

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

**Sistema de Estresse e Uso de Substâncias:
Efeito de polimorfismos no gene *CRHR1* nas dependências
de *crack* e nicotina**

Guilherme Pinto Bertuzzi

Porto Alegre
Março de 2013

GUILHERME PINTO BERTUZZI

**Sistema de Estresse e Uso de Substâncias:
Efeito de polimorfismos no gene *CRHR1* nas dependências
de *crack* e nicotina**

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

Orientador: Prof. Dr. Claiton H. D. Bau
Co-orientador: Prof. Dr. Rodrigo Grassi-Oliveira

Porto Alegre
Março de 2013

FONTES FINANCIADORAS

As pesquisas foram realizadas no Laboratório de Genética Humana Molecular do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e foram subsidiadas pelas seguintes agências financiadoras: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Instituto do Milênio, Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX, Brasil) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS – DECIT/PPSUS, Brasil).

O aluno recebeu bolsa de estudos concedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

AGRADECIMENTOS

Ao meu **orientador**, Prof. **Claiton** Bau, pela orientação pertinente e constante. Pela disponibilidade e compreensão, com as quais sempre conduziu a construção desse trabalho.

Ao meu **co-orientador**, Prof. **Rodrigo** Grassi de Oliveira, pela oportunidade de desenvolver essa colaboração, assim como a todos os psiquiatras e psicólogos que integram a equipe de coleta de dados clínicos.

À **Verônica** Contini, por todas as orientações dadas desde o ingresso no laboratório. Também por ser uma companhia constante e uma eterna colega, que se mantém próxima mesmo com o passar do tempo.

Aos colegas da **Sala 109**, **Nina**, **Diego**, **Renata**, **Evelise**, **Lucas**, **Gabriela** e **Jaqueline**, por todo companheirismo e convivência agradável ao longo dos anos no Departamento. Em especial, ao **Diego** Rovaris, pela disponibilidade e competência na assessoria estatística desse trabalho.

À **Katiane** Silva, pela relação serena e animada. Por permitir uma interação essencial entre as áreas Clínica e Genética do nosso grupo de pesquisa e, especialmente, pelas manhãs divertidas de trabalho no campus.

Aos **colegas** dos **Laboratórios 114 e 116**, por favorecerem a criação de um ambiente de trabalho tranquilo e de muita interação. Ainda, pela companhia nos almoços, cafés, etc.

Aos **euamigos**, em especial à **Letícia**, à **Fernanda**, e à **Karina**. Por, através da diversidade de interesses e atuações, permitirem o meu crescimento e solidificação enquanto geneticista e biólogo.

À **Raíssa**, por fazer parte da minha vida. Por acompanhar cada momento dos últimos meses da construção desse trabalho, com muito apoio, compreensão e tolerância.

Aos meus **pais**, **Arthur** e **Rose**, pelo apoio e suporte sempre. Por serem os pais que são, capazes de fornecer um ambiente familiar com muita solidez e união, essenciais às nossas vidas e ao meu crescimento. Muito obrigado.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	5
RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	9
1 INTRODUÇÃO.....	11
1.1 Transtornos por Uso de Substâncias.....	12
1.1.1 Dependência de <i>crack</i>	14
1.1.2 Tabagismo.....	16
1.1.3 Etiologia e Herdabilidade.....	17
1.2 Sistema de Estresse: O Eixo HPA e Dependência Química.....	18
1.2.1 Genética, eixo HPA e fenótipos psiquiátricos.....	19
1.2.2 Gene <i>CRHR1</i>	20
2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	24
3 ARTIGO EM PREPARAÇÃO <i>Association of a CRHR1 gene polymorphism with tobacco and crack cocaine smoking.....</i>	27
4 ARTIGO EM PREPARAÇÃO <i>Childhood trauma exposure, polymorphisms on CRHR1 gene and crack cocaine dependence: a gene-environment approach on severity and craving in a sample of women</i>	46
5 DISCUSSÃO.....	61
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACTH Hormônio Adrenocorticotrófico
- APA Associação Norte-Americana de Psiquiatria
- ASI6* *Addiction Severity Index*
- AUTS2* Gene que codifica proteína envolvida na susceptibilidade ao Autismo
- CCQ* *Cocaine Craving Questionnaire*
- CEBRID Centro Brasileiro de Informações Sobre Drogas Psicotrópicas
- CHRNA5-A3-B4* *Cluster* gênico que codifica as subunidade $\alpha 5$, $\alpha 3$ e $\beta 4$ dos receptores nicotínicos
- CRH* Gene que codifica o CRH
- CRH Hormônio liberador de corticotrofina
- CRHBP* Gene que codifica proteína ligante de CRH
- CRHR1* Gene que codifica o receptor tipo 1 de CRH
- CRHR2* Gene que codifica o receptor tipo 2 de CRH
- CSSA* *Cocaine Selective Severity Assessment*
- CTQ* *Childhood Trauma Questionnaire*
- DSM Manual Estatístico e Diagnóstico de Transtornos Mentais
- FTND Teste Fagerström para Dependência de Nicotina
- GWAS *Genome-Wide Association Study* (Estudo de Associação por Varredura Genômica)
- HPA Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
- HTR1B* Gene que codifica o receptor 1b de serotonina
- INCA Instituto Nacional do Câncer
- MC2R* Gene que codifica receptor de ACTH
- nAChR Receptor nicotínico de acetilcolina
- NR3C1* Gene que codifica o receptor de glicocorticóide
- NR3C2* Gene que codifica o receptor de mineralocorticóide
- POMC* Gene que codifica proteína precursora de ACTH
- SNP *Single Nucleotide Polymorphism* (Polimorfismo de Base Única)

TC Transtorno de Conduta
TDAH Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade
TEPT Transtorno de Estresse Pós-Traumático
TOD Transtorno de Oposição e Desafio
TPAS Transtorno de Personalidade Anti-Social
TUS Transtornos por Uso de Substâncias

RESUMO

Os Transtornos por Uso de Substâncias (TUS) são propostos pela Associação Norte-Americana de Psiquiatria e englobam diversas dependências químicas, incluindo o tabagismo e a dependência de *crack*. O uso de *crack* tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, segundo dados de levantamentos brasileiros e mundiais. Com mecanismo de ação semelhante ao da cocaína, porém com efeito mais rápido, o *crack* é uma droga que causa grave prejuízo a seus usuários e conduz à dependência em pouco tempo. O tabagismo também é uma condição bastante prevalente no mundo inteiro, sendo que os prejuízos relacionados a esse transtorno envolvem principalmente o desenvolvimento de doenças respiratórias e câncer. Diversos trabalhos têm buscado identificar fatores de suscetibilidade a esses transtornos, sendo que estudos de associação envolvendo genes do sistema de resposta a estresse vêm ganhando importância. O eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA) é o sistema de resposta a estresse mais conhecido em humanos e alvo do presente trabalho, uma vez que o funcionamento dessa cascata de sinalização da produção de cortisol pode desempenhar um papel relevante no desenvolvimento de psicopatologias. Além disso, o eixo HPA pode ser considerado um mediador da relação entre situações adversas na infância e o surgimento de TUS. O objetivo desse trabalho, portanto, é investigar o papel de polimorfismos no gene *CRHR1* (que codifica o receptor tipo 1 do hormônio liberador de corticotrofina – CRH, hormônio inicial do eixo HPA) sobre o desenvolvimento e características clínicas da dependência química. Para isso, foram realizados dois estudos, envolvendo amostras de mulheres. No primeiro artigo, a partir de três amostras – (1) 136 usuárias de *crack*, (2) 55 tabagistas e (3) 262 voluntárias saudáveis – foram identificadas diferenças de frequências alélicas e genotípicas do SNP rs12944712; além disso, a análise de haplótipos envolvendo tal SNP e o rs110402 revelou maior frequência do haplótipo contendo o alelo G nos dois polimorfismos nos grupos de usuárias de *crack* e tabagistas. No segundo artigo, foi avaliado o efeito da interação gene-ambiente envolvendo os mesmos polimorfismos e situações adversas na infância – estimada pela escala *Childhood Trauma Questionnaire (CTQ)* –

sobre características clínicas da amostra de usuárias de *crack*, como *craving* e gravidade da dependência – estimados, respectivamente, pelas escalas *Cocaine Selective Severity Assessment (CSSA)* e *Addiction Severity Index (ASI6)*. A análise não revelou uma interação significativa. A presente dissertação, portanto, revela um efeito do gene *CRHR1* sobre o desenvolvimento de TUS, embora esse efeito pareça não se manifestar sobre a gravidade. Mais estudos são necessários visando esclarecer o real efeito do gene e do eixo HPA como um todo sobre os fenótipos e comportamentos aditivos, bem como os mecanismos subjacentes a essa relação.

Palavras chave: *Crack* · Tabagismo · Eixo HPA · Receptor de CRH · *CRHR1*.

ABSTRACT

The Substance Use Disorders (SUD) are proposed by the American Psychiatric Association and comprise several addictions, including tobacco and crack cocaine smoking. The prevalence of crack cocaine dependence has grown considerably, according to survey data from Brazil and worldwide. With mechanism of action similar to cocaine but with faster effect, crack is a drug that causes severe impairments to its users and leads to dependence in a short time. Tobacco smoking is also a highly prevalent condition worldwide, and the impact related to this disorder includes cancer and respiratory diseases. Several studies have attempted the identification of susceptibility factors to these disorders, and association studies involving stress response system genes have been performed. The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) axis is the best known stress response system, and the signaling cascade production of cortisol may play a role in the development of psychopathology. In addition, HPA axis can be considered a mediator of the relationship between early life adversity and SUD. The aim of this study is to investigate the role of polymorphisms in *CRHR1* gene (encoding the corticotrophin releasing factor – CRH – receptor type 1, an initial factor in HPA axis response) on the development and clinical traits of drug dependence. Two studies were conducted on women samples. In the first article, three groups were compared - (1) 136 crack smokers, (2) 55 tobacco smokers and (3) 262 healthy volunteers. Differences in allele and genotype frequencies of the SNP rs12944712 were identified; in addition, the haplotype analysis involving this SNP and rs110402 revealed a higher frequency of the haplotype containing G allele in both polymorphisms in the groups of nicotine dependents and crack smokers. In the second article, we evaluated the effect of a gene-environment interaction involving the same polymorphisms and childhood adversity - estimated by Childhood Trauma Questionnaire (CTQ) scale – on clinical characteristics of the sample of crack users, such as craving and severity of dependence - estimated respectively by the Cocaine Selective Severity Assessment (CSSA) and Addiction Severity Index (ASI6) scales. The analysis did not reveal a significant interaction. This dissertation thus shows an effect of *CRHR1* gene

polymorphism on the development of SUD, although this effect does not seem to impact disorder severity. More studies are needed in order to clarify the actual effect of the gene and of the HPA axis as a whole on addictive behaviors.

Keywords: Crack · Smoking · HPA Axis · CRH receptors · *CRHR1*.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Transtornos por Uso de Substâncias

Os transtornos por uso de substâncias (TUS), de acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-IV), da *American Psychiatric Association* (APA, 2004), englobam o abuso e a dependência de diferentes substâncias (álcool, nicotina, cocaína, anfetaminas, canabinóides, alucinógenos, etc.). A dependência a uma substância é caracterizada pela presença de três ou mais sintomas, apresentados a seguir, ocorrendo conjuntamente durante um período de 12 meses:

- Tolerância, definida pela necessidade de quantidades maiores da substância para atingir a intoxicação ou o efeito desejado; ou pelo efeito marcadamente diminuído com o uso continuado da mesma quantidade da substância.
- Abstinência, definida pela síndrome de abstinência característica da substância; ou quando a mesma substância (ou proximamente relacionada) é utilizada para aliviar ou evitar sintomas de abstinência.
- A substância freqüentemente é utilizada em quantidades maiores ou por um período mais longo do que pretendido.
- Há desejo persistente ou esforços sem sucesso de diminuir ou controlar o uso da substância.
- Uma grande quantidade de tempo é gasta em atividades necessárias para obter a substância, utilizando a substância ou se recuperando dos seus efeitos.
- Atividades sociais, ocupacionais ou recreativas são abandonadas ou reduzidas devido ao uso da substância.
- O uso da substância é mantido apesar do conhecimento da ocorrência de problema físico ou psicológico recorrente ou persistente que provavelmente foi causado ou exacerbado pela substância. (APA, 2004).

Além disso, os TUD são considerados transtornos psiquiátricos externalizantes, historicamente definidos como uma forma de comportamento caracterizada por ações impulsivas hiperativas, agressividade e quebra de regras (Farmer *et al.*, 2009). São também considerados transtornos

externalizantes o Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH), Transtorno de Conduta (TC), Transtorno de Oposição e Desafio (TOD) e Transtorno de Personalidade Anti-social (TPAS). A ocorrência conjunta desses transtornos ao longo do desenvolvimento é extremamente freqüente (Costello *et al.*, 2003; Egger e Angold, 2006), sugerindo mecanismos etiológicos e fisiopatogênicos semelhantes entre eles.

Em geral, os transtornos externalizantes são considerados preditores de TUS e essa relação pode ser mediada pelo conceito de Desinibição Comportamental (Tarter *et al.*, 2003; Young *et al.*, 2009), o qual consiste no déficit na habilidade de inibir ações que visem uma gratificação imediata, mesmo que estas possam levar a conseqüências negativas a médio e longo prazo (Young *et al.*, 2009). Estudos relatam associação entre TUS e TDAH, TOD, TC e TPAS (Couwenbergh *et al.*, 2006; Wilens *et al.*, 2011). O aumento dos transtornos externalizantes em pacientes com TUS é uma característica significativa em homens e mulheres. Entretanto, alguns estudos sugerem que em pacientes do sexo feminino, fenótipos de internalização também se destacam como relacionados ao desenvolvimento da dependência (Dakof, 2000; Edokpolo *et al.*, 2010). Além disso, são conhecidas variações de dimensões de temperamento, como o aumento de busca de novidades, em indivíduos com transtornos externalizantes, (Kim *et al.*, 2010; Purper-Ouakil *et al.*, 2010), o que também pode ser verificado em situações de dependência química e tabagismo (Chakroun *et al.*, 2010; Sousa *et al.*, 2011).

Condições ambientais, como nível socioeconômico, problemas familiares e presença de TUS nos pais podem ser considerados fatores de susceptibilidade ao uso de substâncias (Kirisci *et al.*, 2005). Essas características demográficas e psicológicas, que por sua vez podem estar associadas tanto a fatores genéticos como do ambiente, podem também estar envolvidas na dependência ao *crack* e nicotina.

Os TUS mais comuns na maioria dos países para os quais há dados epidemiológicos disponíveis são as dependências de álcool e de nicotina. No entanto, muitas outras substâncias psicoativas costumam ser usadas, embora cada uma delas apresente uma variação conforme a disponibilidade em cada país (CEBRID, 2006; UNODC, 2012). A presente dissertação terá como foco as Dependências de *crack* e de nicotina, como apresentado a seguir.

1.1.1 Dependência de *crack*

O *crack*, também chamado de cocaína fumada, é uma droga psicoativa gerada a partir da adição de água e bicarbonato de sódio ao cloridrato de cocaína. As pedras geradas podem ser fumadas em cachimbos e possuem efeito semelhante ao da cocaína. A adição desses compostos à pasta de cocaína faz com que o *crack* seja uma droga muito mais barata e esse é um dos principais fatores que contribuiu para a popularização do seu consumo.

O mecanismo de ação do *crack* é similar ao da cocaína, uma vez que o composto psicoativo é o mesmo. A droga atua inibindo transportadores de monoaminas, principalmente dopamina (Nestler, 2005). O aumento desses neurotransmissores na fenda sináptica está envolvido com os efeitos de euforia, bem-estar e sentimentos de competência descritos durante o uso. Todavia, devido ao fato de o *crack* ser absorvido através dos pulmões, o princípio ativo chega mais rapidamente ao cérebro, gerando um efeito muito mais rápido e intenso do que nas outras formas de utilização da cocaína (Gossop *et al.*, 1994). Como a duração dos efeitos é muito mais curta, a sensação de fissura (ou *craving*¹) é potencializada e então o uso acaba sendo repetido. Esse aumento de frequência é um dos fatores que pode contribuir no desenvolvimento de uma condição de dependência à droga. Dessa forma, usuários de *crack* vivenciam sintomas de dependência em um tempo mais curto após o primeiro uso, quando comparados com usuários de cocaína em pó ou injetada (Chen e Anthony, 2004).

No Brasil, o consumo do *crack* tem aumentado consideravelmente desde os anos 90 e, segundo o Levantamento Domiciliar de Drogas Psicotrópicas (CEBRID, 2006) 0,7% da população estudada já fez uso da droga na vida. Um estudo de seguimento em uma amostra brasileira de usuários de *crack* revelou uma alta taxa de mortalidade, sendo homicídio a causa mais freqüente, seguida por AIDS e overdose (Dias *et al.*, 2011).

¹ Prioriza-se a utilização de *craving* ao invés de fissura, devido ao uso popular do termo “fissura”, inclusive entre os dependentes, o que confere uma influência social e regional muito forte.

Os efeitos fisiológicos gerados pelo uso do *crack*, normalmente, estão relacionados a problemas respiratórios, aumento de pressão arterial e problemas vasculares (Milroy e Parai, 2011). Em termos psiquiátricos, diversos danos também são descritos, sendo paranóia/psicose e condições violentas as características mais frequentes (Morton, 1999). Além disso, são conhecidos déficits cognitivos associados à dependência do *crack*, principalmente relacionados a memória, atenção e funções executivas (Cunha *et al.*, 2004).

É possível uma análise de prejuízos em diversas áreas da vida social do usuário de *crack*, a partir de escalas de gravidade e severidade de dependência. A mais utilizada, *Addiction Severity Index (ASI6)*, além de informar um escore final de gravidade, permite inferir sobre os danos nas áreas psiquiátrica, médica, legal, de lazer, ou relacionados à família e amigos dos usuários.

Para o tratamento de usuários de *crack*, não há evidências de efeitos psicofarmacológicos consistentes e os graus de fissura, ou *craving*, são muito elevados. O *craving* é entendido como um desejo súbito e intenso de utilizar uma determinada substância. A utilização de intervenções terapêuticas multidisciplinares que tenham como foco a sua diminuição e controle é essencial. Além disso, torna-se importante o monitoramento do *craving*, já que a dificuldade para interromper o uso da droga está relacionada ao enfrentamento dessa condição.

Diferentes estudos têm como foco a variação de *craving* em condições de dependência. Há evidências de uma relação direta entre essa variação e o tempo de recaída (Sinha *et al.*, 2003), bem como entre a frequência do uso de cocaína e a intensidade e recorrência do *craving* (Da Silveira *et al.*, 2006). São descritas, ainda, taxas de *craving* mais elevadas em usuários de *crack*, quando comparados com dependentes de outras formas de cocaína e usuários ocasionais (Da Silveira *et al.*, 2006). A medição é realizada, normalmente, através das escalas *Cocaine Craving Questionnaire (CCQ-N-10)* e *Cocaine Selective Severity Assessment (CSSA)*.

Recentemente, o problema do uso do *crack* tem sido bastante abordado pela mídia e, algumas vezes, é até referido como uma epidemia. Essas diversas observações são evidências de um problema de saúde pública e

políticas visando não só a diminuição do consumo, mas também o tratamento dos dependentes, têm se tornado cada vez mais necessárias.

1.1.2 Tabagismo

O uso de nicotina é uma condição muito freqüente atualmente. Relatório do CEBRID (2006) revela que 44% dos indivíduos entrevistados, em 108 cidades com mais de 200 mil habitantes, já fizeram uso de tabaco *na vida* e que 10% dos indivíduos entrevistados apresentam dependência à substância. Na região Sul, 10,7% da população é dependente (12,2% dos homens e 9,6% das mulheres), e a maior prevalência (12%) é observada em jovens com idade entre 18 e 24 anos (CEBRID, 2006).

Apesar de o uso constante de nicotina estar fortemente associado à condição de dependência, existem evidências de que uma grande proporção de fumantes não sejam dependentes (Breslau *et al.*, 2001). Dessa forma, escalas de avaliação da gravidade da dependência são utilizadas, principalmente na área de pesquisa. O principal instrumento utilizado para essa avaliação é o *Teste Fagerström para Dependência de Nicotina* (FTND), composto por seis questões que visam determinar o grau de tolerância desenvolvido pelos fumantes, possibilitando uma análise mais refinada do uso de nicotina.

Com relação aos prejuízos do tabagismo, sabe-se que são principalmente fisiológicos. Segundo relatório anual apresentado pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2011), o tabagismo é o principal fator de risco evitável para diferentes formas de câncer, sendo responsável por cerca de 80% dos casos de câncer de pulmão e 46% dos casos de câncer da cavidade oral, entre outros. Entretanto, sabe-se também que o tabagismo é uma condição comórbida muito freqüente em pacientes com outros transtornos psiquiátricos (John *et al.*, 2004).

O mecanismo neurobiológico de ação da nicotina compreende a ativação do sistema límbico, através da ligação aos receptores nicotínicos (nAChRs) (Mansvelter e McGehee, 2002). Sabe-se que variações nesses

receptores estão relacionadas a uma susceptibilidade aumentada ao desenvolvimento da dependência (Brunzell e Picciotto, 2009; Wu, 2009).

1.1.3 Etiologia e Herdabilidade

O Transtorno por Uso de Substâncias é uma doença complexa, de caráter multifatorial e, portanto, diversos fatores genéticos e ambientais podem ser considerados fatores de suscetibilidade. Em geral, a herdabilidade de TUS é de moderada a alta; para o alcoolismo, por exemplo, estimada em cerca de 55% (Young-Wolff *et al.*, 2012). Estima-se, para sintomas de dependência em usuários de cocaína, uma herdabilidade de aproximadamente 65% (Kendler e Prescott, 1998; Kendler *et al.*, 2000) e para o tabagismo, a herdabilidade é estimada entre 50% e 60% (Vink *et al.*, 2005; Li, 2006).

Ao longo das duas últimas décadas, diversos genes têm sido associados à dependência de substâncias, principalmente, aqueles envolvidos em sistemas de neurotransmissão (Cigler *et al.*, 2001; Guindalini *et al.*, 2006; Lohoff *et al.*, 2008; Fernandez-Castillo *et al.*, 2010). Mais recentemente, estudos de varredura genômica (*Genome-wide Association Studies*, GWAS) têm sido realizados, mas os resultados ainda são pouco conclusivos. Com relação ao alcoolismo, por exemplo, a maioria dos GWAS não encontra nenhuma região fortemente associada ao fenótipo (Treutlein *et al.*, 2009; Bierut *et al.*, 2010; Edenberg *et al.*, 2010); entretanto, uma meta-análise envolvendo 12 estudos com populações europeias aponta para a região cromossômica onde se localiza o gene *AUTS2*, inicialmente implicado no desenvolvimento de autismo (Schumann *et al.*, 2011). Além disso, estudos que se utilizam da abordagem de genes candidatos sugerem a importância de outros genes sobre o consumo de álcool, tais como *CRHR1* (Treutlein *et al.*, 2006), *ALDH2* (Yao *et al.*, 2011) e *HTR1B* (Contini *et al.*, 2012).

Estudos envolvendo o tabagismo apresentam resultados um pouco mais consistentes, tanto utilizando-se da abordagem de genes candidatos quanto em GWAS. A região cromossômica 15q25 engloba o agrupamento gênico *CHRNA5–CHRNA3–CHRNA4* e tem sido relacionada à dependência de nicotina em estudos de varredura genômica (Bierut *et al.*, 2007; Saccone *et al.*,

2007). Variações nesses genes também já foram individualmente associadas à dependência e a outros fenótipos relacionados, como gravidade da dependência, quantidade de cigarros e cessação do uso de tabaco (Munafo e Johnstone, 2008; Falcone *et al.*, 2011; Kapoor *et al.*, 2012). Além desse agrupamento, vários outros genes têm se mostrado associados, embora em geral com pequeno efeito individual (revisão em Munafo e Johnstone, 2008). Com relação à dependência de *crack*, ainda não existem associações com genes individualmente; todavia, alguns estudos de varredura genômica revelam regiões importantes na suscetibilidade ao uso de cocaína administrada de outras maneiras (Johnson *et al.*, 2009; Drgon *et al.*, 2010).

No tocante a condições ambientais, pode-se destacar o papel de eventos traumáticos na infância no desenvolvimento de diversas psicopatologias, inclusive os transtornos por uso de substâncias (De Bellis, 2002; Cutajar *et al.*, 2010). Ainda, alguns estudos sugerem o efeito de interações entre alguns genes e situações adversas na infância sobre o desenvolvimento de dependências (Blomeyer *et al.*, 2008).

1.2 Sistema de Estresse: O Eixo HPA e Dependência Química

O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) é o sistema de resposta ao estresse mais estudado em humanos (Zhou *et al.*, 2010). O funcionamento normal da cascata inicia com a produção pelo hipotálamo do hormônio liberador de corticotrofina (CRF ou CRH) em resposta a estímulos estressores diversos. O CRH atua sobre a hipófise, induzindo a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que atinge a corrente sanguínea. A partir dessa sinalização por ACTH, o córtex adrenal secreta hormônios esteróides, especialmente os glicocorticóides. Dentre estes, destaca-se o cortisol, considerado o principal hormônio de resposta ao estresse, e responsável por alterações de funcionamento em diversos tipos celulares no corpo humano.

Essa cascata de sinalização do eixo HPA tem um papel relevante no desenvolvimento de transtornos psiquiátricos, especialmente transtornos afetivos e de humor (Lopez-Duran *et al.*, 2009; Ostiguy *et al.*, 2011; Wardenaar *et al.*, 2011; Flandreau *et al.*, 2012). Da mesma forma, há evidências para uma

relação entre o sistema de resposta a estresse e dependências químicas. Porém, estudos divergem no que diz respeito ao sentido da relação, de acordo com a dependência analisada e as metodologias de avaliação dos níveis do componente em questão (Boschloo *et al.*, 2011; Sinha *et al.*, 2011; van Leeuwen *et al.*, 2011).

Com relação à cocaína, alterações de função do eixo HPA e da liberação do cortisol já foram descritas tanto em modelos animais, quanto em estudos realizados com usuários da droga (Mantsch e Goeders, 2000; Goeders, 2002; Sinha *et al.*, 2003; Palamarchouk *et al.*, 2009). Alguns resultados demonstram a importância de componentes do eixo HPA em condições específicas da dependência de cocaína, como o *craving*, recaída e gravidade (Sinha *et al.*, 2006; Brady *et al.*, 2009).

O tabagismo também é um fenótipo cuja relação com o sistema de estresse é conhecida. Além de ser considerada um agente estressor que, portanto, é capaz de ativar o eixo HPA (Richards *et al.*, 2011), a nicotina também gera alterações na resposta ao estresse psicossocial: fumantes apresentam diminuição da produção de cortisol, após o uso crônico do tabaco (Rohleder e Kirschbaum, 2006). Essas alterações podem, ainda, ser dependentes do gênero (al'Absi, 2006; Back *et al.*, 2008) e da intensidade do uso de nicotina (Mendelson *et al.*, 2005; Steptoe e Ussher, 2006).

Os eventos adversos na infância podem também ser considerados um fator mediador da relação entre o eixo HPA e a dependência química. Muitos estudos evidenciam que alterações nos níveis de componentes do eixo HPA podem estar relacionadas a situações de eventos adversos durante a infância (Ouellet-Morin *et al.*, 2011; McCrory *et al.*, 2012). Em mulheres saudáveis, a exposição ao trauma gera uma resposta atenuada de cortisol, medida a partir do teste de dexametasona/CRH (Dex/CRH test) (Klaassens, 2010) e o abuso físico está associado a uma menor produção de cortisol em resposta a testes de estresse psicossocial (Carpenter 2011). Em homens, entretanto, a perda parental na infância pode induzir uma resposta aumentada da produção de cortisol, a partir de análises utilizando o teste Dex/CRH (Tyrka *et al.*, 2008).

1.2.1 Genética, eixo HPA e fenótipos psiquiátricos

A variabilidade genética presente nos genes que codificam componentes do eixo HPA tem sido alvo de diversos estudos de associação envolvendo fenótipos psiquiátricos, tais como suicídio (De Luca *et al.*, 2010), depressão (Papiol *et al.*, 2007), transtorno de estresse pós-traumático (Amstadter *et al.*, 2011), pânico (Keck *et al.*, 2008), alcoolismo (Treutlein *et al.*, 2006; Ribbe *et al.*, 2011) e doença de Parkinson (Shadrina *et al.*, 2006). Dentre os principais genes estudados, destacam-se aqueles que codificam proteínas envolvidas na produção e ação do CRH (*CRH*, *CRHR1*, *CRHR2*, *CRHBP*), na produção e ação do ACTH (*POMC* e *MC2R*), e na ação do cortisol (*NR3C1*, *NR3C2*). Além disso, foram descritas interações entre diferentes genes desse sistema (Ressler *et al.*, 2010; Boscarino *et al.*, 2011; Ishitobi *et al.*, 2012), evidenciando um papel significativo do eixo na predisposição aos transtornos psiquiátricos.

O eixo HPA, ainda, tem sido considerado um fator importante no entendimento da relação entre eventos traumáticos na infância e alguns transtornos psiquiátricos. Sabe-se que interações entre genes do eixo HPA e situações de trauma são capazes de alterar a resposta ao estresse, a partir de níveis diferenciados de produção de cortisol (Tyrka *et al.*, 2009). Com base nisso, alguns estudos têm como foco a análise das interações gene-ambiente. Já foi relatado o efeito dessas interações sobre o desenvolvimento de depressão (Polanczyk *et al.*, 2009; Grabe *et al.*, 2010), alcoolismo (Blomeyer *et al.*, 2008; Clarke e Schumann, 2009), Transtorno de Estresse Pós-Traumático (TEPT) (Binder *et al.*, 2008) e suicídio (Roy *et al.*, 2010), entre outros. Contudo, apesar de haver uma possível influência da interação entre níveis de componentes do eixo HPA e trauma na infância no desenvolvimento das dependências químicas (Moran-Santa Maria *et al.*, 2010), não existem estudos relacionando-a ao efeito dos genes citados anteriormente.

1.2.2 Gene *CRHR1*

Embora alguns estudos tenham como foco a variação de cortisol em situações de dependência e analisem variantes genéticas envolvidas com a ação do cortisol (Badrack *et al.*, 2008; Desrivières *et al.*, 2011), poucas análises

envolvem componentes anteriores do eixo de sinalização da produção desse hormônio.

Dessa forma, a análise de genes como *CRHR1*, que codifica o receptor tipo 1 de CRH, pode contribuir na compreensão do papel do eixo como um todo sobre fenótipos de dependência. Polimorfismos no gene *CRHR1* e outros genes relacionados ao CRH (*CRHBP* e *CRH*) já foram associados a variações dos níveis de componentes do eixo HPA, especialmente cortisol (Sheikh *et al.*, 2013). Análises envolvendo modelos animais durante exposição crônica à cocaína, demonstram um aumento significativo dos níveis de mRNA, na região da hipófise anterior, no 14^o dia de exposição (Zhou *et al.*, 2003). Além disso, os ratos dependentes de cocaína apresentam diferentes níveis de estresse, acompanhados de um aumento de *craving*, quando tratados com infusões de CRH (Brady *et al.*, 2009). Ou seja, a variação de resposta gerada a partir de diferenças no receptor de CRH pode ter relação com o desenvolvimento do *craving* e a variação da resposta ao estresse. Sabe-se também que a inibição da expressão gênica (*knockout*) dos receptores de CRH em camundongos, gera um aumento da ocorrência de comportamentos exploratórios em indivíduos mutantes homocigotos (Timpl *et al.*, 1998), bem como um aumento do consumo de álcool após situações de estresse (Sillaber *et al.*, 2002)

A Figura 1 apresenta representações esquemáticas do gene *CRHR1*, bem como de alguns dos SNPs mais analisados. Estudos de associação envolvendo polimorfismos nos genes *CRHR1* revelam um papel importante em determinados fenótipos psiquiátricos, especialmente depressão (Polanczyk *et al.*, 2009), e alcoolismo (Treutlein *et al.*, 2006).

Dentre os polimorfismos no gene *CRHR1*, destaca-se o rs1876831, uma transição em região intrônica, cujo efeito descrito em alcoolistas está relacionado à intensidade do abuso de álcool (Treutlein *et al.*, 2006). Há, ainda, evidências de interação entre esse polimorfismo e eventos de estresse na infância: homocigotos para o alelo C que vivenciaram maior número de eventos traumáticos na infância apresentam menor idade de início de abuso (Schmid *et al.*, 2010), além de consumirem maiores quantidades de bebida (Blomeyer *et al.*, 2008).

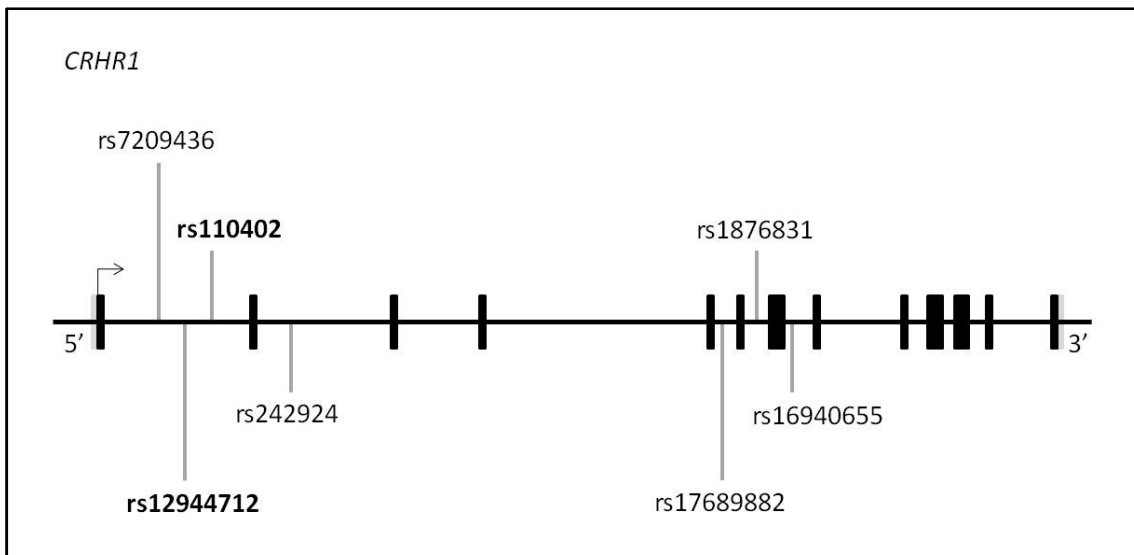


Figura 1 Representação esquemática dos genes *CRHR1* e seus principais polimorfismos. Em negrito, as variações que serão utilizadas no presente trabalho.

Outros polimorfismos no mesmo gene também parecem ter papel importante em variações de resposta a estresse, mesmo não tendo sido associados diretamente a comportamentos aditivos. O polimorfismo rs12944712, por exemplo, foi associado ao TEPT, relacionando sintomas do transtorno ao número de cópias do alelo G (Amstadter *et al.*, 2011). O polimorfismo rs110402, uma transição no íntron 1 do gene, apresenta resultados significativos envolvendo depressão e eventos traumáticos na infância (Bradley *et al.*, 2008; Polanczyk *et al.*, 2009). Além disso, essa variante foi, recentemente, associada ao desenvolvimento de alcoolismo em uma amostra de esquizofrênicos (Ribbe *et al.*, 2011). Ainda, para o polimorfismo rs7209436, já foram descritas associações com estresse na infância e fenótipos relacionados a transtornos de humor, suicídio e depressão (Ben-Efraim *et al.*, 2011; DeYoung *et al.*, 2011). Análises envolvendo haplótipo formado pelos SNPs rs72094736, rs110402e rs242924 revelaram um efeito dessas variantes sobre transtorno depressivo maior (Bradley *et al.*, 2008; Ishitobi *et al.*, 2012) e pânico (Keck *et al.*, 2008; Ishitobi *et al.*, 2012).

A regulação do gene *CRHR1* ocorre principalmente a partir de mecanismos pós-transcricionais, através de interações com proteínas citosólicas na região 5'LS (Wu *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2011). Ainda, o *splicing*

alternativo é bastante freqüente nos transcritos do gene, tendo sido já descritas sete isoformas em humanos, quatro delas expressas na região da hipófise (Pisarchik e Slominski, 2001). Embora a identificação de SNPs que influenciam o *splicing* alternativo venha se mostrando uma perspectiva promissora (Mota *et al.*, 2012), infelizmente não dispomos ainda de evidências para o gene *CRHR1*.

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

JUSTIFICATIVA

A dependência de crack traz aos usuários diversos danos, envolvendo desde problemas respiratórios até prejuízos intensos no âmbito pessoal e social. O tratamento normalmente é acompanhado por uma grande incidência de transtornos de humor e sintomas extremos de abstinência, o que acarreta uma alta taxa de recaída. O tabagismo também se constitui em um fenótipo que causa grande prejuízo a seus usuários, principalmente relacionados ao desenvolvimento de câncer e problemas respiratórios. Além disso, a dificuldade em parar de fumar também está relacionada ao *craving* nos pacientes, evidenciando um possível envolvimento de ambos os transtornos com o sistema de resposta a estresse.

Diversos são os fatores de suscetibilidade, tanto relacionados a aspectos genéticos quanto fatores ambientais que predispõem aos TUS. A variação genética e eventos traumáticos na infância podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento dos transtornos externalizadores, incluindo as dependências químicas e a heterogeneidade fenotípica observada em situações de desintoxicação.

O eixo HPA tem sido considerado mediador dessa variação fenotípica, a partir de alterações regulatórias dos componentes dessa rota de resposta ao estresse. A análise da influência da variação genética, portanto, através do estudo de polimorfismos nos genes do eixo HPA, pode auxiliar na compreensão dos verdadeiros mecanismos subjacentes à variação clínica observada.

Além disso, o conhecimento dos mecanismos biológicos que predispõem à dependência química e baseiam as variações fenotípicas observadas ao longo da desintoxicação pode trazer informações importantes para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

OBJETIVOS

Objetivo geral

- Avaliar o possível papel da variação genética do receptor de CRH sobre a suscetibilidade e apresentação clínica das dependências de *crack* e nicotina.

Objetivos específicos

- Avaliar a influência dos polimorfismos rs110402 e rs12944712 no gene *CRHR1* sobre a dependência de *crack* em uma amostra de usuárias em desintoxicação.

- Analisar a influência dos polimorfismos rs110402 e rs12944712 no gene *CRHR1* sobre a dependência de nicotina em uma amostra de doadoras de sangue.

- Verificar o efeito de haplótipos envolvendo os dois polimorfismos na suscetibilidade às dependências e variação clínica das amostras.

- Avaliar o efeito da interação entre a variação genética em *CRHR1* e eventos traumáticos na infância sobre a variação do *craving* durante a desintoxicação e nos escores de gravidade da dependência de usuárias de *crack*.

3 ARTIGO EM PREPARAÇÃO

*Association of a CRHR1 gene polymorphism with
tobacco and crack cocaine smoking*

(a ser submetido à revista *Journal of Psychiatric Research* – FI = 4,66)

Association of a *CRHR1* gene polymorphism with tobacco and crack cocaine smoking

Guilherme Pinto Bertuzzi¹, Diego Luiz Rovaris¹, Rodrigo Grassi-Oliveira³, Renata Basso Cupertino¹, Verônica Contini¹, Nina Roth Mota¹, Eduardo Schneider Vitola², Eugenio Horacio Grevet², Claiton Henrique Dotto Bau¹

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

² Department of Psychiatry, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

³ Centre for Traumatic Stress Studies and Research (NEPTE), Biomedical Research Institute (IPB), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Corresponding Author

Dr. Claiton H. D. Bau, Department of Genetics, Instituto de Biociências, UFRGS, CEP: 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil.

Caixa Postal: 15053.

Email: claiton.bau@ufrgs.br.

Telephone: (5551) 3308-6718; Fax: (5551) 3308-7311.

ABSTRACT

Crack cocaine and tobacco smoking are Substance Use Disorders with high prevalence around the world, mainly in emerging countries. Both lead to severe physiological or psychiatric impairments. Variations in the Hypothalamus-Pituitary-Adrenal (HPA) axis of stress response are related to different aspects of substance dependence. Polymorphisms in HPA-related genes, therefore, are candidate in association studies involving these phenotypes. The *CRHR1* gene which encodes corticotropin releasing hormone (CRH) receptor is involved in the initial step of HPA response and functioning. The aim of this study was to investigate the effect of rs110402 and rs12944712 in the use of smoked cocaine and nicotine. The analysis included three groups of women: (1) 136 cocaine smokers; (2) 55 nicotine dependents; and (3) 262 healthy subjects. The chi-square analysis revealed a significant difference in rs12944712 frequencies between the three groups ($p= 0.007$). We also estimated haplotypes and described a significant frequency increase of a haplotype containing G allele in both polymorphisms in the groups of cocaine and tobacco smokers ($p= 0.002$). Therefore, our results suggest an effect of *CRHR1* gene polymorphisms on the development of cocaine and tobacco smoking. This is the first study to associate a polymorphism in a HPA-related gene to smoked cocaine and replications are needed to corroborate these findings. Further studies should also explore the possibility that some genetic associations could be specifically related to the smoking route of drug brain delivery.

Keywords: Smoked cocaine · tobacco smoking · HPA axis · stress response
genes · *CRHR1* polymorphism.

INTRODUCTION

Crack cocaine dependence is a substance use disorder that causes severe impairments on physical and mental health in addition to social life of users. The drug has a growing epidemiological relevance in several parts of the world (Foltin *et al.*, 2003; Marsden *et al.*, 2009) and in Brazil is nowadays considered as a major social and health problem (Duailibi *et al.*, 2008). It shares the mechanism of action with cocaine, but its route of administration is more efficient and fast to deliver the cocaine to the brain (Gossop *et al.*, 1994). Thus, the psychiatric effects on *crack* users are worse and they experience symptoms of dependence in a shorter time after the first use, when compared with users of powder or injected cocaine (Chen & Anthony, 2004).

Tobacco smoking is another condition where the potential for nicotine dependence is high and occurs in a short period of time. Nicotine is the most widely abused drug around the world, with about 1 billion male and 250 million female smokers worldwide (WHO, 2011). A wide range of biological effects contribute to its negative impact on health, including mainly carcinogenic processes (INCA, 2011).

The stress regulatory system, namely the hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis, has a significant role on the development of drug dependence (Majewska, 2002; Koob, 2008). The signaling cascade involves the secretion of corticotropin releasing hormone (CRH) from the hypothalamus, subsequent release of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) from the pituitary, and culminates in the secretion of cortisol by adrenal cortex. Thereby, the CRH receptors are essential to the axis functioning and its role in drug dependence is

also investigated. Sillaber *et al.* (2002) demonstrated that when exposed to a stress situation, mutant mice lacking functional CRH type 1 receptors had increased alcohol intake. It also has been showed that some psychiatric patients could present dysregulation on HPA axis components, such as CRH, ACTH and cortisol levels (Lopez-Duran *et al.*, 2009; Ostiguy *et al.*, 2011; Wardenaar *et al.*, 2011). The CRH type 1 receptor is encoded by *CRHR1* gene, which is expressed mainly in the pituitary, but also in extrahypothalamic circuits (Steckler & Holsboer, 1999; Hsu *et al.*, 2012; Laryea *et al.*, 2012).

Different SNPs in *CRHR1* have been analyzed in genetic association studies. The CC genotype in rs1876831 was associated with heavy alcohol drinking (Treutlein *et al.*, 2006). In a sample of schizophrenic individuals, the A allele of rs110402 was associated with high risk of comorbid alcoholism (Ribbe *et al.*, 2011). Mood and anxiety disorders and suicide are also focus of association studies involving *CRHR1*, due to the known alterations of the HPA axis in patients (Reul & Holsboer, 2002; Merali *et al.*, 2004). Significant findings were obtained linking rs7209436, rs110402 and rs242924 SNPs in Major Depressive Disorder (Bradley *et al.*, 2008; Ishitobi *et al.*, 2012) and Panic Disorder (Keck *et al.*, 2008; Ishitobi *et al.*, 2012). Posttraumatic Stress Disorder was also related to *CRHR1* gene, through an association between the GG genotype on rs12944712 and PTSD symptoms (Amstadter *et al.*, 2011). Taking together, these results suggest a potential role of *CRHR1* gene in modulating susceptibility to mood, anxiety and substance use disorders.

In order to investigate the effect of *CRHR1* gene on the susceptibility to smoked cocaine and nicotine dependence, we analyzed two polymorphisms

(rs110402 and rs12944712) in these three samples of women: (1) *crack* users, (2) tobacco smokers and (3) healthy volunteers.

MATERIAL AND METHODS

Subjects

The sample of *crack* cocaine dependents comprised 136 women aged 18 to 45 years with diagnosis of Substance Use Disorder - Physiological Dependence of Crack Cocaine Type, who were admitted at a public inpatient detoxification program in Porto Alegre, Brazil. All participants were recruited after admission to a 3-week, locked detoxification treatment facility for female drug and alcohol abusers. These women were in an abstinence-controlled situation. They had no access to alcohol, cigarettes or drugs. In addition, benzodiazepines should not be prescribed during treatment. The exclusion criteria were as follows: (a) evidence of clinically significant neurologic diseases that might affect cognition (e.g., delirium, dementia, epilepsy, head trauma and multiple sclerosis), (b) current or past history of psychosis and (c) moderate intelligence impairment.

The samples of nicotine dependents (55 women) and controls (262 women) were both obtained from blood donors volunteers, recruited at Hospital de Clínicas de Porto Alegre. The only inclusion criteria were to be females of European descent, 18 years of age or older. The exclusion criteria were: (a) evidence of clinically significant neurologic diseases that might affect cognition (e.g., delirium, dementia, epilepsy, head trauma and multiple sclerosis), (b)

current or past history of psychosis, ADHD or nicotine dependence (for the control group) and (c) moderate intelligence impairment.

Participation in the study was voluntary and anonymous, and all the participants signed an informed consent form that was previously approved by the Research Ethics Committees of the participating institutions.

Clinical characterization

To investigate psychiatric diagnoses in *crack* cocaine users, the Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders (SCID-IV) was used (Del-Ben *et al.*, 2001; APA, 2004). Trained psychiatrist administered this interview.

The nicotine dependent and control groups were evaluated for psychiatric diagnosis also by SCID-IV. The Fagerström Test for Nicotine Dependence was used to evaluate severity of smoking.

SNPs selection and Genotyping

Two polymorphisms on the intronic region of CRHR1 gene were studied: rs12944712 and rs110402. This selection was based on previous association of SNPs on related psychiatric phenotypes and allelic frequencies described in HapMap, in addition to preliminary evidence of functionality (Tyrka *et al.*, 2009). DNA was extracted by a salting out method (Lahiri & Nurnberger, 1991), from peripheral blood of patients and controls. Genotyping was conducted using TaqMan[®] allelic discrimination system (Applied Biosystems) in a Real Time PCR-based method.

Statistical analysis

The characterization of the Linkage Disequilibrium and the estimation of haplotypes comprising the *CRHR1* polymorphisms were performed with the MLOCUS program (Long *et al.*, 1995; Long, 1999). The analyses of Hardy–Weinberg equilibrium and differences in allele, genotype and haplotype frequencies between the three groups were analyzed by the Pearson chi-square test, followed by *post-hoc* comparisons. The haplotype analysis was restricted to those with frequency ≥ 0.05 . All tests were 2-tailed and the significance level was set at 0.05.

RESULTS

Clinical and demographic characteristics of the crack users, nicotine dependents and healthy subjects are presented in Table 1, as well as the allelic and genotype frequencies of rs110402 and rs12944712. The genotype distributions among the samples did not deviate from the values expected according to Hardy–Weinberg equilibrium in any polymorphism analyzed (all $p > 0.2$).

We observed a significant difference in genotype ($p = 0.007$) and allelic ($p = 0.003$) distribution of the polymorphism rs12944712 between the three groups. *Post-hoc* analyses revealed an increase of the G allele of this polymorphism on crack dependents, compared to healthy subjects ($p = 0.0002$). There was no significant differences in the genotype or allelic frequencies of rs110402 ($p > 0.1$).

Haplotype analysis reveals that rs110402 and rs12944712 are in strong Linkage Disequilibrium ($D' = 0.97$). A haplotype formed by the G allele in rs110402 and again G allele rs12944712 is more frequent in crack users. The haplotype comprising G allele on rs110402 and A allele on rs12944712 is more frequent in healthy subjects ($p = 0.002$) (Table 2).

DISCUSSION

The results of this study suggested that the G allele on rs12944712 in *CRHR1* might be associated to a higher risk of smoked cocaine and nicotine dependence. These findings reinforce previous evidence suggesting that variations in *CRHR1* may be relevant in the relationships between the reward and stress response systems and drug dependence.

HPA response variations have been linked to substance use, including drinking behavior (Boschloo *et al.*, 2011), late onset of alcoholism (Evans *et al.*, 2012) and heavy drinking in males (Thayer *et al.*, 2006). Among women, the evidences go in the same direction, indicating that ACTH and cortisol secretion are elevated in drinkers, when compared to controls (Gianoulakis *et al.*, 2003; Badrick *et al.*, 2008). Taking together our findings and previous literature, the overall data suggest that individuals carrying the G allele on rs12944712 may have a response pattern that could be related to both altered stress response and substance dependence, including PTSD symptoms (Amstadter *et al.*, 2011) and nicotine and smoked cocaine dependences (present study). Smoking is the fastest route for drug delivery to the brain. Therefore, further studies should

explore the possibility that some brain circuitries could be involved in response to drugs administered with a fast delivery route.

Our data also confirms findings of Amstadter *et al.* (2011), showing that rs129944712 and rs110402 are in strong Linkage Disequilibrium. Both studies suggest that significant associations could more likely be attributed to the intronic rs129944712. Although the regulation of *CRHR1* gene is mainly at translational and posttranslational level, it is known that activation of transcription is important for maintaining adequate CRH receptor levels (Aguilera *et al.*, 2004). Furthermore, there are at least seven variants of alternative splicing on *CRHR1* gene, four of which have been verified in humans (Pisarchik & Slominski, 2001). At a molecular level, therefore, rs12944712, due to its intronic location, could be regulator of this transcription activation and splicing mechanisms. On the other hand, the significant associations could also be due to LD between rs12944712 and other functional SNPs. In this context, other studies focused on *CRHR1* that did not include rs129944712 revealed an association with major depressive disorder (Bradley *et al.*, 2008; Polanczyk *et al.*, 2009).

Some limitations of this study should be mentioned. First, our sample is comprised only by women, limiting the extrapolation of these findings to men. Case control studies should always consider the potential bias related to population stratification. In this study, although all subjects live in the same city (Porto Alegre), sample collections were performed in two different facilities, where the group with smoked cocaine dependence did not have ethnicity as an exclusion or inclusion criteria. The group of women with nicotine dependence or healthy subjects was composed only of individuals of European Descent.

Nevertheless, we compared the allelic frequencies between self-reported European descendents and the group with other self-reported ancestries within the smoked cocaine users and no significant differences have been detected (data not shown but available upon request). The degree of African admixture in the population of Rio Grande do Sul is smaller than in other Brazilian states and has been estimated at approximately 6% (Zembrzuski *et al.*, 2006).

Our study is the first one to report an association between *CRHR1* and both smoked cocaine and nicotine dependences. Despite these results are preliminary, the plausibility of the findings clearly demand replication in independent samples. The fact that both dependences involve smoking as the route for delivery may be related to common biological mechanisms involving the stress response and brain reward circuitries.

Table 1 | Allelic and genotype frequencies, clinical and demographic characteristics of the patient and control groups

	Crack dependents (N=136)	Smokers (N=55)	Controls (N=262)	p^a
Age, mean (SD)	28.88 (7.64)	31.13 (9.43)	28.67 (8.67)	0.140
Years of schooling, mean (SD)	7.70 (3.11)	13.72 (3.48)	13.65 (2.94)	<0.001
Major Depressive Disorder, N (%)	34 (25.8)	17 (31.5)	87 (33.3)	0.317
Genotype and Allelic Frequencies, N (%)				
rs12944712				
AA	10 (7.5)	5 (9.6)	58 (22.3)	0.003 ^b
AG	73 (54.5)	29 (55.8)	123 (47.3)	
GG	51 (38.1)	18 (34.6)	79 (30.4)	
A	93 (34.7)	39 (37.5)	238 (45.9)	0.007
G	175 (65.3)	65 (62.5)	280 (54.1)	
rs110402				
AA	24 (17.6)	10 (19.2)	55 (21.3)	0.384
AG	72 (52.9)	30 (57.7)	117 (45.3)	
GG	40 (29.4)	12 (23.1)	86 (33.3)	
A	120 (44.1)	50 (48.1)	226 (44.0)	0.736
G	152 (55.9)	54 (51.9)	288 (56.0)	

^a Continuous variables were compared by ANOVA and categorical data by Pearson's Chi-Square test. ^bPostHoc analysis (AA vs AG/GG): Crack vs. control: p=0.0002; Smokers vs. control: p=0.051

Table 2 | Haplotype frequencies in the patient and control groups

		Crack (N=136)	Smokers (N=53)	Controls (N=261)	p^a
rs12944712	rs110402				
A	A	-	-	0.0057	0.002
A	G	0.3566	0.3962	0.4540	
G	A	0.4412	0.4717	0.4348	
G	G	0.2022	0.1321	0.1054	

Lewontin's coefficient: Patients D' = 1.00; Control D' = 0.97. ^aHaplotypes with frequency lower than 0.05 were excluded from the analysis. $\chi^2=16.636$

REFERENCES

- Aguilera G, Nikodemova M, Wynn PC, Catt KJ. Corticotropin releasing hormone receptors: two decades later. *Peptides* 2004; 25:319-329.
- Amstadter AB, Nugent NR, Yang BZ, Miller A, Siburian R, Moorjani P, Haddad S, Basu A, Fagerness J, Saxe G, Smoller JW, Koenen KC. Corticotrophin-releasing hormone type 1 receptor gene (CRHR1) variants predict posttraumatic stress disorder onset and course in pediatric injury patients. *Disease Markers* 2011; 30:89-99.
- American Psychiatry Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 4th ed. Washington, DC. 2004.
- Badrick E, Bobak M, Britton A, Kirschbaum C, Marmot M, Kumari M. The relationship between alcohol consumption and cortisol secretion in an aging cohort. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2008; 93:750-757.
- Boschloo L, Vogelzangs N, Licht CM, Vreeburg SA, Smit JH, van den Brink W, Veltman DJ, de Geus EJ, Beekman AT, Penninx BW. Heavy alcohol use, rather than alcohol dependence, is associated with dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the autonomic nervous system. *Drug and Alcohol Dependence* 2011; 116:170-176.
- Bradley RG, Binder EB, Epstein MP, Tang Y, Nair HP, Liu W, Gillespie CF, Berg T, Evces M, Newport DJ, Stowe ZN, Heim CM, Nemeroff CB, Schwartz A, Cubells JF, Ressler KJ. Influence of child abuse on adult depression: moderation by the corticotropin-releasing hormone receptor gene. *Archives of General Psychiatry* 2008; 65:190-200.

- Chen CY, Anthony JC. Epidemiological estimates of risk in the process of becoming dependent upon cocaine: cocaine hydrochloride powder versus crack cocaine. *Psychopharmacology (Berl)* 2004; 172:78-86.
- Del-Ben CM, Vilela JA, Crippa JA, Hallak JE, Labatti CM, Zuardi AW. Reliability of the Structured Clinical Interview for DSM-IV - Clinical Version. *Revista Brasileira de Psiquiatria* 2001; 23:156-159.
- Duailibi LB, Ribeiro M, Laranjeira R. Profile of cocaine and crack users in Brazil. *Cadernos de Saude Publica* 2008; 24 Suppl 4:s545-557.
- Evans BE, Greaves-Lord K, Euser AS, Franken IH, Huizink AC. The relation between hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis activity and age of onset of alcohol use. *Addiction* 2012; 107:312-322.
- Foltin RW, Ward AS, Haney M, Hart CL, Collins ED. The effects of escalating doses of smoked cocaine in humans. *Drug and Alcohol Dependence* 2003; 70:149-157.
- Gianoulakis C, Dai X, Brown T. Effect of chronic alcohol consumption on the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and pituitary beta-endorphin as a function of alcohol intake, age, and gender. *Alcoholism: Clinical & Experimental Research* 2003; 27:410-423.
- Gossop M, Griffiths P, Powis B, Strang J. Cocaine: patterns of use, route of administration, and severity of dependence. *The British Journal of Psychiatry* 1994; 164:660-664.
- Hsu DT, Mickey BJ, Langenecker SA, Heitzeg MM, Love TM, Wang H, Kennedy SE, Pecina M, Shafir T, Hodgkinson CA, Enoch MA, Goldman D, Zubieta JK. Variation in the corticotropin-releasing hormone receptor 1

(CRHR1) gene influences fMRI signal responses during emotional stimulus processing. *The Journal of Neuroscience* 2012; 32:3253-3260.

Instituto Nacional De Câncer. Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, RJ. 2011.

Ishitobi Y, Nakayama S, Yamaguchi K, Kanehisa M, Higuma H, Maruyama Y, Ninomiya T, Okamoto S, Tanaka Y, Tsuru J, Hanada H, Isogawa K, Akiyoshi J. Association of CRHR1 and CRHR2 with major depressive disorder and panic disorder in a Japanese population. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* 2012; 159B:429-436.

Keck ME, Kern N, Erhardt A, Unschuld PG, Ising M, Salyakina D, Muller MB, Knorr CC, Lieb R, Hohoff C, Krakowitzky P, Maier W, Bandelow B, Fritze J, Deckert J, Holsboer F, Muller-Myhsok B, Binder EB. Combined effects of exonic polymorphisms in CRHR1 and AVPR1B genes in a case/control study for panic disorder. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* 2008; 147B:1196-1204.

Koob GF. A role for brain stress systems in addiction. *Neuron* 2008; 59:11-34.

Lahiri DK, Nurnberger JI, Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Research* 1991; 19:5444.

Laryea G, Arnett MG, Muglia LJ. Behavioral Studies and Genetic Alterations in Corticotropin-Releasing Hormone (CRH) Neurocircuitry: Insights into Human Psychiatric Disorders. *Behavioral Sciences (Basel)* 2012; 2:135-171.

Long JC. Software and documentation distributed by the author section on population genetics and linkage. Laboratory of Neurogenetics, NIAAA National Institutes of Health. Bethesda, MD. 1999;

Long JC, Williams RC, Urbanek M. An E-M algorithm and testing strategy for multiple-locus haplotypes. *The American Journal of Human Genetics* 1995; 56:799-810.

Lopez-Duran NL, Kovacs M, George CJ. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation in depressed children and adolescents: a meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology* 2009; 34:1272-1283.

Majewska MD. HPA axis and stimulant dependence: an enigmatic relationship. *Psychoneuroendocrinology* 2002; 27:5-12.

Marsden J, Eastwood B, Bradbury C, Dale-Perera A, Farrell M, Hammond P, Knight J, Randhawa K, Wright C. Effectiveness of community treatments for heroin and crack cocaine addiction in England: a prospective, in-treatment cohort study. *The Lancet* 2009; 374:1262-1270.

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

Ostiguy CS, Ellenbogen MA, Walker CD, Walker EF, Hodgins S. Sensitivity to stress among the offspring of parents with bipolar disorder: a study of daytime cortisol levels. *Psychological Medicine* 2011; 1-11.

Pisarchik A, Slominski AT. Alternative splicing of CRH-R1 receptors in human and mouse skin: identification of new variants and their differential expression. *The FASEB Journal* 2001; 15:2754-2756.

Polanczyk G, Caspi A, Williams B, Price TS, Danese A, Sugden K, Uher R, Poulton R, Moffitt TE. Protective effect of CRHR1 gene variants on the

development of adult depression following childhood maltreatment: replication and extension. *Archives of General Psychiatry* 2009; 66:978-985.

Reul JM, Holsboer F. Corticotropin-releasing factor receptors 1 and 2 in anxiety and depression. *Current Opinion in Pharmacology* 2002; 2:23-33.

Ribbe K, Ackermann V, Schwitulla J, Begemann M, Papiol S, Grube S, Sperling S, Friedrichs H, Jahn O, Sillaber I, Gefeller O, Krampe H, Ehrenreich H. Prediction of the Risk of Comorbid Alcoholism in Schizophrenia by Interaction of Common Genetic Variants in the Corticotropin-Releasing Factor System. *Archives of General Psychiatry* 2011;

Sillaber I, Rammes G, Zimmermann S, Mahal B, Zieglsansberger W, Wurst W, Holsboer F, Spanagel R. Enhanced and delayed stress-induced alcohol drinking in mice lacking functional CRH1 receptors. *Science* 2002; 296:931-933.

Steckler T, Holsboer F. Corticotropin-releasing hormone receptor subtypes and emotion. *Biological Psychiatry* 1999; 46:1480-1508.

Thayer JF, Hall M, Sollers JJ, 3rd, Fischer JE. Alcohol use, urinary cortisol, and heart rate variability in apparently healthy men: Evidence for impaired inhibitory control of the HPA axis in heavy drinkers. *International Journal of Psychophysiology* 2006; 59:244-250.

Treutlein J, Kissling C, Frank J, Wiemann S, Dong L, Depner M, Saam C, Lascorz J, Soyka M, Preuss UW, Rujescu D, Skowronek MH, Rietschel M, Spanagel R, Heinz A, Laucht M, Mann K, Schumann G. Genetic association of the human corticotropin releasing hormone receptor 1 (CRHR1) with binge drinking and alcohol intake patterns in two independent samples. *Molecular Psychiatry* 2006; 11:594-602.

- Tyrka AR, Price LH, Gelernter J, Schepker C, Anderson GM, Carpenter LL. Interaction of childhood maltreatment with the corticotropin-releasing hormone receptor gene: effects on hypothalamic-pituitary-adrenal axis reactivity. *Biological Psychiatry* 2009; 66:681-685.
- Wardenaar KJ, Vreeburg SA, van Veen T, Giltay EJ, Veen G, Penninx BW, Zitman FG. Dimensions of depression and anxiety and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Biological Psychiatry* 2011; 69:366-373.
- World Health Organization. *Systematic Review of the link between tobacco and poverty*. Geneva. 2011.
- Zembrzuski VM, Callegari-Jacques SM, Hutz MH. Application of an African Ancestry Index as a genomic control approach in a Brazilian population. *Annals of Human Genetics* 2006; 70:822-828.

4 ARTIGO EM PREPARAÇÃO

Childhood trauma exposure, polymorphisms on CRHR1 gene and crack cocaine dependence: a gene-environment approach on severity and craving in a sample of women

(a ser submetido à revista *Psychiatry Research* – FI: 2,524)

Childhood trauma exposure, polymorphisms on *CRHR1* gene and crack cocaine dependence: a gene-environment approach on severity and craving in a sample of women

Guilherme Pinto Bertuzzi^a, Diego Luiz Rovaris^a, Rodrigo Grassi-Oliveira^b, Renata Basso Cupertino^a, Thiago Wendt Viola^b, Mateus Luz Lewandoski^b, Claiton Henrique Dotto Bau^{a*}

^a Department of Genetics, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

^b Centre for Traumatic Stress Studies and Research (NEPTE), Biomedical Research Institute (IPB), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

***Corresponding Author**

Dr. Claiton H. D. Bau, Department of Genetics, Instituto de Biociências, UFRGS, CEP: 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil.

Caixa Postal: 15053.

Email: claiton.bau@ufrgs.br.

Telephone: (5551) 3308-6718; Fax: (5551) 3308-7311.

ABSTRACT

Follow-up studies have reported the effect of childhood trauma on the development of some psychopathologies, including Substance Use Disorders (SUD). The stress response system is one of the possible biological mechanisms underlying this relationship. The Hypothalamus-Pituitary-Adrenal (HPA) axis is the most important stress response system in humans and genetic variations in HPA-related genes have already been associated with SUD. It is hypothesized that gene-environment interactions could be related to the drug dependence development. Therefore, the aim of this study is to test a possible interaction between *CRHR1* polymorphisms and a history of early life adversity on severity and craving of smoked cocaine dependence. We assessed the history of trauma using the Childhood Trauma Questionnaire (CTQ), and the outcome variables of severity of dependence and craving were, respectively, Cocaine Selective Severity Assessment (CSSA) and Addiction Severity Index (ASI6) scale scores. Although main effects have been previously reported, we did not find significant interaction effects.

Keywords: Gene-environment interaction · addiction severity · craving · childhood trauma · HPA axis · *CRHR1* polymorphism

1. Introduction

Alterations in the stress response system coordinated by the hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis are associated to early life stress situations (Tyrka *et al.*, 2008; Carpenter *et al.*, 2011; Ouellet-Morin *et al.*, 2011). In healthy women, the childhood trauma exposure leads to an attenuated cortisol response in a dexamethasone/corticotrophin releasing hormone (Dex/CRH) test (Klaassens, 2010) and the physical abuse was associated with a blunted cortisol response to a psychosocial stress task (Carpenter *et al.*, 2011). Early life stress is related to the development of some psychopathologies, such as anxiety and substance use disorders (De Bellis, 2002; Cutajar *et al.*, 2010; McCrory *et al.*, 2012).

An initial step on stress response is hypothalamic secretion of the Corticotropin-Releasing Hormone (CRH), and binding to its receptor (CRH-R) on the pituitary gland (Zhou *et al.*, 2010). The *CRHR1* gene, which encodes CRH type 1 receptor, is implicated in the regulation of cortisol levels (Tyrka *et al.*, 2009; Mahon *et al.*, 2012). Polymorphisms on *CRHR1* have been associated to mood and anxiety disorders (Reul and Holsboer, 2002; Keck *et al.*, 2008; Ishitobi *et al.*, 2012) and alcoholism (Treutlein *et al.*, 2006).

There are also reports that *CRHR1* gene polymorphisms interact with stressful life experiences to predict depression (Heim *et al.*, 2009; Polanczyk *et al.*, 2009; Kranzler *et al.*, 2011), suicide (Wasserman *et al.*, 2008; Ben-Efraim *et al.*, 2011) and alcoholism (Blomeyer *et al.*, 2008; Schmid *et al.*, 2010). In addition, it is known that this interaction could be related to HPA axis dysregulation: for subjects with a history of maltreatment, the GG genotype of

CRHR1 rs110402 polymorphism was associated with elevated cortisol responses to the Dex/CRH test (Tyrka *et al.*, 2009). Despite these evidences, there are no investigations of *CRHR1*-environment interactions on clinical characteristics of smoked cocaine dependence.

The aim of the present study is to investigate a possible gene-environment interaction, involving two *CRHR1* polymorphisms and childhood trauma exposure on the severity of dependence and craving in cocaine smokers.

2. Methods

2.1 Subjects

The sample comprised 136 crack cocaine-addicted women who were admitted at a public inpatient detoxification program in Southern Brazil. All participants were recruited after admission to a 3-week, locked detoxification treatment facility for female drug and alcohol abusers. These women were in an abstinence-controlled situation. They had no access to alcohol, cigarettes or drugs. In addition, benzodiazepines should not be prescribed during treatment. The inclusion criteria were as follows: (a) women aged 18 to 45 years; (b) diagnosis of Substance Use Disorder - Physiological Dependence of Crack Cocaine Type; (c) a minimum of four years of formal education and (d) absence of co-morbid psychotic syndromes.

2.2 Clinical instruments

To investigate psychiatric diagnoses, the Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders (SCID I) was used (Del-Ben *et al.*, 2001; APA, 2004).

The Addiction Severity Index version 6 (ASI-6) (McLellan *et al.*, 1980; Kessler *et al.*, 2012) was used due to its dimensional approach that assesses the severity of problems in the following seven domains: health, legal, occupational, socio-familial, and psychiatric aspects, and use of alcohol and drugs.

The severity of the withdrawal symptoms was 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.

The presence of childhood trauma was investigated using the Brazilian version of the Childhood Trauma Questionnaire (CTQ) (Bernstein *et al.*, 2003; Grassi-Oliveira *et al.*, 2006). This questionnaire is a five-point Likert-type scale including a subscale measuring the frequency of trauma events during

childhood. This study defined presence of trauma if participant scores were classified as moderate to severe according to the CTQ manual, such a previous finding of our research group (personal communication).

2.3 SNP selection and genotyping

The *CRHR1* intronic polymorphisms rs12944712 and rs110402 were studied. This selection was based on previous association of SNPs on related psychiatric phenotypes and allelic frequencies described by HapMap. DNA was extracted by a salting out method (Lahiri and Nurnberger, 1991), from peripheral blood of patients. Genotyping was conducted using TaqMan[®] allelic discrimination system (Applied Biosystems) in a Real Time PCR-based method.

2.4 Statistical analysis

SNPs were inserted in the model as a haplotype, estimated using MLocus program (Long *et al.*, 1995; Long, 1999). We defined a risk haplotype according to a previous significant association with the development of smoked cocaine dependence in our sample (Bertuzzi *et al.*, 2013). This haplotype contains G allele in rs12944712 and G allele in rs110402.

To investigate the effects of gene-environment interaction on ASI6 scores of the subscales Drugs, Alcohol and Psychiatry, we used Generalized Linear Model (GzLM); the model type and link function were personalized according to dependent variable distribution. Craving and withdrawal symptoms, assessed by CSSA, was compared through Generalized Estimating Equation (GEE) Modeling. The autoregressive covariance structure was selected once the correlation between CSSA evaluations exponentially declined over time.

3. Results

There were no significant associations of the gene-environment interaction and any one of the subscales scores of ASI6 analyzed (Table 1). We performed the same tests including the SNPs separately in the model, and the results were the same (data not shown).

The variation of craving among time in the four groups of the gene-trauma interaction were not significantly different ($\chi^2= 1.363$, DF= 3, $p= 0.714$).

4. Discussion

Our data suggest that there are no interaction effects between the polymorphisms on *CRHR1* gene and childhood trauma exposure on craving during treatment and dependence severity scores measured by ASI6 scale. This finding is relevant because there is substantial evidence that *CRHR1* and childhood trauma have significant effects on drug dependence (Treutlein *et al.*, 2006; Cutajar *et al.*, 2010), including smoked cocaine (Bertuzzi *et al.* 2013, Francke *et al.*, 2013).

Despite previous studies have investigated the effect of gene-environment interaction involving HPA axis related genes and early life stress (Blomeyer *et al.*, 2008) on the susceptibility to substance use disorders, our study is the first one to analyze specifically smoked cocaine dependence.

Cocaine smoking is becoming highly prevalent, mainly in emerging countries, causing severe impairment (Dias *et al.*, 2011). Since there is no pharmacological treatment efficient to the smoked cocaine use, the comprehension of mechanisms underlying the clinical aspects of detoxification could help the development of alternative therapies.

Unfortunately, we could not test the role of this gene-environment interaction on the susceptibility to smoked cocaine dependence, since we do not have a control group evaluated with the same protocol. We cannot rule out the possibility that such interaction exists but is limited to susceptibility instead of severity or craving. Additional investigations are necessary to better clarify the role of HPA-related genes, childhood trauma and their interactions on both the susceptibility, severity and craving of smoked cocaine and other drug dependencies.

Table 1 Interaction between haplotype on CRHR1 and presence of Physical Neglect on scores of severity of smoked cocaine (ASI6)

	Statistics	DF	P
ASI6 – subscale Drugs			
	Wald Chi-Square		
rs110402-rs12944712 haplotype	0.173	1	0.677
Physical neglect	0.245	1	0.620
Haplotype*Physical neglect	0.053	1	0.818
ASI6 – subscale Alcohol			
rs110402-rs12944712 haplotype	0.174	1	0.676
Physical neglect	0.069	1	0.793
Haplotype*Physical neglect	1.359	1	0.244
ASI6 – subscale Psychiatry			
rs110402-rs12944712 haplotype	0.006	1	0.936
Physical neglect	6.936	1	0.008
Haplotype*Physical neglect	0.000	1	0.993

References

- American Psychiatry Association, 2004. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th ed. Washington, DC.
- Ben-Efraim Y.J., Wasserman D., Wasserman J., Sokolowski M., 2011. Gene-environment interactions between CRHR1 variants and physical assault in suicide attempts. *Genes, Brain and Behavior* 10, 663-672.
- Bernstein D.P., Stein J.A., Newcomb M.D., Walker E., Pogge D., Ahluvalia T., Stokes J., Handelsman L., Medrano M., Desmond D., Zule W., 2003. Development and validation of a brief screening version of the Childhood Trauma Questionnaire. *Child Abuse & Neglect* 27, 169-190.
- Bertuzzi G.P., Rovaris D.L., Grassi-Oliveira R., Cupertino R.B., Contini V., Mota N.R., Vitola E.S., Grevet E.H., Bau C.H., 2013. Association of a CRHR1 gene polymorphism with tobacco and crack cocaine smoking. [Artigo em preparação].
- Blomeyer D., Treutlein J., Esser G., Schmidt M.H., Schumann G., Laucht M., 2008. Interaction between CRHR1 gene and stressful life events predicts adolescent heavy alcohol use. *Biological Psychiatry* 63, 146-151.
- Carpenter L.L., Shattuck T.T., Tyrka A.R., Geraciotti T.D., Price L.H., 2011. Effect of childhood physical abuse on cortisol stress response. *Psychopharmacology (Berl)* 214, 367-375.
- Cutajar M.C., Mullen P.E., Ogloff J.R., Thomas S.D., Wells D.L., Spataro J., 2010. Psychopathology in a large cohort of sexually abused children followed up to 43 years. *Child Abuse & Neglect* 34, 813-822.

- De Bellis M.D., 2002. Developmental traumatology: a contributory mechanism for alcohol and substance use disorders. *Psychoneuroendocrinology* 27, 155-170.
- Del-Ben C.M., Vilela J.A., Crippa J.A., Hallak J.E., Labatti C.M., Zuardi A.W., 2001. Reliability of the Structured Clinical Interview for DSM-IV - Clinical Version. *Revista Brasileira de Psiquiatria* 23, 156-159.
- Dias A.C., Araujo M.R., Dunn J., Sesso R.C., de Castro V., Laranjeira R., 2011. Mortality rate among crack/cocaine-dependent patients: a 12-year prospective cohort study conducted in Brazil. *Journal of Substance Abuse Treatment* 41, 273-278.
- Francke, I.D., Viola T.W.; Tractenberg S.G.; Grassi-Oliveira R., 2013. Childhood Neglect and Increased Withdrawal and Depressive Severity in Crack Cocaine-Users During Early Abstinence. *Child Abuse & Neglect in press*.
- Grassi-Oliveira R., Stein L.M., Pezzi J.C., 2006. [Translation and content validation of the Childhood Trauma Questionnaire into Portuguese language]. *Revista de Saude Publica* 40, 249-255.
- Heim C., Bradley B., Mletzko T.C., Deveau T.C., Musselman D.L., Nemeroff C.B., Ressler K.J., Binder E.B., 2009. Effect of Childhood Trauma on Adult Depression and Neuroendocrine Function: Sex-Specific Moderation by CRH Receptor 1 Gene. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 3, 41.
- Ishitobi Y., Nakayama S., Yamaguchi K., Kanehisa M., Higuma H., Maruyama Y., Ninomiya T., Okamoto S., Tanaka Y., Tsuru J., Hanada H., Isogawa K., Akiyoshi J., 2012. Association of CRHR1 and CRHR2 with major depressive disorder and panic disorder in a Japanese population. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* 159B, 429-436.

- Kampman K.M., Volpicelli J.R., McGinnis D.E., Alterman A.I., Weinrieb R.M., D'Angelo L., Epperson L.E., 1998. Reliability and validity of the Cocaine Selective Severity Assessment. *Addictive Behaviors* 23, 449-461.
- Keck M.E., Kern N., Erhardt A., Unschuld P.G., Ising M., Salyakina D., Muller M.B., Knorr C.C., Lieb R., Hohoff C., Krakowitzky P., Maier W., Bandelow B., Fritze J., Deckert J., Holsboer F., Muller-Myhsok B., Binder E.B., 2008. Combined effects of exonic polymorphisms in CRHR1 and AVPR1B genes in a case/control study for panic disorder. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* 147B, 1196-1204.
- Kessler F., Cacciola J., Alterman A., Faller S., Souza-Formigoni M.L., Cruz M.S., Brasiliano S., Pechansky F., 2012. Psychometric properties of the sixth version of the Addiction Severity Index (ASI-6) in Brazil. *Revista Brasileira de Psiquiatria* 34, 24-33.
- Klaassens E.R., 2010. Bouncing back - trauma and the HPA-axis in healthy adults. *European Journal of Psychotraumatology* 1, 5844.
- Kranzler H.R., Feinn R., Nelson E.C., Covault J., Anton R.F., Farrer L., Gelernter J., 2011. A CRHR1 haplotype moderates the effect of adverse childhood experiences on lifetime risk of major depressive episode in African-American women. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* 156B, 960-968.
- Lahiri D.K., Nurnberger J.I., Jr., 1991. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Research* 19, 5444.

- Long J.C., 1999. Software and documentation distributed by the author section on population genetics and linkage. Laboratory of Neurogenetics, NIAAA National Institutes of Health. Bethesda, MD.
- Long J.C., Williams R.C., Urbanek M., 1995. An E-M algorithm and testing strategy for multiple-locus haplotypes. *The American Journal of Human Genetics* 56, 799-810.
- Mahon P.B., Zandi P.P., Potash J.B., Nestadt G., Wand G.S., 2012. Genetic association of FKBP5 and CRHR1 with cortisol response to acute psychosocial stress in healthy adults. *Psychopharmacology (Berl)*
- McCrory E., De Brito S.A., Viding E., 2012. The link between child abuse and psychopathology: a review of neurobiological and genetic research. *Journal of the Royal Society of Medicine* 105, 151-156.
- McLellan A.T., Luborsky L., Woody G.E., O'Brien C.P., 1980. An improved diagnostic evaluation instrument for substance abuse patients. The Addiction Severity Index. *The Journal of Nervous and Mental Disease* 168, 26-33.
- Ouellet-Morin I., Odgers C.L., Danese A., Bowes L., Shakoor S., Papadopoulos A.S., Caspi A., Moffitt T.E., Arseneault L., 2011. Blunted cortisol responses to stress signal social and behavioral problems among maltreated/bullied 12-year-old children. *Biological Psychiatry* 70, 1016-1023.
- Polanczyk G., Caspi A., Williams B., Price T.S., Danese A., Sugden K., Uher R., Poulton R., Moffitt T.E., 2009. Protective effect of CRHR1 gene variants on the development of adult depression following childhood maltreatment: replication and extension. *Archives of General Psychiatry* 66, 978-985.
- Reul J.M., Holsboer F., 2002. Corticotropin-releasing factor receptors 1 and 2 in anxiety and depression. *Current Opinion in Pharmacology* 2, 23-33.

- Schmid B., Blomeyer D., Treutlein J., Zimmermann U.S., Buchmann A.F., Schmidt M.H., Esser G., Rietschel M., Banaschewski T., Schumann G., Laucht M., 2010. Interacting effects of CRHR1 gene and stressful life events on drinking initiation and progression among 19-year-olds. *The International Journal of Neuropsychopharmacology* 13, 703-714.
- Treutlein J., Kissling C., Frank J., Wiemann S., Dong L., Depner M., Saam C., Lascorz J., Soyka M., Preuss U.W., Rujescu D., Skowronek M.H., Rietschel M., Spanagel R., Heinz A., Laucht M., Mann K., Schumann G., 2006. Genetic association of the human corticotropin releasing hormone receptor 1 (CRHR1) with binge drinking and alcohol intake patterns in two independent samples. *Molecular Psychiatry* 11, 594-602.
- Tyrka A.R., Price L.H., Gelernter J., Schepker C., Anderson G.M., Carpenter L.L., 2009. Interaction of childhood maltreatment with the corticotropin-releasing hormone receptor gene: effects on hypothalamic-pituitary-adrenal axis reactivity. *Biological Psychiatry* 66, 681-685.
- Tyrka A.R., Wier L., Price L.H., Ross N., Anderson G.M., Wilkinson C.W., Carpenter L.L., 2008. Childhood parental loss and adult hypothalamic-pituitary-adrenal function. *Biological Psychiatry* 63, 1147-1154.
- Wasserman D., Sokolowski M., Rozanov V., Wasserman J., 2008. The CRHR1 gene: a marker for suicidality in depressed males exposed to low stress. *Genes, Brain and Behavior* 7, 14-19.
- Zhou Y., Proudnikov D., Yuferov V., Kreek M.J., 2010. Drug-induced and genetic alterations in stress-responsive systems: Implications for specific addictive diseases. *Brain Research* 1314, 235-252.

5 DISCUSSÃO

A hipótese inicial dessa dissertação era de que polimorfismos no gene *CRHR1* poderiam estar envolvidos no desenvolvimento das dependências de drogas, de modo que esse efeito poderia mediar a relação entre situações adversas na infância e o desenvolvimento da psicopatologia. O conjunto de resultados permitiu identificar um polimorfismo genético possivelmente associado ao risco de duas dependências de substâncias fumadas, nicotina e cocaína. Esse achado abre a hipótese de que possa haver mecanismos genéticos e neurobiológicos relacionados com a resposta específica a essa via de administração.

Nosso resultado positivo, entretanto, pode ser melhor interpretado à luz de evidências prévias. Verificamos um aumento da frequência do alelo G do polimorfismo rs12944712 em dependentes, sendo que o mesmo polimorfismo já havia sido associado a fenótipos relacionados ao estresse, especificamente sintomas de TEPT (Amstadter *et al.*, 2011). Na nossa amostra, os dois polimorfismos – rs110402 e rs12944712 – estão em forte desequilíbrio de ligação, situação já descrita no estudo anterior (Amstadter *et al.*, 2011), o que inclui a possibilidade de que o efeito funcional do gene poderia ser, na realidade, mediado por outros SNPs. Por exemplo, os SNPs rs110402 e rs1876831 já foram associados à dependência de álcool (Treutlein *et al.*, 2006; Blomeyer *et al.*, 2008; Ribbe *et al.*, 2011).

A composição dessas amostras apenas por mulheres limita a extrapolação dos dados para o sexo masculino. No entanto, a maior homogeneidade do grupo pode ser positiva, considerando que a função do eixo HPA parece incluir considerável dimorfismo sexual (Back *et al.*, 2008). Sabe-se que, no que diz respeito a funcionamento hormonal e cerebral, homens e mulheres apresentam diferenças significativas; ainda, os padrões de transtornos psiquiátricos também são diferentes entre os sexos, com prevalências variáveis de acordo com o gênero. Com relação ao uso de nicotina, por exemplo, alguns fatores de risco foram descritos de forma diferente de acordo com o sexo (al'Absi 2006), bem como mulheres tabagistas apresentaram maior produção de cortisol do que homens (Back *et al.*, 2008). Assim, as amostras utilizadas nesse trabalho permitem a obtenção de dados que visam auxiliar no entendimento dos mecanismos envolvidos na suscetibilidade ao uso de substâncias ao menos em mulheres. É preciso

destacar, no entanto, que o tamanho amostral disponível é muito pequeno, considerando os desafios impostos pelo pequeno tamanho de efeito de variações genéticas em características multifatoriais. Infelizmente, essa grave limitação é comum às pesquisas em dependências químicas menos tradicionais, como é o caso do crack. Sem dúvidas, os esforços de coleta de dados no mundo inteiro devem persistir.

Alterações na produção de cortisol em resposta ao estresse são comuns em pacientes com transtornos psiquiátricos. Por exemplo, já foi descrito esse aumento em mulheres com Transtorno Depressivo Maior (Heim *et al.*, 2000). Ainda, os glicocorticóides desempenham um papel regulatório na expressão de genes relacionados ao eixo HPA, incluindo o gene *CRHR1* (Ochedalski *et al.*, 1998). O SNP rs110402 gera uma alteração significativa dos níveis de cortisol (Tyrka *et al.*, 2009; Mahon *et al.*, 2012), indicando que variações no gene *CRHR1* podem estar envolvidas nesse processo de regulação da produção de glicocorticóides, tornando os indivíduos mais ou menos responsivos a situações de estresse. Além disso, os níveis de cortisol estão positivamente associados ao aumento do *craving* (Buchmann *et al.*, 2010; McKee *et al.*, 2011), bem como ao aumento da satisfação descrita após o uso de nicotina (McKee *et al.* 2011). Então, essa relação entre os níveis de cortisol e variantes em genes de resposta a estresse, apesar de pouco clara, pode ser um possível mecanismo subjacente às associações observadas.

A presente dissertação apresenta dois estudos inovadores na área de genética psiquiátrica. Poucos trabalhos têm como foco específico a dependência de *crack*, de modo que os nossos artigos são os primeiros a associar esse transtorno a polimorfismos em genes relacionados ao eixo HPA. Além disso, nenhum estudo até o momento realizou uma análise comparativa de frequências gênicas com o grupo de dependentes de nicotina, outra substância com elevado potencial de dependência com a mesma via de administração. De maneira preliminar, levantamos a hipótese de que exista um mecanismo comum ao desenvolvimento de dependências de diferentes substâncias que são fumadas, por elas chegarem muito mais rapidamente ao cérebro (Gossop *et al.*, 1994). Usuários de drogas apresentam diferenças nos graus de ativação do sistema de recompensa (George e Koob, 2010; Saunders e Robinson, 2011), e sabe-se que essa variação pode ter relação com alguns

componentes genéticos (Cohen *et al.*, 2007). Dessa forma, um efeito de interações envolvendo a via de administração e a variabilidade genética individual poderia explicar essa variação de respostas. Os polimorfismos no gene *CRHR1*, assim como em outros genes relacionados ao TUS, podem estar envolvidos especificamente na ativação de mecanismos neurobiológicos específicos do uso de substâncias fumadas.

Nosso trabalho pretende contribuir para a compreensão e entendimento dos mecanismos relacionados ao estresse que podem estar envolvidos na suscetibilidade ao uso de substância. Principalmente no que diz respeito à dependência de *crack*, consideramos de grande valia o estudo de genes candidatos, ainda que de forma isolada, dada a plausibilidade biológica inerente a esse mecanismo. Como futuras investigações nessa linha de pesquisa, destacam-se ainda as possíveis interações entre o gene *CRHR1* e outros genes relacionados ao eixo HPA, no contexto de um mecanismo de ação orquestrada de diferentes genes sobre os TUS.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- al'Absi M (2006) Hypothalamic-pituitary-adrenocortical responses to psychological stress and risk for smoking relapse. *Int J Psychophysiol* 59: 218-227.
- Amstadter AB, Nugent NR, Yang BZ, Miller A, Siburian R, Moorjani P, Haddad S, Basu A, Fagerness J, Saxe G, *et al.* (2011) Corticotrophin-releasing hormone type 1 receptor gene (CRHR1) variants predict posttraumatic stress disorder onset and course in pediatric injury patients. *Dis Markers* 30: 89-99.
- American Psychiatry Association (2004) *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 4th ed. Washington, DC.
- Back SE, Waldrop AE, Saladin ME, Yeatts SD, Simpson A, McRae AL, Upadhyaya HP, Contini Sisson R, Spratt EG, Allen J, *et al.* (2008) Effects of gender and cigarette smoking on reactivity to psychological and pharmacological stress provocation. *Psychoneuroendocrinology* 33: 560-568.
- Badrick E, Bobak M, Britton A, Kirschbaum C, Marmot M e Kumari M (2008) The relationship between alcohol consumption and cortisol secretion in an aging cohort. *J Clin Endocrinol Metab* 93: 750-757.
- Ben-Efraim YJ, Wasserman D, Wasserman J e Sokolowski M (2011) Gene-environment interactions between CRHR1 variants and physical assault in suicide attempts. *Genes Brain Behav* 10: 663-672.
- 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, 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.

- Binder EB, Bradley RG, Liu W, Epstein MP, Deveau TC, Mercer KB, Tang Y, Gillespie CF, Heim CM, Nemeroff CB, *et al.* (2008) Association of FKBP5 polymorphisms and childhood abuse with risk of posttraumatic stress disorder symptoms in adults. *JAMA* 299: 1291-1305.
- Blomeyer D, Treutlein J, Esser G, Schmidt MH, Schumann G e Laucht M (2008) Interaction between CRHR1 gene and stressful life events predicts adolescent heavy alcohol use. *Biol Psychiatry* 63: 146-151.
- Boscarino JA, Erlich PM, Hoffman SN, Rukstalis M e Stewart WF (2011) Association of FKBP5, COMT and CHRNA5 polymorphisms with PTSD among outpatients at risk for PTSD. *Psychiatry Res* 188: 173-174.
- Boschloo L, Vogelzangs N, Licht CM, Vreeburg SA, Smit JH, van den Brink W, Veltman DJ, de Geus EJ, Beekman AT e Penninx BW (2011) Heavy alcohol use, rather than alcohol dependence, is associated with dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the autonomic nervous system. *Drug Alcohol Depend* 116: 170-176.
- Bradley RG, Binder EB, Epstein MP, Tang Y, Nair HP, Liu W, Gillespie CF, Berg T, Evces M, Newport DJ, *et al.* (2008) Influence of child abuse on adult depression: moderation by the corticotropin-releasing hormone receptor gene. *Arch Gen Psychiatry* 65: 190-200.
- Brady KT, McRae AL, Moran-Santa Maria MM, DeSantis SM, Simpson AN, Waldrop AE, Back SE e Kreek MJ (2009) Response to corticotropin-releasing hormone infusion in cocaine-dependent individuals. *Arch Gen Psychiatry* 66: 422-430.
- Breslau N, Johnson EO, Hiripi E e Kessler R (2001) Nicotine dependence in the United States: prevalence, trends, and smoking persistence. *Arch Gen Psychiatry* 58: 810-816.
- Brunzell DH e Picciotto MR (2009) Molecular mechanisms underlying the motivational effects of nicotine. *Nebr Symp Motiv* 55: 17-30.

- Buchmann AF, Laucht M, Schmid B, Wiedemann K, Mann K e Zimmermann US (2010) Cigarette craving increases after a psychosocial stress test and is related to cortisol stress response but not to dependence scores in daily smokers. *J Psychopharmacol* 24: 247-255.
- Centro Brasileiro de Informação Sobre Drogas Psicotrópicas (2006) II Levantamento Domiciliar Sobre Uso de Drogas Psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país. São Paulo, SP.
- Chakroun N, Johnson EI e Swendsen J (2010) Mood and personality-based models of substance use. *Psychol Addict Behav* 24: 129-136.
- Chen CY e Anthony JC (2004) Epidemiological estimates of risk in the process of becoming dependent upon cocaine: cocaine hydrochloride powder versus crack cocaine. *Psychopharmacology (Berl)* 172: 78-86.
- Cigler T, LaForge KS, McHugh PF, Kapadia SU, Leal SM e 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 e Schumann G (2009) Gene-environment interactions resulting in risk alcohol drinking behaviour are mediated by CRF and CRF1. *Pharmacol Biochem Behav* 93: 230-236.
- Cohen MX, Krohn-Grimberghe A, Elger CE e Weber B (2007) Dopamine gene predicts the brain's response to dopaminergic drug. *Eur J Neurosci* 26: 3652-3660.
- Contini V, Bertuzzi GP, Polina ER, Hunemeier T, Hendler EM, Hutz MH e Bau CH (2012) A haplotype analysis is consistent with the role of functional HTR1B variants in alcohol dependence. *Drug Alcohol Depend* 122: 100-104.
- Costello EJ, Mustillo S, Erkanli A, Keeler G e Angold A (2003) Prevalence and development of psychiatric disorders in childhood and adolescence. *Arch Gen Psychiatry* 60: 837-844.

- Couwenbergh C, van den Brink W, Zwart K, Vreugdenhil C, van Wijngaarden-Cremers P e van der Gaag RJ (2006) Comorbid psychopathology in adolescents and young adults treated for substance use disorders: a review. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 15: 319-328.
- Cunha PJ, Nicastrí S, Gomes LP, Moino RM e Peluso MA (2004) [Neuropsychological impairments in crack cocaine-dependent inpatients: preliminary findings]. *Rev Bras Psiquiatr* 26: 103-106.
- Cutajar MC, Mullen PE, Ogloff JR, Thomas SD, Wells DL e Spataro J (2010) Psychopathology in a large cohort of sexually abused children followed up to 43 years. *Child Abuse Negl* 34: 813-822.
- Da Silveira DX, Doering-Silveira E, Niel M e Jorge MR (2006) Predicting craving among cocaine users. *Addict Behav* 31: 2292-2297.
- Dakof GA (2000) Understanding gender differences in adolescent drug abuse: issues of comorbidity and family functioning. *J Psychoactive Drugs* 32: 25-32.
- De Bellis MD (2002) Developmental traumatology: a contributory mechanism for alcohol and substance use disorders. *Psychoneuroendocrinology* 27: 155-170.
- De Luca V, Tharmalingam S, Zai C, Potapova N, Strauss J, Vincent J e Kennedy JL (2010) Association of HPA axis genes with suicidal behaviour in schizophrenia. *J Psychopharmacol* 24: 677-682.
- Desrivières 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.
- DeYoung CG, Cicchetti D e Rogosch FA (2011) Moderation of the association between childhood maltreatment and neuroticism by the corticotropin-releasing hormone receptor 1 gene. *J Child Psychol Psychiatry* 52: 898-906.

- Dias AC, Araujo MR, Dunn J, Sesso RC, de Castro V e Laranjeira R (2011) Mortality rate among crack/cocaine-dependent patients: a 12-year prospective cohort study conducted in Brazil. *J Subst Abuse Treat* 41: 273-278.
- Drgon T, Zhang PW, Johnson C, Walther D, Hess J, Nino M e Uhl GR (2010) Genome wide association for addiction: replicated results and comparisons of two analytic approaches. *PLoS One* 5: e8832.
- 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.
- Edokpolo O, James P, Kearns C, Campbell A e Smyth BP (2010) Gender differences in psychiatric symptomatology in adolescents attending a community drug and alcohol treatment program. *J Psychoactive Drugs* 42: 31-36.
- Egger HL e Angold A (2006) Common emotional and behavioral disorders in preschool children: presentation, nosology, and epidemiology. *J Child Psychol Psychiatry* 47: 313-337.
- Falcone M, Jepson C, Benowitz N, Bergen AW, Pinto A, Wileyto EP, Baldwin D, Tyndale RF, Lerman C e Ray R (2011) Association of the nicotine metabolite ratio and CHRNA5/CHRNA3 polymorphisms with smoking rate among treatment-seeking smokers. *Nicotine Tob Res* 13: 498-503.
- Farmer RF, Seeley JR, Kosty DB e Lewinsohn PM (2009) Refinements in the hierarchical structure of externalizing psychiatric disorders: Patterns of lifetime liability from mid-adolescence through early adulthood. *J Abnorm Psychol* 118: 699-710.
- Fernandez-Castillo N, Ribases M, Roncero C, Casas M, Gonzalvo B e Cormand B (2010) Association study between the DAT1, DBH and DRD2 genes and cocaine dependence in a Spanish sample. *Psychiatr Genet* 20: 317-320.

- Flandreau EI, Ressler KJ, Owens MJ e Nemeroff CB (2012) Chronic overexpression of corticotropin-releasing factor from the central amygdala produces HPA axis hyperactivity and behavioral anxiety associated with gene-expression changes in the hippocampus and paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Psychoneuroendocrinology* 37: 27-38.
- George O e Koob GF (2010) Individual differences in prefrontal cortex function and the transition from drug use to drug dependence. *Neurosci Biobehav Rev* 35: 232-247.
- Goeders NE (2002) The HPA axis and cocaine reinforcement. *Psychoneuroendocrinology* 27: 13-33.
- Gossop M, Griffiths P, Powis B e Strang J (1994) Cocaine: patterns of use, route of administration, and severity of dependence. *Br J Psychiatry* 164: 660-664.
- Grabe HJ, Schwahn C, Appel K, Mahler J, Schulz A, Spitzer C, Fenske K, Barnow S, Lucht M, Freyberger HJ, *et al.* (2010) Childhood maltreatment, the corticotropin-releasing hormone receptor gene and adult depression in the general population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 153B: 1483-1493.
- 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.
- Heim C, Newport DJ, Heit S, Graham YP, Wilcox M, Bonsall R, Miller AH e Nemeroff CB (2000) Pituitary-adrenal and autonomic responses to stress in women after sexual and physical abuse in childhood. *JAMA* 284: 592-597.
- Instituto Nacional de Câncer (2011) Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, RJ.

- Ishitobi Y, Nakayama S, Yamaguchi K, Kanehisa M, Higuma H, Maruyama Y, Ninomiya T, Okamoto S, Tanaka Y, Tsuru J, *et al.* (2012) Association of CRHR1 and CRHR2 with major depressive disorder and panic disorder in a Japanese population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 159B: 429-436.
- John U, Meyer C, Rumpf HJ e Hapke U (2004) Smoking, nicotine dependence and psychiatric comorbidity--a population-based study including smoking cessation after three years. *Drug Alcohol Depend* 76: 287-295.
- Johnson C, Drgon T, McMahon FJ e Uhl GR (2009) Convergent genome wide association results for bipolar disorder and substance dependence. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 150B: 182-190.
- 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.
- Keck ME, Kern N, Erhardt A, Unschuld PG, Ising M, Salyakina D, Muller MB, Knorr CC, Lieb R, Hohoff C, *et al.* (2008) Combined effects of exonic polymorphisms in CRHR1 and AVPR1B genes in a case/control study for panic disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B: 1196-1204.
- Kendler KS e Prescott CA (1998) Cocaine use, abuse and dependence in a population-based sample of female twins. *Br J Psychiatry* 173: 345-350.
- Kendler KS, Karkowski LM, Neale MC e 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.
- Kim HW, Cho SC, Kim BN, Kim JW, Shin MS e Yeo JY (2010) Does oppositional defiant disorder have temperament and psychopathological profiles independent of attention deficit/hyperactivity disorder? *Compr Psychiatry* 51: 412-418.

- Kirisci L, Vanyukov M e Tarter R (2005) Detection of youth at high risk for substance use disorders: a longitudinal study. *Psychol Addict Behav* 19: 243-252.
- Klaassens ER (2010) Bouncing back - trauma and the HPA-axis in healthy adults. *Eur J Psychotraumatol* 1.
- Li MD (2006) The genetics of nicotine dependence. *Curr Psychiatry Rep* 8: 158-164.
- 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.
- Lopez-Duran NL, Kovacs M e George CJ (2009) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation in depressed children and adolescents: a meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology* 34: 1272-1283.
- Ma QY, Zhang XN, Jiang H, Wang ZQ, Zhang HJ, Xue LQ, Chen MD e Song HD (2011) Mimecan in pituitary corticotroph cells may regulate ACTH secretion and the HPAA. *Mol Cell Endocrinol* 341: 71-77.
- Mahon PB, Zandi PP, Potash JB, Nestadt G e Wand GS (2012) Genetic association of FKBP5 and CRHR1 with cortisol response to acute psychosocial stress in healthy adults. *Psychopharmacology (Berl)*.
- Mansvelder HD e McGehee DS (2002) Cellular and synaptic mechanisms of nicotine addiction. *J Neurobiol* 53: 606-617.
- Mantsch JR e Goeders NE (2000) Effects of cocaine self-administration on plasma corticosterone in rats: relationship to hippocampal type II glucocorticoid receptors. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 24: 633-646.

- McCorry E, De Brito SA e Viding E (2012) The link between child abuse and psychopathology: a review of neurobiological and genetic research. *J R Soc Med* 105: 151-156.
- McKee SA, Sinha R, Weinberger AH, Sofuoglu M, Harrison EL, Lavery M e Wanzer J (2011) Stress decreases the ability to resist smoking and potentiates smoking intensity and reward. *J Psychopharmacol* 25: 490-502.
- Mendelson JH, Sholar MB, Goletiani N, Siegel AJ e Mello NK (2005) Effects of low- and high-nicotine cigarette smoking on mood states and the HPA axis in men. *Neuropsychopharmacology* 30: 1751-1763.
- Milroy CM e Parai JL (2011) The histopathology of drugs of abuse. *Histopathology* 59: 579-593.
- Moran-Santa Maria MM, McRae-Clark AL, Back SE, DeSantis SM, Baker NL, Spratt EG, Simpson AN e 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.
- Morton WA (1999) Cocaine and Psychiatric Symptoms. *Prim Care Companion J Clin Psychiatry* 1: 109-113.
- Mota NR, Rovaris DL, Bertuzzi GP, Contini V, Vitola ES, Grevet EH, Roman T, Callegari-Jacques SM, Hutz MH e Bau CH (2012) DRD2/DRD4 heteromerization may influence genetic susceptibility to alcohol dependence. *Mol Psychiatry*.
- Munafò MR e Johnstone EC (2008) Genes and cigarette smoking. *Addiction* 103: 893-904.
- Nestler EJ (2005) The neurobiology of cocaine addiction. *Sci Pract Perspect* 3: 4-10.

- Ochedalski T, Rabadan-Diehl C e Aguilera G (1998) Interaction between glucocorticoids and corticotropin releasing hormone (CRH) in the regulation of the pituitary CRH receptor in vivo in the rat. *J Neuroendocrinol* 10: 363-369.
- Ostiguy CS, Ellenbogen MA, Walker CD, Walker EF e Hodgins S (2011) Sensitivity to stress among the offspring of parents with bipolar disorder: a study of daytime cortisol levels. *Psychol Med*: 1-11.
- Ouellet-Morin I, Odgers CL, Danese A, Bowes L, Shakoor S, Papadopoulos AS, Caspi A, Moffitt TE e Arseneault L (2011) Blunted cortisol responses to stress signal social and behavioral problems among maltreated/bullied 12-year-old children. *Biol Psychiatry* 70: 1016-1023.
- Palamarchouk V, Smagin G e Goeders NE (2009) Self-administered and passive cocaine infusions produce different effects on corticosterone concentrations in the medial prefrontal cortex (MPC) of rats. *Pharmacol Biochem Behav* 94: 163-168.
- Papiol S, Arias B, Gasto C, Gutierrez B, Catalan R e Fananas L (2007) Genetic variability at HPA axis in major depression and clinical response to antidepressant treatment. *J Affect Disord* 104: 83-90.
- Pisarchik A e Slominski AT (2001) Alternative splicing of CRH-R1 receptors in human and mouse skin: identification of new variants and their differential expression. *FASEB J* 15: 2754-2756.
- Polanczyk G, Caspi A, Williams B, Price TS, Danese A, Sugden K, Uher R, Poulton R e Moffitt TE (2009) Protective effect of CRHR1 gene variants on the development of adult depression following childhood maltreatment: replication and extension. *Arch Gen Psychiatry* 66: 978-985.
- Purper-Ouakil D, Cortese S, Wohl M, Aubron V, Orejarena S, Michel G, Asch M, Mouren MC e Gorwood P (2010) Temperament and character dimensions associated with clinical characteristics and treatment

outcome in attention-deficit/hyperactivity disorder boys. *Compr Psychiatry* 51: 286-292.

Ressler KJ, Bradley B, Mercer KB, Deveau TC, Smith AK, Gillespie CF, Nemeroff CB, Cubells JF e Binder EB (2010) Polymorphisms in CRHR1 and the serotonin transporter loci: gene x gene x environment interactions on depressive symptoms. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 153B: 812-824.

Ribbe K, Ackermann V, Schwitulla J, Begemann M, Papiol S, Grube S, Sperling S, Friedrichs H, Jahn O, Sillaber I, *et al.* (2011) Prediction of the Risk of Comorbid Alcoholism in Schizophrenia by Interaction of Common Genetic Variants in the Corticotropin-Releasing Factor System. *Arch Gen Psychiatry*.

Richards JM, Stipelman BA, Bornovalova MA, Daughters SB, Sinha R e 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.

Rohleder N e Kirschbaum C (2006) The hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis in habitual smokers. *Int J Psychophysiol* 59: 236-243.

Roy A, Gorodetsky E, Yuan Q, Goldman D e Enoch MA (2010) Interaction of FKBP5, a stress-related gene, with childhood trauma increases the risk for attempting suicide. *Neuropsychopharmacology* 35: 1674-1683.

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.

Saunders BT e Robinson TE (2011) Individual variation in the motivational properties of cocaine. *Neuropsychopharmacology* 36: 1668-1676.

- Schmid B, Blomeyer D, Treutlein J, Zimmermann US, Buchmann AF, Schmidt MH, Esser G, Rietschel M, Banaschewski T, Schumann G, *et al.* (2010) Interacting effects of CRHR1 gene and stressful life events on drinking initiation and progression among 19-year-olds. *Int J Neuropsychopharmacol* 13: 703-714.
- Schumann G, Coin LJ, Lourdasamy A, Charoen P, Berger KH, Stacey D, Desrivieres S, Aliev FA, Khan AA, Amin N, *et al.* (2011) Genome-wide association and genetic functional studies identify autism susceptibility candidate 2 gene (AUTS2) in the regulation of alcohol consumption. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 7119-7124.
- Shadrina M, Nikopentius T, Slominsky P, Illarioshkin S, Bagyeva G, Markova E, Ivanova-Smolenskaia I, Kurg A, Limborska S e Metspalu A (2006) Association study of sporadic Parkinson's disease genetic risk factors in patients from Russia by APEX technology. *Neurosci Lett* 405: 212-216.
- Sheikh HI, Kryski KR, Smith HJ, Hayden EP e Singh SM (2013) Corticotropin-releasing hormone system polymorphisms are associated with children's cortisol reactivity. *Neuroscience* 229: 1-11.
- Sillaber I, Rammes G, Zimmermann S, Mahal B, Zieglgansberger W, Wurst W, Holsboer F e Spanagel R (2002) Enhanced and delayed stress-induced alcohol drinking in mice lacking functional CRH1 receptors. *Science* 296: 931-933.
- Sinha R, Talih M, Malison R, Cooney N, Anderson GM e Kreek MJ (2003) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis and sympatho-adreno-medullary responses during stress-induced and drug cue-induced cocaine craving states. *Psychopharmacology (Berl)* 170: 62-72.
- Sinha R, Garcia M, Paliwal P, Kreek MJ e Rounsaville BJ (2006) Stress-induced cocaine craving and hypothalamic-pituitary-adrenal responses are predictive of cocaine relapse outcomes. *Arch Gen Psychiatry* 63: 324-331.

- Sinha R, Fox HC, Hong KI, Hansen J, Tuit K e Kreek MJ (2011) Effects of adrenal sensitivity, stress- and cue-induced craving, and anxiety on subsequent alcohol relapse and treatment outcomes. *Arch Gen Psychiatry* 68: 942-952.
- 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.
- Steptoe A e Ussher M (2006) Smoking, cortisol and nicotine. *Int J Psychophysiol* 59: 228-235.
- Tarter RE, Kirisci L, Mezzich A, Cornelius JR, Pajer K, Vanyukov M, Gardner W, Blackson T e Clark D (2003) Neurobehavioral disinhibition in childhood predicts early age at onset of substance use disorder. *Am J Psychiatry* 160: 1078-1085.
- Timpl P, Spanagel R, Sillaber I, Kresse A, Reul JM, Stalla GK, Blanquet V, Steckler T, Holsboer F e Wurst W (1998) Impaired stress response and reduced anxiety in mice lacking a functional corticotropin-releasing hormone receptor 1. *Nat Genet* 19: 162-166.
- Treutlein J, Kissling C, Frank J, Wiemann S, Dong L, Depner M, Saam C, Lascorz J, Soyka M, Preuss UW, *et al.* (2006) Genetic association of the human corticotropin releasing hormone receptor 1 (CRHR1) with binge drinking and alcohol intake patterns in two independent samples. *Mol Psychiatry* 11: 594-602.
- 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.
- Tyrka AR, Wier L, Price LH, Ross N, Anderson GM, Wilkinson CW e Carpenter LL (2008) Childhood parental loss and adult hypothalamic-pituitary-adrenal function. *Biol Psychiatry* 63: 1147-1154.

- Tyrka AR, Price LH, Gelernter J, Schepker C, Anderson GM e Carpenter LL (2009) Interaction of childhood maltreatment with the corticotropin-releasing hormone receptor gene: effects on hypothalamic-pituitary-adrenal axis reactivity. *Biol Psychiatry* 66: 681-685.
- United Nations Office on Drug and Crime (2012) *World Drug Report*. Vienna.
- van Leeuwen AP, Creemers HE, Greaves-Lord K, Verhulst FC, Ormel J e Huizink AC (2011) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis reactivity to social stress and adolescent cannabis use: the TRAILS study. *Addiction* 106: 1484-1492.
- Vink JM, Willemsen G e Boomsma DI (2005) Heritability of smoking initiation and nicotine dependence. *Behav Genet* 35: 397-406.
- Wardenaar KJ, Vreeburg SA, van Veen T, Giltay EJ, Veen G, Penninx BW e Zitman FG (2011) Dimensions of depression and anxiety and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Biol Psychiatry* 69: 366-373.
- Wilens TE, Martelon M, Joshi G, Bateman C, Fried R, Petty C e Biederman J (2011) Does ADHD predict substance-use disorders? A 10-year follow-up study of young adults with ADHD. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 50: 543-553.
- Wu J (2009) Understanding of nicotinic acetylcholine receptors. *Acta Pharmacol Sin* 30: 653-655.
- Wu Z, Ji H, Hassan A, Aguilera G e Sandberg K (2004) Regulation of pituitary corticotropin releasing factor type-1 receptor mRNA binding proteins by modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Neuroendocrinol* 16: 214-220.
- Yao CT, Cheng CA, Wang HK, Chiu SW, Chen YC, Wang MF, Yin SJ e Peng GS (2011) The role of ALDH2 and ADH1B polymorphism in alcohol consumption and stroke in Han Chinese. *Hum Genomics* 5: 569-576.

- Young-Wolff KC, Chereji E e Prescott CA (2012) Heritability of alcohol dependence is similar in women and men. *Evid Based Ment Health* 15: 57.
- Young SE, Friedman NP, Miyake A, Willcutt EG, Corley RP, Haberstick BC e Hewitt JK (2009) Behavioral disinhibition: liability for externalizing spectrum disorders and its genetic and environmental relation to response inhibition across adolescence. *J Abnorm Psychol* 118: 117-130.
- Zhou Y, Spangler R, Schlussman SD, Ho A e Kreek MJ (2003) Alterations in hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity and in levels of proopiomelanocortin and corticotropin-releasing hormone-receptor 1 mRNAs in the pituitary and hypothalamus of the rat during chronic 'binge' cocaine and withdrawal. *Brain Res* 964: 187-199.
- Zhou Y, Proudnikov D, Yuferov V e Kreek MJ (2010) Drug-induced and genetic alterations in stress-responsive systems: Implications for specific addictive diseases. *Brain Res* 1314: 235-252.