survey. *J Psychiatr Res*, 46(4), 436-443.
- Kirschbaum C, Wust S, and Strasburger CJ (1992) 'Normal' cigarette smoking increases free cortisol in habitual smokers. *Life Sci*, 50(6), 435-442.
- Klok MD, Vreeburg SA, Penninx BW, Zitman FG, de Kloet ER, and DeRijk RH (2011) Common functional mineralocorticoid receptor polymorphisms modulate the cortisol awakening response: Interaction with SSRIs. *Psychoneuroendocrinology*, 36(4), 484-494.
- Kollins SH, McClernon FJ, and Fuemmeler BF (2005) Association between smoking and attention-deficit/hyperactivity disorder symptoms in a population-based sample of young adults. *Arch Gen Psychiatry*, 62(10), 1142-1147.
- Kortmann GL, Contini V, Bertuzzi GP, Mota NR, Rovaris DL, Paixao-Cortes VR et al (2012) The role of a mineralocorticoid receptor gene functional polymorphism in the symptom dimensions of persistent ADHD. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. May 15. [Epub ahead of print].
- Kumsta R, Entringer S, Koper JW, van Rossum EF, Hellhammer DH, and Wust S (2007) Sex specific associations between common glucocorticoid receptor gene variants and hypothalamus-pituitary-adrenal axis responses to psychosocial stress. *Biol Psychiatry*, 62(8), 863-869.
- Kumsta R, Entringer S, Koper JW, van Rossum EF, Hellhammer DH, and Wust S (2008) Glucocorticoid receptor gene polymorphisms and glucocorticoid sensitivity of subdermal blood vessels and leukocytes. *Biol Psychol*, 79(2), 179-184.
- Kuningas M, de Rijk RH, Westendorp RG, Jolles J, Slagboom PE, and van Heemst D (2007) Mental performance in old age dependent on cortisol and genetic variance in the mineralocorticoid and glucocorticoid receptors. *Neuropsychopharmacology*, 32(6), 1295-1301.

- Lahiri DK and Nurnberger JI (1991) A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res*, 19(19), 5444.
- Liu W, Wang J, Sauter NK, and Pearce D (1995) Steroid receptor heterodimerization demonstrated in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(26), 12480-12484.
- Lutfy K, Aimiwu O, Mangubat M, Shin CS, Nerio N, Gomez R et al (2012) Nicotine stimulates secretion of corticosterone via both CRH and AVP receptors. *J Neurochem*, 120(6), 1108-1116.
- Mayhew KP, Flay BR, and Mott JA (2000) Stages in the development of adolescent smoking. *Drug Alcohol Depend*, 59 Suppl 1, S61-81.
- McEwen A, West R, and McRobbie H (2008) Motives for smoking and their correlates in clients attending Stop Smoking treatment services. *Nicotine Tob Res*, 10(5), 843-850.
- Mendelson JH, Sholar MB, Goletiani N, Siegel AJ, and Mello NK (2005) Effects of low- and high-nicotine cigarette smoking on mood states and the HPA axis in men. *Neuropsychopharmacology*, 30(9), 1751-1763.
- Mendelson JH, Goletiani N, Sholar MB, Siegel AJ, and Mello NK (2008) Effects of smoking successive low- and high-nicotine cigarettes on hypothalamic-pituitary-adrenal axis hormones and mood in men. *Neuropsychopharmacology*, 33(4), 749-760.
- Oakley RH and Cidlowski JA (2011) Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids. *J Biol Chem*, 286(5), 3177-3184.
- Oitzl MS, Champagne DL, van der Veen R, and de Kloet ER (2010) Brain development under stress: hypotheses of glucocorticoid actions revisited. *Neurosci Biobehav Rev*, 34(6), 853-866.
- Oswald LM, Wong DF, McCaul M, Zhou Y, Kuwabara H, Choi L et al (2005) Relationships among ventral striatal dopamine release, cortisol secretion, and subjective responses to amphetamine. *Neuropsychopharmacology*, 30(4), 821-832.
- Polina ER, Contini V, Hutz MH, and Bau CH (2009) The serotonin 2A receptor gene in alcohol dependence and tobacco smoking. *Drug Alcohol Depend*, 101(1-2), 128-131.
- Richards JM, Stipelman BA, Bornovalova MA, Daughters SB, Sinha R, and Lejuez CW (2011) Biological mechanisms underlying the relationship between stress and

- smoking: state of the science and directions for future work. *Biol Psychol*, 88(1), 1-12.
- Rogausch A, Kochen MM, Meineke C, and Hennig J (2007) Association between the BclII glucocorticoid receptor polymorphism and smoking in a sample of patients with obstructive airway disease. *Addict Biol*, 12(1), 93-99.
- Savory JG, Prefontaine GG, Lamprecht C, Liao M, Walther RF, Lefebvre YA et al (2001) Glucocorticoid receptor homodimers and glucocorticoid-mineralocorticoid receptor heterodimers form in the cytoplasm through alternative dimerization interfaces. *Mol Cell Biol*, 21(3), 781-793.
- Siiskonen SJ, Visser LE, Tiemeier H, Hofman A, Lamberts SW, Uitterlinden AG et al. (2009) BclII glucocorticoid receptor polymorphism and smoking in the general population. *Addict Biol*, 14(3), 349-355.
- Sinha R (2008) Chronic stress, drug use, and vulnerability to addiction. *Ann N Y Acad Sci*, 1141, 105-130.
- Sousa NO, Grevet EH, Salgado CA, Silva KL, Victor MM, Karam RG et al (2011) Smoking and ADHD: an evaluation of self medication and behavioral disinhibition models based on comorbidity and personality patterns. *J Psychiatr Res*, 45(6), 829-834.
- Spijker AT, Giltay EJ, van Rossum EF, Manenshijn L, DeRijk RH, Haffmans J et al (2011) Glucocorticoid and mineralocorticoid receptor polymorphisms and clinical characteristics in bipolar disorder patients. *Psychoneuroendocrinology*, 36(10), 1460-1469.
- Spijker AT, van Rossum EF, Hoencamp E, DeRijk RH, Haffmans J, Blom M et al (2009) Functional polymorphism of the glucocorticoid receptor gene associates with mania and hypomania in bipolar disorder. *Bipolar Disord*, 11(1), 95-101.
- Stephoe A and Ussher M (2006) Smoking, cortisol and nicotine. *Int J Psychophysiol*, 59(3), 228-235.
- Szczepankiewicz A, Leszczynska-Rodziewicz A, Pawlak J, Rajewska-Rager A, Dmitrzak-Weglarz M, Wilkosc M et al (2011) Glucocorticoid receptor polymorphism is associated with major depression and predominance of depression in the course of bipolar disorder. *J Affect Disord*, 134(1-3), 138-144.

- Trapp T, Rupprecht R, Castren M, Reul JM, and Holsboer F (1994) Heterodimerization between mineralocorticoid and glucocorticoid receptor: a new principle of glucocorticoid action in the CNS. *Neuron*, 13(6), 1457-1462.
- van Leeuwen N, Kumsta R, Entringer S, de Kloet ER, Zitman FG, DeRijk RH et al (2010) Functional mineralocorticoid receptor (MR) gene variation influences the cortisol awakening response after dexamethasone. *Psychoneuroendocrinology*, 35(3), 339-349.
- van Leeuwen N, Bellingrath S, de Kloet ER, Zitman FG, DeRijk RH, Kudielka BM et al (2011) Human mineralocorticoid receptor (MR) gene haplotypes modulate MR expression and transactivation: implication for the stress response. *Psychoneuroendocrinology*, 36(5), 699-709.
- Wand GS, Oswald LM, McCaul ME, Wong DF, Johnson E, Zhou Y et al (2007) Association of amphetamine-induced striatal dopamine release and cortisol responses to psychological stress. *Neuropsychopharmacology*, 32(11), 2310-2320.
- Wellman RJ, DiFranza JR, Savageau JA, and Dussault GF (2004) Short term patterns of early smoking acquisition. *Tob Control*, 13(3), 251-257.
- Wilkins JN, Carlson HE, Van Vunakis H, Hill MA, Gritz E, and Jarvik ME (1982) Nicotine from cigarette smoking increases circulating levels of cortisol, growth hormone, and prolactin in male chronic smokers. *Psychopharmacology (Berl)*, 78(4), 305-308.
- Wills TA, Sandy JM, and Yaeger AM (2002) Stress and smoking in adolescence: a test of directional hypotheses. *Health Psychol*, 21(2), 122-130.
- Winternitz WW and Quillen D (1977) Acute hormonal response to cigarette smoking. *J Clin Pharmacol*, 17(7), 389-397.

Table 1 Characteristics of participants

	Never-smokers (<i>n</i> = 514)	Lifetime smokers (<i>n</i> = 113)	P-value
Males	253 (49.2)	58 (51.3)	0.755
Age (years)	28.5 (8.3)	32.1 (9.7)	0.001
Schooling (years)	13.3 (2.9)	12.7 (3.5)	0.158
Generalized anxiety disorder	50 (9.7)	14 (12.5)	0.161
Major depressive disorder	135 (26.3)	37 (33.0)	0.391
Minor allele and genotype frequencies			
GR rs6198			
G allele	0.162	0.168	0.070/0.224*
AA	0.707	0.714	
AG	0.247	0.249	
GG	0.046	0.037	
MR rs5522			
Val allele	0.118	0.141	0.788/0.370*
Ile/Ile	0.776	0.734	
Ile/Val	0.208	0.256	
Val/Val	0.016	0.010	

Data are mean and (standard deviation) or *n* and (%);

*P-value for Hardy-Weinberg equilibrium (never-smokers and lifetime smokers, respectively).

GR, Glucocorticoid receptor. MR, Mineralocorticoid receptor.

Table 2 Multiple logistic regression analysis of the influence of *NR3C2* (MR) and *NR3C1* (GR) polymorphisms on tobacco smoking susceptibility

	B	SE	Wald	df	OR (CI 95%)^a	P-value
Main effect of MR rs5522 in the total sample						
Ile/Ile	0	-			1	-
Ile/Val+Val/Val	0.19	0.24	0.59	1	1.20 (0.75-1.9)	0.442
Main effect of GR rs6198 in the total sample						
AA	0	-			1	-
AG+GG	0.10	0.23	0.18	1	1.10 (0.70-1.74)	0.672
rs5522-rs6198 interaction						
Presence of rs5522-Val allele in rs6198-G carriers	-1.71	0.63	7.26	1	0.18 (0.05-0.63)	0.007
Presence of rs5522-Val allele in rs6198-G noncarriers	0.61	0.28	4.87	1	1.83 (1.07-3.15)	0.027
Presence of rs6198-G allele in rs5522-Val noncarriers	0.47	0.26	3.29	1	1.61 (0.96-2.68)	0.070

^aAdjusted for age;

Hosmer and Lemeshow goodness-of-fit test, P = 0.890.

GR, Glucocorticoid Receptor. MR, Mineralocorticoid receptor. SE, standard error. df, degrees of freedom. OR, odds ratio. CI, confidence interval.

Table 3 Influence of *NR3C2* (MR) and *NR3C1* (GR) SNPs on cigarettes per day and FTND score (MANCOVA analysis)

	Cigarettes per day	F test	df	P-Value	FTND score	F test	df	P-Value
MR rs5522								
Ile/Ile (n = 76)	15.3 (1.2)	0.23	1	0.633*	2.5 (0.3)	0.05	1	0.823*
Val carriers (n = 26)	16.8 (3.0)				2.7 (0.7)			
GR rs6198								
AA (n = 73)	12.3 (1.2)	5.24	1	0.024	1.6 (0.3)	7.53	1	0.007
G carriers (n = 29)	20.0 (2.9)				3.6 (0.7)			
rs5522-rs6198 interaction								
Ile/Ile-AA (n = 50)	12.9 (1.4)	0.68	1	0.413*	1.9 (0.3)	1.33	1	0.251*
Ile/Ile-G carriers (n = 26)	17.6 (1.9)				3.1 (0.4)			
Val carriers-AA (n = 23)	11.8 (2.0)				1.3 (0.4)			
Val carriers-G carriers (n =3)	21.8 (5.7)				4.1 (1.2)			

Mean and (standard error); Age was a covariate.

*Power observed was < 0.4.

In this analysis the sample size is smaller (n = 102).

GR, Glucocorticoid Receptor. MR, Mineralocorticoid receptor. FTND, the Fagerström Test for Nicotine Dependence. df , degrees of freedom.

Capítulo V

ARTIGO #3

EM PREPARAÇÃO – British Journal of Psychiatry

Original Article

Polymorphisms related to HPA axis reactivity, childhood neglect and their interaction on crack cocaine addiction

Diego L. Rovaris¹, Guilherme P. Bertuzzi¹, Nina R. Mota¹, Sídia M. Callegari-Jacques^{1,2}, Luciano S. P. Guimarães³, Júlio Carlos Pezzi⁴, Thiago Wendt Viola⁵, Claiton H. D. Bau¹ and Rodrigo Grassi-Oliveira⁵.

Author affiliations:

1. Department of Genetics, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil
2. Department of Statistics, Instituto de Matemática, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil
3. Biostatistics Unit, Grupo de Pesquisa e Pós-graduação, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil
4. Post-Graduate Program in Health Sciences, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Brazil.
5. Centre for Traumatic Stress Studies and Research (NEPTE), Biomedical Research Institute (IPB), Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Brazil

Correspondence to:

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

Email: claiton.bau@ufrgs.br

Background

The hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and the childhood trauma seem to have a putative role on the establishment of substance use disorders. However, no genetic study evaluated gene-gene and gene-environment interactions between components of this neurocircuit and childhood maltreatment on severity and susceptibility to cocaine addiction.

Aims

To search for gene-gene and gene-environment interactions involved in crack cocaine addiction through the evaluation of functional polymorphisms related to HPA axis and childhood physical neglect.

Method

Our sample is composed by 139 crack cocaine-addicted women who completed 3 weeks of follow-up during early abstinence. Withdrawal symptoms were assessed through the Cocaine Selective Severity Assessment (CSSA) scale. Generalized estimating equation modeling and conditional logistic regression with counterfactuals were used to test gene-gene and gene-environment interactions. Functional polymorphisms within mineralocorticoid receptor (*NR3C2*) and glucocorticoid receptor (*NR3C1*) coding genes were evaluated.

Results

We found a *NR3C2-NR3C1* interaction modulating the severity of withdrawal crack cocaine symptoms ($P = 0.002$). In the Post Hoc analysis, carriers of the *NR3C2* rs5522-Val and *NR3C1* rs6198-G alleles showed lower overall severity scores when compared to other genotype groups (P -values ≤ 0.035). An interaction between the rs5522-Val allele and childhood physical neglect altered the risk to crack cocaine addiction (hazard ratio = 4.0, 95%CI: 1.7-9.2, $P = 0.001$). In the gene-gene-environment, a 'high risk' genotype group interacted weakly with physical neglect conferring risk for crack cocaine addiction (hazard ratio = 1.9, 95%CI: 0.9-3.9, $P = 0.083$).

Conclusions

These findings are consistent with the role of interactions between *NR3C2* and *NR3C1* genes and childhood neglect on crack cocaine susceptibility. It is possible that alterations in the HPA axis reactivity caused by both physical neglect and functional SNPs in genes related to stress system change the cortisol levels and, consequently, the cocaine reinforcement properties in dopaminergic pathways.

Declaration of interest

None.

Keywords

Cocaine; stress; mineralocorticoid receptor; glucocorticoid receptor; gene-gene interaction; childhood trauma.

Introduction

Crack cocaine addiction is a growing concern especially in emergent countries like Brazil (Bastos 2012; World Drug Report 2012). Considering that its prevalence increase is recent, most available research that may help its understanding originates from injected or inhaled cocaine addiction. Analyses of twin pairs have shown that the heritability of cocaine dependence is approximately 65%–79% (Kendler and Prescott 1998; Kendler et al. 2000). Environmental effects are also very relevant, being childhood neglect and poor parent-child attachment the main factors related to cocaine use during adulthood (Gerra et al. 2009b; Gerra et al. 2009a; Moran-Santa Maria et al. 2010). Childhood neglect results in alterations of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis in humans (Gerra et al. 2008; Gerra et al. 2009b) and maternal separation is related to epigenetic modifications of the glucocorticoid receptor gene in rodents (Perroud et al. 2011). Furthermore, clinical and experimental findings are consistent with the relationships between stress, cocaine use and the biology of substance use disorders. Cortisol increases the release of dopamine in mesocorticolimbic pathways (Oswald et al. 2005; Wand et al. 2007) and cocaine stimulates secretion of cortisol and corticosterone (Baumann et al. 1995; Heesch et al. 1995; Mello 2010). There is also evidence that HPA axis dysregulation modulates craving and relapse in cocaine-abstinent addicts (Brady et al. 2009; Sinha et al. 2006).

Recently, we demonstrated an interaction effect on smoking susceptibility between two functional SNPs (single nucleotide polymorphisms) from the mineralocorticoid (MR) and glucocorticoid receptor (GR) genes (Rovaris et al. 2013). The encoded receptors are transcription factors expressed in several brain areas that modulate the dopamine neurotransmission dynamics by regulating cortisol availability (Sinha 2008). MRs and GRs must necessarily act together in coordinating all steps of the stress response (Joels et al. 2008). The binding with corticosteroids (cortisol in humans and corticosterone in rodents) results in dimerization and conformational changes that increase the interaction of these receptors with DNA-responsive elements (Schoneveld et al. 2004). The dimerization process may result in MR/MR, GR/GR and MR/GR complexes, which have distinct transactivation capacities (Liu et al. 1995; Savory et al. 2001; Trapp et al. 1994). Additionally, a MR/GR balance hypothesis has been proposed (Joels et al. 2008; Oitzl et al. 2010). This theory suggests that an imbalance between MRs and GRs generated from

genetic and/or epigenetic variations would lead to an impaired stress response, increasing the susceptibility to stress-related disorders, including substance use disorders.

Within MR coding gene (*NR3C2*), rs5522 is the most studied SNP. It comprises a G/A substitution in the second exon, resulting in an isoleucine to valine change (Ile180Val). The rs5522-Val allele has been associated *in vitro* to lower efficiency in using cortisol as ligand, but not aldosterone (Arai et al. 2003; DeRijk et al. 2006). Moreover, the allele was shown to increase salivary and plasma cortisol responses to a psychosocial stressor and dexamethasone suppression test (DeRijk et al. 2006; van Leeuwen et al. 2010). The rs5522-Val allele was also linked to attention-deficit/hyperactivity disorder dimensions (Kortmann et al. 2012), depressive symptoms in geriatric patients (Kuningas et al. 2007) and altered reward learning (Bogdan et al. 2010). A nominal association of rs5522-Val allele and severity of smoking behavior was found in a genome wide association study ($P = 1.52E-05$) (Berrettini et al. 2008).

In the GR coding gene (*NR3C1*) alternative splicing near the end of the primary transcript generates two main receptor isoforms, termed GR α and GR β , which differ at their length and molecular effect (Kino et al. 2009; Lewis-Tuffin and Cidlowski 2006). The *NR3C1* rs6198 (A3669G) is a functional SNP that alters the rates of GR α /GR β expression, where the G allele favors the expression of the GR β isoform (DeRijk et al. 2001). GR β is unable to bind cortisol and acts as a dominant negative inhibitor of the classic MR and GR isoforms (Bamberger et al. 1997; Oakley and Cidlowski 2011). Previous studies have associated the rs6198-G allele with major depressive disorder (Szczepankiewicz et al. 2011) and altered cortisol response following a psychological stressor and dexamethasone suppression test (Kumsta et al. 2007; Kumsta et al. 2008). A protective effect of the rs6198-G allele on the clinical manifestation and course of bipolar disorder was also reported (Spijker et al. 2009; Spijker et al. 2011).

Taking into account the links between HPA axis, early life stress and cocaine addiction, and the evidence that *NR3C2* and *NR3C1* variants influence HPA axis reactivity, this study has three objectives. *First*: To verify the potential role of *NR3C2* rs5522 and *NR3C2* rs6198 SNPs on severity of crack cocaine withdrawal symptoms during abstinence. *Second*: To replicate in the crack cocaine sample the previous interaction between *NR3C2* rs5522 and *NR3C1* rs6198 SNPs found on tobacco smoking susceptibility (Rovaris et al. 2013). *Third*: To test interactions between childhood physical neglect and *NR3C2* and *NR3C1* SNPs in crack cocaine addiction.

Methods

Sample

This is a follow-up study (Figure 1). The sample comprised one hundred and thirty-nine crack cocaine-addicted women who were admitted at a public inpatient detoxification program in Southern Brazil. All of the participants were recruited after admission to a 3-week, locked detoxification treatment facility for female drug and alcohol abusers. These women were in a controlled abstinence situation. They had no access to alcohol, cigarettes or drugs. Benzodiazepines were not prescribed during treatment. The inclusion criteria were as follows: women aged 18 to 45 years; diagnosis of substance use disorder - physiological dependence of crack cocaine type; a minimum of four years of formal education and an absence of comorbid psychotic syndromes. Patients were excluded if they met any of the following exclusion criteria: presence of previously undetected psychotic symptoms; diagnosis of a neurologic, infectious, or metabolic disease; severe cognitive impairment resulting in alteration of the state of consciousness and psychomotor agitation; Mini-Mental State Examination (MMSE) score < 18; and use of benzodiazepines.

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

Instruments

The Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders (SCID I) was used to provide psychiatric diagnoses. The MMSE was used to screen severe cognitive impairment that could impact the understanding of the research instruments (Folstein et al. 1975). Participants who scored less than 18 were excluded; this cutoff point was chosen because it exhibited the best sensitivity among Brazilians with a low/average level of education (Bertolucci et al. 1994; Maia et al. 2006). The estimated intelligence quotient of the participants was assessed using the Wechsler Abbreviated Scale of Intelligence (WASI) Matrix Reasoning and Vocabulary subtests (Axelrod 2002).

Severity of the withdrawal symptoms were evaluated four days after admission and then two times per week of treatment using the Cocaine Selective Severity Assessment (CSSA) adapted for crack cocaine. This instrument assesses the clinical severity of the signs and symptoms of abstinence; it has been validated, and it exhibits high degrees of

internal consistency and reliability (Kampman et al. 1998). A total of 18 items are scored on a nine-centimeter visual analog scale, which correspond to the symptoms commonly reported in the literature as associated with the desire for and abstinence from cocaine. It includes questions on craving, hyper- and hypophagia, fatigue, anhedonia, anxiety, irritability, sleep disorders, lack of concentration, paranoia, desire for carbohydrates, bradycardia, and suicidal ideation.

Childhood neglect is difficult to define since there is many culturally differences regarding child-rearing practices, however it generally refers to the lack of parental care and the failure to meet children's basic needs (English, 2005). A traditional list of immediate basic needs includes food, shelter, clothing, sanitation and healthcare (Davis-Sharts, 1986). Any failure to provide such basic physical safety and security domain is defined as physical neglect (English, 2005; Bernstein et al. 2003). The presence of childhood physical neglect was investigated using the Brazilian version of the Childhood Trauma Questionnaire (CTQ) (Bernstein et al. 2003; Grassi-Oliveira et al. 2006). Participants were asked whether there was enough to eat, if their parents drinking interfered with their care, if they ever wore dirty clothes, and if there was someone to take them to healthcare during childhood. They answered the questions using a five-point Likert-type scale regarding frequency of physical neglect events. This study defined presence of physical neglect when scale scores were classified as moderate to extreme according to the CTQ manual.

Laboratory methods

DNA was extracted from peripheral blood by the salting out method (Lahiri and Nurnberger 1991). The *NR3C2* rs5522 and *NR3C1* rs6198 SNPs (also known as Ile180Val and A3669G, respectively) were genotyped using the TaqMan SNP genotyping assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), according to the manufacture's recommended protocol.

Statistical Analysis

Generalized estimating equation (GEE) modeling was used to analyze the effect of the SNPs and potential gene-gene or gene-environment interactions on CSSA evaluations over time. The autoregressive covariance structure was selected since the correlations between CSSA evaluations (times 1, 2, 3 and 4) declined exponentially with time. The

difference in CSSA scores between baseline and last CSSA evaluation (termed Δ base) and the estimated intelligence quotient were considered potential confounders using a conceptual framework (Victora et al. 1997) and a flexible statistical definition (Maldonado and Greenland 1993).

A case-only approach was employed to analyze the potential interaction effect between SNPs and childhood physical neglect on crack cocaine susceptibility. This control-free analysis is an efficient way of estimating gene-environment interactions, but it cannot evaluate the main effect of either. Such interactions may be obtained in a case-only design when independence between genotypes and environment exposure is assumed (Lee et al. 2010). Notably, case-only tests possess a higher power leading sometimes to a more valid estimation of interaction than the corresponding case-control analysis (Gatto et al. 2004). In this study, case-only hazard ratios (coHR) and 95% confidence intervals (95%CI) were estimated via conditional logistic regression with counterfactuals (Lee et al. 2010). The Supplementary Material provides the adapted SAS codes used in our analyses.

Results

Genotypic, psychiatric and socio-demographic characteristics of the sample are given in Table 1. Genotype distributions of *NR3C2* rs5522 and *NR3C1* rs6198 SNPs were in concordance with Hardy–Weinberg equilibrium law (chi-square = 0.036; df = 1; P = 0.849 and Chi-square = 1.418; df = 1; P = 0.234, respectively).

GEE modeling

GEE analysis showed that severity of withdrawal symptoms decreased over time in the total sample (P < 0.001; Supplementary Material, Table S1). There was a significant gene-gene interaction between the studied SNPs on CSSA estimated overall means (P = 0.002, Table 2). In the Post Hoc analysis, carriers of the rs5522-Val and rs6198-G alleles showed lower overall severity of withdrawal symptoms when compared with other genotype groups (P-values \leq 0.035, Figure 2). The three-way rs5522-rs6198-time interaction was not significant (P = 0.282, Table 2).

An effect of childhood physical neglect on withdrawal symptoms was found (P = 0.027; Supplementary Material, Table S1). Therefore, in a secondary analysis we tested for gene-environmental interactions. There were no rs5522- or rs6198-physical neglect interactions on CSSA estimated overall means (Wald Chi-square = 0.659, df = 1, P =

0.417; Wald Chi-square = 2.140, df = 1, P = 0.143, respectively). We also test a possible gene-gene-environment interaction. For this, carriers of the rs5522-Val and rs6198-G alleles were grouped with rs5522-Ile and rs6198-A homozygotes in a group termed 'low risk'. The two remaining genotypes combinations were classified as a 'high risk' group (Supplementary Material, Table S2). In this analysis, there was no significant NR3C2/NR3C1-physical neglect interaction on severity of withdrawal symptoms (Wald Chi-square = 0.050, df = 1, P = 0.823).

Case-only analysis

Table 3 presents the coHR for gene-environment interactions between SNPs and childhood physical neglect. Case-only analysis revealed that an interaction existed between physical neglect and rs5522-Val allele in crack cocaine addiction (chi-square = 10.293; df = 1; coHR = 4.0, 95%CI: 1.7–9.2, P = 0.001). No significant interaction between physical neglect and rs6198-G allele was detected (chi-square = 1.650; df = 1; coHR = 1.8, 95%CI: 0.7–4.1, P = 0.198). The 'high risk' genotype group interacted weakly with childhood physical neglect on crack cocaine susceptibility (chi-square = 3.007; df = 1; coHR = 1.9, 95%CI: 0.9–3.9, P = 0.083).

Discussion

In this study we provide further evidence that an interaction between genes related to HPA axis influences the severity of crack cocaine withdrawal symptoms. This first finding is in agreement with previous results in substance use disorders (Rovaris et al. 2013). Furthermore, gene-childhood neglect interactions were also found in gene-environment analyses. The latter findings are supported by epidemiological and human experimental studies showing a key relationship between childhood trauma and HPA axis dysregulation on cocaine addiction (Moran-Santa Maria et al. 2010; Widom et al. 2006).

Although rs5522 and rs6198 SNPs are not in the coding portion of hinge, the region which appears to be necessary for MR/GR heterodimerization (Savory et al. 2001), the very well characterized functional effects of rs5522-Val and rs6198-G alleles strengthens these gene-gene interactions findings. The rs5522-Val generates reduced MR transactivation activity (Arai et al. 2003; DeRijk et al. 2006; van Leeuwen et al. 2010) whereas the rs6198-G allele increases the GR β isoform that acts as an inhibitor of MR (Bamberger et al. 1997; DeRijk et al. 2001). Our findings regarding their role in substance

use disorders (tobacco and cocaine smoking, from previous and current studies respectively) point to a protective effect of rs6198-G allele in rs5522-Val carriers, consistently with an inhibiting effect of the GR β isoform (increased by the rs6198-G allele) (Bamberger et al. 1997) over the HPA disruptive rs5522-Val allele (Bogdan et al. 2010; DeRijk 2009; Kortmann et al. 2012; Kuningas et al. 2007). Additionally, it has been suggested that high cortisol levels may influence the reward pathways, enhancing the reinforcement proprieties of drugs (Richards et al. 2011; Sinha 2008). Hypercortisolism would be expected in carriers of the rs5522-Val and rs6198-G alleles (DeRijk 2009). However, it is reasonable to think that excessive cortisol secretion would not result in further stimulation of dopaminergic neurons in mesocorticolimbic pathways because of the lack of fully functioning MRs and GRs.

Our results also showed gene-childhood neglect and gene-gene-childhood neglect interactions. Childhood trauma increases the stress reactivity and the susceptibility to substance use disorders in adulthood (Back et al. 2008; Clarke et al. 2011; Gerra et al. 2009a; Schafer et al. 2010; Spratt et al. 2009). Additionally, changes in the HPA axis induced by childhood trauma and poor parental care perception were related to cocaine use during adulthood (Gerra et al. 2009b; Moran-Santa Maria et al. 2010). The case-only analyses suggested that a significant interaction exists between the rs5522-Val allele and childhood physical neglect on crack cocaine susceptibility. The high-risk genotype group (rs5522-Val carriers with rs6198-A homozygosis and rs6198-G carriers with rs5522-Ile homozygosis) also interacted with childhood neglect conferring risk for crack cocaine addiction. No gene-environment interaction was significantly in the severity of withdrawal symptoms analyses, which is consistent with a more pronounced role of childhood trauma in initiation into drug use (Fishbein et al. 2011; Kerr et al. 2009). However, few studies have investigated gene-childhood trauma interactions on cocaine addiction and none of them involved stress-related genes (Enoch et al. 2010; Gerra et al. 2007; Gerra et al. 2009a).

There are some limitations to the present study. *First*, although a women-only sample has the advantage of homogeneity, extrapolations to male gender should be made with caution due gender differences in HPA axis activity (Fernandez-Guasti et al. 2012; Reynolds et al. 2012). However, our previous study in the tobacco smoking sample did not show significant heterogeneity of odds ratios when SNP-gender interactions were considered in the Cochran-Mantel-Haenszel analyses (Rovaris et al. 2013). *Second*, our

study used a control-free approach. The case-only is an efficient way to estimate interactions when there is gene-environment independence (Dennis et al. 2011). Since no evidence supporting a possible effect of rs5522-Val and rs6198-G alleles on risk of suffering a childhood trauma is available, we assumed that gene-childhood neglect independence exists. *Third*, due the prospective cohort design, the stringent inclusion and exclusion criteria and the specificity of target population, our sample size was relative small in comparison to other gene-environment mental disorder-related studies. However, it is comparable to the only longitudinal study in cocaine addiction genetics (Mannelli et al. 2005).

In summary, several lines of evidence have addressed the association between HPA axis and cocaine addiction, but we are the first to demonstrate interactions between stress-related genes and childhood neglect conferring risk to this phenotype. Our results also suggest that *NR3C2* and *NR3C1* interactions might have an effect on severity of withdrawal symptoms of crack cocaine addicts. This data should be considered for inclusion in future meta-analysis designed to clarify the effects of MR and GR coding genes on substance use disorders. As far as we know, no genetic association studies on cocaine addiction included SNPs in both *NR3C2* and *NR3C1* genes.

Acknowledgments

This study was supported by CNPq, MCT/CT-Saúde, DECIT/SCTIE/MS, FAPERGS-PqG and FAPERGS-DECIT-PPSUS. We are thankful to Dr. Tina Chui from National Taiwan University for providing the modified SAS codes, to the Developmental Cognitive Neuroscience (GNCD) research team and to the staff of the Hospital Espírita - Sistema de Saúde Mãe de Deus for all the support regarding data collection.

References

- Arai, K., Nakagomi, Y., Iketani, M., Shimura, Y., Amemiya, S., Ohyama, K., et al. (2003) Functional polymorphisms in the mineralocorticoid receptor and amiloride-sensitive sodium channel genes in a patient with sporadic pseudohypoaldosteronism. *Hum Genet*, 112(1), 91-97.
- Axelrod, B. N. (2002) Validity of the Wechsler abbreviated scale of intelligence and other very short forms of estimating intellectual functioning. *Assessment*, 9(1), 17-23.
- Back, S. E., Brady, K. T., Waldrop, A. E., Yeatts, S. D., McRae, A. L., and Spratt, E. (2008) Early life trauma and sensitivity to current life stressors in individuals with and without cocaine dependence. *Am J Drug Alcohol Abuse*, 34(4), 389-396.
- Bamberger, C. M., Bamberger, A. M., Wald, M., Chrousos, G. P., and Schulte, H. M. (1997) Inhibition of mineralocorticoid activity by the beta-isoform of the human glucocorticoid receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 60(1-2), 43-50.
- Bastos, F. I. (2012) Crack in Brazil: a public health emergency. *Cad Saude Publica*, 28(6), 1016-1017.
- Baumann, M. H., Gendron, T. M., Becketts, K. M., Henningfield, J. E., Gorelick, D. A., and Rothman, R. B. (1995) Effects of intravenous cocaine on plasma cortisol and prolactin in human cocaine abusers. *Biol Psychiatry*, 38(11), 751-755.
- Bernstein, D. P., Stein, J. A., Newcomb, M. D., Walker, E., Pogge, D., Ahluvalia, T., et al. (2003) Development and validation of a brief screening version of the Childhood Trauma Questionnaire. *Child Abuse Negl*, 27(2), 169-190.
- Berrettini, W., Yuan, X., Tozzi, F., Song, K., Francks, C., Chilcoat, H., et al. (2008) Alpha-5/alpha-3 nicotinic receptor subunit alleles increase risk for heavy smoking. *Mol Psychiatry*, 13(4), 368-373.
- Bertolucci, P. H., Brucki, S. M., Campacci, S. R., and Juliano, Y. (1994) [The Mini-Mental State Examination in a general population: impact of educational status]. *Arq Neuropsiquiatr*, 52(1), 1-7.
- Bogdan, R., Perlis, R. H., Fagerness, J., and Pizzagalli, D. A. (2010) The impact of mineralocorticoid receptor ISO/VAL genotype (rs5522) and stress on reward learning. *Genes Brain Behav*, 9(6), 658-667.
- Brady, K. T., McRae, A. L., Moran-Santa Maria, M. M., DeSantis, S. M., Simpson, A. N., Waldrop, A. E., et al. (2009) Response to corticotropin-releasing hormone infusion in cocaine-dependent individuals. *Arch Gen Psychiatry*, 66(4), 422-430.

- Clarke, T. K., Laucht, M., Ridinger, M., Wodarz, N., Rietschel, M., Maier, W., et al. (2011) KCNJ6 is associated with adult alcohol dependence and involved in gene x early life stress interactions in adolescent alcohol drinking. *Neuropsychopharmacology*, 36(6), 1142-1148.
- Crime, U. N. O. o. D. a. (2012) World Drug Report 2012. World Drug Report 2012 (United Nations Publication, Sales No. E.12.XI.1).
- Davis-Sharts, J. (1986) An empirical test of Maslow's theory of need hierarchy using hologicistic comparison by statistical sampling. *ANS Adv Nurs Sci*, 9(1), 58-72.
- Dennis, J., Hawken, S., Krewski, D., Birkett, N., Gheorghe, M., Frei, J., et al. (2011) Bias in the case-only design applied to studies of gene-environment and gene-gene interaction: a systematic review and meta-analysis. *Int J Epidemiol*, 40(5), 1329-1341.
- DeRijk, R. H. (2009) Single nucleotide polymorphisms related to HPA axis reactivity. *Neuroimmunomodulation*, 16(5), 340-352.
- DeRijk, R. H., Schaaf, M. J., Turner, G., Datson, N. A., Vreugdenhil, E., Cidlowski, J., et al. (2001) A human glucocorticoid receptor gene variant that increases the stability of the glucocorticoid receptor beta-isoform mRNA is associated with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 28(11), 2383-2388.
- DeRijk, R. H., Wust, S., Meijer, O. C., Zennaro, M. C., Federenko, I. S., Hellhammer, D. H., et al. (2006) A common polymorphism in the mineralocorticoid receptor modulates stress responsiveness. *J Clin Endocrinol Metab*, 91(12), 5083-5089.
- English, D. J., Thompson, R., Graham, J. C., and Briggs, E. C. (2005) Toward a definition of neglect in young children. *Child Maltreat*, 10(2), 190-206.
- Enoch, M. A., Hodgkinson, C. A., Yuan, Q., Shen, P. H., Goldman, D., and Roy, A. (2010) The influence of GABRA2, childhood trauma, and their interaction on alcohol, heroin, and cocaine dependence. *Biol Psychiatry*, 67(1), 20-27.
- Fernandez-Guasti, A., Fiedler, J. L., Herrera, L., and Handa, R. J. (2012) Sex, stress, and mood disorders: at the intersection of adrenal and gonadal hormones. *Horm Metab Res*, 44(8), 607-618.
- Fishbein, D., Novak, S. P., Krebs, C., Warner, T., and Hammond, J. (2011) The mediating effect of depressive symptoms on the relationship between traumatic childhood experiences and drug use initiation. *Addict Behav*, 36(5), 527-531.

- Folstein, M. F., Folstein, S. E., and McHugh, P. R. (1975) "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res*, 12(3), 189-198.
- Gatto, N. M., Campbell, U. B., Rundle, A. G., and Ahsan, H. (2004) Further development of the case-only design for assessing gene-environment interaction: evaluation of and adjustment for bias. *Int J Epidemiol*, 33(5), 1014-1024.
- Gerra, G., Zaimovic, A., Castaldini, L., Garofano, L., Manfredini, M., Somaini, L., et al. (2009a) Relevance of perceived childhood neglect, 5-HTT gene variants and hypothalamus-pituitary-adrenal axis dysregulation to substance abuse susceptibility. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 153B(3), 715-722.
- Gerra, G., Zaimovic, A., Garofano, L., Ciusa, F., Moi, G., Avanzini, P., et al. (2007) Perceived parenting behavior in the childhood of cocaine users: relationship with genotype and personality traits. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 144B(1), 52-57.
- Gerra, G., Leonardi, C., Cortese, E., Zaimovic, A., Dell'Agnello, G., Manfredini, M., et al. (2008) Adrenocorticotrophic hormone and cortisol plasma levels directly correlate with childhood neglect and depression measures in addicted patients. *Addict Biol*, 13(1), 95-104.
- Gerra, G., Leonardi, C., Cortese, E., Zaimovic, A., Dell'agnello, G., Manfredini, M., et al. (2009b) Childhood neglect and parental care perception in cocaine addicts: relation with psychiatric symptoms and biological correlates. *Neurosci Biobehav Rev*, 33(4), 601-610.
- Grassi-Oliveira, R., Stein, L. M., and Pezzi, J. C. (2006) [Translation and content validation of the Childhood Trauma Questionnaire into Portuguese language]. *Rev Saude Publica*, 40(2), 249-255.
- Heesch, C. M., Negus, B. H., Keffer, J. H., Snyder, R. W., 2nd, Risser, R. C., and Eichhorn, E. J. (1995) Effects of cocaine on cortisol secretion in humans. *Am J Med Sci*, 310(2), 61-64.
- Joels, M., Karst, H., DeRijk, R., and de Kloet, E. R. (2008) The coming out of the brain mineralocorticoid receptor. *Trends Neurosci*, 31(1), 1-7.
- Kampman, K. M., Volpicelli, J. R., McGinnis, D. E., Alterman, A. I., Weinrieb, R. M., D'Angelo, L., et al. (1998) Reliability and validity of the Cocaine Selective Severity Assessment. *Addict Behav*, 23(4), 449-461.

- Kendler, K. S. and Prescott, C. A. (1998) Cocaine use, abuse and dependence in a population-based sample of female twins. *Br J Psychiatry*, 173, 345-350.
- Kendler, K. S., Karkowski, L. M., Neale, M. C., and 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.
- Kerr, T., Stoltz, J. A., Marshall, B. D., Lai, C., Strathdee, S. A., and Wood, E. (2009) Childhood trauma and injection drug use among high-risk youth. *J Adolesc Health*, 45(3), 300-302.
- Kino, T., Su, Y. A., and Chrousos, G. P. (2009) Human glucocorticoid receptor isoform beta: recent understanding of its potential implications in physiology and pathophysiology. *Cell Mol Life Sci*, 66(21), 3435-3448.
- Kortmann, G. L., Contini, V., Bertuzzi, G. P., Mota, N. R., Rovaris, D. L., Paixao-Cortes, V. R., et al. (2012) The role of a mineralocorticoid receptor gene functional polymorphism in the symptom dimensions of persistent ADHD. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*.
- Kumsta, R., Entringer, S., Koper, J. W., van Rossum, E. F., Hellhammer, D. H., and Wust, S. (2007) Sex specific associations between common glucocorticoid receptor gene variants and hypothalamus-pituitary-adrenal axis responses to psychosocial stress. *Biol Psychiatry*, 62(8), 863-869.
- Kumsta, R., Entringer, S., Koper, J. W., van Rossum, E. F., Hellhammer, D. H., and Wust, S. (2008) Glucocorticoid receptor gene polymorphisms and glucocorticoid sensitivity of subdermal blood vessels and leukocytes. *Biol Psychol*, 79(2), 179-184.
- Kuningas, M., de Rijk, R. H., Westendorp, R. G., Jolles, J., Slagboom, P. E., and van Heemst, D. (2007) Mental performance in old age dependent on cortisol and genetic variance in the mineralocorticoid and glucocorticoid receptors. *Neuropsychopharmacology*, 32(6), 1295-1301.
- Lahiri, D. K. and 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.
- Lee, W. C., Wang, L. Y., and Cheng, K. F. (2010) An easy-to-implement approach for analyzing case-control and case-only studies assuming gene-environment independence and Hardy-Weinberg equilibrium. *Stat Med*, 29(24), 2557-2567.

- Lewis-Tuffin, L. J. and Cidlowski, J. A. (2006) The physiology of human glucocorticoid receptor beta (hGRbeta) and glucocorticoid resistance. *Ann N Y Acad Sci*, 1069, 1-9.
- Liu, W., Wang, J., Sauter, N. K., and Pearce, D. (1995) Steroid receptor heterodimerization demonstrated in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(26), 12480-12484.
- Maia, A. L., Godinho, C., Ferreira, E. D., Almeida, V., Schuh, A., Kaye, J., et al. (2006) [Application of the Brazilian version of the CDR scale in samples of dementia patients]. *Arq Neuropsiquiatr*, 64(2B), 485-489.
- Maldonado, G. and Greenland, S. (1993) Simulation study of confounder-selection strategies. *Am J Epidemiol*, 138(11), 923-936.
- Mannelli, P., Patkar, A. A., Murray, H. W., Certa, K., Peindl, K., Mattila-Evenden, M., et al. (2005) Polymorphism in the serotonin transporter gene and response to treatment in African American cocaine and alcohol-abusing individuals. *Addict Biol*, 10(3), 261-268.
- Mello, N. K. (2010) Hormones, nicotine, and cocaine: clinical studies. *Horm Behav*, 58(1), 57-71.
- Moran-Santa Maria, M. M., McRae-Clark, A. L., Back, S. E., DeSantis, S. M., Baker, N. L., Spratt, E. G., et al. (2010) Influence of cocaine dependence and early life stress on pituitary-adrenal axis responses to CRH and the Trier social stressor. *Psychoneuroendocrinology*, 35(10), 1492-1500.
- Oakley, R. H. and Cidlowski, J. A. (2011) Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids. *J Biol Chem*, 286(5), 3177-3184.
- Oitzl, M. S., Champagne, D. L., van der Veen, R., and de Kloet, E. R. (2010) Brain development under stress: hypotheses of glucocorticoid actions revisited. *Neurosci Biobehav Rev*, 34(6), 853-866.
- Oswald, L. M., Wong, D. F., McCaul, M., Zhou, Y., Kuwabara, H., Choi, L., et al. (2005) Relationships among ventral striatal dopamine release, cortisol secretion, and subjective responses to amphetamine. *Neuropsychopharmacology*, 30(4), 821-832.
- Perroud, N., Paoloni-Giacobino, A., Prada, P., Olie, E., Salzmann, A., Nicastro, R., et al. (2011) Increased methylation of glucocorticoid receptor gene (NR3C1) in adults with a history of childhood maltreatment: a link with the severity and type of trauma. *Transl Psychiatry*, 1, e59.

- Reynolds, R. M., Hii, H. L., Pennell, C. E., McKeague, I. W., Kloet, E. R., Lye, S., et al. (2012) Analysis of baseline hypothalamic-pituitary-adrenal activity in late adolescence reveals gender specific sensitivity of the stress axis. *Psychoneuroendocrinology*.
- Richards, J. M., Stipelman, B. A., Bornovalova, M. A., Daughters, S. B., Sinha, R., and Lejuez, C. W. (2011) Biological mechanisms underlying the relationship between stress and smoking: state of the science and directions for future work. *Biol Psychol*, 88(1), 1-12.
- Rovaris, D. L., Mota, N. R., de Azeredo, L. A., Cupertino, R. B., Bertuzzi, G. P., Polina, E. R., et al. (2013) MR and GR functional SNPs may modulate tobacco smoking susceptibility. *Journal of Neural Transmission*.
- Savory, J. G., Prefontaine, G. G., Lamprecht, C., Liao, M., Walther, R. F., Lefebvre, Y. A., et al. (2001) Glucocorticoid receptor homodimers and glucocorticoid-mineralocorticoid receptor heterodimers form in the cytoplasm through alternative dimerization interfaces. *Mol Cell Biol*, 21(3), 781-793.
- Schafer, I., Langeland, W., Hissbach, J., Luedecke, C., Ohlmeier, M. D., Chodzinski, C., et al. (2010) Childhood trauma and dissociation in patients with alcohol dependence, drug dependence, or both-A multi-center study. *Drug Alcohol Depend*, 109(1-3), 84-89.
- Schoneveld, O. J., Gaemers, I. C., and Lamers, W. H. (2004) Mechanisms of glucocorticoid signalling. *Biochim Biophys Acta*, 1680(2), 114-128.
- Sinha, R. (2008) Chronic stress, drug use, and vulnerability to addiction. *Ann N Y Acad Sci*, 1141, 105-130.
- Sinha, R., Garcia, M., Paliwal, P., Kreek, M. J., and Rounsaville, B. J. (2006) Stress-induced cocaine craving and hypothalamic-pituitary-adrenal responses are predictive of cocaine relapse outcomes. *Arch Gen Psychiatry*, 63(3), 324-331.
- Spijker, A. T., Giltay, E. J., van Rossum, E. F., Manenschijn, L., DeRijk, R. H., Haffmans, J., et al. (2011) Glucocorticoid and mineralocorticoid receptor polymorphisms and clinical characteristics in bipolar disorder patients. *Psychoneuroendocrinology*, 36(10), 1460-1469.
- Spijker, A. T., van Rossum, E. F., Hoencamp, E., DeRijk, R. H., Haffmans, J., Blom, M., et al. (2009) Functional polymorphism of the glucocorticoid receptor gene

- associates with mania and hypomania in bipolar disorder. *Bipolar Disord*, 11(1), 95-101.
- Spratt, E. G., Back, S. E., Yeatts, S. D., Simpson, A. N., McRae-Clark, A., Moran-Santa Maria, M. M., et al. (2009) Relationship between child abuse and adult smoking. *Int J Psychiatry Med*, 39(4), 417-426.
- Szczepankiewicz, A., Leszczynska-Rodziewicz, A., Pawlak, J., Rajewska-Rager, A., Dmitrzak-Weglarz, M., Wilkosc, M., et al. (2011) Glucocorticoid receptor polymorphism is associated with major depression and predominance of depression in the course of bipolar disorder. *J Affect Disord*, 134(1-3), 138-144.
- Trapp, T., Rupprecht, R., Castren, M., Reul, J. M., and Holsboer, F. (1994) Heterodimerization between mineralocorticoid and glucocorticoid receptor: a new principle of glucocorticoid action in the CNS. *Neuron*, 13(6), 1457-1462.
- van Leeuwen, N., Bellingrath, S., de Kloet, E. R., Zitman, F. G., DeRijk, R. H., Kudielka, B. M., et al. (2010) Human mineralocorticoid receptor (MR) gene haplotypes modulate MR expression and transactivation: implication for the stress response. *Psychoneuroendocrinology*, 36(5), 699-709.
- Victora, C. G., Huttly, S. R., Fuchs, S. C., and Olinto, M. T. (1997) The role of conceptual frameworks in epidemiological analysis: a hierarchical approach. *Int J Epidemiol*, 26(1), 224-227.
- Wand, G. S., Oswald, L. M., McCaul, M. E., Wong, D. F., Johnson, E., Zhou, Y., et al. (2007) Association of amphetamine-induced striatal dopamine release and cortisol responses to psychological stress. *Neuropsychopharmacology*, 32(11), 2310-2320.
- Widom, C. S., Marmorstein, N. R., and White, H. R. (2006) Childhood victimization and illicit drug use in middle adulthood. *Psychol Addict Behav*, 20(4), 394-403.

Table 1 – Characteristics of participants

	n = 139
	<i>Mean (SD)</i>
Age (years)	28.9 (7.6)
Schooling (years)	7.7 (3.1)
Intelligence quotient	84.1 (14.1)
Withdrawal before admission (days)	1.0 (2.8)*
	<i>n (%)</i>
Physical neglect	54 (37.5)
Minor allele and genotype frequencies	
<i>NR3C2</i> rs5522	
Val allele	0.125
Ile/Ile	110 (76.4)
Ile/Val	32 (22.2)
Val/Val	2 (1.4)
<i>NR3C1</i> rs6198	
G allele	0.090
AA	118 (81.9)
AG	26 (18.1)
GG	0 (0.0)

*Median and interquartile range.

Table 2 – Generalized estimating equation model to evaluate the influence of *NR3C2* rs5522 and *NR3C1* rs6198 SNPs on Cocaine Selective Severity Assessment CSSA evaluations over time

Terms	Wald Chi-square	df	P-value
rs5522	3.579	1	0.059
rs6198	4.160	1	0.041
Time*	52.579	3	<0.001
rs5522-rs6198 interaction	10.014	1	0.002
rs5522-Time interaction	3.118	3	0.374
rs6198-Time interaction	4.675	3	0.197
rs5522-rs6198-Time interaction	3.816	3	0.282

*Detoxification treatment (four evaluations).
df = degrees of freedom.

Table 3 – Case-only analyses of gene-environment interactions in crack cocaine addicts (n = 278*)

Crack cocaine	Physical Neglect	coHR (95%CI)		Chi-square	P-value
		Low	High		
<i>NR3C2</i> rs5522					
Ile/Ile		1.0 (ref)	-	10.293	0.001
Val carriers		-	4.0 (-1.7-9.2)		
<i>NR3C1</i> rs6198					
AA		1.0 (ref)	-	1.650	0.198
G carriers		-	1.8 (0.7-4.1)		
<i>NR3C2-NR3C1</i>					
Low risk		1.0 (ref)	-	3.007	0.083
High risk		-	1.9 (0.9-3.9)		

*1 counterfactual subject (R=0) is created to each recruited subject (R=1), with the counterfactuals having exactly the same exposition status as the factual subject but different genotype (see Lee et al. 2010).

coHR, case-only hazard ratio.

Figure 1 – Study flowchart.

MMSE = Mini-Mental State Examination.

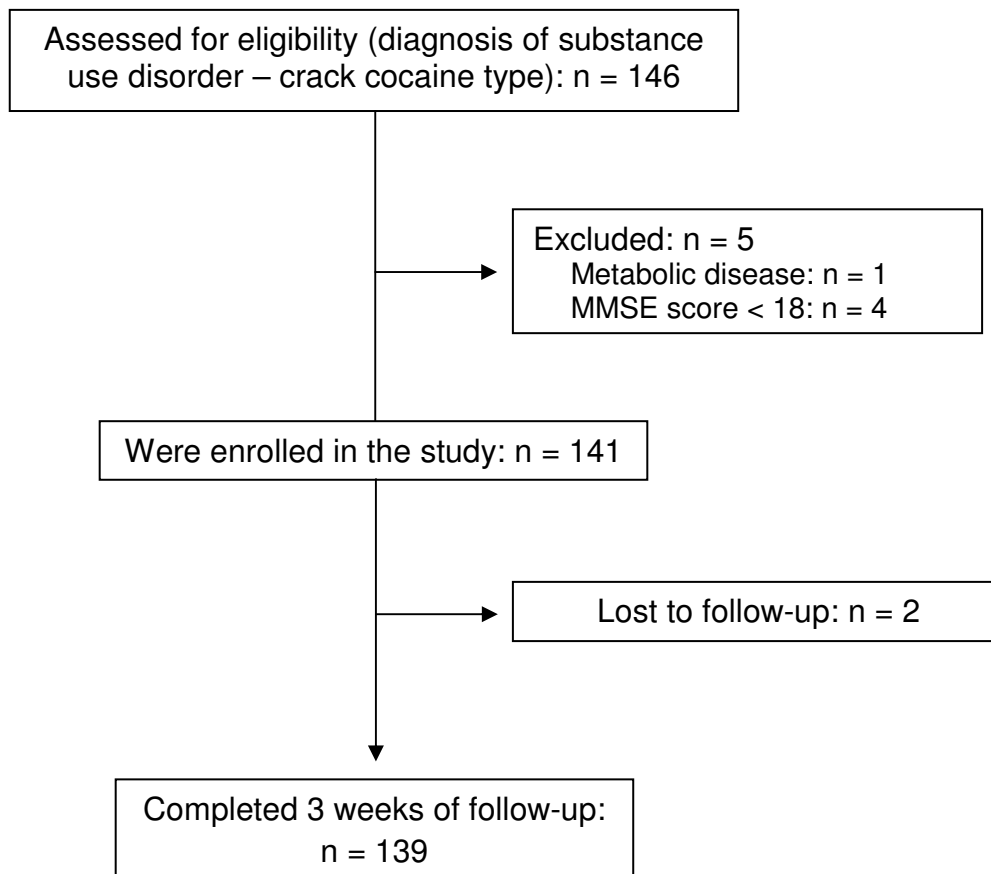
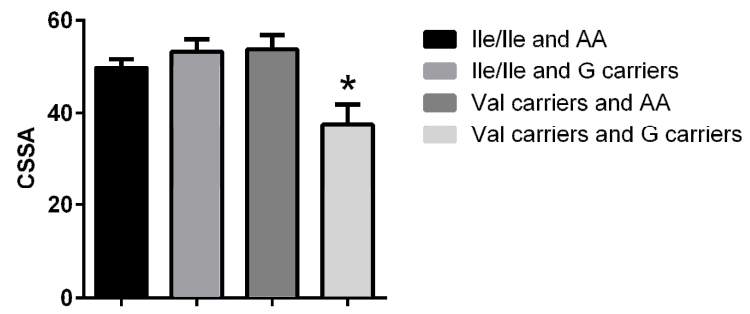


Figure 2 – Mean CSSA (Cocaine Selective Severity Assessment) scores during detoxification treatment in a generalized estimating equation model (a total of four assessments). There was a significant gene-gene interaction between the *NR3C2* rs5522 and *NR3C1* rs6198 SNPs on CSSA estimated overall means (Wald Chi-square: 10.014; df: 1; $P = 0.002$). *Post Hoc analysis: carriers of the rs5522-Val and rs6198-G alleles significantly differ from the other groups (Ile/Ile and AA, $P = 0.035$; Ile/Ile and G carriers, $P = 0.011$; Val carriers and AA, $P = 0.011$). Ile/Ile and AA, Ile/Ile and G carriers and Val carriers and AA did not differ from each other (P -values > 0.05).



Supplementary Material, Table S1 – Generalized estimating equation models to evaluate the main effects of detoxification treatment, physical neglect and potential covariates.

Terms	Wald Chi-square	df	p-value
Time*	51.05	3	<0.001
Physical neglect	4.91	1	0.027
Δ base	0.45	1	0.503
Intelligence quotient.	0.27	1	0.604

*Detoxification treatment (four evaluations).

Δ base = the difference between baseline and last CSSA evaluation.

df = degrees of freedom.

Supplementary Material, Table S2 – MR/GR binary variable

<i>NR3C2</i> rs5522	<i>NR3C1</i> rs6198	Risk group	Coded as
Ile/Ile	AA	Low	0
Val carriers	G carriers	Low	0
Ile/Ile	G carriers	High	1
Val carriers	AA	High	1

The classification was made according to Rovaris et al 2013.

Supplementary Material, Methods

SAS codes used when G is a binary variable (0 = absence of the risk allele and 1 = presence of the risk allele). The full method is described in Lee et al - Statistics in Medicine. 2010 Oct 30; 29 (24): 2557-67.

```
/* Conditional logistic regression with counterfactuals (case-only, G=0, 1) */
```

```
data counterfactual;
```

```
    set teste;
```

```
    do temp_i=0 to 1;
```

```
        R=(temp_i=0);
```

```
        temp_g=mod((G+temp_i), 2);
```

```
        output;
```

```
    end; run;
```

```
data counterfactual;
```

```
    set counterfactual;
```

```
    G=temp_g;
```

```
    sur=1-R;
```

```
    GE=G*E;
```

```
    drop temp_g temp_i; run;
```

```
proc phreg data=counterfactual nosummary;
```

```
    strata ID;
```

```
    model sur*R(0)= G GE;
```

```
run;
```

.....

For the above SAS codes, the corresponding likelihood is

$$P(G | E, R = 1) = \frac{\exp(\delta^* G + \gamma GE)}{\sum_{g=0}^1 \exp(\delta^* g + \gamma g E)},$$

where $\delta^* = \delta + \alpha$ (a nuisance parameter, α is genetic main effect) and γ is gene-environment interaction effect.

6.1 Tabagismo e Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade

No capítulo IV, uma influência dos SNPs rs5522 (*NR3C2*) e rs6198 (*NR3C1*) sobre o tabagismo foi demonstrada em um grupo de 627 indivíduos da população geral. Com a finalidade de testar esses achados em uma amostra independente, uma análise em pacientes com TDAH foi realizada. 505 adultos eurodescendentes (261 homens) foram incluídos na análise. Embora a frequência de dependência de nicotina seja significativamente maior no TDAH, quando comparado com a população geral (43% e 18,0%, respectivamente, $P < 0,001$), nenhum efeito significativo dos SNPs rs5522 e rs6198 foi detectado sobre o tabagismo *lifetime* nesses pacientes (Tabela 1). Não foi demonstrado também efeito de interação entre os SNPs nos dois genes estudados.

Uma característica marcante entre os indivíduos com TDAH é a presença de outras comorbidades, além do tabagismo. O transtorno depressivo maior (TDM) foi uma comorbidade presente em 37,3% dos pacientes que fizeram parte da amostra. Dessa forma, foi avaliado o efeito dos SNPs nos genes *NR3C2* e *NR3C1* sobre o TDM. A presença do alelo G do rs6198 no gene *NR3C1* foi associada com aumento no risco de desenvolvimento de TDM (odds ratio = 1,58; IC95% = 1,02-2,43; $P = 0,040$; Tabela 2). Pacientes com transtorno bipolar (TB) foram excluídos da análise, pois a literatura aponta para um efeito de proteção do alelo G sobre esse transtorno (Spijker *et al.*, 2009; Spijker *et al.*, 2011). Interações SNP-gênero não foram inseridas no modelo, pois não foi detectada heterogeneidade de odds ratios em uma análise estratificada pelo método de Cochran-Mantel-Haenszel (rs5522-gênero, $P = 0,835$; rs6198-gênero, $P = 0,499$).

Na sequência, um modelo de regressão logística multinomial testou o papel dos SNPs estudados em indivíduos com tabagismo somente (Grupo 1), com TDM somente (Grupo 2) ou com TDM e comorbidade com tabagismo (Grupo 3). Os pacientes com TDAH sem TDM, TB e tabagismo formaram a categoria de referência (Grupo 4). Essa análise demonstrou que o alelo G do rs6198 no gene *NR3C1* só confere risco para o grupo 3 (odds ratio = 2,01; IC95% 1,10 - 3,83; $P = 0,023$; Tabela 3). Nenhum efeito sobre o Grupo 1 ou Grupo 2 foi detectado.

Tabela 1 – Influência de polimorfismos nos genes *NR3C2* e *NR3C1* sobre o tabagismo em um *background* de TDAH (regressão logística binária)

	B	EP	OR	IC 95%	P
Tabagismo					
<i>NR3C1</i> rs6198					
AA	0	-	1	-	-
AG+GG	0,23	0,21	1,26	0,84-1,89	0,256
 <i>NR3C2</i> rs5522					
Ile/Ile	0	-	1	-	-
Ile/Val+Val/Val	-0,36	0,23	0,70	0,44-1,10	0,125

TDAH = transtorno de déficit de atenção e hiperatividade; TDM = transtorno depressivo maior.

Os tamanhos amostrais estão descritos na Tabela 1.

O termo de interação rs5522-rs6198 não foi significativo (Wald = 2,026; P = 0,631).

Tabela 2 – Influência de polimorfismos nos genes *NR3C2* e *NR3C1* sobre o TDM em um *background* de TDAH (regressão logística binária)

	B	EP	OR	IC 95%	P
TDM					
<i>NR3C1</i> rs6198					
AA	0	-	1	-	-
AG+GG	0,45	0,22	1,58	1,02-2,43	0,040
 <i>NR3C2</i> rs5522					
Ile/Ile	0	-	1	-	-
Ile/Val+Val/Val	0,02	0,25	1,02	0,63-1,66	0,939

TDAH = transtorno de déficit de atenção e hiperatividade; TDM = transtorno depressivo maior; TB = transtorno bipolar.

Os tamanhos amostrais estão descritos na Tabela 1.

Modelo TDM: TDAH com TDM comparado com TDAH sem TDM e TB

O termo de interação rs5522-rs6198 não foi significativo (Wald = 0,230; P = 0,155).

Tabela 3 – Influência de polimorfismos nos genes *NR3C2* e *NR3C1* sobre o TDM e tabagismo em um *background* de TDAH (regressão logística multinomial)

	1) TDM sem Tabagismo (n = 112)		2) Tabagismo sem TDM (n = 100)		3) TDM e Tabagismo (n = 76)	
	b (EP)	OR (IC 95%)	b (EP)	OR (IC 95%)	b (EP)	OR (IC 95%)
<i>NR3C1</i> rs6198						
AA	0	1	0	1	0	1
AG+GG	0,38 (0,29)	1,46 (0,82 - 2,60)	0,16 (0,31)	1,17 (0,64 - 2,16)	0,72 (0,32)	2,01 (1,10 - 3,83)^a
<i>NR3C2</i> rs5522						
Ile/Ile	0	1	0	1	0	1
Ile/Val+Val/Val	1,14 (0,30)	1,15 (0,63 - 2,08)	-0,36 (0,34)	0,70 (0,36 - 1,36)	-0,62 (0,40)	0,54 (0,25 - 1,18)

TDAH = transtorno de déficit de atenção e hiperatividade; TDM = transtorno depressivo maior; TB = transtorno bipolar.

Grupo 4: Categoria de referência (n = 140) = sem TDM, TB e tabagismo.

^avalor **P = 0,023**.

Goodness-of-fit: Pearson or Deviance > 0,3.

Interações gene-gene não foram significativas.

Capítulo VII
DISCUSSÃO GERAL

Comentários e conclusões pormenorizados já foram apresentadas ao final de cada artigo. A partir de uma visão ampliada do assunto, a discussão geral desta dissertação terá a finalidade de integrar todas as informações geradas nos capítulos III, IV, V e VI.

7.1 A Hipótese Inicial e os Resultados Encontrados

A hipótese inicial deste trabalho foi construída a partir de uma série de evidências epidemiológicas e experimentais que apóiam o envolvimento dos sistemas de estresse no TUS. Mais especificamente, a desregulação do eixo HHA é referida como um fator principal envolvido em todas as etapas do processo de drogadição (Sinha, 2001; Sinha, 2008; Richards *et al.*, 2011; Bruijnzeel, 2012). Como as estimativas de herdabilidade das dependências de nicotina e de cocaína são elevadas (Kendler e Prescott, 1998; Kendler *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2003), foi levantada a hipótese de que variações em genes que codificam as proteínas envolvidas na retroalimentação negativa do eixo HHA poderiam estar envolvidas no TUS. Dessa forma, polimorfismos funcionais nos genes que codificam o MR e o GR (*NR3C2* rs5522 e *NR3C1* rs6198, respectivamente) foram avaliados. Até o momento, somente quatro estudos testaram o papel de variações nesses genes sobre o TUS, sendo os fenótipos investigados as dependências de nicotina e de álcool. Influências significativas dos SNPs sobre o alcoolismo em adolescentes, sobre o tabagismo, além de uma associação nominal com a gravidade do tabagismo em um GWAS, foram reportadas nesses trabalhos (Rogausch *et al.*, 2007; Berrettini *et al.*, 2008; Siiskonen *et al.*, 2009; Desrivieres *et al.*, 2011).

No presente estudo, os fenótipos avaliados foram as dependências de nicotina e de cocaína/*crack*. Associações significativas foram encontradas entre os dois SNPs funcionais testados, em ambos os fenótipos. Primeiramente, foi demonstrado um efeito de interação gene-gene sobre a suscetibilidade ao tabagismo e efeitos principais de um dos SNPs avaliados sobre a gravidade da dependência de nicotina (capítulo IV). No capítulo V, a interação gene-gene descrita no capítulo IV foi replicada em uma amostra de dependentes de cocaína/*crack*. Além disso, efeitos de interação entre os genes *NR3C2*, *NR3C1* e negligência física na infância foram demonstrados. No capítulo VI, uma influência do polimorfismo no gene *NR3C1* foi encontrada sobre a tripla comorbidade TDAH – TDM – tabagismo. Os achados nas três amostras independentes (capítulo IV, n = 627; capítulo V, n = 139; e capítulo VI, n = 505) corroboram, então, a hipótese desenvolvida no início deste trabalho.

7.2 O Eixo HHA, Tabagismo e o TDAH

O tabagismo é uma comorbidade comum em pacientes com TDAH, apresentando uma frequência maior do que na população geral (Kollins *et al.*, 2005; Biederman *et al.*, 2006; Sousa *et al.*, 2011). Todavia, as associações com tabagismo descritas no capítulo IV não foram *a priori* replicadas em uma amostra de pacientes com esse transtorno (capítulo VI). Esse fato vem sendo observado em outros sistemas trabalhados pelo nosso grupo, tais como o dopaminérgico e o colinérgico. Modelos estatísticos de associação que são encontrados na amostra da população geral não são replicados na amostra com *background* de TDAH, e vice e versa. Isso pode ser consistente com uma hipótese de que os mecanismos que aumentam a suscetibilidade ao tabagismo nos indivíduos com TDAH podem ser diferentes daqueles que conferem risco para a população geral. Além disso, as teorias da ‘desinibição comportamental’ e da ‘auto-medicação’ têm sido propostas com o intuito de explicar a frequência elevada do tabagismo em indivíduos com transtornos psiquiátricos, tais como o TDAH e a esquizofrenia (Dinn *et al.*, 2004; Kalil *et al.*, 2008; Sousa *et al.*, 2011).

Entretanto, os pacientes com TDAH apresentam uma característica substancial e pouco avaliada na maioria dos estudos clínicos, epidemiológicos e genéticos: a frequência elevada de outras comorbidades, além da dependência de nicotina. A partir disso, nós passamos a considerar possíveis relações entre o tabagismo e outros transtornos presentes em um *background* de TDAH. O TDM foi a comorbidade escolhida por três motivos principais: pacientes com TDAH apresentam frequências elevadas dessa comorbidade (Biederman, 2004; McGough *et al.*, 2005; Secnik *et al.*, 2005; Kessler *et al.*, 2006); há uma literatura extensa apontando para o fato de que o TDM pode levar ao tabagismo, bem como o tabagismo pode resultar no TDM (Benjet *et al.*, 2004; Kinnunen *et al.*, 2006; Fischer *et al.*, 2007; Scott *et al.*, 2009; dos Santos *et al.*, 2010); e por fim, dois estudos de associação do tipo gene candidato já demonstraram uma influência significativa dos polimorfismos investigados neste trabalho sobre o TDM e sintomas de depressão (Kuningas *et al.*, 2007; Szczepankiewicz *et al.*, 2011).

Nossos resultados são consistentes com os de Szczepankiewicz *et al.* (2011), que associaram o alelo G do rs6198 no gene *NR3C1* com TDM e sintomas de depressão no curso clínico do transtorno bipolar. Todavia, quando incluímos o tabagismo na análise, a associação só ocorre no grupo de indivíduos tabagistas com TDM. Como a literatura

aponta para uma rota bidirecional entre os dois transtornos (Jamal *et al.*, 2011), é possível que os mecanismos etiológicos sejam compartilhados entre o tabagismo e o TDM. Além disso, influências do alelo Val do rs5522 no gene *NR3C2* sobre os sintomas do TDAH já foram reportadas em um trabalho do nosso grupo (Kortmann *et al.*, 2012). Olhando sob uma perspectiva integrada, esses dados sugerem que a desregulação do eixo HHA pode ter um papel na fisiopatologia dos transtornos mentais em geral. É possível que o risco de desenvolvimento de um transtorno ou de outro, com ou sem comorbidades, possa estar relacionado a interações do eixo HHA com outros sistemas biológicos, incluindo os de neurotransmissão. De qualquer forma, essa nova hipótese deve ser testada em estudos posteriores.

7.3 Interações Gene-Gene e Gene-Ambiente

O rs5522 do gene *NR3C2* foi associado de forma nominal com a gravidade do tabagismo em um GWAS (Berrettini *et al.*, 2008), entretanto, nenhum sinal do rs6198 do gene *NR3C1* sobre o TUS foi detectado até o momento. Considerando os resultados dos capítulos IV e V, uma explicação plausível para esse fato envolve a possibilidade de interações gene-gene. A epistasia é um mecanismo biológico responsável por uma parcela importante das herdabilidades perdida e fantasma de um fenótipo complexo (Zuk *et al.*, 2012), todavia, a avaliação individual dos *loci* realizadas nas varreduras genômicas impede a detecção desse tipo de efeito (Cordell, 2009; Manolio *et al.*, 2009; Zuk *et al.*, 2012). Alguns métodos estatísticos já possibilitam o teste de interações de duas vias em dados de GWAS. Não obstante, a ausência de plausibilidade biológica para a grande maioria dos termos de interação, além da correção vigorosa para múltiplos testes, dificulta o aparecimento de associações significativas nesse tipo de estudo. Como discutido no capítulo III, algumas modificações metodológicas na avaliação de interações em bancos de GWAS já são observadas na literatura, sendo o uso da biologia de sistemas uma das mais promissoras (Emily *et al.*, 2009). De qualquer forma, nenhum trabalho que empregou esse tipo de análise no TUS foi publicado até o momento.

Por outro lado, em estudos de associação do tipo gene candidato, o uso de hipóteses prévias parece ser a melhor abordagem para avaliar epistasia. Por exemplo, algumas interações entre genes que codificam proteínas do sistema dopaminérgico, as quais interagem fisicamente, foram demonstradas pelo nosso grupo (Mota *et al.*, 2012) e por outros (Sullivan *et al.*, 2013). No caso do eixo HHA, a forma coordenada de atuação do

MR e do GR e as evidências de formação de heterodímeros fortalecem o estudo de interações. Nossos resultados, tanto no tabagismo quanto na dependência de cocaína/*crack*, mostram que o alelo G do rs6198 pode modificar o efeito do alelo Val do rs5522 (ou vice e versa). Dessa forma, a presença de ambos os alelos parece conferir proteção contra a dependência de nicotina, além de estar associada com melhor prognóstico de dependentes de cocaína/*crack*. Como mencionado no final capítulo V, essa interação pode ser implicada na modulação da dinâmica dopaminérgica em circuitos mesocorticolímbicos envolvidos nas propriedades de reforço e de recompensa das drogas de abuso. De qualquer forma, esses achados, bem como as novas hipóteses geradas por eles, precisam ser confirmados e investigados a partir de estudos com modelos animais e por replicações em amostras humanas independentes.

Embora a interação *NR3C2-NR3C1* não tenha sido significativa nas análises realizadas na amostra de TDAH, a possibilidade da sua existência não pode ser descartada. A divisão dos 505 indivíduos em 4 subgrupos (capítulo VI) pode ter resultado na diminuição do poder estatístico necessário para a detecção de um efeito significativo.

Nós também encontramos efeitos de interação entre os SNPs estudados com negligência física. O trauma na infância é um dos fatores ambientais mais associado com o desenvolvimento do TUS (Gerra, Leonardi, *et al.*, 2009; Gerra, Zaimovic, *et al.*, 2009; Moran-Santa Maria *et al.*, 2010) e o possível mecanismo biológico envolve a desregulação do eixo HHA (Gerra *et al.*, 2008; Gerra, Leonardi, *et al.*, 2009). Poucos estudos avaliaram o papel de interações entre genes e trauma na infância sobre a dependência de cocaína, sendo que nenhum avaliou SNPs relacionados ao sistema de estresse (Gerra *et al.*, 2007; Gerra, Zaimovic, *et al.*, 2009; Enoch *et al.*, 2010). Além disso, a falta de consenso na literatura em relação ao efeito do trauma na infância sobre a atividade do eixo HHA (hipo ou hiper-reatividade) dificulta a interpretação das associações encontradas pelo nosso grupo. Todavia, não se pode desconsiderar o fato de que as discrepâncias observadas no papel dos eventos traumáticos na infância sobre a circuitaria neuroendócrina podem envolver variações genéticas nos componentes do sistema de estresse, incluindo os genes *NR3C2* e *NR3C1*.

7.4 Considerações Finais e Perspectivas Futuras

Os dados aqui apresentados são consistentes com o envolvimento do sistema de estresse em aspectos da neurobiologia do TUS, incluindo suscetibilidade e gravidade.

Nossos achados devem ser incluídos em futuros estudos de meta-análise, que tenham como finalidade esclarecer os papéis dos genes codificadores de componentes do eixo HHA sobre as dependências de nicotina e de cocaína. Além disso, o efeito de interação entre os SNPs rs5522 e rs6198 detectado aqui deve ser confirmado em ensaios de transativação, e possíveis relações com liberação de dopamina em circuitos mesocorticolímbicos precisam ser testadas a partir de experimentação com modelos animais.

Sob o ponto de vista neurofisiológico, a literatura aponta que o eixo HHA interage com os sistemas dopaminérgico, noradrenérgico, serotoninérgico, gabaérgico e glutamatérgico (Sinha, 2008; DeRijk, 2009; Prager e Johnson, 2009). A partir desses dados, este trabalho cria novas perguntas: o eixo HHA pode ser considerado um denominador comum na biologia do desenvolvimento do TUS? Qual a relação com outros sistemas? Além disso, pacientes portadores dos alelos Val (rs5522) e G (rs6198) que passaram por tratamentos de desintoxicação são menos prováveis de recair? Se sim, será que os rs5522 e rs6198 poderão servir como marcadores genéticos de prognóstico? Dessa forma, as investigações que serão realizadas no futuro pelo nosso grupo e por outros poderão explorar ainda mais esse papel do estresse sobre as dependências de nicotina e de cocaína, bem como de outras drogas de abuso. Isso contribuirá para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas e planos de terapia individualizados, fazendo com que pacientes que sofrem as consequências negativas do TUS possam receber o tratamento adequado, que ao final, é o maior objetivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrawal A, Lynskey MT, Hinrichs A, Grucza R, Saccone SF, Krueger R, Neuman R, Howells W, Fisher S, Fox L, *et al.* (2011) A genome-wide association study of DSM-IV cannabis dependence. *Addict Biol* 16: 514-518.
- Ahlbom A and Alfredsson L (2005) Interaction: A word with two meanings creates confusion. *Eur J Epidemiol* 20: 563-564.
- al'Absi M, Hatsukami D and Davis GL (2005) Attenuated adrenocorticotrophic responses to psychological stress are associated with early smoking relapse. *Psychopharmacology (Berl)* 181: 107-117.
- al'Absi M, Hatsukami D, Davis GL and Wittmers LE (2004) Prospective examination of effects of smoking abstinence on cortisol and withdrawal symptoms as predictors of early smoking relapse. *Drug Alcohol Depend* 73: 267-278.
- Amato L, Minozzi S, Pani PP, Solimini R, Vecchi S, Zuccaro P and Davoli M (2011) Dopamine agonists for the treatment of cocaine dependence. *Cochrane Database Syst Rev*: CD003352.
- Arai K, Nakagomi Y, Iketani M, Shimura Y, Amemiya S, Ohyama K and Shibasaki T (2003) Functional polymorphisms in the mineralocorticoid receptor and amiloride-sensitive sodium channel genes in a patient with sporadic pseudohypoaldosteronism. *Hum Genet* 112: 91-97.
- Association AP (1994) *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders Fourth Edition*. Washington, D.C.
- Back SE, Brady KT, Waldrop AE, Yeatts SD, McRae AL and Spratt E (2008) Early life trauma and sensitivity to current life stressors in individuals with and without cocaine dependence. *Am J Drug Alcohol Abuse* 34: 389-396.
- Bamberger CM, Bamberger AM, Wald M, Chrousos GP and Schulte HM (1997) Inhibition of mineralocorticoid activity by the beta-isoform of the human glucocorticoid receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 60: 43-50.
- Baumann MH, Gendron TM, Becketts KM, Henningfield JE, Gorelick DA and Rothman RB (1995) Effects of intravenous cocaine on plasma cortisol and prolactin in human cocaine abusers. *Biol Psychiatry* 38: 751-755.

- Benjet C, Wagner FA, Borges GG and Medina-Mora ME (2004) The relationship of tobacco smoking with depressive symptomatology in the Third Mexican National Addictions Survey. *Psychol Med* 34: 881-888.
- Benowitz NL (2010) Nicotine addiction. *N Engl J Med* 362: 2295-2303.
- Berrettini W, Yuan X, Tozzi F, Song K, Francks C, Chilcoat H, Waterworth D, Muglia P and Mooser V (2008) Alpha-5/alpha-3 nicotinic receptor subunit alleles increase risk for heavy smoking. *Mol Psychiatry* 13: 368-373.
- Biederman J (2004) Impact of comorbidity in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Clin Psychiatry* 65 Suppl 3: 3-7.
- Biederman J, Monuteaux MC, Mick E, Spencer T, Wilens TE, Silva JM, Snyder LE and Faraone SV (2006) Young adult outcome of attention deficit hyperactivity disorder: a controlled 10-year follow-up study. *Psychol Med* 36: 167-179.
- Bierut LJ, Agrawal A, Bucholz KK, Doheny KF, Laurie C, Pugh E, Fisher S, Fox L, Howells W, Bertelsen S, *et al.* (2010) A genome-wide association study of alcohol dependence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 5082-5087.
- Bierut LJ, Madden PA, Breslau N, Johnson EO, Hatsukami D, Pomerleau OF, Swan GE, Rutter J, Bertelsen S, Fox L, *et al.* (2007) Novel genes identified in a high-density genome wide association study for nicotine dependence. *Hum Mol Genet* 16: 24-35.
- Bierut LJ, Stitzel JA, Wang JC, Hinrichs AL, Grucza RA, Xuei X, Saccone NL, Saccone SF, Bertelsen S, Fox L, *et al.* (2008) Variants in nicotinic receptors and risk for nicotine dependence. *Am J Psychiatry* 165: 1163-1171.
- Bloch PJ, Nall AH, Weller AE, Ferraro TN, Berrettini WH, Kampman KM, Pettinati HM, Dackis CA, O'Brien CP, Oslin DW, *et al.* (2009) Association analysis between polymorphisms in the dopamine D3 receptor (DRD3) gene and cocaine dependence. *Psychiatr Genet* 19: 275-276.
- Borroto-Escuela DO, Van Craenenbroeck K, Romero-Fernandez W, Guidolin D, Woods AS, Rivera A, Haegeman G, Agnati LF, Tarakanov AO and Fuxe K (2011) Dopamine D2 and D4 receptor heteromerization and its allosteric receptor-receptor interactions. *Biochem Biophys Res Commun* 404: 928-934.
- Bouma EM, Riese H, Nolte IM, Oosterom E, Verhulst FC, Ormel J and Oldehinkel AJ (2011) No associations between single nucleotide polymorphisms in corticoid

- receptor genes and heart rate and cortisol responses to a standardized social stress test in adolescents: the TRAILS study. *Behav Genet* 41: 253-261.
- Brady KT, McRae AL, Moran-Santa Maria MM, DeSantis SM, Simpson AN, Waldrop AE, Back SE and Kreek MJ (2009) Response to corticotropin-releasing hormone infusion in cocaine-dependent individuals. *Arch Gen Psychiatry* 66: 422-430.
- Bruijnzeel AW (2012) Tobacco addiction and the dysregulation of brain stress systems. *Neurosci Biobehav Rev* 36: 1418-1441.
- Bruner KL, Derfoul A, Robertson NM, Guerriero G, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES and Litwack G (1997) The unliganded mineralocorticoid receptor is associated with heat shock proteins 70 and 90 and the immunophilin FKBP-52. *Recept Signal Transduct* 7: 85-98.
- Buczek Y, Le AD, Wang A, Stewart J and Shaham Y (1999) Stress reinstates nicotine seeking but not sucrose solution seeking in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 144: 183-188.
- Caporaso N, Gu F, Chatterjee N, Sheng-Chih J, Yu K, Yeager M, Chen C, Jacobs K, Wheeler W, Landi MT, *et al.* (2009) Genome-wide and candidate gene association study of cigarette smoking behaviors. *PLoS One* 4: e4653.
- Carlborg O and Haley CS (2004) Epistasis: too often neglected in complex trait studies? *Nat Rev Genet* 5: 618-625.
- Chen X, Chen J, Williamson VS, An SS, Hetttema JM, Aggen SH, Neale MC and Kendler KS (2009) Variants in nicotinic acetylcholine receptors alpha5 and alpha3 increase risks to nicotine dependence. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 150B: 926-933.
- Chrousos GP (2009) Stress and disorders of the stress system. *Nat Rev Endocrinol* 5: 374-381.
- Cigler T, LaForge KS, McHugh PF, Kapadia SU, Leal SM and Kreek MJ (2001) Novel and previously reported single-nucleotide polymorphisms in the human 5-HT(1B) receptor gene: no association with cocaine or alcohol abuse or dependence. *Am J Med Genet* 105: 489-497.
- Clarke TK, Laucht M, Ridinger M, Wodarz N, Rietschel M, Maier W, Lathrop M, Lourdasamy A, Zimmermann US, Desrivieres S, *et al.* (2011) KCNJ6 is associated with adult alcohol dependence and involved in gene x early life stress interactions in adolescent alcohol drinking. *Neuropsychopharmacology* 36: 1142-1148.

- Cordell HJ (2009) Detecting gene-gene interactions that underlie human diseases. *Nat Rev Genet* 10: 392-404.
- da Silveira DX, Doering-Silveira E, Niel M and Jorge MR (2006) Predicting craving among cocaine users. *Addict Behav* 31: 2292-2297.
- Dani JA and Heinemann S (1996) Molecular and cellular aspects of nicotine abuse. *Neuron* 16: 905-908.
- de Iudicibus S, Franca R, Martelossi S, Ventura A and Decorti G (2011) Molecular mechanism of glucocorticoid resistance in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 17: 1095-1108.
- De Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS and Joels M (1998) Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev* 19: 269-301.
- DeRijk R and de Kloet ER (2005) Corticosteroid receptor genetic polymorphisms and stress responsivity. *Endocrine* 28: 263-270.
- DeRijk RH (2009) Single nucleotide polymorphisms related to HPA axis reactivity. *Neuroimmunomodulation* 16: 340-352.
- DeRijk RH and de Kloet ER (2008) Corticosteroid receptor polymorphisms: determinants of vulnerability and resilience. *Eur J Pharmacol* 583: 303-311.
- DeRijk RH, Schaaf MJ, Turner G, Datson NA, Vreugdenhil E, Cidlowski J, de Kloet ER, Emery P, Sternberg EM and Detera-Wadleigh SD (2001) A human glucocorticoid receptor gene variant that increases the stability of the glucocorticoid receptor beta-isoform mRNA is associated with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 28: 2383-2388.
- DeRijk RH, van Leeuwen N, Klok MD and Zitman FG (2008) Corticosteroid receptor-gene variants: modulators of the stress-response and implications for mental health. *Eur J Pharmacol* 585: 492-501.
- DeRijk RH, Wust S, Meijer OC, Zennaro MC, Federenko IS, Hellhammer DH, Giacchetti G, Vreugdenhil E, Zitman FG and de Kloet ER (2006) A common polymorphism in the mineralocorticoid receptor modulates stress responsiveness. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 5083-5089.
- Desrivieres S, Lourdasamy A, Muller C, Ducci F, Wong CP, Kaakinen M, Pouta A, Hartikainen AL, Isohanni M, Charoen P, *et al.* (2011) Glucocorticoid receptor (NR3C1) gene polymorphisms and onset of alcohol abuse in adolescents. *Addict Biol* 16: 510-513.

- Dinn WM, Aycicegi A and Harris CL (2004) Cigarette smoking in a student sample: neurocognitive and clinical correlates. *Addict Behav* 29: 107-126.
- dos Santos VA, Migott AM, Bau CH and Chatkin JM (2010) Tobacco smoking and depression: results of a cross-sectional study. *Br J Psychiatry* 197: 413-414.
- Drgon T, Montoya I, Johnson C, Liu QR, Walther D, Hamer D and Uhl GR (2009) Genome-wide association for nicotine dependence and smoking cessation success in NIH research volunteers. *Mol Med* 15: 21-27.
- Edenberg HJ, Koller DL, Xuei X, Wetherill L, McClintick JN, Almasy L, Bierut LJ, Bucholz KK, Goate A, Aliev F, *et al.* (2010) Genome-wide association study of alcohol dependence implicates a region on chromosome 11. *Alcohol Clin Exp Res* 34: 840-852.
- Emily M, Mailund T, Hein J, Schauer L and Schierup MH (2009) Using biological networks to search for interacting loci in genome-wide association studies. *Eur J Hum Genet* 17: 1231-1240.
- Enoch MA, Hodgkinson CA, Yuan Q, Shen PH, Goldman D and Roy A (2010) The influence of GABRA2, childhood trauma, and their interaction on alcohol, heroin, and cocaine dependence. *Biol Psychiatry* 67: 20-27.
- Evans BE, Greaves-Lord K, Euser AS, Franken IH and Huizink AC (2012) The relation between hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis activity and age of onset of alcohol use. *Addiction* 107: 312-322.
- Falba T, Teng HM, Sindelar JL and Gallo WT (2005) The effect of involuntary job loss on smoking intensity and relapse. *Addiction* 100: 1330-1339.
- Fernandez-Castillo N, Ribases M, Roncero C, Casas M, Gonzalvo B and Cormand B (2010) Association study between the DAT1, DBH and DRD2 genes and cocaine dependence in a Spanish sample. *Psychiatr Genet* 20: 317-320.
- Ferreira PEM and Martini RK (2001) Cocaína: lendas, história e abuso. *Rev Bras Psiquiatr* 23: 96-99.
- Fischer AG, Bau CH, Grevet EH, Salgado CA, Victor MM, Kalil KL, Sousa NO, Garcia CR and Belmonte-de-Abreu P (2007) The role of comorbid major depressive disorder in the clinical presentation of adult ADHD. *J Psychiatr Res* 41: 991-996.
- Frederick SL, Reus VI, Ginsberg D, Hall SM, Munoz RF and Ellum G (1998) Cortisol and response to dexamethasone as predictors of withdrawal distress and abstinence success in smokers. *Biol Psychiatry* 43: 525-530.

- Freire MT, Marques FZ, Hutz MH and Bau CH (2006) Polymorphisms in the DBH and DRD2 gene regions and smoking behavior. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 256: 93-97.
- Funder JW (1993) Mineralocorticoids, glucocorticoids, receptors and response elements. *Science* 259: 1132-1133.
- Funder JW (2005) Mineralocorticoid receptors: distribution and activation. *Heart Fail Rev* 10: 15-22.
- Gass P, Kretz O, Wolfer DP, Berger S, Tronche F, Reichardt HM, Kellendonk C, Lipp HP, Schmid W and Schutz G (2000) Genetic disruption of mineralocorticoid receptor leads to impaired neurogenesis and granule cell degeneration in the hippocampus of adult mice. *EMBO Rep* 1: 447-451.
- Gerra G, Leonardi C, Cortese E, Zaimovic A, Dell'Agnello G, Manfredini M, Somaini L, Petracca F, Caretti V, Baroni C, *et al.* (2008) Adrenocorticotrophic hormone and cortisol plasma levels directly correlate with childhood neglect and depression measures in addicted patients. *Addict Biol* 13: 95-104.
- Gerra G, Leonardi C, Cortese E, Zaimovic A, Dell'agnello G, Manfredini M, Somaini L, Petracca F, Caretti V, Raggi MA, *et al.* (2009) Childhood neglect and parental care perception in cocaine addicts: relation with psychiatric symptoms and biological correlates. *Neurosci Biobehav Rev* 33: 601-610.
- Gerra G, Zaimovic A, Castaldini L, Garofano L, Manfredini M, Somaini L, Leonardi C, Gerra ML and Donnini C (2009) Relevance of perceived childhood neglect, 5-HTT gene variants and hypothalamus-pituitary-adrenal axis dysregulation to substance abuse susceptibility. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 153B: 715-722.
- Gerra G, Zaimovic A, Garofano L, Ciusa F, Moi G, Avanzini P, Talarico E, Gardini F, Brambilla F, Manfredini M, *et al.* (2007) Perceived parenting behavior in the childhood of cocaine users: relationship with genotype and personality traits. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 144B: 52-57.
- Gilbert DG, Dibb WD, Plath LC and Hiyane SG (2000) Effects of nicotine and caffeine, separately and in combination, on EEG topography, mood, heart rate, cortisol, and vigilance. *Psychophysiology* 37: 583-595.
- Gilbert DG, Meliska CJ, Williams CL and Jensen RA (1992) Subjective correlates of cigarette-smoking-induced elevations of peripheral beta-endorphin and cortisol. *Psychopharmacology (Berl)* 106: 275-281.

- Gonzalez S, Rangel-Barajas C, Peper M, Lorenzo R, Moreno E, Ciruela F, Borycz J, Ortiz J, Lluís C, Franco R, *et al.* (2012) Dopamine D4 receptor, but not the ADHD-associated D4.7 variant, forms functional heteromers with the dopamine D2S receptor in the brain. *Mol Psychiatry* 17: 650-662.
- Grant BF, Hasin DS, Chou SP, Stinson FS and Dawson DA (2004) Nicotine dependence and psychiatric disorders in the United States: results from the national epidemiologic survey on alcohol and related conditions. *Arch Gen Psychiatry* 61: 1107-1115.
- Guindalini C, Howard M, Haddley K, Laranjeira R, Collier D, Ammar N, Craig I, O'Gara C, Bubb VJ, Greenwood T, *et al.* (2006) A dopamine transporter gene functional variant associated with cocaine abuse in a Brazilian sample. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 4552-4557.
- Guindalini C, Laranjeira R, Collier D, Messas G, Vallada H and Breen G (2008) Dopamine-beta hydroxylase polymorphism and cocaine addiction. *Behav Brain Funct* 4: 1.
- Heesch CM, Negus BH, Keffer JH, Snyder RW, 2nd, Risser RC and Eichhorn EJ (1995) Effects of cocaine on cortisol secretion in humans. *Am J Med Sci* 310: 61-64.
- Henningfield JE, Miyasato K and Jasinski DR (1985) Abuse liability and pharmacodynamic characteristics of intravenous and inhaled nicotine. *J Pharmacol Exp Ther* 234: 1-12.
- Ho MK, Goldman D, Heinz A, Kaprio J, Kreek MJ, Li MD, Munafo MR and Tyndale RF (2010) Breaking barriers in the genomics and pharmacogenetics of drug addiction. *Clin Pharmacol Ther* 88: 779-791.
- Ishikawa H, Ohtsuki T, Ishiguro H, Yamakawa-Kobayashi K, Endo K, Lin YL, Yanagi H, Tsuchiya S, Kawata K, Hamaguchi H, *et al.* (1999) Association between serotonin transporter gene polymorphism and smoking among Japanese males. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 8: 831-833.
- Jamal M, Does AJ, Penninx BW and Cuijpers P (2011) Age at smoking onset and the onset of depression and anxiety disorders. *Nicotine Tob Res* 13: 809-819.
- Joels M, Karst H, DeRijk R and de Kloet ER (2008) The coming out of the brain mineralocorticoid receptor. *Trends Neurosci* 31: 1-7.

- Johnson LR, Farb C, Morrison JH, McEwen BS and LeDoux JE (2005) Localization of glucocorticoid receptors at postsynaptic membranes in the lateral amygdala. *Neuroscience* 136: 289-299.
- Kablinger AS, Lindner MA, Casso S, Hefti F, DeMuth G, Fox BS, McNair LA, McCarthy BG and Goeders NE (2012) Effects of the combination of metyrapone and oxazepam on cocaine craving and cocaine taking: a double-blind, randomized, placebo-controlled pilot study. *J Psychopharmacol* 26: 973-981.
- Kalil KL, Bau CH, Grevet EH, Sousa NO, Garcia CR, Victor MM, Fischer AG, Salgado CA and Belmonte-de-Abreu P (2008) Smoking is associated with lower performance in WAIS-R Block Design scores in adults with ADHD. *Nicotine Tob Res* 10: 683-688.
- Kapoor M, Wang JC, Bertelsen S, Bucholz K, Budde JP, Hinrichs A, Agrawal A, Brooks A, Chorlian D, Dick D, *et al.* (2012) Variants located upstream of CHRNA4 on chromosome 15q25.1 are associated with age at onset of daily smoking and habitual smoking. *PLoS One* 7: e33513.
- Karst H, Berger S, Turiault M, Tronche F, Schutz G and Joels M (2005) Mineralocorticoid receptors are indispensable for nongenomic modulation of hippocampal glutamate transmission by corticosterone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 19204-19207.
- Kendler KS, Karkowski LM, Neale MC and Prescott CA (2000) Illicit psychoactive substance use, heavy use, abuse, and dependence in a US population-based sample of male twins. *Arch Gen Psychiatry* 57: 261-269.
- Kendler KS and Prescott CA (1998) Cocaine use, abuse and dependence in a population-based sample of female twins. *Br J Psychiatry* 173: 345-350.
- Kessler RC, Adler L, Barkley R, Biederman J, Conners CK, Demler O, Faraone SV, Greenhill LL, Howes MJ, Secnik K, *et al.* (2006) The prevalence and correlates of adult ADHD in the United States: results from the National Comorbidity Survey Replication. *Am J Psychiatry* 163: 716-723.
- Kinnunen T, Haukkala A, Korhonen T, Quiles ZN, Spiro A, 3rd and Garvey AJ (2006) Depression and smoking across 25 years of the Normative Aging Study. *Int J Psychiatry Med* 36: 413-426.
- Kino T, Su YA and Chrousos GP (2009) Human glucocorticoid receptor isoform beta: recent understanding of its potential implications in physiology and pathophysiology. *Cell Mol Life Sci* 66: 3435-3448.

- Kollins SH, McClernon FJ and Fuemmeler BF (2005) Association between smoking and attention-deficit/hyperactivity disorder symptoms in a population-based sample of young adults. *Arch Gen Psychiatry* 62: 1142-1147.
- Kortmann GL, Contini V, Bertuzzi GP, Mota NR, Rovaris DL, Paixao-Cortes VR, de Lima LL, Grevet EH, Salgado CA, Vitola ES, *et al.* (2012) The role of a mineralocorticoid receptor gene functional polymorphism in the symptom dimensions of persistent ADHD. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.*
- Kumsta R, Entringer S, Koper JW, van Rossum EF, Hellhammer DH and Wust S (2007) Sex specific associations between common glucocorticoid receptor gene variants and hypothalamus-pituitary-adrenal axis responses to psychosocial stress. *Biol Psychiatry* 62: 863-869.
- Kumsta R, Entringer S, Koper JW, van Rossum EF, Hellhammer DH and Wust S (2008) Glucocorticoid receptor gene polymorphisms and glucocorticoid sensitivity of subdermal blood vessels and leukocytes. *Biol Psychol* 79: 179-184.
- Kuningas M, de Rijk RH, Westendorp RG, Jolles J, Slagboom PE and van Heemst D (2007) Mental performance in old age dependent on cortisol and genetic variance in the mineralocorticoid and glucocorticoid receptors. *Neuropsychopharmacology* 32: 1295-1301.
- Lander ES (2011) Initial impact of the sequencing of the human genome. *Nature* 470: 187-197.
- Lasser K, Boyd JW, Woolhandler S, Himmelstein DU, McCormick D and Bor DH (2000) Smoking and mental illness: A population-based prevalence study. *JAMA* 284: 2606-2610.
- Le Menuet D, Zennaro MC, Viengchareun S and Lombes M (2000) Transgenic mouse models to study human mineralocorticoid receptor function in vivo. *Kidney Int* 57: 1299-1306.
- Lerman C, Caporaso NE, Bush A, Zheng YL, Audrain J, Main D and Shields PG (2001) Tryptophan hydroxylase gene variant and smoking behavior. *Am J Med Genet* 105: 518-520.
- Li MD, Cheng R, Ma JZ and Swan GE (2003) A meta-analysis of estimated genetic and environmental effects on smoking behavior in male and female adult twins. *Addiction* 98: 23-31.

- Listwak SJ, Gold PW and Whitfield HJ, Jr. (1996) The human mineralocorticoid receptor gene promoter: its structure and expression. *J Steroid Biochem Mol Biol* 58: 495-506.
- Liu JZ, Tozzi F, Waterworth DM, Pillai SG, Muglia P, Middleton L, Berrettini W, Knouff CW, Yuan X, Waeber G, *et al.* (2010) Meta-analysis and imputation refines the association of 15q25 with smoking quantity. *Nat Genet* 42: 436-440.
- Liu W, Wang J, Sauter NK and Pearce D (1995) Steroid receptor heterodimerization demonstrated in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 12480-12484.
- Lohoff FW, Bloch PJ, Ferraro TN, Berrettini WH, Pettinati HM, Dackis CA, O'Brien CP, Kampman KM and Oslin DW (2009) Association analysis between polymorphisms in the conserved dopamine neurotrophic factor (CDNF) gene and cocaine dependence. *Neurosci Lett* 453: 199-203.
- Lohoff FW, Weller AE, Bloch PJ, Nall AH, Ferraro TN, Kampman KM, Pettinati HM, Oslin DW, Dackis CA, O'Brien CP, *et al.* (2008) Association between the catechol-O-methyltransferase Val158Met polymorphism and cocaine dependence. *Neuropsychopharmacology* 33: 3078-3084.
- Lutfy K, Aimiwu O, Mangubat M, Shin CS, Nerio N, Gomez R, Liu Y and Friedman TC (2012) Nicotine stimulates secretion of corticosterone via both CRH and AVP receptors. *J Neurochem* 120: 1108-1116.
- Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, Goldstein DB, Hindorff LA, Hunter DJ, McCarthy MI, Ramos EM, Cardon LR, Chakravarti A, *et al.* (2009) Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature* 461: 747-753.
- McClellan J and King MC (2010) Genomic analysis of mental illness: a changing landscape. *JAMA* 303: 2523-2524.
- McEwen A, West R and McRobbie H (2008) Motives for smoking and their correlates in clients attending Stop Smoking treatment services. *Nicotine Tob Res* 10: 843-850.
- McGough JJ, Smalley SL, McCracken JT, Yang M, Del'Homme M, Lynn DE and Loo S (2005) Psychiatric comorbidity in adult attention deficit hyperactivity disorder: findings from multiplex families. *Am J Psychiatry* 162: 1621-1627.
- McKee SA, Sinha R, Weinberger AH, Sofuoglu M, Harrison EL, Lavery M and Wanzer J (2011) Stress decreases the ability to resist smoking and potentiates smoking intensity and reward. *J Psychopharmacol* 25: 490-502.

- Meijsing SH, Pufall MA, So AY, Bates DL, Chen L and Yamamoto KR (2009) DNA binding site sequence directs glucocorticoid receptor structure and activity. *Science* 324: 407-410.
- Mello NK (2010) Hormones, nicotine, and cocaine: clinical studies. *Horm Behav* 58: 57-71.
- Mendelson JH, Goletiani N, Sholar MB, Siegel AJ and Mello NK (2008) Effects of smoking successive low- and high-nicotine cigarettes on hypothalamic-pituitary-adrenal axis hormones and mood in men. *Neuropsychopharmacology* 33: 749-760.
- Mendelson JH, Sholar MB, Goletiani N, Siegel AJ and Mello NK (2005) Effects of low- and high-nicotine cigarette smoking on mood states and the HPA axis in men. *Neuropsychopharmacology* 30: 1751-1763.
- Messas G, Meira-Lima I, Turchi M, Franco O, Guindalini C, Castelo A, Laranjeira R and Vallada H (2005) Association study of dopamine D2 and D3 receptor gene polymorphisms with cocaine dependence. *Psychiatr Genet* 15: 171-174.
- Moran-Santa Maria MM, McRae-Clark AL, Back SE, DeSantis SM, Baker NL, Spratt EG, Simpson AN and Brady KT (2010) Influence of cocaine dependence and early life stress on pituitary-adrenal axis responses to CRH and the Trier social stressor. *Psychoneuroendocrinology* 35: 1492-1500.
- Morishima Y, Kanelakis KC, Murphy PJ, Lowe ER, Jenkins GJ, Osawa Y, Sunahara RK and Pratt WB (2003) The hsp90 cochaperone p23 is the limiting component of the multiprotein hsp90/hsp70-based chaperone system in vivo where it acts to stabilize the client protein: hsp90 complex. *J Biol Chem* 278: 48754-48763.
- Morsink MC, Steenbergen PJ, Vos JB, Karst H, Joels M, De Kloet ER and Datson NA (2006) Acute activation of hippocampal glucocorticoid receptors results in different waves of gene expression throughout time. *J Neuroendocrinol* 18: 239-252.
- Mota NR, Rovaris DL, Bertuzzi GP, Contini V, Vitola ES, Grevet EH, Roman T, Callegari-Jacques SM, Hutz MH and Bau CH (2012) DRD2/DRD4 heteromerization may influence genetic susceptibility to alcohol dependence. *Mol Psychiatry*.
- Nair SM, Karst H, Dumas T, Phillips R, Sapolsky RM, Rumpff-van Essen L, Maslam S, Lucassen PJ and Joels M (2004) Gene expression profiles associated with survival of individual rat dentate cells after endogenous corticosteroid deprivation. *Eur J Neurosci* 20: 3233-3243.

- National Institute on Drug Abuse (2011) Research Report: Cocaine: Abuse and Addiction. <http://www.nida.nih.gov/DrugPages/Cocaine.html>.
- Nielsen DA, Ji F, Yuferov V, Ho A, He C, Ott J and Kreek MJ (2010) Genome-wide association study identifies genes that may contribute to risk for developing heroin addiction. *Psychiatr Genet* 20: 207-214.
- Oakley RH and Cidlowski JA (2011) Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids. *J Biol Chem* 286: 3177-3184.
- Oitzl MS, Champagne DL, van der Veen R and de Kloet ER (2010) Brain development under stress: hypotheses of glucocorticoid actions revisited. *Neurosci Biobehav Rev* 34: 853-866.
- Oswald LM, Wong DF, McCaul M, Zhou Y, Kuwabara H, Choi L, Brasic J and Wand GS (2005) Relationships among ventral striatal dopamine release, cortisol secretion, and subjective responses to amphetamine. *Neuropsychopharmacology* 30: 821-832.
- Pani PP, Trogu E, Vecchi S and Amato L (2011) Antidepressants for cocaine dependence and problematic cocaine use. *Cochrane Database Syst Rev*: CD002950.
- Pascual-Le Tallec L, Demange C and Lombes M (2004) Human mineralocorticoid receptor A and B protein forms produced by alternative translation sites display different transcriptional activities. *Eur J Endocrinol* 150: 585-590.
- Pascual-Le Tallec L and Lombes M (2005) The mineralocorticoid receptor: a journey exploring its diversity and specificity of action. *Mol Endocrinol* 19: 2211-2221.
- Patkar AA, Berrettini WH, Hoehe M, Hill KP, Gottheil E, Thornton CC and Weinstein SP (2002) No association between polymorphisms in the serotonin transporter gene and susceptibility to cocaine dependence among African-American individuals. *Psychiatr Genet* 12: 161-164.
- Pauly JR, Ullman EA and Collins AC (1988) Adrenocortical hormone regulation of nicotine sensitivity in mice. *Physiol Behav* 44: 109-116.
- Pilowsky DJ, Keyes KM and Hasin DS (2009) Adverse childhood events and lifetime alcohol dependence. *Am J Public Health* 99: 258-263.
- Polina ER, Contini V, Hutz MH and Bau CH (2009) The serotonin 2A receptor gene in alcohol dependence and tobacco smoking. *Drug Alcohol Depend* 101: 128-131.
- Prager EM, Brielmaier J, Bergstrom HC, McGuire J and Johnson LR (2010) Localization of mineralocorticoid receptors at mammalian synapses. *PLoS One* 5: e14344.

- Prager EM and Johnson LR (2009) Stress at the synapse: signal transduction mechanisms of adrenal steroids at neuronal membranes. *Sci Signal* 2: re5.
- Prestes AP, Marques FZ, Hutz MH, Roman T and Bau CH (2007) Tobacco smoking and the ADRA2A C-1291G polymorphism. *J Neural Transm* 114: 1503-1506.
- Reul JM and de Kloet ER (1985) Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology* 117: 2505-2511.
- Richards JM, Stipelman BA, Bornovalova MA, Daughters SB, Sinha R and Lejuez CW (2011) Biological mechanisms underlying the relationship between stress and smoking: state of the science and directions for future work. *Biol Psychol* 88: 1-12.
- Robinson SF, Grun EU, Pauly JR and Collins AC (1996) Changes in sensitivity to nicotine and brain nicotinic receptors following chronic nicotine and corticosterone treatments in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 54: 587-593.
- Rogausch A, Kochen MM, Meineke C and Hennig J (2007) Association between the BclII glucocorticoid receptor polymorphism and smoking in a sample of patients with obstructive airway disease. *Addict Biol* 12: 93-99.
- Rohsenow DJ, Martin RA, Eaton CA and Monti PM (2007) Cocaine craving as a predictor of treatment attrition and outcomes after residential treatment for cocaine dependence. *J Stud Alcohol Drugs* 68: 641-648.
- Rouge-Pont F, Deroche V, Le Moal M and Piazza PV (1998) Individual differences in stress-induced dopamine release in the nucleus accumbens are influenced by corticosterone. *Eur J Neurosci* 10: 3903-3907.
- Saccone NL, Wang JC, Breslau N, Johnson EO, Hatsukami D, Saccone SF, Grucza RA, Sun L, Duan W, Budde J, *et al.* (2009) The CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 nicotinic receptor subunit gene cluster affects risk for nicotine dependence in African-Americans and in European-Americans. *Cancer Res* 69: 6848-6856.
- Saccone SF, Hinrichs AL, Saccone NL, Chase GA, Konvicka K, Madden PA, Breslau N, Johnson EO, Hatsukami D, Pomerleau O, *et al.* (2007) Cholinergic nicotinic receptor genes implicated in a nicotine dependence association study targeting 348 candidate genes with 3713 SNPs. *Hum Mol Genet* 16: 36-49.
- Sapolsky RM, Romero LM and Munck AU (2000) How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev* 21: 55-89.

- Savory JG, Prefontaine GG, Lamprecht C, Liao M, Walther RF, Lefebvre YA and Hache RJ (2001) Glucocorticoid receptor homodimers and glucocorticoid-mineralocorticoid receptor heterodimers form in the cytoplasm through alternative dimerization interfaces. *Mol Cell Biol* 21: 781-793.
- Schafer I, Langeland W, Hissbach J, Luedecke C, Ohlmeier MD, Chodzinski C, Kemper U, Keiper P, Wedekind D, Havemann-Reinecke U, *et al.* (2010) Childhood trauma and dissociation in patients with alcohol dependence, drug dependence, or both-A multi-center study. *Drug Alcohol Depend* 109: 84-89.
- Scheidweiler KB, Plessinger MA, Shojaie J, Wood RW and Kwong TC (2003) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of methylecgonidine, a crack cocaine pyrolyzate. *J Pharmacol Exp Ther* 307: 1179-1187.
- Schlaepfer IR, Hoft NR, Collins AC, Corley RP, Hewitt JK, Hopfer CJ, Lessem JM, McQueen MB, Rhee SH and Ehringer MA (2008) The CHRNA5/A3/B4 gene cluster variability as an important determinant of early alcohol and tobacco initiation in young adults. *Biol Psychiatry* 63: 1039-1046.
- Schoneveld OJ, Gaemers IC and Lamers WH (2004) Mechanisms of glucocorticoid signalling. *Biochim Biophys Acta* 1680: 114-128.
- Scott TJL, Heil SH, Higgins ST, Badger GJ and Bernstein IM (2009) Depressive symptoms predict smoking status among pregnant women. *Addict Behav* 34: 705-708.
- Secnik K, Swensen A and Lage MJ (2005) Comorbidities and costs of adult patients diagnosed with attention-deficit hyperactivity disorder. *Pharmacoeconomics* 23: 93-102.
- Sherva R, Kranzler HR, Yu Y, Logue MW, Poling J, Arias AJ, Anton RF, Oslin D, Farrer LA and Gelernter J (2010) Variation in nicotinic acetylcholine receptor genes is associated with multiple substance dependence phenotypes. *Neuropsychopharmacology* 35: 1921-1931.
- Siahpush M and Carlin JB (2006) Financial stress, smoking cessation and relapse: results from a prospective study of an Australian national sample. *Addiction* 101: 121-127.
- Siiskonen SJ, Visser LE, Tiemeier H, Hofman A, Lamberts SW, Uitterlinden AG and Stricker BH (2009) BclII glucocorticoid receptor polymorphism and smoking in the general population. *Addict Biol* 14: 349-355.

- Sinha R (2001) How does stress increase risk of drug abuse and relapse? *Psychopharmacology (Berl)* 158: 343-359.
- Sinha R (2008) Chronic stress, drug use, and vulnerability to addiction. *Ann N Y Acad Sci* 1141: 105-130.
- Sinha R, Garcia M, Paliwal P, Kreek MJ and Rounsaville BJ (2006) Stress-induced cocaine craving and hypothalamic-pituitary-adrenal responses are predictive of cocaine relapse outcomes. *Arch Gen Psychiatry* 63: 324-331.
- Sousa NO, Grevet EH, Salgado CA, Silva KL, Victor MM, Karam RG, Vitola ES, Picon FA, Zeni GD, Rohde LA, *et al.* (2011) Smoking and ADHD: an evaluation of self medication and behavioral disinhibition models based on comorbidity and personality patterns. *J Psychiatr Res* 45: 829-834.
- Spijker AT, Giltay EJ, van Rossum EF, Manenschijs L, Derijk RH, Haffmans J, Zitman FG and Hoencamp E (2011) Glucocorticoid and mineralocorticoid receptor polymorphisms and clinical characteristics in bipolar disorder patients. *Psychoneuroendocrinology*.
- Spijker AT, van Rossum EF, Hoencamp E, DeRijk RH, Haffmans J, Blom M, Manenschijs L, Koper JW, Lamberts SW and Zitman FG (2009) Functional polymorphism of the glucocorticoid receptor gene associates with mania and hypomania in bipolar disorder. *Bipolar Disord* 11: 95-101.
- Spratt EG, Back SE, Yeatts SD, Simpson AN, McRae-Clark A, Moran-Santa Maria MM, Price KL, Hartwell KT and Brady KT (2009) Relationship between child abuse and adult smoking. *Int J Psychiatry Med* 39: 417-426.
- Steptoe A and Ussher M (2006) Smoking, cortisol and nicotine. *Int J Psychophysiol* 59: 228-235.
- Sullivan D, Pinsonneault JK, Papp AC, Zhu H, Lemeshow S, Mash DC and Sadee W (2013) Dopamine transporter DAT and receptor DRD2 variants affect risk of lethal cocaine abuse: a gene-gene-environment interaction. *Transl Psychiatry* 3: e222.
- Sullivan PF, Jiang Y, Neale MC, Kendler KS and Straub RE (2001) Association of the tryptophan hydroxylase gene with smoking initiation but not progression to nicotine dependence. *Am J Med Genet* 105: 479-484.
- Sutton RE, Koob GF, Le Moal M, Rivier J and Vale W (1982) Corticotropin releasing factor produces behavioural activation in rats. *Nature* 297: 331-333.

- Szczepankiewicz A, Leszczynska-Rodziewicz A, Pawlak J, Rajewska-Rager A, Dmitrzak-Weglarz M, Wilkosc M, Skibinska M and Hauser J (2011) Glucocorticoid receptor polymorphism is associated with major depression and predominance of depression in the course of bipolar disorder. *J Affect Disord* 134: 138-144.
- Thierry AM, Tassin JP, Blanc G and Glowinski J (1976) Selective activation of mesocortical DA system by stress. *Nature* 263: 242-244.
- Thorgeirsson TE, Gudbjartsson DF, Surakka I, Vink JM, Amin N, Geller F, Sulem P, Rafnar T, Esko T, Walter S, *et al.* (2010) Sequence variants at CHRN3-CHRNA6 and CYP2A6 affect smoking behavior. *Nat Genet* 42: 448-453.
- Tobacco and Genetics Consortium (2010) Genome-wide meta-analyses identify multiple loci associated with smoking behavior. *Nat Genet* 42: 441-447.
- Trapp T, Rupprecht R, Castren M, Reul JM and Holsboer F (1994) Heterodimerization between mineralocorticoid and glucocorticoid receptor: a new principle of glucocorticoid action in the CNS. *Neuron* 13: 1457-1462.
- Treutlein J, Cichon S, Ridinger M, Wodarz N, Soyka M, Zill P, Maier W, Moessner R, Gaebel W, Dahmen N, *et al.* (2009) Genome-wide association study of alcohol dependence. *Arch Gen Psychiatry* 66: 773-784.
- Turner JD, Alt SR, Cao L, Vernocchi S, Trifonova S, Battello N and Muller CP (2010) Transcriptional control of the glucocorticoid receptor: CpG islands, epigenetics and more. *Biochem Pharmacol* 80: 1860-1868.
- United Nations Office on Drugs and Crime (2012) World Drug Report 2012. World Drug Report 2012 (United Nations Publication, Sales No. E.12.XI.1).
- van Leeuwen N, Bellingrath S, de Kloet ER, Zitman FG, DeRijk RH, Kudielka BM and Wust S (2010) Human mineralocorticoid receptor (MR) gene haplotypes modulate MR expression and transactivation: implication for the stress response. *Psychoneuroendocrinology* 36: 699-709.
- van Leeuwen N, Kumsta R, Entringer S, de Kloet ER, Zitman FG, DeRijk RH and Wust S (2009) Functional mineralocorticoid receptor (MR) gene variation influences the cortisol awakening response after dexamethasone. *Psychoneuroendocrinology* 35: 339-349.
- Viengchareun S, Le Menuet D, Martinerie L, Munier M, Pascual-Le Tallec L and Lombes M (2007) The mineralocorticoid receptor: insights into its molecular and (patho)physiological biology. *Nucl Recept Signal* 5: e012.

- Wand GS, Oswald LM, McCaul ME, Wong DF, Johnson E, Zhou Y, Kuwabara H and Kumar A (2007) Association of amphetamine-induced striatal dopamine release and cortisol responses to psychological stress. *Neuropsychopharmacology* 32: 2310-2320.
- Weiss RD, Griffin ML, Mazurick C, Berkman B, Gastfriend DR, Frank A, Barber JP, Blaine J, Salloum I and Moras K (2003) The relationship between cocaine craving, psychosocial treatment, and subsequent cocaine use. *Am J Psychiatry* 160: 1320-1325.
- Wilkins JN, Carlson HE, Van Vunakis H, Hill MA, Gritz E and Jarvik ME (1982) Nicotine from cigarette smoking increases circulating levels of cortisol, growth hormone, and prolactin in male chronic smokers. *Psychopharmacology (Berl)* 78: 305-308.
- Wills TA, Sandy JM and Yaeger AM (2002) Stress and smoking in adolescence: a test of directional hypotheses. *Health Psychol* 21: 122-130.
- Winhusen T, Somoza E, Harrer JM, Moore E, Ussery T, Kropp F, Singal B, Elkashef A and Mojsiak J (2005) Metyrapone and cocaine: a double-blind, placebo-controlled drug interaction study. *Pharmacol Biochem Behav* 80: 631-638.
- Winternitz WW and Quillen D (1977) Acute hormonal response to cigarette smoking. *J Clin Pharmacol* 17: 389-397.
- World Health Organization (2011) WHO report on the global tobacco epidemic, 2011: warning about the dangers of tobacco.
- Wu NS, Schairer LC, Dellor E and Grella C (2010) Childhood trauma and health outcomes in adults with comorbid substance abuse and mental health disorders. *Addict Behav* 35: 68-71.
- Zennaro MC, Farman N, Bonvalet JP and Lombes M (1997) Tissue-specific expression of alpha and beta messenger ribonucleic acid isoforms of the human mineralocorticoid receptor in normal and pathological states. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 1345-1352.
- Zhou Y, Proudnikov D, Yuferov V and Kreek MJ (2010) Drug-induced and genetic alterations in stress-responsive systems: Implications for specific addictive diseases. *Brain Res* 1314: 235-252.
- Zuk O, Hechter E, Sunyaev SR and Lander ES (2012) The mystery of missing heritability: Genetic interactions create phantom heritability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 1193-1198.

Anexo 1 – Produção Científica Adicional no Período de Mestrado

- Mota, N. R., **Rovaris, D. L.**, Bertuzzi, G. P., Contini, V., Vitola, E. S., Grevet, E. H., Roman, T., Callegari-Jacques, S. M., Hutz, M. H. and Bau, C. H. D. DRD2/DRD4 heteromerization may influence genetic susceptibility to alcohol dependence. *Molecular Psychiatry*. 2012 May 8. doi: 10.1038/mp.2012.50, 2012 [Epub ahead of print].
- Kortmann, G. L., Contini, V., Bertuzzi, G. P., Mota, N. R., **Rovaris, D. L.**, Paixao-Cortes, V. R., Lima, L. L., Grevet, E. H., Salgado, C. A. I., Vitola, E. S., Belmonte-de-Abreu, P., Rohde, L. A. and Bau, C. H. D. The role of a mineralocorticoid receptor gene functional polymorphism in the symptom dimensions of persistent ADHD. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*. 2012 May 15 [Epub ahead of print].
- Contini, V., **Rovaris, D. L.**, Victor, M. M., Grevet, E. H., Rohde, L. A., and Bau, C. H. Pharmacogenetics of response to methylphenidate in adult patients with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD): A systematic review. *European Neuropsychopharmacology*. 2012 Jun 16 [Epub ahead of print].
- Silva, K. L., **Rovaris, D. L.**, Guimarães-da-Silva, P. O., Grevet, E. H., Victor, M. M., Salgado, C. A. I., Vitola, E. S., Contini, V., Bertuzzi, G. P., Picon, F. A., Karam, R. G., Belmonte-de-Abreu, P., Rohde, L. A. and Bau, C. H. D. Could comorbid bipolar disorder account for a significant share of executive function deficits in adults with ADHD? *Submetido*.
- Victor, M. M., Grevet, E. H., Salgado, C. A. I., Silva, K. L., Karam, R. G., Vitola, E. S., Picon, F. A., Contini, V., **Rovaris, D. L.**, Guimarães-da-Silva, P. O., Blaya-Rochal, P., Belmonte-de-Abreu, P., Rohde, L. A. and Bau, C. H. D. Severity but not comorbidities predicts response to methylphenidate in adults with ADHD: results from a naturalistic study. *Submetido*.
- Busatto, M., Fraga, F., **Rovaris, D. L.**, Boquett, J. A., Faccini, L. S., Chies, J. A. B. and Vianna, P. Apoptosis in preeclampsia: are there any effects of TP53, MDM2 and LIF polymorphisms in disease development? *Submetido*.

Anexo 2 – Aprovação Comissão de Ética em Pesquisa do HCPA**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE**
Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação

COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

RESOLUÇÃO

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

Projeto: 01-321**Versão do Projeto:** 22/01/2002**Versão do TCLE:** 22/01/2002**Pesquisadores:**

PAULO SILVA BELMONTE DE ABREU

CLAITON H. O. BAU

EUGENIO GREVET

CARLOS ALBERTO IGLESIAS SALGADO

BETINA CHAIT

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

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

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

Porto Alegre, 25 de janeiro de 2002.

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

Anexo 3 – Aprovação Comissão de Ética em Pesquisa da PUCRS**Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul**Faculdade de Psicologia
Programa de Pós-Graduação em Psicologia

Ofício 063/2010 – SGL

Porto Alegre, 16 de novembro de 2010.

Senhor(a) Pesquisador(a)

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

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

Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Margareth da Silva Oliveira', written over a horizontal line.

Prof. Dra. Margareth da Silva Oliveira

Coordenadora da Comissão Científica da Faculdade de Psicologia

Ilmo(a) Sr(a)

Prof. Orientador: Rodrigo Grassi de Oliveira

Pesquisador(a): Ingrid D'Avila Francke

PUCRS**Campus Central**

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

Porto Alegre – RS – Brasil

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

E-mail: psicologia-pg@pucrs.brwww.pucrs.br/psipos

Anexo 4 – Teste de Dependência à Nicotina de Fagerström (FTND)

Quadro 1 - Itens e escore do Teste de Dependência à Nicotina de Fagerström (FTND): Pontos

1. Quanto tempo após acordar você fuma seu primeiro cigarro?	
(1) Dentro de 5 minutos	3
(2) Entre 6-30 minutos	2
(3) Entre 31-60 minutos	1
(4) Após 60 minutos	0
(5) Não fuma	
2. Você acha difícil não fumar em lugares proibidos, como igrejas, ônibus, etc.?	
(1) Sim	1
(0) Não	0
3. Qual cigarro do dia traz mais satisfação?	
(1) O primeiro da manhã	1
(2) Outros	0
(3) Nenhum	
4. Quantos cigarros você fuma por dia?	
(1) Menos de 10	0
(2) De 11 a 20	1
(3) De 21 a 30	2
(4) Mais de 31	3
(5) Não fuma	
5. Você fuma mais freqüentemente pela manhã?	
(1) Sim	1
(0) Não	0
6. Você fuma mesmo doente?	
(1) Sim	1
(0) Não	0

Conclusão sobre o grau de dependência:

0 - 2 pontos = muito baixo

3 - 4 pontos = baixo

5 pontos = médio

6 -7 pontos = elevado

8 -10 pontos = muito elevado

(Uma soma acima de 6 pontos indica que, provavelmente, o paciente sentirá desconforto (síndrome de abstinência) ao deixar de fumar). (13)

Anexo 5 – Avaliação de Severidade Seletiva para Cocaína – CSSA

AVALIAÇÃO DE SEVERIDADE SELETIVA PARA COCAÍNA – CSSA

Dias de abstinência:Data aplicação..... N° da aplicação.....

Marque em qualquer lugar da escala abaixo e conforme a severidade dos sinais e sintomas :

1- HIPERFAGIA

|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
0 7

0 = apetite normal
3-4 = come muito mais que o usual
7 = come mais de duas vezes a quantidade usual de comida

2 – HIPOFAGIA

|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
0 7

0 = apetite normal
3-4 = come menos da metade da quantidade normal de comida
7 = não tem apetite

3 – FISSURA POR CARBOIDRATO

|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
0 7

0 = sem fissura
3-4 = forte fissura por doces, metade do tempo
7 = forte fissura por doces, todo o tempo

4 – Marque o desejo mais forte por crack que você sentiu nas últimas 24 horas:

|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
0 7

sem desejo incapaz de resistir

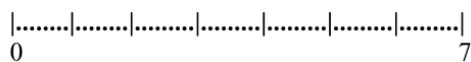
5 – Marque qual a frequência da ânsia por usar crack nas últimas 24 horas.

|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
0 7

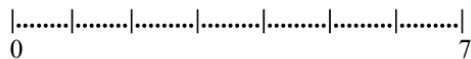
nunca todo o tempo

6 – BRADICARDIA

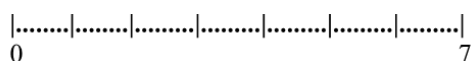
0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7
 + que 64 | 64-63 | 62-61 | 60-59 | 58-57 | 56-55 | 54-53 | - que 53

7 – SONO I

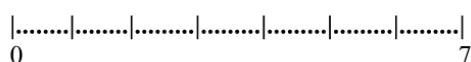
0 = quantidade normal de sono
 3-4 = metade da quantidade normal
 7 = sem sono

8 – SONO II

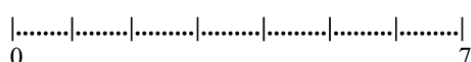
0 = quantidade de sono normal
 3-4 = consegue dormir ou dorme metade do dia
 7 = dorme ou consegue dormir todo o tempo

9 – ANSIEDADE

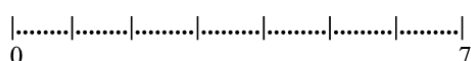
0 = geralmente não se sente ansioso
 3-4 = sente-se ansioso metade do tempo
 7 = sente-se ansioso todo o tempo

10 – NÍVEL DE ENERGIA

0 = sente-se alerta e tem a quantidade de energia usual
 3-4 = sente-se cansado a metade do tempo
 7 = sente-se cansado todo o tempo

11 – NÍVEL DE ATIVIDADE

0 = sem alterações em atividades usuais
 3-4 = participa da metade das atividades usuais
 7 = sem participação em atividades usuais

12 – NÍVEL DE TENSÃO

0-1 = raramente sente-se tenso
 3-4 = sente-se tenso metade do tempo
 7 = sente-se tenso a maior parte ou todo o tempo

13 – ATENÇÃO

|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
0 7



0 = capaz de se concentrar para ler, conversar, fazer tarefas e planejar sem dificuldades
3-4 = tem dificuldade com os itens acima metade do tempo
7 = tem dificuldade com os itens acima todo o tempo

14 –IDEAÇÃO PARANÓIDE

|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
0 7



0 = sem evidência de pensamentos paranóicos
3-4 = incapaz de confiar em alguém
5 = sente que as pessoas estão querendo pegá-lo (sente-se perseguido ou espiado).
7 = sente que determinada pessoa/grupo está tramando contra você

15 – ANEDONIA

|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
0 7



0 = a capacidade de divertir-se permanece inalterada
3-4 = capaz de divertir-se metade do tempo
7 = incapaz de divertir-se

16 –DEPRESSÃO

|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
0 7



0 = sem sentimentos relacionados a tristeza ou depressão
3-4 = sente-se triste ou deprimido metade do tempo
7 = sente-se deprimido todo o tempo

17 – SUICÍDIO

|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
0 7



0 = não pensa a respeito de morte
3-4 = sente como se a vida não valesse ser vivida
7 = sente-se como se a vida estivesse terminando.

18 – IRRITABILIDADE

|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
0 7



0 = sente que a maioria das coisas não são irritantes
3-4 = sente que muitas coisas são irritantes
7 = sente que a maior parte das coisas são irritantes ou perturbadoras

Total: _____ Paciente: _____

Anexo 6 – Questionário de Trauma na Infância (CTQ)

QUESTI

Identificação:protocolo.....
 Idade: _____ Sexo: _____

As afirmações abaixo se referem a algumas experiências de quando você era criança ou adolescente.

Embora estas afirmações sejam de natureza pessoal, por favor, responda o mais sinceramente possível.

Para cada afirmação, circule a resposta que melhor descreve o que você acha que ocorreu enquanto crescia.

Se você desejar mudar sua resposta, coloque um **X** na antiga e circule a nova escolha.

Enquanto eu crescia...	Nunca	Poucas Vezes	Às Vezes	Muitas Vezes	Sempre
1. Eu não tive o suficiente para comer.	•	•	•	•	•
2. Eu soube que havia alguém para me cuidar e proteger.	•	•	•	•	•
3. As pessoas da minha família me chamaram de coisas do tipo "estúpido (a)", "preguiçoso (a)" ou "feio (a)".	•	•	•	•	•
4. Meus pais estiveram muito bêbados ou drogados para poder cuidar da família.	•	•	•	•	•
5. Houve alguém na minha família que ajudou a me sentir especial ou importante.	•	•	•	•	•
6. Eu tive que usar roupas sujas.	•	•	•	•	•
7. Eu me senti amado (a).	•	•	•	•	•
8. Eu achei que meus pais preferiam que eu nunca tivesse nascido.	•	•	•	•	•
9. Eu apanhei tanto de alguém da minha família que tive de ir ao hospital ou consultar um médico.	•	•	•	•	•
10. Não houve nada que eu quisesse mudar na minha família.	•	•	•	•	•
11. Alguém da minha família me bateu tanto que me deixou com machucados roxos.	•	•	•	•	•
12. Eu apanhei com cinto, vara, corda ou outras coisas que machucaram.	•	•	•	•	•
13. As pessoas da minha família cuidavam umas das outras.	•	•	•	•	•
14. Pessoas da minha família disseram coisas que me machucaram ou me ofenderam.	•	•	•	•	•
15. Eu acredito que fui maltratado (a) fisicamente.	•	•	•	•	•
16. Eu tive uma ótima infância.	•	•	•	•	•
17. Eu apanhei tanto que um professor, vizinho ou médico chegou a notar.	•	•	•	•	•
18. Eu senti que alguém da minha família me odiava.	•	•	•	•	•
19. As pessoas da minha família se sentiam unidas.	•	•	•	•	•
20. Tentaram me tocar ou me fizeram tocar de uma maneira sexual.	•	•	•	•	•
21. Ameaçaram me machucar ou contar mentiras sobre mim se eu não fizesse algo sexual.	•	•	•	•	•
22. Eu tive a melhor família do mundo.	•	•	•	•	•
23. Tentaram me forçar a fazer algo sexual ou assistir coisas sobre sexo.	•	•	•	•	•
24. Alguém me molestou.	•	•	•	•	•
25. Eu acredito que fui maltratado (a) emocionalmente.	•	•	•	•	•
26. Houve alguém para me levar ao médico quando eu precisei.	•	•	•	•	•
27. Eu acredito que fui abusado (a) sexualmente.	•	•	•	•	•
28. Minha família foi uma fonte de força e apoio.	•	•	•	•	•