Caroline Perez Camilo

**Estudos epigenéticos em
dependentes de crack e cocaína:
investigação da metilação global do
genoma**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Programa de Psiquiatria
Orientador: Prof. Dr. Homero Pinto Vallada
Filho

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de
2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2015

Caroline Perez Camilo

**Estudos epigenéticos em
dependentes de crack e cocaína:
investigação da metilação global do
genoma**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Programa de Psiquiatria
Orientador: Prof. Dr. Homero Pinto Vallada
Filho

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de
2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Camilo, Caroline Perez

Estudos epigenéticos em dependentes de crack e cocaína : investigação da metilação global do genoma / Caroline Perez Camilo. -- São Paulo, 2015.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Psiquiatria.

Orientador: Homero Pinto Vallada Filho.

Descritores: 1.Epigenética 2.Genética 3.Metilação 4.Metilação de DNA 5.Metiloma 6.Cocaína 7.Cocaína crack

USP/FM/DBD-225/15

Dedico essa dissertação a um anjo que Deus colocou na minha vida. Uma irmã, cúmplice e confidente, que de muitas formas me ajudou, apoiou e incentivou para que fosse possível a concretização deste trabalho. Que não mediu esforços para me auxiliar em todo e qualquer momento. Obrigada, Daiane Cimino.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela saúde, fé, perseverança e por iluminar o meu caminho durante esta caminhada.

Aos meus pais, Ana Maria e Izilmar, por sua história de sucesso na educação dos filhos diante todas as adversidades. Agradeço pela educação que me deram, pela confiança, pelas broncas e por tudo que fizeram por mim com o objetivo de me formar pessoalmente e profissionalmente.

Ao meu irmão, Ronaldo, meu melhor amigo, por seus conselhos, ensinamentos e por acreditar em mim e no meu potencial em todos os momentos. Aos meus familiares, por me incentivar nas horas mais difíceis e nas decisões tomadas, por compartilhar e sempre estar ao meu lado ao longo das minhas conquistas.

Aos amigos, aos que se foram e aos que permanecem em minha vida até hoje, por todas as palavras de incentivo e persistência.

Ao orientador Professor Doutor Homero Vallada, pelo voto de confiança em me acolher como orientanda. Por sua paciência, experiência e ensinamentos nessa jornada. E, principalmente, por incentivar minha maturidade acadêmica e pessoal.

À Banca de qualificação, composta pela Profa. Márcia Scazufca, Prof. Guilherme Messas e Prof. Hermano Tavares, pelas sugestões e orientações adequadas ao aprimoramento dessa pesquisa.

Aos colegas do Laboratório de Patologia Clínica, às colegas Kátia Ichi, Alessandra Moraes, Débora Zambori, Luciana dos Santos, e todos os colegas do Instituto de Psiquiatria do HCFMUSP que me ajudaram durante o desenvolvimento e execução desse trabalho e por me receberem desde o início com carinho e atenção.

À Professora Doutora Helena Brentani, por todo o ensinamento, colaboração e por me acompanhar no desenvolvimento ideológico da pesquisa. Sua participação foi fundamental para a realização desse trabalho.

Aos colegas do grupo de genética, Aderbal Ruy, Andressa Zambori, Ana Carolina Tahira, Bianca Lisboa, Cecília Feio, Henrique Vieira e Viviane Neri. Agradeço pelas conversas, pelos momentos especiais, pelo amadurecimento e por tornarem os dias mais felizes e agradáveis. Por sua experiência acadêmica no convívio e aprendizado e pelo apoio, força e paciência.

Ao suporte financeiro fornecido pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – Fapesp (processo nº 2013/00659-2) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Capes pela bolsa de estudo concedida.

Meus sinceros agradecimentos a todos os envolvidos nesse projeto.

*“O SENHOR é o meu pastor: nada me faltará. Deitar-me faz
em verdes pastos, guia-me mansamente a águas tranquilas.
Refrigera a minha alma; guia-me pelas veredas da justiça,
por amor do seu nome. Ainda que eu andasse pelo vale da
sombra da morte, não temeria mal algum, porque tu estás
comigo; a tua vara e o teu cajado me consolam. Preparas
uma mesa perante mim na presença dos meus inimigos,
unges a minha cabeça com óleo, o meu cálice transborda.
Certamente que a bondade e a misericórdia me seguirão
todos os dias da minha vida: e habitarei na casa do Senhor
por longos dias.” Salmos - 23.*

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in IndexMedicus*.

SUMÁRIO

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Resumo

Abstract

1.	INTRODUÇÃO.....	1
1.1.	HISTÓRICO.....	1
1.2.	EPIDEMIOLOGIA.....	2
1.3.	COCAÍNA E CRACK.....	5
1.3.1.	Mecanismos de ação do crack no organismo.....	9
1.4.	ESTUDO GENÉTICOS	11
1.4.1.	Estudos Genético Epidemiológicos.....	12
1.4.1.1.	Estudos em famílias, gêmeos e adotados	12
1.4.2.	Estudos Genético Moleculares	13
1.4.2.1.	Estudos de ligação e associação	13
1.5.	ESTUDOS EPIGENÉTICOS	15
1.5.1.	Epigenética.....	15
1.5.2.	Epigenética e dependência química	19
1.5.3.	Epigenética e o abuso/ dependência de cocaína.....	19
1.5.4.	Metilação do DNA e o abuso/ dependência de cocaína.....	20

2.	JUSTIFICATIVA.....	22
3.	OBJETIVOS.....	23
3.1.	OBJETIVO GERAL	23
3.2.	OBJETIVO ESPECÍFICO	23
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
4.1.	METILAÇÃO GLOBAL	24
4.1.1.	Casos e controles.....	24
4.1.2.	Seleção das amostras.....	24
4.1.3.	Extração de DNA	27
4.1.4.	Metilação Global - Procedimento	27
4.2.	APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	29
4.3.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
4.3.1.	Ensaio <i>Illumina Infinium Human Methylation450 (450K) BeadChip</i> .	30
4.3.2.	Análise e interpretação dos dados.....	32
4.3.2.1.	Pré - processamento	33
4.3.2.2.	Correção e normalização.....	34
4.3.2.3.	Análise.....	35
5.	RESULTADOS.....	37
5.1.	Avaliação de qualidade e integridade do DNA.....	37
5.2.	METILAÇÃO GLOBAL	37
5.2.1.	Pré processamento.....	37
5.2.2.	Estimativa da composição sanguínea e normalização dos valores gerados pelas sondas <i>InfI</i> e <i>InfII</i>	38
5.2.3.	Comparação dos grupos	42

5.2.3.1. Caracterização dos sítios diferencialmente metilados entre casos e controles	42
5.2.3.2. <i>Probe Lasso</i>	47
6. DISCUSSÃO.....	52
7. CONCLUSÃO.....	61
8. ANEXOS.....	62
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

Lista de figuras

	Pag.
Figura 1 - Aumento no consumo de cocaína e seus produtos entre os anos de 2001 e 2005 e consumo de crack no território nacional.....	3
Figura 2 - Consumo de cocaína aspirada e crack em adultos na população brasileira em relação ao ano de 2012 para o uso no ‘último ano’ que antecedeu o levantamento e uso ‘na vida’	4
Figura 3 - Consumo de crack nas cenas de consumo (‘cracolândias’) em todo o território nacional no ano de 2012, indicando maior prevalência na região Nordeste do país.....	5
Figura 4 - Etapas dos processos físicos/químicos para obtenção da cocaína e de seus produtos a partir das folhas de coca.....	7
Figura 5 – Vias de administração de cocaína e suas características quanto a concentração de cocaína, concentração plasmática, velocidade e duração dos efeitos, e potencial de dependência.....	8
Figura 6 – Representação do processo de metilação do DNA, com a adição de um grupamento metil (CH ₃) ao carbono da posição cinco da citosina (C), catalizada pela enzima DNA metiltransferase (DNMT) em dinucleotídeos CpG.....	17
Figura 7 – Classificação dos indivíduos de acordo com a frequência de uso da droga para crack e para cocaína, a partir de uma amostra inicial de 746 usuários/dependentes.....	25
Figura 8 – Seleção das amostras do estudo para a realização do procedimento de metilação global do DNA.....	26
Figura 9 – Lâminas <i>Illumina Infinium Human Methylation450 (450K) BeadChip</i> no <i>scanner iScan Microarray Scanner</i> para a genotipagem das amostras por microarray.....	29
Figura 10 – Distribuição de regiões em relação ao gene e a ilha CpG.....	30
Figura 11 – Ensaio de metilação <i>Infinium I</i>	31
Figura 12 – Ensaio de metilação <i>Infinium II</i>	32
Figura 13 – Cálculo de β corresponde a porcentagem de metilação.....	34

Figura 14 -	Géis de agarose de parte das amostras demonstrando uniformidade quanto à qualidade e integridade do DNA.....	37
Figura 15 -	Estimativa da porcentagem celular em cada amostra do estudo pela função <i>estimatecellcount</i>	40
Figura 16 -	Gráfico de normalização BMIQ.....	41
Figura 17 -	Agrupamento hierárquico das amostras baseado nos valores de β das 446.662 sondas.....	41
Figura 18 -	Gráfico MDS baseado nos valores de β das sondas com maior variância.....	42
Figura 19 -	Agrupamento hierárquico representando o padrão de metilação entre casos e controles utilizando os 250 sítios diferencialmente metilados.....	44
Figura 20 -	Disposição dos sítios diferencialmente metilados.....	45
Figura 21 -	Rede PPI do modulo que apresentou hiper-representação dos genes diferencialmente metilados.....	46
Figura 22 -	<i>Boxplot</i> - distância entre os dados de acordo com a sua função genômica e ilha CpG.....	48
Figura 23 -	<i>Cumulative Quantile Plot</i> - tamanho das janelas empregadas para a busca de DMRs.....	48
Figura 24 -	Gráfico de pontos em escala de tamanho que ilustram o tamanho das janelas utilizadas no <i>Probe lasso</i>	49
Figura 25 -	Esquemas representativos das localizações das DMRs mapeadas no UCSC <i>Genome Browser</i>	51

Lista de tabelas

	Pag.
Tabela 1 - Porcentagem das células sanguíneas de acordo com o <i>estimateCellCounts</i>	38
Tabela 2 - Relação entre os sítios diferencialmente metilados ($adjP < 10^{-5}$) e os vinte e três genes que se apresentaram com $ \Delta\beta $ maior ou igual a 0,1 na comparação entre casos e controles.....	43
Tabela 3 - Descrição das regiões diferencialmente metiladas (DMRs) e genes hipometilados na comparação entre casos e controles.....	50

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

<i>adjP</i>	<i>p</i> -valor ajustado
BMIQ	<i>Beta mixture quantile</i>
ChAMP	<i>Chip Analysis Methylation Pipeline</i>
CpG	'Citosina-fosfato de ligação Guanina'
DMR	<i>Differentially methylated regions</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
<i>InfI</i>	<i>Infinium I</i>
<i>InfII</i>	<i>Infinium II</i>
MDS	<i>Multidimensional scaling</i>
MVP	<i>Methylation Variable Positions</i>
NAC	Núcleo accumbens
pb	pares de base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFC	Córtex pré-frontal
PPI	Protein-protein interaction
SNC	Sistema nervoso central
SNPs	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
TSS	<i>Transcription start site</i>
UTR	<i>Untranslated region</i>

Resumo

Camilo CP. *Estudos epigenéticos em dependentes de crack e cocaína: investigação da metilação global do genoma* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

INTRODUÇÃO: A expansão e disseminação do consumo de crack e cocaína no Brasil vem se tornando um grave problema de saúde pública nos últimos vinte anos. Diferentes abordagens biológicas têm sido investigadas utilizando o fenótipo de abuso/dependência de crack/cocaína, cujos resultados têm demonstrado a participação importante do substrato genético, assim como a sua interação com os fatores ambientais no desenvolvimento desse transtorno. **OBJETIVOS:** Investigar o padrão de metilação do DNA do genoma de indivíduos que apresentam abuso/dependência de cocaína e de crack, comparando ao padrão de metilação de indivíduos controles. **MÉTODOS:** Foram selecionados 24 dependentes de cocaína e crack e 24 controles saudáveis, pareados por sexo e idade. Utilizando amostras de DNA extraídas de sangue periférico de cada um dos participantes, foi realizada a técnica de metilação global com o ensaio *Illumina Infinium Human Methylation450 (450K) BeadChip*. Os resultados iniciais foram normalizados considerando a heterogeneidade celular e analisados utilizando o pacote ChAMP (*Chip Analysis Methylation Pipeline*) para identificar genes e/ou regiões gênicas diferencialmente metiladas que possam representar fatores de vulnerabilidade para o comportamento de abuso/dependência do crack e da cocaína. Os processos biológicos e vias celulares com os quais os sítios diferencialmente metilados estão envolvidos foram explorados usando as ferramentas disponibilizadas pelo “*WebGestalt*” e pelo “*UCSC Genome Browser*”. **RESULTADOS:** Foram observados 250 sítios diferencialmente

metilados, associados a 246 genes na comparação dos perfis de metilação entre os casos e controles, sendo que 49% destes estavam localizados nas regiões promotoras dos genes, sugerindo que esses sítios podem estar relacionados com a expressão gênica. Alterações estatisticamente significantes no padrão de metilação entre casos e controles foram observadas em 23 sítios CpG (p -valor ajustado $<10^{-5}$ e $|\Delta\beta| = 0,1$). Observou-se também que três regiões diferencialmente metiladas foram associadas a genes hipometilados (*BMP8A*, *GPR88* e *RNF166*) (p -valor ajustado <0.05), cada uma com pelo menos três sítios. Alterações estatisticamente significantes também foram observadas em seis genes hiper-representados: *CALCA*, *NCOA2*, *DRD2*, *EHMT1*, *EHMT2*, *MAP2K1*, *MAPK3* e *MAPK1*, envolvidos em processos biológicos e moleculares. CONCLUSÕES: Observou-se diferenças estatisticamente significativas no padrão de metilação genômico de usuários/dependentes de crack e cocaína quando comparados aos controles saudáveis em amostra de DNA extraídas de sangue periférico. Comparação de estudos de expressão em tecido cerebral correlacionaram-se parcialmente com os achados apresentados. Outros estudos utilizando amostras independentes são necessários para confirmar esses achados. A confirmação desses resultados poderá contribuir na identificação e compreensão dos mecanismos biológicos envolvidos na dependência do crack/cocaína.

Descritores: epigenética; genética; metilação; metilação do DNA; metiloma; cocaína; crack.

Abstract

Camilo CP. *Epigenetic studies in crack and cocaine dependents: investigation of global genome methylation* [Dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2015.

BACKGROUND: The expansion and dissemination of crack and cocaine in Brazil has become a progressive and serious public health problem during the last twenty years. Different biological approaches have been investigated using the crack/cocaine abuser/dependent phenotype, with results confirming the important role of the genetic component, as well as its interaction with environmental factors.

OBJECTIVES: To investigate the DNA methylation pattern levels in the genome of individuals with crack and cocaine abuse/dependence and comparing it with the DNA methylation pattern of the genome of control subjects. **METHODS:** 24 crack and cocaine abusers/dependents and 24 healthy controls were selected and matched by sex and age. Using DNA samples from peripheral blood of each participant, a global methylation technique was performed using the Illumina Infinium Human Methylation450 (450K) Bead Chip assay. The initial results were normalized for cellular heterogeneity and re-analyzed using ChAMP package (Chip Methylation Analysis Pipeline) to identify differentially methylated genes or/and DNA regions that may represent biological/genetic risk factors for crack and cocaine abuse/dependence behavior. The biological processes and cellular pathways were explored using tools provided by “WebGestalt” and “UCSC Genome Browser”. **RESULTS:** 250 differentially methylated sites associated with 246 genes in methylation comparison profiles between cases and controls were identified, of

which almost half were located in the promoter regions of genes (49%), suggesting that these sites may be related to gene expression. Statistically significant changes in the methylation patterns between cases and controls were observed in 23 CpG sites (*adjust p-value* <10⁻⁵ and $|\Delta\beta| = 0.1$). In addition, three differentially methylated regions were associated with hypomethylated genes (*BMP8A*, *GPR88* e *RNF166*) (*adjust p-value* <0.05), each one with at least three sites. Statistically significant changes were also observed with six hyper-represented genes: *CALCA*, *NCOA2*, *DRD2*, *EHMT1*, *EHMT2*, *MAP2K1*, *MAPK3* e *MAPK1*, which are involved in biological and molecular processes. CONCLUSIONS: Crack and cocaine users/dependents presented significant statistical differences in the methylation pattern when compared to healthy controls in DNA samples extracted from peripheral blood. Results from gene expression studies using brain tissue can be correlated with our results. In order to confirm the present findings, future studies should be replicated using independent samples. The confirmation of these results will contribute to the understanding of the biological mechanisms involved in crack/cocaine dependence.

Descriptors: epigenetics; genetics; methylation; DNA methylation; global methylation; cocaine; crack.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico

A cocaína é um alcalóide extraído dos arbustos das plantas *Erythroxylon coca* e *Erythroxylon novogranatense*, provenientes da América do Sul, principalmente da Bolívia, Colômbia e Peru (Mata, 2003; Rivera et al., 2005). Há relatos sobre o uso dessas plantas desde 2500 a.C., época em que os Incas mascavam as folhas desses arbustos, conhecidas como folhas de coca, para suportar a fadiga durante suas atividades, como a caça, devido aos efeitos do ar rarefeito das montanhas em que viviam, e para suportar a fome (Escohotado, 1998; Mejia, Posada, 2008).

Dos meados do século XIX aos primeiros anos do século XX, o substrato da folha de coca, a cocaína, começou a ser utilizado popularmente na indústria Européia e Norte Americana. Nesse mesmo período, seu uso abusivo e nocivo foi reconhecido, tornando a comercialização dessa substância proibida em diversos países. Mas, em 1960, seu consumo se popularizou novamente e o seu uso prejudicial adquiriu, em 1980, o status de dependência para a nosologia psiquiátrica (Washton, 1989; Karch, 2006).

A partir de 1984, surgiu em bairros pobres de cidades americanas uma nova forma de consumo da cocaína, a forma fumada, conhecida como ‘crack’ (Reinarman, Levine, 1997).

1.2. Epidemiologia

Os primeiros casos sobre o uso da forma fumada da cocaína no Brasil foram observados a partir de 1989 (Nappo et al., 1994; Dunn et al., 1996). Por ser uma droga de baixo preço e efeitos bem mais intensos que as drogas comumente consumidas na época (ex: maconha, solventes, pó de cocaína, etc.), o uso do crack se disseminou progressivamente por todo o território nacional (Dunn, Laranjeira, 1999).

A partir da década de 1990, surgiram os primeiros estudos estimando a prevalência do consumo da cocaína e do crack na população brasileira. Esses estudos englobam tanto avaliações regionais (Ferri et al., 1997; Ferri, Gossop, 1999; Silva et al., 2006; Dias et al., 2011; Wagner et al., 2012) quanto nacionais. Os levantamentos epidemiológicos nacionais, abordam a prevalência do consumo de drogas no âmbito nacional da população geral ou em populações específicas, como em estudantes do ensino médio e fundamental (Galduróz et al., 1997; Galduróz et al., 2004; Carlini et al., 2010), estudantes universitários (Oliveira et al., 2013) e em crianças e adolescentes em situação de rua (Noto et al., 1997; Noto et al., 2003).

Os primeiros levantamentos nacionais foram organizados pelo Centro Brasileiro sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), que realizou dois levantamentos domiciliares, em 2001 e 2005, conhecidos como ‘I e II Levantamento Domiciliar Sobre o Uso de Drogas Psicotrópicas no Brasil’ (Carlini et al., 2001a; Carlini et al., 2007). Esses dois levantamentos envolveram as 107 maiores cidades do Brasil e constataram um aumento no consumo de cocaína e crack (‘uso na vida’) em todo o território nacional,

com destaque para aumento do consumo de crack principalmente nas regiões Sul e Suldeste (Figura 1).

FONTE: Adaptado de Carlini et al., 2001a; Carlini et al., 2007

Figura 1. A: Aumento no consumo de cocaína e crack ('uso na vida') entre os anos de 2001 e 2005; B: Consumo de crack no território nacional, indicando aumento principalmente nas regiões Sul e Suldeste

Outro importante levantamento nacional de base populacional foi realizado em 2006 pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Políticas Públicas do Álcool e Outras Drogas (INPAD), da UNIFESP, o 'I Levantamento Nacional sobre os padrões de consumo de álcool na população brasileira (I LENAD)' (Laranjeira et al., 2007). Em 2012, foi realizado o 'II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas (II LENAD)'. A comparação dos resultados entre esses dois levantamentos mostrou que o consumo de crack aumentou no país. No II LENAD, observou-se que pelo menos 6,1% da população brasileira já fez o uso de cocaína na vida (entre adolescentes e adultos), e aproximadamente 2,9 % já fizeram o uso de suas outras formas de consumo, como o crack (2,1%) e o oxi (0,8%) (Laranjeira et al., 2014).

Esse estudo também revelou que 0,7% da população brasileira de adultos consumiu crack nos últimos 12 meses, o que equivale a aproximadamente 800 mil brasileiros. Para o uso na vida, essa prevalência foi de 1,3%, representando 1,7 milhões de brasileiros (Laranjeira et al., 2014) (Figura 2).

FONTE: Adaptado de Laranjeira et al., 2014

Figura 2 - Consumo de cocaína aspirada e crack em adultos na população brasileira em relação ao ano de 2012 para o uso no ‘último ano’ que antecedeu o levantamento e uso ‘na vida’

De acordo com a Organização das Nações Unidas (ONU), o Brasil é o 2º maior mercado de cocaína do mundo (2,8 milhões de pessoas) ficando abaixo apenas dos EUA (4,1 milhões de pessoas). Em 2013, a *United Nations Office on Drugs and Crime* (UNODC), apontou o Brasil como uma das nações emergentes onde o uso da cocaína em suas diferentes formas de consumo está aumentando, enquanto há uma diminuição no consumo dessas drogas em outros países (Laranjeira et al., 2014).

O mais recente estudo epidemiológico, realizado pela Fundação Oswaldo Cruz em 2012, titulado como ‘Pesquisa Nacional sobre o uso de crack: quem são os usuários de crack e/ou similares do Brasil? Quantos são nas capitais brasileiras?’,

analisou a prevalência do consumo de crack e outras drogas na população em situação de rua, especificamente nas cenas de uso do crack, denominadas popularmente como ‘cracolândias’ (Bastos, Bertoni, 2014). Esse levantamento apontou dados sobre o ‘uso recente’ (últimos 6 meses) de drogas e trouxe resultados relevantes a cerca do consumo de crack e seus similares (merla, oxi e pasta base de cocaína, formas fumadas da cocaína assim como o crack). A prevalência do consumo de crack nessa população em geral foi de 0,54% (247.773 usuários) e de 0,81% para os similares (366.598 usuários). A região com maior prevalência de consumo foi a região Nordeste, com 1,29% (Figura 3).

FONTE: Adaptado de Bastos, Bertoni, 2014

Figura 3. Consumo de crack nas cenas de consumo ('cracolândias') em todo o território nacional no ano de 2012, indicando maior prevalência na região Nordeste do país

1.3. Cocaína e crack

Através dos estudos epidemiológicos apresentados, observa-se que o consumo de cocaína e sua forma fumada, o crack, vem apresentando expansão no Brasil ao

longo das últimas duas décadas. Além do desafio de se apresentar políticas eficazes no manejo, controle e prevenção do consumo de cocaína e crack, é igualmente importante investigar e compreender a ação da cocaína sobre a saúde do indivíduo, assim como o impacto das diferentes formas de apresentação da droga sobre o organismo.

Para a obtenção da cocaína e crack através das folhas de coca, são necessários diversos processos físicos e químicos. A Figura 4 demonstra os processos para a produção dessas drogas. Resumidamente, esse processo consiste na adição de ácidos e bases que alteram a composição química das substâncias subsequentes e a pureza das drogas, pois quanto mais refinado, mais pura e maior a concentração de cocaína em cada produto (Chasin et al., 2008; Oliveira, Nappo, 2008; Ribeiro et al., 2012).

Além das diferenças nas etapas químicas decorrentes da produção, a cocaína e suas diferentes formas de apresentação, como o crack, a merla e o oxi, diferenciam-se em características físicas, e são essas diferenças que vão definir a via de administração para o consumo de cada produto (Chasin et al., 2008). Seguindo o esquema da Figura 4, quando o produto obtido é o ‘cloridrato de cocaína’, esse é popularmente conhecido como ‘pó de cocaína’. A merla e o oxi, produzidos a partir da pasta de cocaína, possuem formato de ‘pedra’, assim como o crack, mas a merla possui densidade menor que o oxi e crack, sendo comumente misturada com cigarro ou maconha (combinação conhecida como ‘mesclado’). Uma observação importante sobre a produção do crack é que pode ser produzido em diversas etapas do processo, a partir da ‘pasta de cocaína’, da ‘pasta base de cocaína’ e, muito raramente, do ‘cloridrato de cocaína’, tornando esse produto mais fácil de ser produzido e mais

disponível para o consumo (Chasin et al., 2008; Mejia, Posada, 2008; Oliveira, Nappo, 2008; UNODC, 2008; UNODC, 2009).

FONTE: Adaptado de Ribeiro et al., 2012

Figura 4 – Etapas de processos físicos/químicos para obtenção da cocaína e de seus produtos a partir das folhas de coca

Quanto às vias de administração de cada produto, o ‘cloridrato de cocaína’ (‘pó’) pode ser utilizado pela via intranasal (cheirada) e via intravenosa (injetável). A outra via de utilização é a pulmonar (fumada), utilizada para o consumo da merla, do oxi e do crack. A via de administração escolhida pelos usuários para o consumo

dessas drogas influencia na velocidade e duração dos efeitos, assim como no potencial de dependência das drogas, como pode ser visto na Figura 5 (Lizasoain et al., 2002; Oliveira, Nappo, 2008).

	Concentração de Cocaína	Concentração Plasmática	Velocidade dos efeitos	Duração dos efeitos	Dependência
Folha de Coca (Mascada)	0,5 – 1,5 %	60 min	Lenta	30 – 60 min	-----
Cloridrato de Cocaína (Intranasal)	12 – 75 %	5 – 10 min	Rápida	30 – 60 min	Longo Prazo
Cloridrato de Cocaína (Intravenosa)	12 – 75 %	30 – 45 seg	Rápida	10 – 20 min	Curto Prazo
Pasta de Cocaína (Merla)	40 – 85 %	8 – 10 seg	Muito Rápida	5 – 10 min	Curto Prazo
Pasta Base de Cocaína (Crack)	40 – 85 %	8 – 10 seg	Muito Rápida	5 – 10 min	Curto Prazo

FONTE: Adaptado de Lizasoain et al., 2002

Figura 5 - Vias de administração de cocaína e suas características quanto à concentração de cocaína, concentração plasmática, velocidade e duração dos efeitos, e potencial de dependência

Dentre as vias de administração de cocaína, nota - se pela Figura 5 que o crack, além de ser mais disponível pela facilidade de sua produção, destaca-se entre as outras vias pelo conjunto de curto tempo para atingir sua concentração plasmática, rápida e imediata duração do efeito e seu alto índice de concentração (40 - 85% de cocaína), fazendo com que os usuários sofram um grande potencial de dependência (Lizasoain et al., 2002; Ministério da Saúde, 2010; Marques et al., 2012).

A ‘pedra’ do crack é pouco solúvel em água e por ser uma substância volátil passa da forma sólida para gasosa quando aquecida em temperatura por volta 95 °C,

o que a diferencia do ‘cloridrato de cocaína’, que apresenta ponto de fusão mais elevado (197 °C) (Negrete, 1992; Carlini et al., 2001b; Oliveira, Nappo, 2008).

O crack é utilizado através de cachimbos ou recipientes improvisados pelos usuários que possam imitar o uso de um cachimbo. Quando o usuário fuma a pedra de crack, o vapor produzido é absorvido pelos pulmões. Seus efeitos ocorrem instantaneamente, mas com curta duração (5 - 10 minutos) (Ellenhorn, 1997; Jones, 1997; Carlini et al., 2001b; Lizasoain et al., 2002).

1.3.1. Mecanismos de ação do crack no organismo

Visto que o crack e os outros produtos similares são a cocaína sob formulação molecular distinta do pó de cocaína, sua ação no organismo é semelhante, sendo as diferenças decorrentes da via de administração. Assim, utilizaremos como termo geral ‘cocaína’ para exemplificar a atuação dessas diferentes apresentações no organismo.

A absorção da cocaína pelo organismo ocorre em cerca de uma hora e sua concentração sérica é determinada principalmente pela via de administração. Uma vez absorvida, a cocaína se liga a proteínas plasmáticas, com maior afinidade pela α -1-glicoproteína ácida (Heard et al., 2008). A apresentação inicial da cocaína na sua fórmula molecular é $C_{17}H_{21}N_4$, na forma de benzoilmetilecgonina, principal metabólito. A meia-vida biológica é de uma hora e seus metabólitos são eliminados pela saliva, suor, cabelo e, principalmente, pela urina. Cerca de apenas 10% da cocaína é excretada inalterada (Chasin et al., 2008). Há um metabólito que diferencia

a via pulmonar das demais vias de administração de cocaína, o metilecgonidina, também chamado de anidroecgonina metil éster (AEME), que ocorre a partir da pirólise da cocaína. Assim, indivíduos que usam o crack além da exposição à cocaína também estão expostos a esse composto, pois ambos são inalados ao mesmo tempo (Paul et al., 2005).

A fumaça inalada pelo usuário durante o uso do crack é composta de partículas e vapores de cocaína, que atingem a extensa área de trocas gasosas dos alvéolos e capilares pulmonares, sendo rapidamente absorvida pela circulação pulmonar e difundindo – se ao ventrículo esquerdo, chegando rapidamente à circulação cerebral (Ellenhorn, 1997; Jones, 1997).

Ao atingir a circulação cerebral, a cocaína chega ao Sistema Nervoso Central (SNC), agindo em diversos neurotransmissores, como nos dopaminérgicos, serotoninérgicos e noradrenérgicos. A ação mais conhecida da cocaína no SNC é sobre o sistema dopaminérgico, principalmente sobre o sistema mesolímbico – mesocortical, conhecido como sistema de recompensa, composto pela área tegmentar ventral, núcleo accumbens (NAc) e córtex pré-frontal (PFC), responsável pelos estímulos excitatórios (Marqueza, Cruzb, 2000; Carlini et al., 2001b).

O mecanismo molecular de ação da cocaína no sistema dopaminérgico ocorre através do bloqueio de recaptção de dopamina na fenda sináptica pela inibição dos transportadores de dopamina, fazendo com que a dopamina fique acumulada na fenda sináptica, causando uma sensação de euforia e bem estar (Kreek et al., 2005) e para compensar esse aumento, os receptores pré-sinápticos são ativados, levando a uma diminuição na sua liberação (Lizasoain et al., 2002; O'Brien, 2006). A quebra

de equilíbrio de produção, ação, e degradação nos níveis de dopamina cerebral pode, dependendo da intensidade e frequência, contribuir para o aparecimento de sintomas ou transtornos psiquiátricos como a ansiedade, depressão, alucinação e delírio (O'Brien, 2006).

Tais evidências apontam que a rápida e imediata duração do efeito dessa droga no organismo, associada com a sensação de prazer, euforia e poder que a droga proporciona, e seu alto índice de concentração, tornam a cocaína fumada, ou crack, uma droga com alto potencial de uso nocivo e dependência quando comparado às outras vias de administração (Ribeiro et al., 2012).

1.4. Estudo Genéticos

Teoricamente, nenhuma dependência química poderá ser determinada exclusivamente pela genética, pois sempre será necessária a substância que gera dependência, encontrada no ambiente. No entanto, mais recentemente tem-se postulado para dependência química, que esse comportamento se instala através de uma complexa interação entre fatores genéticos/biológicos e fatores ambientais, como fatores sócio econômicos, acessibilidade e disponibilidade da droga, assim como na iniciação do uso de substâncias (Koob, LeMoal, 2006).

A constante evolução do consumo de drogas e o rápido desenvolvimento da genética aumentaram o interesse dos pesquisadores pelos mecanismos moleculares envolvidos na dependência química, procurando identificar desde regiões cromossômicas até genes responsáveis. Estudos genético epidemiológicos se

propõem a investigar a etiologia, distribuição e controle de uma doença em grupos de familiares e dos determinantes de genéticos de uma doença na população. Por meio desses, é possível identificar a participação da influência genética e ambiental.

1.4.1. Estudos Genético Epidemiológicos

1.4.1.1. Estudos em famílias, gêmeos e adotados

A dependência possui um alto fator de herdabilidade. Estudos genético epidemiológicos em famílias mostram, por exemplo, maior prevalência para a dependência em descendentes de pais e parentes de 1º grau portadores de dependência química (Bierut et al., 1998), como parentes de probandos com dependência de cocaína e de heroína (Merikangas et al., 1998; Duaux et al., 2000).

Para determinar a relação gene-ambiente, estimar a herdabilidade e o tamanho do efeito genético, são realizados estudos com gêmeos, que comparam a concordância entre gêmeos monozigóticos e dizigóticos. Em relação à vulnerabilidade para o uso de drogas, esses estudos mostram que o componente genético é significativo e que a diferença de resultados com gêmeos dizigóticos rejeita a idéia do abuso de substâncias ser causado somente por um determinante genético, incluindo assim a ação do ambiente (Duaux et al., 2000).

Gêmeos monozigóticos apresentaram maior concordância para a dependência de drogas quando comparados aos gêmeos dizigóticos, 26,2% e 16,5%, respectivamente (Tsuang et al., 1996). E, coortes de gêmeos revelaram alta taxa de herdabilidade, 79% para a dependência de cocaína (Agrawal, Lynskey, 2008).

Como grande parte da agregação familiar para a dependência pode ser explicada por fatores genéticos em contraposição às influências familiares não-genéticas (Gynther et al., 1995; Kendler et al., 2000), indivíduos adotados, por exemplo, herdam os genes de sua família biológica e sua experiência de vida ocorre em outra família, tornando possível verificar se há essa interação entre a influência genética e os fatores ambientais.

Os problemas relacionados à família adotiva podem levar a adversidades no ambiente familiar. Se há a presença de um risco biológico em um ambiente adverso, é esperada maior probabilidade de um indivíduo ter um problema como a dependência de substâncias (Langbehn et al., 2003).

Em relação às drogas em geral, indivíduos adotados apresentam risco maior para dependência, 50,5%, enquanto não adotados apresentam risco de 35,4%. Para a dependência de cocaína, esse risco é maior também para os adotados quando comparados a não adotados, 6,6 % e 2,7 %, respectivamente (Yoon et al., 2012).

1.4.2. Estudos Genético Moleculares

1.4.2.1. Estudos de ligação e associação

Diante a alta taxa de herdabilidade para o abuso/dependência de cocaína, pesquisadores buscam identificar genes responsáveis pela variância desse tipo de comportamento. Estudos de ligação (ou “*linkage*”) procuram identificar um único gene, ou *locus* de risco, que pode fornecer localizações cromossômicas com base na

observação de alelos marcadores e o traço de determinada doença na família (Gelernter, Kranzler, 2010).

Em relação à dependência de cocaína, poucos estudos foram realizados utilizando a abordagem investigativa dos estudos de ligação. Em 2005, Gelernter et al. identificaram regiões cromossômicas relacionadas com distúrbios de substâncias, encontrando resultados sugestivos para a dependência de cocaína relacionados a *locus* no cromossomo 10 e no cromossomo 3. Foi encontrada também uma relação entre o uso pesado de cocaína e o marcador *D12S346* do cromossomo 12.

Outro tipo de estudo que busca genes responsáveis para determinada doença é o estudo de associação, que identifica a frequência de um *locus* e compara a frequência de uma variante genética em grupos afetados e não afetados (caso x controle).

Até o momento, diferentes genes e variantes têm sido estudadas para a vulnerabilidade ao abuso/dependência de cocaína, e mais recentemente de crack (Stolf et al., 2014). A maioria desses genes está relacionado aos principais neurotransmissores que integram o sistema de recompensa dopaminérgico, como as monoaminas, com o gene que codifica o transportador da serotonina, *SLC6A4* (*Solute Carrier Family 6, member 4*) (Patkar et al., 2001; Patkar et al., 2002; Tristán-Noguero et al., 2013), as catecolaminas (noradrenalina, adrenalina e dopamina), com os genes *COMT* (*catecol-O-metiltransferase*) (Lohoff et al., 2008), os receptores de dopamina *DRD2* (*dopamine receptor D2*) (Noble et al., 1993; Gelernter et al., 1999; Messas et al., 2005; Fernández-Castillo et al., 2010; Lohoff et al., 2010) e *DRD3* (*dopamine receptor D3*) (Messas et al., 2005; Bloch et al., 2009), o gene do transportador de dopamina *SLC6A3* (*solute carrier family 6 (neurotransmitter*

transporter), *member 3*) (Guindalini et al., 2006b; Fernández-Castillo et al., 2010; Lohoff et al., 2010), assim como o gene responsável pelo metabolismo de dopamina *DβH* (*dopamina β-hidroxilase*) (Fernández-Castillo et al., 2010). Em menor proporção, são estudados os genes do sistema opióide, como o *PDYN* (*prodynorphin*) (Chen et al., 2002; Dahl et al., 2005).

1.5. Estudos Epigenéticos

Por muitos anos os estudos em abuso e dependência química concluem que os fatores etiológicos são decorrentes da complexa interação genético-ambiental. Entretanto, apenas recentemente descobriu-se como essa interação poderia ocorrer a nível molecular, passando a ser chamado de “efeito epigenético” (Wong et al., 2011; Duncan, Keller, 2011).

1.5.1. Epigenética

Epigenética é uma série de processos bioquímicos que alteram a expressão de genes de um organismo sem alterar a sequência de DNA (*Deoxyribonucleic Acid/Ácido desoxirribonucléico*). É produto da interação do ambiente com o genoma do indivíduo, que determinam o aspecto funcional na saúde e na doença (Nielsen et al., 2012; Vassoler et al., 2014; Nestler, 2014). Essas alterações podem ser mantidas por vários anos, inclusive passados de uma geração a outra, persistindo durante as divisões celulares por meio da mitose e da meiose (Portela, Esteller, 2010).

A epigenética engloba modificações no DNA e em histonas, proteínas que juntamente com o DNA formam a estrutura global da cromatina. Modificações epigenéticas nessas estruturas, DNA ou histonas, regulam a expressão dos genes atuando em diversos processos como a diferenciação celular (Goldberg et al., 2007; McQuown, Wood, 2010).

Como a principal modificação epigenética investigada no presente estudo é a metilação do DNA, as modificações das histonas serão brevemente citadas apenas para exemplificar outros mecanismos epigenéticos.

As histonas são proteínas no qual o DNA se enrola para a formação do nucleossomo, apresentando um importante papel na regulação e expressão gênica. As principais modificações nas histonas incluem a acetilação, que está relacionada com a descompactação e condensação da cromatina, promovendo a atividade de transcrição (Feng, Nestler, 2013); a fosforilação, associada também à inibição ou ativação da cromatina e ativação da transcrição; e a metilação, processo correlacionado com a ativação ou repressão da expressão gênica (Nielsen et al., 2012). Há uma hipótese chamada de ‘Código de Histonas’, que propõe que a soma dessas modificações em uma região promotora específica define um estado epigenético de ativação ou silenciamento do gene (Wong et al., 2011).

Outros mecanismos como ubiquitinação, sumoilação, citrulinação, e ADP-ribosilação ainda são pouco compreendidos (Tsankova et al., 2007; Yuferov et al., 2010; Wong et al., 2011; Feng, Nestler, 2013).

A metilação do DNA é a modificação epigenética mais estável quando comparada com as modificações das histonas, que são consideradas reversíveis, pois regula a plasticidade da transcrição do genoma (Wong et al., 2011). Consiste na adição de um grupamento metil (CH₃) ao carbono da posição cinco da citosina (C), catalizada pela enzima DNA metiltransferase em dinucleotídeos CpG, que são regiões em que uma citosina (C) precede uma guanina (G) na sequência de DNA ('C-fosfato de ligação G') (Figura 6) (Goldberg et al., 2007; Anier et al., 2010; Yuferov et al., 2010; Robison, Nestler, 2011; Feng, Nestler, 2013; Fragou et al., 2013; Nestler, 2014).

FONTE: Wong et al., 2011

Figura 6 – Representação do processo de metilação do DNA, com a adição de um grupamento metil (CH₃) ao carbono da posição cinco da citosina (C), catalizada pela enzima DNA metiltransferases (DNMT) em dinucleotídeos CpG

A metilação é comum em todo o genoma e aproximadamente 3% de todas as citosinas no DNA humano e cerca de 70% dos dinucleotídeos CpG estão metilados. Esses dinucleotídeos se agrupam no genoma, em regiões conhecidas como ilhas

CpG, que contém pelo menos 200 pares de base e um conteúdo G+C maior que 50%. Em humanos, existem aproximadamente 45.000 ilhas CpG, que estão localizadas, em sua maioria, em regiões promotoras de genes. A metilação nessas regiões está associada ao silenciamento gênico e, quando essas ilhas CpG não estão metiladas, são relacionadas à expressão gênica (Oliveira et al, 2010; Portela, Esteller, 2010; Yuferov et al., 2010).

Dinucleotídeos encontrados fora de ilhas, em regiões conhecidas como "margens da ilha CpG", discutidas posteriormente, são menos metilados quando comparadas com as ilhas em si (Tsankova et al., 2007; Robison, Nestler, 2011; Nielsen et al., 2012) e também estão associadas com a inativação transcricional. Quando a metilação ocorre no corpo dos genes, é correlacionada também com a expressão do gene (Doi et al., 2009; Irizarry et al., 2009; Portela, Esteller, 2010). Uma fração de CpGs, que estão profundamente metiladas, encontradas em elementos repetitivos, são responsáveis pela proteção da integridade genômica e evitam a instabilidade cromossômica, translocações e quebras gênicas (Esteller, 2007).

A compreensão do processo de desmetilação é ainda estudado. O que sabemos até o momento, é que pode ocorrer de forma ativa ou passiva. A desmetilação ativa ocorre pela ação da enzima demetilase, que remove o grupo CH₃ (Robison, Nestler, 2011; Fragou et al., 2013). A forma passiva é realizada pela ação das proteínas de translocação *ten-eleven* (TET), que reparam a citosina formando a 5-hidroximetilcitosina (5hmC). A 5hmC é mais abundante no cérebro em comparação com outros órgãos e está relacionada com os processos de aprendizagem e memória (Feng et al., 2015).

1.5.2. Epigenética e dependência química

A metilação do DNA e as modificações nas histonas, diretamente afetadas por drogas de abuso, contribuem para o uso crônico de substâncias quando alteradas nas regiões de recompensa do cérebro, pois fazem a mediação entre o vício e a resposta neurobiológica (Agrawal, Lynskey 2008; Wong et al., 2011), regulando a ação da droga e induzindo mudanças altamente estáveis, que podem determinar a vulnerabilidade do indivíduo à exposição e dependência de drogas (Robison, Nestler, 2011; Feng, Nestler, 2013; Nestler, 2014).

Modificações relacionadas com a cromatina e padrões de expressão de genes são importantes para os efeitos de longa duração de psicoestimulantes no cérebro. Neuroadaptações induzidas por essa classe de drogas estão relacionadas, por exemplo, com a acetilação e fosforilação das histonas (Anier et al., 2010; LaPlant, Nestler, 2011). A acetilação das histonas têm sido demonstrada em vários genes candidatos no NAc como resposta à exposição aguda ou crônica a estimulantes, e essas mudanças se correlacionam com a expressão gênica alterada (Feng, Nestler, 2013).

1.5.3. Epigenética e o abuso/ dependência de cocaína

Em relação à cocaína, diversos estudos mostram, em sua totalidade em modelo animal, a relação entre a dependência dessa droga e alterações epigenética, principalmente relacionadas a modificações nas histonas e fatores de transcrição.

Muitos promotores de genes específicos regulam mudanças na acetilação das histonas após a exposição à cocaína. Em geral, os genes ativados pelo uso de cocaína são marcados pelo aumento da acetilação das histonas, enquanto genes que são reprimidos são marcados pela metilação das histonas (McQuown, Wood, 2010).

Os fatores de transcrição mais estudados nessa interação são o fator de transcrição Δ fosB, que é acumulado lentamente após cada exposição à droga e altamente estável por meses após a interrupção (Tsankova et al., 2007; LaPlant, Nestler, 2011); CREB (*cAMP response element binding protein*), que é induzido rapidamente nas regiões do cérebro relacionadas com a recompensa, como o NAc após cada exposição à droga (McQuown, Wood, 2010; Feng, Nestler, 2013); e BDNF (*Brain-derived neurotrophic factor*), que tem seus níveis aumentados no hipocampo após exposição crônica à cocaína e têm sido relacionado ao processo de recaída, pois seus níveis não diminuem após a retirada da droga (Tsankova et al., 2007; Robison, Nestler, 2011; Vassoler et al., 2014).

1.5.4. Metilação do DNA e o abuso/ dependência de cocaína

Em uma revisão da literatura, foi possível observar que os estudos sobre as mudanças de metilação de DNA encontrados em toxicodependência sugerem o possível papel da epigenética na predisposição de uma maior vulnerabilidade para a dependência (Robison, Nestler, 2011; Nielsen et al., 2012). Assim como a remodelação da cromatina, essas alterações podem ocorrer em resposta ao uso de drogas e contribuir para a consolidação da memória no hipocampo e no córtex de

armazenamento, processos críticos na dependência (Nielsen et al., 2012; Fragou et al., 2013).

Estudos sobre a metilação do DNA em relação ao abuso/ dependência de cocaína em humanos são escassos e esse tipo de estudo em relação ao abuso/ dependência de crack ainda não foi relatado.

2. JUSTIFICATIVA

A expansão e disseminação do consumo de cocaína e crack no Brasil têm se tornado um crescente problema de saúde pública durante os últimos vinte anos. Não há tratamento médico específico para esses dependentes, sendo as intervenções biológicas ainda limitadas. Uma compreensão mais aprofundada dos mecanismos envolvidos na interação entre os fatores biológicos e os fatores ambientais poderá contribuir com soluções mais eficazes de prevenção e tratamento dos dependentes de cocaína/crack. Os estudos sobre a metilação do DNA no genoma de indivíduos abusadores/dependentes de cocaína em humanos são escassos e não há qualquer relato para os dependentes de crack. Dessa forma, o presente projeto procurou realizar análises epigenéticas buscando identificar alterações nos níveis de metilação global do DNA para o abuso/ dependência de cocaína e crack quando comparados com um grupo controle.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O objetivo do presente estudo foi investigar o padrão de metilação de DNA de todo o genoma de indivíduos dependentes de cocaína e crack e comparar com o padrão de metilação de DNA de indivíduos controle.

3.2. Objetivo Específico

A partir dos resultados do estudo de metilação global, identificar os genes, regiões gênicas e vias biológicas que possam estar diferencialmente metiladas entre os dois grupos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Metilação Global

4.1.1. Casos e controles

Para essa pesquisa, foram selecionados casos de abuso/dependência de cocaína e crack e indivíduos controle provenientes do banco de DNA do Programa de Genética e Farmacogenética (ProGene) do Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (IPq-HCFMUSP). A descrição detalhada da seleção e avaliação dos indivíduos dependentes de cocaína/crack (casos) e dos controles encontram-se no Anexo A.

4.1.2. Seleção das amostras

A partir de uma amostra total de 746 indivíduos dependentes de cocaína e/ ou crack, dividimos esses indivíduos quanto ao modo de uso das drogas: “uso contínuo”, “várias vezes”, “poucas vezes” e “nunca”. Em seguida, diferenciamos aqueles que faziam uso somente de cocaína, somente de crack e usuários de ambas as formas (Figura 7).

Dentre os grupos formados selecionamos o grupo identificado como “uso contínuo” de ambas as drogas (Figura 7), composto por 209 indivíduos, pois o uso concomitante do crack e da cocaína pode trazer prejuízos maiores do que o uso

isolado de ambas as drogas, tornando o prejuízo neurobiológico desses indivíduos mais grave (Leonard et al., 2008).

1º Critério de Classificação – Uso da droga	
4	Uso contínuo
3	Várias Vezes
2	Poucas Vezes
1	Nunca

2º Critério de Classificação – Classificação dos usuários

Crack		Indivíduos
Crack – 3	x 1 – Cocaína	0
Crack – 4	x 1 – Cocaína	28
Crack – 4	x 2 – Cocaína	31
		Total. 59

Cocaína e Crack		Indivíduos
Crack – 2	x 3 – Cocaína	23
Crack – 3	x 2 – Cocaína	4
Crack – 3	x 3 – Cocaína	37
Crack – 3	x 4 – Cocaína	55
Crack – 4	x 3 – Cocaína	197
Crack – 4	x 4 – Cocaína	209
		Total. 525

Cocaína		Indivíduos
Crack – 1	x 3 – Cocaína	35
Crack – 1	x 4 – Cocaína	66
Crack – 2	x 4 – Cocaína	41
		Total. 142

Figura 7 – Classificação dos indivíduos de acordo com a frequência de uso da droga para crack e para cocaína, a partir de uma amostra inicial de 746 usuários/dependentes

Como parte da seleção dessas amostras para o estudo de metilação global do genoma, buscando homogeneidade entre os 209 indivíduos, pois diferenças inter-individuais e fatores ambientais podem influenciar a metilação do DNA (Sarter et al., 2005). Os três critérios utilizados foram o sexo, o tempo de uso das drogas e a idade.

Em relação ao sexo, optamos pelos indivíduos do sexo masculino, já que dentre os 209 indivíduos da amostra de dependentes de cocaína e crack, 201 são do sexo masculino e apenas oito são do sexo feminino. Para o segundo critério de seleção, baseado no tempo de uso das drogas, dos 201 indivíduos, o tempo de uso de crack e cocaína poderia variar até 17 anos de uso. Identificamos 38 indivíduos que

apresentavam uso prolongado e com pouca variabilidade no tempo de uso (8 a 10 anos). Como as marcas epigenéticas mudam ao longo do tempo (Madrigano et al., 2012), o terceiro critério de seleção foi a idade, que entre o grupo selecionado até o momento variava entre 22 e 42 anos. Selecionamos aqueles indivíduos que estavam dentro da variabilidade mínima possível que foi de seis anos em relação à idade (23 a 29 anos – média de idade: 26 anos), e o total de casos ao final foi de 26 indivíduos, posteriormente reduzido para 24 participantes devido a problemas técnicos (ex. concentração/quantidade inadequada de DNA). Os casos selecionados foram pareados com os controles por sexo, etnia e idade. A amostra final foi composta por 48 indivíduos, sendo 24 do grupo de casos e 24 do grupo controle (Figura 8).

Figura 8 – Seleção das amostras do estudo para a realização do procedimento de metilação global do DNA

4.1.3. Extração de DNA

A descrição sobre a coleta dessas amostras e extração de DNA também estão descritas no Anexo A. Resumidamente, o DNA foi extraído a partir do sangue total utilizando o método Fenol/Clorofórmio e, o método “Salting Out”, descrito por Miller et al. (1988). Todas as amostras de DNA foram avaliadas quanto à sua concentração e pureza por meio da densidade óptica (DO) em espectrofotômetro (*NanoDrop® 2000, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA*), sendo o resultado expresso em ng/ul. Foram utilizados 2 µl de cada amostra para a quantificação. A pureza do DNA é estabelecida pela relação de absorbância entre os comprimentos de onda de 260 e 280 nm, sendo o valor ideal de aproximadamente 1,8. Uma medida secundária também foi utilizada para verificar a pureza do DNA, estabelecida pela relação de absorbância entre os comprimentos de onda 260 e 230 nm, sendo a escala ideal de pureza compreendida entre 1,8 e 2,2 (Thermo Fisher Scientific, 2009). A integridade foi verificada através de eletroforese, em gel de agarose a 1,5% corado com Brometo de Etídio. As amostras diluídas a 100ng/ul e um marcador de 100 pb foram aplicados juntamente com o *Loading Buffer* no gel de agarose por aproximadamente 40 minutos (Waltrick-Zambuzzi et al., 2012).

4.1.4. Metilação Global - Procedimento

O procedimento de avaliação da metilação global foi realizado pelo laboratório Deoxi Biotecnologia (www.deoxi.com.br). Para o experimento, foram utilizados 500 ng de DNA. As amostras de DNA passaram por tratamento com bissulfito de sódio (*EZ DNA methylation kit. Zymo Research. Cat. No. D5004, Irvine, California, USA*),

de acordo com as recomendações do fabricante, que consiste na conversão de bases citosina não metiladas em uracila, enquanto as bases citosina metiladas permanecem inalteradas. O DNA bissulfito convertido foi desnaturado, neutralizado e amplificado em uma PCR (*Polymerase Chain Reaction*/ Reação em cadeia de polimerase) isotérmica, por aproximadamente 16 horas, com perfil de incubação de 16 ciclos a 95 °C durante 30 segundos, 50 °C durante 60 minutos e um passo final de realização de 4 °C durante 10 minutos. O produto amplificado foi fragmentado por um processo de hidrólise enzimática para evitar o excesso de fragmentação da amostra. Após uma precipitação com isopropanol, o DNA fragmentado foi recolhido por centrifugação a 4 °C e ressuspensão em tampão para hibridização.

As amostras de DNA fragmentadas e em ressuspensão foram dispensadas nas lâminas do ensaio *Illumina Infinium Human Methylation450 (450K) BeadChip* (*Illumina Inc, San Diego, California, USA*), seguindo o protocolo de Metilação *Illumina Infinium HD*. Doze amostras foram aplicadas em cada lâmina, quatro no total, e essas lâminas preparadas foram incubadas *overnight*, por aproximadamente 20 horas a 37 °C, no *Illumina Hybridization Oven* (*Illumina Inc, San Diego, California, USA*).

As lâminas foram inseridas no *scanner iScan Microarray Scanner* (*Illumina Inc, San Diego, California, USA*) (Figura 9), que digitalizou o ‘*BeadChip*’, usando um laser para excitar o fluoróforo do produto de extensão de uma base única nas sondas. Essa extensão de base única incorpora marcadores detectáveis utilizando o DNA capturado como modelo e determina o nível de metilação dos CpGs. O *scanner*

registrou imagens de alta resolução da luz emitida a partir dos fluoróforos. Todas os ensaios passaram pelo padrão de controle de qualidade *Illumina*.

Figura 9 – Lâminas *Illumina Infinium Human Methylation450 (450K) BeadChip* são inseridas no *scanner iScan Microarray Scanner* para o a genotipagem das amostras por microarray

4.2. Aprovação do Comitê de Ética

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEP-FMUSP) segundo o protocolo número 143/13 (Anexo B).

4.3. Análise estatística

4.3.1. Ensaio *Illumina Infinium Human Methylation450 (450K) BeadChip*

A análise de metilação com o ensaio *Illumina Infinium Human Methylation450 (450K) BeadChip* (*Illumina Inc, San Diego, California, USA*) analisa 485.577 sítios, dos quais 482.421 são CpGs, 3.091 não-CpGs e 65 são sondas de controle. Essa lâmina abrange a cobertura tanto de genes quanto de ilhas CpG. Em relação ao gene, cobre 99% de todos os genes *RefSeq*, que são sequências de referência com múltiplas sondas por gene (Bibikova et al., 2011). A distribuição genômica é dividida em sítios de início da transcrição (TSS - *transcription start site*) TSS200 e TSS1500, que são as regiões promotoras separadas em 200 e 1500 pares de base (pb), 5' e 3' UTR (*untranslated region*), primeiro éxon, corpo do gene e a região intergênica. A cobertura relacionada às ilhas CpG é de 96% de todo o genoma e seu conteúdo é dividido em ilhas e regiões localizadas nas margens nas ilhas, chamadas de ‘*shore*’ (até 2000 pb), ‘*shelf*’ (2000 a 4000 pb) e ‘*open sea*’ (mais de 4000 pb) (Figura 10) (Bibikova et al., 2011; Dyson et al., 2014).

FONTE: Dyson et al., 2014

Figura 10. Distribuição de regiões em relação ao gene e a ilha CpG

A plataforma *Infinium HumanMethylation450K* consiste em dois ensaios químicos diferentes que reportam a informação sobre o estado de metilação, chamados de *Infinium I (InfI)* (135.501 sondas) e *Infinium II (InfII)* (350.076 sondas) (Dedeurwaerder et al., 2014). O ensaio *InfI* segue a tecnologia de seu precursor, o *Infinium HumanMethylation27 BeadChip*, que consiste em duas sondas, uma para o *locus* 'metilado' e uma para o *locus* 'não-metilado'. Essas sondas são desenhadas para parear com os conteúdos C (citosina - metilado) e T (timina - não metilado) resultantes da conversão de bissulfito (Figura 11).

FONTE: Adaptado de Bibikova et al., 2011; Fortin, 2013

Figura 11. Ensaio de metilação *Infinium I (InfI)*. A: Sondas sintéticas presentes nas lâminas que servem como base para a ligação do DNA bissulfito convertido; B: As duas sondas do ensaio *InfI* para o *locus* não metilado (U) e para o *locus* metilado (M); C: Hibridização do *locus* não metilado – ambos incorporam o mesmo tipo de nucleotídeo, mas a ligação do *locus* não metilado ocorre na sonda com a base CA, impedindo a formação das bases CG; D: Hibridização do *locus* metilado - como na figura B, ambos incorporam o mesmo tipo de nucleotídeo, mas o *locus* metilado se liga a sonda que permite a formação das bases CG.

O ensaio *Infinium II* (*InfII*) utiliza um único tipo de sonda que complementa a base anterior do sítio em questão e a adição de uma base é marcada com um fluoróforo. É a intensidade desses fluoróforos, com a cor verde para metilado e vermelho para não metilado, que permite calcular a quantidade de sondas metiladas e não metiladas (Figura 12) (Bibikova et al., 2011; Touleimat, Tost, 2012; Dedeurwaerder et al., 2014).

FONTE: Adaptado de Bibikova et al., 2011; Fortin, 2013.

Figura 12. Ensaio de metilação *Infinium II* (*InfII*). A: Sonda do ensaio *InfII*; B: Ligação do locus não metilado na sonda com a incorporação da base única A (adenina), corada com o fluoróforo vermelho, no sítio não metilado T (timina); C: Hibridização do locus metilado – Ligação do locus metilado na sonda com a incorporação da base única G (guanina), corada com o fluoróforo verde, no sítio metilado C (citosina), permitindo a formação das bases CG.

4.3.2. Análise e interpretação dos dados

Os dados da metilação do DNA seguem um fluxo de análise que compreende as etapas de pré-processamento dos dados, correção e controle de qualidade,

normalização, análise estatística, validação e interpretação dos resultados (Bock, 2012; Pidsley et al., 2013). Para a análise dos dados da nossa pesquisa optamos pelo pacote ChAMP (*Chip Analysis Methylation Pipeline*), um *pipeline* que integra os métodos de análise de *450K methylation BeadChip* atualmente disponíveis e inclui o método para identificação das regiões diferencialmente metilados (DMRs), chamado *Probe Lasso* (Morris et al., 2014; Morris, Beck, 2015).

4.3.2.1. Pré - processamento

A informação sobre a intensidade dos sinais verde e vermelho estão contidas em arquivos chamados IDAT, gerados para cada amostra pela quantificação dos sinais durante a varredura no *iScan Microarray Scanner*. Cada IDAT é composto pela identificação da amostra, a média e o desvio padrão do sinal de intensidade e o número de sondas de cada tipo (Ex: 5859594006_R01C01_*Grn*, onde 5859594006 corresponde a identificação da lâmina, R01C01 localização da amostra, *Grn* corresponde ao sinal verde e *Red* corresponde ao sinal vermelho) (Smith et al. 2013). A leitura desses dados foi realizada com a ferramenta *illuminaio*, implementada no pacote *MINFI*, convertendo os dados em valores Beta. Esses valores Beta (β), ou seja, o nível de metilação de CpG, podem assumir valores contínuos entre o intervalo 0 (não metilado) e 1 (completamente metilado), calculados pela razão entre a intensidade da sonda metilada e a intensidade total (Figura 13) (Bibikova et al., 2006; Du et al., 2010; Touleimat, Tost, 2012).

$$Beta = \frac{M}{M+U}$$

FONTE: Adaptado de Du et al., 2010

Figura 13: Cálculo de β corresponde a porcentagem de metilação; M – metilado; U – Não metilado

Para o pré-processamento dos dados, que consiste na verificação da qualidade das amostras, é realizada a filtragem das sondas para evitar os vieses das variações não relacionadas com diferenças de metilação de DNA e com o contexto biológico do estudo. São filtrados os sítios com menos de três *beads* em mais de duas amostras (Morris et al., 2014; Morris, Beck, 2015) e sondas com detecção de *p-valor* <0,01, por apresentarem baixa detecção de fluorescência. Para a detecção da baixa qualidade das amostras foram geradas três imagens: um gráfico mostrando a densidade dos valores β sem normalização, um gráfico MDS (*multidimensional scaling*) que permite a visualização da similaridade entre as amostras, e um gráfico ‘*cluster*’ que também permite visualizar a similaridade das amostras por meio de um agrupamento hierárquico (Bibikova et al., 2011; Morris et al., 2014).

4.3.2.2. Correção e normalização

Após o pré processamento, realiza-se a correção baseada no cálculo esperado de metilação pela celularidade. Como o sangue é um conjunto heterogêneo de diferentes tipos de células, cada uma com um perfil de metilação do DNA diferente, essa correção se faz necessária para identificar diferenças reais na metilação entre os

casos e controles, sem o viés dessa metilação estar relacionada com a contagem de células sanguíneas diferentes. Para a realização dessa correção, é utilizada a função *estimateCellCounts*, do pacote *MINFI*, que estima a porcentagem das células TCD4, TCD8, células B, monócitos, ‘*natural killer*’ e granulócitos para cada CpG e corrige através da identificação de 600 sondas pré discriminadas para cada tipo, recalculando o valor de β de acordo com essa porcentagem (Houseman et al., 2012; Jaffe, Irizarry, 2014).

Para tornar possível uma medição comparável entre as amostras, realiza-se a normalização dos dados pelo método BMIQ (*Beta mixture quantile*), que reconhece as diferenças entre as sondas *Infinium I* e *II* e aproxima as sondas *InfII* para ter uma distribuição próxima das sondas *InfI*. Para cada amostra, as sondas individuais são classificadas como não metilada, hemimetilada (meio metilada) e metilada. Quando a sonda do tipo *InfI* foi classificada como hemimetilada, foi ajustada para medir o intervalo entre metilada e não metilada (Wu et al., 2014). São geradas três imagens semelhantes às imagens apresentadas no pré processamento (gráfico de densidade, gráfico MDS e gráfico ‘*cluster*’) representando os dados normalizados (Morris et al., 2014).

4.3.2.3. Análise

Após as etapas descritas acima, realiza - se a análise dos dados utilizando o MVP (*Methylation Variable Positions*) e o *Probe Lasso*, ambos utilizando a função *Limma* do pacote *Bioconductor*. O MVP é um método que busca a metilação

diferencial em um único sítio CpG e sua análise consiste em calcular o *p-valor* diferencial de metilação. Essa análise mostra também quantos MVPs são encontrados entre os grupos estudados e os dados são filtrados por um *p-valor* de interesse, incluindo para cada sonda, o valor médio de β para cada grupo e o valor beta delta para os dois grupos usados ($\Delta\beta$) na comparação (Rakyan et al., 2011; Morris et al., 2014).

Se o DNA diferencialmente metilado for encontrado em vários sítios CpG, caracterizam-se então as chamadas regiões diferencialmente metiladas (DMRs - *Differentially methylated regions*), que podem variar até 1000 pb (Rakyan et al., 2011). O *Probe Lasso* (*Probe Lasso – DMR Hunter*) é um método do pacote ChAMP que tem como função reunir essas sondas diferencialmente metiladas em sítios CpG e seus entornos para formar as DMRs. Assim, considerando as características genômicas e a densidade das sondas dos dados, um laço é lançado em torno de cada sonda CpG significativa e captura o número de sondas adequadas para formar DMRs. Esses dados são revertidos em um quadro com informações estatísticas e de associação genômica para cada MVP (Morris et al., 2014; Butcher, Beck, 2015). Um *p-valor* é calculado para cada DMR e os resultados são convertidos em três gráficos: um gráfico ‘*Boxplot*’ com a distância entre os dados de acordo com a sua função genômica e ilha CpG, um gráfico ‘*Cumulative Quantile Plot*’ que ilustra o tamanho de todas as janelas empregadas para cada DMR, e um gráfico de pontos, com pontos em escalas de tamanho que ilustram o tamanho das janelas de acordo com a característica genômica (Morris, Beck, 2015).

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação de qualidade e integridade do DNA

Todas as 48 amostras apresentaram concentração e pureza adequadas e dentro dos parâmetros estabelecidos. O DNA íntegro pode ser visto como uma grande e única banda na região superior do gel de agarose (Figura 14).

Figura 14 – Géis de agarose a 1,5% de parte das amostras utilizadas no presente projeto demonstrando uniformidade quanto à qualidade e integridade do DNA. Na primeira coluna está representado o marcador de peso molecular que varia de 1000-100pb

5.2. Metilação Global

5.2.1. Pré processamento

Do total de sítios analisados (485.512, excluindo os 65 controles internos da lâmina), foram retiradas da amostra 1.272 sondas por apresentarem baixa qualidade de fluorescência com *p-valor* de detecção $>0,01$ e 284 sítios representados por menos de três *beads* em mais de duas amostras. Adicionalmente, foram filtrados 28.792 SNPs (*Single nucleotide polymorphism*/ Polimorfismo de nucleotídeo único) e 8502

sondas inespecíficas por se alinharem em múltiplos locais no genoma (Nordlund et al., 2015). Desta forma, restaram 446.662 sondas que foram analisadas nas 48 amostras.

5.2.2. Estimativa da composição sanguínea e normalização dos valores gerados pelas sondas *InfI* e *InfII*

A função *estimateCellCounts* estimou a porcentagem das células sanguíneas (Tabela 1), de acordo com o valor de β para cada sítio e para cada amostra após a correção da composição sanguínea. As amostras são plotadas baseado nos valores de intensidade das 600 sondas selecionadas pelo estudo original (Houseman et al., 2012), que são capazes de discriminar os diferentes tipos celulares sanguíneos (Figura 15).

Tabela 1: Porcentagem das células sanguíneas de acordo com o *estimateCellCounts*

	TCD8	TCD4	'Natural killer'	Células B	Monócitos	Granulócitos
U1	9%	15%	4%	4%	4%	64%
U2	9%	18%	6%	1%	7%	58%
U3	3%	15%	8%	2%	9%	61%
U4	11%	15%	6%	7%	10%	51%
U5	7%	16%	9%	5%	4%	59%
U6	6%	19%	0%	4%	8%	63%
U7	5%	15%	5%	3%	10%	60%
U8	7%	20%	3%	5%	9%	56%
U9	4%	7%	1%	5%	9%	76%
U10	8%	19%	0%	6%	6%	62%
U11	2%	5%	2%	2%	11%	78%

Legenda: U - Usuários; C - Controles.

continua

Tabela 1 (conclusão): Porcentagem das células sanguíneas de acordo com o *estimateCellCounts*

	TCD8	TCD4	‘Natural killer’	Células B	Monócitos	Granulócitos
U12	5%	11%	6%	5%	9%	63%
U13	8%	10%	5%	2%	7%	67%
U14	2%	5%	8%	2%	10%	73%
U15	10%	15%	4%	8%	8%	55%
U16	15%	18%	4%	6%	13%	45%
U17	6%	13%	10%	6%	6%	57%
U18	5%	15%	1%	7%	8%	63%
U19	7%	11%	5%	4%	6%	67%
U20	3%	3%	2%	1%	8%	84%
U21	10%	23%	0%	6%	6%	54%
U22	14%	25%	1%	9%	8%	44%
U23	7%	12%	5%	2%	6%	70%
U24	8%	12%	13%	5%	9%	52%
C1	7%	13%	3%	5%	9%	64%
C2	7%	20%	9%	7%	6%	51%
C3	7%	7%	6%	2%	7%	72%
C4	6%	6%	7%	3%	8%	69%
C5	7%	8%	4%	4%	9%	69%
C6	11%	15%	2%	9%	9%	55%
C7	7%	5%	0%	3%	9%	76%
C8	5%	11%	4%	5%	13%	62%
C9	2%	6%	2%	3%	8%	78%
C10	3%	20%	5%	6%	6%	59%
C11	7%	20%	1%	7%	8%	58%
C12	8%	16%	0%	5%	6%	67%
C13	10%	12%	1%	7%	11%	58%
C14	3%	5%	6%	2%	6%	78%
C15	0%	0%	0%	2%	9%	89%
C16	4%	11%	1%	5%	6%	71%
C17	1%	12%	4%	4%	7%	70%
C18	3%	10%	2%	3%	8%	74%
C19	7%	21%	7%	5%	7%	52%
C20	14%	14%	3%	5%	11%	52%
C21	6%	10%	5%	4%	10%	64%
C22	5%	11%	3%	4%	8%	68%
C23	6%	10%	8%	0%	12%	62%
C24	6%	20%	9%	4%	9%	52%

Legenda: U - Usuários; C - Controles.

Figura 15 – Estimativa da porcentagem celular em cada amostra do estudo pela função *estimatecellcount*. Os pontos pretos representam as 48 amostras do estudo e os pontos coloridos representam a distribuição das células isoladas utilizadas na realização do cálculo para cada componente sanguíneo: Vermelho – células B; Verde – células T do tipo CD4; Azul - células T do tipo CD8; Azul claro: granulócitos; Rosa – monócitos e; Amarelo – células “natural killers”

Com a normalização dos dados pelo método BMIQ, analisamos os gráficos gerados para avaliar se as sondas *InfII* obtiveram uma distribuição idêntica às sondas *InfI* (Figura 16), para que ambos tipos de sondas tenham características estatísticas semelhantes. Todas as 48 amostras apresentaram normalização adequada e não precisaram ser retiradas do estudo.

Esse método de normalização gerou também um ‘cluster’ demonstrando a similaridade das amostras, por meio de um agrupamento hierárquico, baseado nos valores das 446.662 sondas (Figura 17). Os agrupamentos indicam que, levando em consideração todos os sítios analisados, há similaridade entre os grupos do estudo.

Figura 16 – Gráfico de normalização BMIQ. A: Amostras pré normalização; B: Amostras pós normalização

Figura 17 – Agrupamento hierárquico das amostras baseado nos valores de β das 446.662 sondas, demonstrando a similaridade entre as amostras. A: pré normalização e; B: pós normalização; A cor laranja representa os usuários (casos) e a cor verde os controles

Para confirmar que não há viés entre os grupos amostrais, as 1000 sondas que apresentaram maior variância entre todas as amostras, observadas pelo desvio padrão, foram usadas para plotar o gráfico MDS possibilitando avaliar o nível de similaridade entre as amostras (Figura 18). No gráfico é possível verificar a homogeneidade das amostras.

Figura 18 – Gráfico MDS baseado nos mil valores de β das sondas com maior variância. A: MDS pré normalização; B: MDS pós normalização

5.2.3. Comparação dos grupos

5.2.3.1. Caracterização dos sítios diferencialmente metilados entre casos e controles

A comparação dos perfis de metilação entre os casos e controles revelou 250 sítios diferencialmente metilados p -valor ajustado ($adjP$) $< 10^{-5}$ que estão associados a 246 genes. Destes sítios, 108 apresentaram-se hipermetilados e 142 hipometilados em casos em relação a controles (Anexo C). Destes, 23 genes apresentaram-se com $|\Delta\beta|$ maior ou igual a 0,1 (Tabela 2).

A análise de agrupamento hierárquico (Figura 19) para ilustrar o padrão de metilação entre casos e controles, através da plotagem dos 250 sítios diferencialmente metilados, foi realizada utilizando a distância euclidiana (média) e os sítios normalizados por Z -Score. Esta análise demonstrou que há diferença no padrão de metilação global entre indivíduos usuários/dependentes de crack/cocaína e controles saudáveis.

Tabela 2: Relação entre os sítios diferencialmente metilados ($adjP < 10^{-5}$) e os vinte e três genes que se apresentaram com $|\Delta\beta|$ maior ou igual a 0,1 na comparação entre casos e controles

ProbeID	adj.P.Val	CHR	Gene	Nome do gene	Relação ao gene_ilha CpG	β Casos	B Controles	$\Delta\beta$
cg10633981	2,50E-018	11	C11orf58	chromosome 11 open reading frame 58	3'UTR - open sea	0,647	0,482	0,17
cg01775802	8,34E-015	14	RGS6	regulator of G-protein signaling 6	Corpo do gene - open sea	0,416	0,268	0,15
cg19933985	1,50E-017	5	SPRY4	sprouty homolog 4 (Drosophila)	IGR - shelf	0,667	0,524	0,14
cg23797200	7,57E-018	17	NKIRAS2	NFKB inhibitor interacting Ras-like 2	Corpo do gene - shelf	0,518	0,392	0,13
cg01287788	1,58E-017	2	SNORD94	small nucleolar RNA, C/D box 94	TSS200 - open sea	0,630	0,507	0,12
cg05590156	3,15E-012	5	TRIO	trio Rho guanine nucleotide exchange factor	Corpo do gene - open sea	0,769	0,647	0,12
cg03150409	1,38E-010	4	WHSC1	Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1	5'UTR - open sea	0,553	0,440	0,11
cg03726791	2,90E-016	2	THAP4	THAP domain containing 4	Corpo do gene - open sea	0,711	0,601	0,11
cg15897635	2,78E-014	1	MARK1	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 1	IGR - shelf	0,418	0,309	0,11
cg05648964	5,20E-010	12	RIMKLB	ribosomal modification protein rimK-like family member B	IGR - open sea	0,724	0,616	0,11
cg02308712	2,07E-018	12	C12orf80	chromosome 12 open reading frame 80	IGR - open sea	0,616	0,508	0,11
cg01736133	1,80E-013	4	LOC645513	uncharacterized LOC645513	IGR - open sea	0,699	0,594	0,11
cg27379715	5,83E-017	2	SNTG2	syntrophin, gamma 2	IGR - open sea	0,650	0,545	0,10
cg14387505	7,36E-008	16	AHSP	alpha hemoglobin stabilizing protein	TSS1500 - open sea	0,507	0,404	0,10
cg04623165	1,23E-011	2	MIR4261	microRNA 4261	IGR - open sea	0,724	0,621	0,10
cg14497545	7,46E-020	4	MAML3	mastermind-like 3 (Drosophila)	Corpo do gene - open sea	0,482	0,379	0,10
cg01994308	4,01E-012	8	PLAG1	pleiomorphic adenoma gene 1	5'UTR - shore	0,536	0,642	-0,11
cg04981696	2,48E-009	16	ABCC1	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 1	Corpo do gene - shore	0,337	0,452	-0,12
cg07920855	4,74E-008	1	IVNSIABP	influenza virus NS1A binding protein	TSS200 - Ilha	0,236	0,354	-0,12
cg12065531	3,21E-013	6	RING1	ring finger protein 1	1º Éxon - Ilha	0,214	0,334	-0,12
cg03252499	2,06E-010	11	OR8B8	olfactory receptor, family 8, subfamily B, member 8	IGR - open sea	0,502	0,638	-0,14
cg11878675	1,58E-017	2	DGUOK	deoxyguanosine kinase	IGR - Ilha	0,203	0,342	-0,14
cg17479131	7,30E-014	7	ATP6V0E2-AS1	ATP6V0E2 antisense RNA 1	Corpo do gene - shelf	0,484	0,625	-0,14

Legenda: Probe ID - Identificação da sonda; adj.P.Val - p-valor ajustado; CHR - Cromossomo; β - Beta; $\Delta\beta$ - Delta Beta.

Figura 19 – Agrupamento hierárquico representando o padrão de metilação entre casos e controles utilizando os 250 sítios diferencialmente metilados. A cor azul representa os sítios hipometilados e a cor vermelha representa os sítios hipermetilados. O agrupamento superior representa os indivíduos da amostra nomeados na parte inferior, onde - U:usuários e C: controles. Os sítios são identificados do lado direito do cluster e o agrupamento destes está demonstrado à esquerda. O nível de metilação é observado através da intensidade das cores

Os sítios diferencialmente metilados estão representados tanto em relação ao gene quanto em relação a ilha CpG (Figura 20). Em ambos os casos, é possível observar que a maior parte dos sítios está localizado próximo ou nas regiões promotoras dos genes.

Figura 20 – Disposição dos sítios diferencialmente metilados. A: Em relação à localização gênica; B: Em relação à ilha CpG

Os genes relacionados aos sítios diferencialmente metilados foram anotados funcionalmente usando o WebGestalt (Wang et al., 2013), com os parâmetros 'Top 10', método estatístico hipergeométrico para análise de avaliação de enriquecimento, teste múltiplo BH (*FDR - False discovery rate*) para ajustar os *p-valores* e com pelo menos cinco genes em cada categoria. Dentre os processos biológicos que apresentaram hiper-representação de genes estão a regulação negativa de processo metabólico de composto nitrogenado (28 genes; *adjP* 2.20e-03), regulação negativa de processo biossintético (32 genes; *adjP* 6.00e-04) e regulação negativa de processos metabólicos celulares (39 genes; *adjP* 6.00e-04). Em relação à função molecular, a atividade de proteína cinase apresentou hiper-representação (18 genes; *adjP* 2.24e-02) e o corpo celular neuronal estava hiper-representado (10 genes; *adjP* 3.30e-02) no componente celular. Quando realizada a análise de associação a drogas encontramos hiper-representadas a glutatona (10 genes; *adjP* e-04) e a adenosina (9 genes; *adjP* 3,2e-03). A análise de módulos de interação proteína-proteína (PPI)

Para a análise de enriquecimento de vias moleculares, utilizamos o banco de dados KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). Para essa análise utilizamos $p\text{-valor} < 0,05$ e no mínimo cinco genes por categoria. Para os 246 genes diferencialmente metilados foram encontrados oito vias enriquecidas: via de sinalização de *MAPK* (6 genes; $adjP\ 4.7e-04$), leucemia mieloide crônica (6 genes; $adjP\ 3.65e-05$), vias de câncer (9 genes; $adjP\ 3e-04$), câncer de próstata (5 genes; $adjP\ 3e-04$), via de sinalização de insulina (6 genes; $adjP\ 3e-04$), via de sinalização de ErbB (5 genes; $adjP\ 3e-04$), *Gap junctions* (5 genes; $adjP\ 3e-04$), via de sinalização de receptores de célula T (5 genes; $adjP\ 6e-04$) (Wang et al., 2013).

5.2.3.2. Probe Lasso

Em busca de regiões de relevância biológica com um maior poder estatístico, a partir dos sítios diferencialmente metilados com $adjP < 0.05$, as DMRs foram agrupadas pelo método *Probe Lasso*, que leva em consideração as características genômicas e a densidade das sondas dos dados.

O primeiro gráfico gerado, um ‘*boxplot*’, mede a distância entre os dados de acordo com a sua função genômica e ilha CpG (Figura 22), o segundo um ‘*Cumulative Quantile Plot*’, mostra o tamanho de todas as janelas empregadas para cada DMR (Figura 23) e um gráfico de pontos, ilustrando o tamanho das janelas de acordo com a característica genômica (Figura 24).

Figura 22 – *Boxplot* mostrando a distância entre os dados de acordo com a sua função genômica e ilha CpG. As cores variam de acordo com a disposição genômica. No eixo Y está representada a distância entre as sondas

Figura 23 – *Cumulative Quantile Plot* - tamanho das janelas empregadas para a busca de DMRs. No eixo Y está a distância (pares de bases) do lasso

Figura 24 – Gráfico de pontos - pontos em escala de tamanho que ilustram o tamanho das janelas utilizadas no probe lasso. As cores variam de acordo com a disposição genômica. O eixo Y está demonstrado a distância (pares de bases) do lasso

Foram identificadas três DMRs que estão relacionadas a três genes: *BMP8A* (*bone morphogenetic protein 8A*), com quatro sítios diferencialmente metilados e tamanho de 104 pb, *GPR88* (*G protein-coupled receptor 88*), com três sítios diferencialmente metilados em 159 pb e *RNF166* (*ring finger protein 166*), com três sítios diferencialmente metilados em 108 pb (Tabela 3).

Tabela 3 – Descrição das regiões diferencialmente metiladas (DMRs) entre casos e controles

probeID	adj.P.Val	CHR	Gene	Relação ao gene_ilha CpG	dmr.start	dmr.end	dmr.size -pb	$\Delta\beta$
cg09547767	0.0353	1	BMP8A	1º Éxon - Ilha	39957342	39957445	104	-0.03
cg13806070	0.0565	1	BMP8A	1º Éxon - Ilha	39957342	39957445	104	-0.04
cg03664992	0.0005	1	BMP8A	1º Éxon - Ilha	39957342	39957445	104	-0.03
cg25139493	0.0012	1	BMP8A	1º Éxon - Ilha	39957342	39957445	104	-0.03
cg22602002	0.0473	1	GPR88	Corpo do gene- Ilha	101005372	101005530	159	-0.02
cg07706463	0.0156	1	GPR88	Corpo do gene - Ilha	101005372	101005530	159	-0.01
cg11882432	0.0186	1	GPR88	Corpo do gene - Ilha	101005372	101005530	159	-0.01
cg23392782	2,49E-05	16	RNF166	1º Éxon - Ilha	88772602	88772709	108	-0.02
cg08873779	0.0002	16	RNF166	1º Éxon - Ilha	88772602	88772709	108	-0.02
cg04297258	0.0002	16	RNF166	1º Éxon - Ilha	88772602	88772709	108	-0.03

Legenda: probeID - Sítio diferencialmente metilado; adj.P.Val - P-valor ajustado; CHR - Cromossomo em que a DMR está localizada; gene.l - Gene em que está localizada a DMR; feat.cgi - Posição da DMR em relação à ilha CpG e em relação ao gene; dmr.start - Posição de início da DMR; dmr.end - Posição do fim da DMR; dmr.size - Tamanho da DMR em pares de base; deltaBeta - média do valor de β .

As 3 DMRs foram mapeadas no *UCSC Genome Browser* (Karolchik et al., 2014) para visualização dos sítios diferencialmente metilados em relação às posições no genoma e ilhas CpGs identificadas *in silico* (Figura 25). Também estão identificados os resultados de dois projetos, o *UCSC Brain DNA Methylation*, que gerou dados por *MeDIP-seq* (*Methylated DNA Immunoprecipitation Sequencing*), *MRE-seq* (*Methylation-sensitive Restriction Enzyme Sequencing*), trimetilação da lisina 4 na histona H3 (H3K4me3) e expressão gênica de amostra do PFC de um homem de 57 anos de idade com o objetivo de investigar o possível papel da metilação intragênica e tecido-específica no controle da expressão gênica (Maunakea et al., 2010). E um segundo estudo, *Brain Histone H3K4me3 ChIP-Seq*, que mostra o

mapeamento da histona H3K4me3 em cérebros de diversos indivíduos com idade de 0 a 69 anos, medidos por imunoprecipitação seguido por sequenciamento de alta cobertura (Chip-seq). Esses experimentos foram feitos em neurônios e outros tipos celulares do PFC (Cheung et al., 2010).

Figura 25 – Esquemas representativos das localizações das DMRs mapeadas no *UCSC Genome Browser* dos genes *BMP8A* (A), *GPR88* (B) e *RNF166* (C). Na figura é possível observar do topo ao fundo: em preto as sondas que fazem parte da DMR; em cinza a banda cromossômica; em azul a anotação do gene; em verde escuro as ilhas CpG definidas por Gardiner-Garden e Frommer (1987). Referentes aos estudos *UCSC Brain DNA Methylation*: em verde o estudo da H3K4me3; em verde escuro *MRE-seq*; em marrom *MeDIP-seq* e em azul o *RNF-seq*. As barras de verde claro a azul escuro correspondem ao estudo da H3K4me3 do *Brain Histone H3K4me3 ChIP-Seq* (Cheung et al., 2010), indivíduo a indivíduo.

6. DISCUSSÃO

O presente estudo, até onde vai o nosso conhecimento, é o primeiro a demonstrar a alteração dos padrões globais de metilação do DNA em indivíduos dependentes de crack e cocaína quando comparados a indivíduos saudáveis, pareados por sexo e idade.

Os resultados evidenciaram que 250 sítios, relacionados a 246 genes, diferem em níveis de metilação ($adjP < 10^{-5}$) entre os grupos de pacientes e controles. Esses sítios podem estar relacionados com a expressão gênica devido sua localização em regiões promotoras (49%) e no corpo do gene (27%). Cerca de 37% desses sítios, encontrados nas margens das ilhas CpGs, ‘*shore*’ e ‘*shelve*’, podem ser relacionados à inativação transcricional (Portela, Esteller, 2010).

Os sítios hipermetilados podem estar relacionados com alterações na regulação transcricional, tanto para a inativação, com 10% dos sítios localizados em regiões promotoras do gene (5’UTR, TSS200 e TSS1500), quanto para a transcrição facilitada, com 44% dos sítios no corpo do gene (Portela, Esteller, 2010).

Na análise entre o padrão de metilação do DNA entre casos e controles, 23 genes diferencialmente metilados ($adjP < 10^{-5}$) apresentaram-se com $|\Delta\beta|$ maior ou igual a 0,1. São eles: *ABCC1* (*ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP) member 1*), *AHSP* (*alpha hemoglobin stabilizing protein*), *ATP6V0E2-AS1* (*ATP6V0E2 antisense RNA 1*), *C11orf58* (*chromosome 11 open reading frame 58*), *C12orf80* (*chromosome 12 open reading frame 80*), *DGUOK* (*deoxyguanosine*

kinase), *IVNS1ABP* (*influenza virus NS1A binding protein*), *LOC645513* (*uncharacterized LOC645513*), *MAML3* (*mastermind-like 3 (Drosophila)*), *MARK1* (*MAP/microtubule affinity-regulating kinase 1*), *MIR4261* (*microRNA 4261*), *NKIRAS2* (*NFKB inhibitor interacting Ras-like 2*), *OR8B8* (*olfactory receptor, family 8, subfamily B, member 8*), *PLAG1* (*pleiomorphic adenoma gene 1*), *RGS6* (*regulator of G-protein signaling 6*), *RIMKLB* (*ribosomal modification protein rimK-like family member B*), *RING1* (*ring finger protein 1*), *SNORD94* (*small nucleolar RNA, C/D box 94*), *SNTG2* (*syntrophin, gamma 2*), *SPRY4* (*sprouty homolog 4 (Drosophila)*), *THAP4* (*THAP domain containing 4*), *TRIO* (*trio Rho guanine nucleotide exchange factor*), *WHSC1* (*Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1*).

Dos 246 genes relacionados aos sítios diferencialmente metilados anotados funcionalmente com o parâmetro 'Top 10' (Wang et al., 2013) do WebGestalt, três estão relacionados a pelo menos quatro processos metabólicos e biológicos hiper-representados: *CALCA* (*calcitonin-related polypeptide alpha*), um gene já associado à doença de Parkinson e enxaqueca. É antagonista de um neuropeptídeo expresso em neurônios de gânglios trigeminais que é o principal mediador da dilatação das artérias cerebrais humanas (Menon et al., 2011).

NCOA2 (*nuclear receptor coactivator 2*), gene envolvido na regulação hormonal, com a expressão no córtex pré-frontal dorsolateral em pacientes com transtorno bipolar (Nurnberger et al., 2011).

DRD2 (*dopamine receptor D2*), gene envolvido na modulação da locomoção, reforço, memória e aprendizagem e têm sido associado à diversas patologias psiquiátricas na literatura como, por exemplo, esquizofrenia (Lencz et al., 2015; Yao

et al., 2015), depressão (Savitz et al., 2013; Pearson-Fuhrhop et al., 2014); jogo patológico (Hillemacher et al., 2015) e dependência de álcool (Delis et al., 2015), nicotina (Ahrens et al., 2015; Ma et al., 2015), opiáceos (Nelson et al., 2014; Levrant et al., 2015), maconha (Colizzi et al., 2015; DiNieri et al., 2015) e cocaína (Noble et al., 1993). A relação entre o gene *DRD2* e o abuso/dependência de cocaína têm sido investigada em diversos estudos em animais (Lee et al., 2006; Bertran-Gonzalez et al., 2008; Lawhorn et al., 2013) e humanos. Os estudos de associação vem sendo uma abordagem muito utilizada para estudar a relação entre o *DRD2* e o abuso/dependência de cocaína, porém apresentaram resultados divergentes, demonstrando associação positiva (Noble et al., 1993), assim como estudos que não reportaram esse achado (Gelernter et al., 1999; Messas et al., 2005; Lohoff et al., 2010; Fernández-Castillo et al., 2010).

Além do gene *DRD2*, diferentes genes e variantes têm sido associadas à vulnerabilidade para o abuso/dependência de cocaína. No sistema de recompensa do cérebro, a cocaína inibe diretamente o transportador de dopamina levando a um aumento dos níveis desse neurotransmissor na fenda sináptica, o que causa um acúmulo deste neurotransmissor, que não pode ser recapturado. Esse acúmulo é responsável pelo estresse oxidativo que pode levar, por exemplo, à neurodegeneração. Por outro lado, em usuários de crack, um estudo recente de 2014 mostrou uma correlação entre a condição de estresse oxidativo e a gravidade dos sintomas de abstinência (Zaparte et al., 2014).

A cerca disso, um achado importante no presente trabalho foi a hiper-representação da glutatona e adenosina na análise de associação a drogas pelo

WebGestalt. A glutathiona tem ação antioxidante e atua como protetor celular contra esses danos oxidativos. O gene que codifica a *GSTP1* (*glutathione S-transferase pi 1*), integrante da família das glutathionas-S-transferases, enzimas que desempenham um papel importante na redução do estresse oxidativo, apresentou-se hipometilado nos casos em nossos resultados (Uys et al., 2011). Esse gene protege o DNA desses danos oxidativos e foi relatado na literatura com associação à dependência de cocaína. Em um estudo da população brasileira, o tipo selvagem para o polimorfismo funcional *GSTP1 Ile105Val* foi encontrado associado a usuários de cocaína, sugerindo a relevância deste gene no mecanismo de resposta à droga (Guindalini et al., 2005). A adenosina é um nucleosídeo que atua como neuromodulador endógeno e têm sido implicado em processos patofisiológicos como a dependência química. Seu receptor antagonista A(2A) é altamente expresso no SNC, principalmente no NAc, estriado ventral e dorsal, onde forma unidades funcionais com o receptor de dopamina *DRD2* alterando sua ligação e sinalização, inibindo a adenosina endógena por aumentar o efeito da dopamina nesses receptores (Lopes et al., 2011; Lane et al., 2012). Estudos em modelo animal têm mostrado um papel importante do A(2A) na modulação dos efeitos agudos da cocaína, principalmente sobre os efeitos comportamentais nos animais. Wells e colaboradores (2012) relataram diminuição na transmissão dopaminérgica no núcleo accumbens de camundongos tratados com cocaína e o papel do A(2A) na modulação dos efeitos agudos da droga, como na regulação da hiperlocomoção.

Na análise de enriquecimento de doenças, estão hiper-representados os transtornos psiquiátricos: tique, estresse, transtorno psicótico induzido e abuso de maconha. Notavelmente, o transtorno psicótico induzido e o abuso de maconha

estavam representados pelos mesmos genes, o *DRD2*, citado anteriormente; *EHMT1* (*euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 1*) e *EHMT2* (*euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 2*). Os genes *EHMT1* e *EHMT2*, também representados na rede PPI, são histonas metiltransferases cujas proteínas as quais codificam estão envolvidas na repressão da transcrição e já foram relacionados com transtornos como a esquizofrenia (Balan et al., 2014). O gene *EHMT2*, encontrado hipometilado na região promotora, e o *EHMT1*, encontrado hipermetilado no corpo do gene, já foram associados com o uso prolongado de cocaína e a expressão gênica, demonstrada em cérebro de camundongos (NAc), por estar sendo influenciada pelo uso desta droga (Maze et al., 2010; 2014; Covington et al., 2011).

O resultado dessa análise de enriquecimento para doenças corrobora com um estudo caso/ controle recente que avaliou a interação do gene *DRD2* em casos de pacientes com dependência de maconha, controles com traços esquizotípicos em relação ao desenvolvimento de transtorno psicótico. Os autores relataram que a interação entre o gene *DRD2* e o uso de maconha pode influenciar a probabilidade de um transtorno psicótico, e os controles saudáveis que carregavam o mesmo alelo do gene *DRD2* que os casos tinham risco aumentado para esquizotipia quando comparados com os controles que não carregavam esse alelo (Colizzi et al., 2015).

Em relação ao estresse, outro transtorno psiquiátrico revelado nessa análise, os principais genes relacionados foram *MAP2K1* (*mitogen-activated protein kinase kinase 1*), *MAPK3* (*mitogen-activated protein kinase 3*) e *MAPK1* (*mitogen-activated protein kinase 1*) relacionados à cascata de sinalização MAPK, processos intracelulares envolvidos na diferenciação, proliferação, regulação de transcrição,

sobrevivência celular e desenvolvimento neuronal (Rubinfeld, Seger, 2005). Esses três genes também apresentaram hiper-representação nos processos biológicos e moleculares e em vias depositadas no banco de dados KEGG. A cascata de sinalização MAPK foi hiper-representada e os genes estavam presentes em mais sete processos: leucemia mieloide crônica, vias de câncer, câncer de próstata, via de sinalização de insulina, via de sinalização de ErbB, *Gap junctions* e via de sinalização de receptores de célula T. desse banco de dados. Em relação à cocaína, a via MAPK é ativada pelo aumento de dopamina extracelular no corpo estriado em resposta ao abuso da droga, desempenhando um importante papel na regulação gênica por ativação direta de fatores de transcrição e na remodelação da cromatina (Brami-Cherrier et al., 2009). Esses dados corroboram com nossos achados, uma vez que esse gene encontra-se hipometilado na região promotora, fazendo com que haja um provável aumento da expressão nos pacientes dependentes da droga. Interessantemente, um estudo com modelos animais mostrou a relação da cocaína e da metilação do gene *MAPK1* quando observou a prole masculina de camundongos de mães expostas à droga (Novikova et al., 2008). *MAPK1*, encontrado hipometilado no promotor e *MAPK3* hipometilado no corpo do gene, foram encontrados envolvidos na regulação dos efeitos da cocaína (Ferguson et al., 2006). A inibição da cascata *Raf-MEK-ERK* modula a sensibilização ao desenvolvimento psicomotor à cocaína (Pierce et al., 1999; Valjent et al., 2005).

Um estudo *post mortem* avaliou o córtex pré-frontal dorsolateral, entre grupos de dependentes de cocaína e controles, encontraram o aumento da expressão gênica de *MAPK3* e *MAP2K1*, sendo este último também hiper expresso em pacientes que faziam uso de crack (Lehrmann et al., 2003).

Encontramos três genes hipometilados relacionados a três DMRs, cada uma com pelo menos três sítios diferencialmente metilados. As DMRs se encontram nos genes *BMP8A* (*bone morphogenetic protein 8A*), membro de uma grande família de moléculas de sinalização de polipeptídeos extracelulares, relacionados com a transformação do fator de crescimento β (TGF- β), envolvido na proliferação, diferenciação e sobrevivência celular (Chung et al., 2015); *GPR88* (*G protein-coupled receptor 88*), que tem expressão elevada no SNC em paralelo com a expressão do gene *DRD2*, sugerindo um papel na regulação dopaminérgica. A expressão desse gene está relacionada também com uma variedade de distúrbios psiquiátricos, incluindo o transtorno bipolar, depressão e esquizofrenia (Dzierba et al., 2015). E, representando a terceira DMR, o gene *RNF166* (*ring finger protein 166*), envolvido na regulação da ativação de células T (Giannini et al., 2008).

No resultado apresentado pelo *GenomeBrowser*, somente o gene *GPR88* apresentou uma baixa intensidade de sinal das três sondas para o experimento de *MRE-seq*, entretanto foi possível identificar um sinal para a região regulatória *H3K4me3* e de expressão no *RNA-seq*. Isto sugere que o baixo sinal de metilação apresentado no *UCSC Brain Methylation* corrobora com o sinal de *H3K4me3*, o qual está relacionado com regiões promotoras ativas (Shlyueva et al., 2014), e a expressão do transcrito identificada pelo *RNA-seq*. Em relação aos genes *RNF166* e *BMP8A*, somente o sinal para *H3K4me3* é encontrado, sugerindo que a região está ativa para a transcrição, o que está de acordo com o baixo sinal de regiões de DNA metilado (*MRE-seq* e *MeDIP*), entretanto não foi possível detectar o transcrito por *RNA-seq*. É importante ressaltar que estes resultados são provenientes de apenas um indivíduo do

sexo masculino de 57 anos sem dados clínicos e epidemiológicos, portanto, esses dados precisam ser melhor avaliados.

Comparando os resultados obtidos com estudos de expressão gênica que avaliam o uso/abuso de cocaína em tecido cerebral de modelo animal, o gene *STX1A* (*Syntaxin 1A (brain)*), um gene do sistema nervoso implicado na afinidade de ligação das vesículas sinápticas com a membrana plasmática pré-sináptica, e que estava hipometilado em casos na nossa pesquisa, apresentou baixa expressão gênica no núcleo accumbens de camundongos tratados com solução salina e cocaína quando comparados com camundongos tratados com soro fisiológico estéril e S-adenosilmetionina (Anier et al., 2013).

Em relação a estudos em humanos, especificamente em tecidos *post mortem* de dependentes de cocaína, encontramos semelhança entre alguns genes nos resultados. Dos genes encontrados diferencialmente metilados, encontramos uma sobreposição com a literatura de 10 genes. Destes, oito possuem diferença de expressão concordante com o padrão de metilação encontrada nas amostras do presente trabalho. São eles: *AEBP2* (*AE binding protein 2*), *CDHR5* (*cadherin-related family member 5*), *HIPK3* (*homeodomain interacting protein kinase 3*), *KLF13* (*Kruppel-like factor 13*), *LMTK2* (*lemur tyrosine kinase 2*), *STMN1* (*stathmin 1*), *MAP2K1* e *MAPK3*, todos hipermetilados na nossa amostra e relacionados à hiper expressão nos estudos encontrados. E, o gene *UBE2V2* (*ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2*), hipometilado e relacionado a baixa expressão gênica (Zhou et al., 2011).

Pouco se sabe sobre a relação entre as alterações no padrão de metilação global do DNA em tecidos cerebral e como essas correspondem aos padrões observados nos

tecidos periféricos facilmente acessíveis, tais como o sangue. Davies e colaboradores (2012) buscaram evidenciar essa relação em tecido cerebral e sangue periférico e encontraram variações inter-individuais em ambos tecidos. Outro estudo, abordando a relação do padrão de metilação sobre o envelhecimento, concluiu que os efeitos da idade sobre os perfis de metilação do DNA podem ser avaliados pelo sangue, considerando que o sangue pode ser um substituto promissor para o tecido cerebral (Horvath et al., 2012). Um estudo mais recente, avaliando essas diferenças para a esquizofrenia, identificou marcadores CpG encontrados através da metilação em sangue periférico que evidenciam uma alta correlação com marcadores de metilação do DNA do cérebro, assim como a identificação de vias biológicas cerebrais afetadas pela esquizofrenia que podem ser identificadas por meio de tecidos periféricos (Walton et al., 2015).

Finalmente, como toda investigação possui algumas limitações metodológicas, o presente estudo segue a regra. Algumas das limitações deste estudo se referem a população e amostra. A população definida para esse estudo de dependentes de cocaína e crack, assim como essa população no geral, não segue um padrão definido de uso/abuso de drogas. Há a droga de preferência entre todas as outras drogas disponíveis e o indivíduo é considerado como dependente preferencialmente da droga de escolha, mas essa preferência não anula a possibilidade de comorbidade com outras drogas. A definição da amostra também pode ser considerada como limitante que, ao seu número reduzido de 48 indivíduos, permite considerar os resultados encontrados para a população em questão. Entretanto, para a seleção da amostra, foram definidos critérios buscando a homogeneidade entre os indivíduos, o que pode reduzir vieses sobre as interferências individuais.

7. CONCLUSÃO

A investigação de metilação global do DNA entre usuários/dependentes de crack e cocaína e controles saudáveis mostrou diferenças estatisticamente significantes no padrão de metilação genômico. Essas alterações estão associadas a genes hiper-representados em processos biológicos e moleculares, e envolvidas com a regulação transcricional.

A observação desses resultados em comparação com estudos de expressão em tecido cerebral já foi relatada na literatura para o abuso/dependência de cocaína e as alterações observadas em estudos anteriores indicam que há uma correlação entre a expressão gênica no cérebro e genes diferencialmente metilados, e que a metilação global do DNA pode ser detectada em sangue periférico.

8. ANEXOS

ANEXO A. Origem dos pacientes/ amostras do banco de DNA (biorepositório) do ProGene (IPq HCFMUSP) – Casos e controles

Os casos de abuso/dependência de cocaína/crack e controles provenientes do banco de DNA do Programa de Genética e Farmacogenética (ProGene) do Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (IPq-HCFMUSP). Esse banco de amostras (biorepositório) já foram utilizados em estudos anteriores, gerando três teses, uma dissertação e publicações desses resultados em diversas revistas internacionais. O primeiro desses estudos relata o papel do polimorfismo Bal I no gene que codifica o receptor de dopamina *DRD3* na dependência de cocaína (Messas et al., 2005), o segundo estudo descreve a importância do efeito da estratificação populacional em estudos de associação e posteriormente a investigação de genes candidatos para a dependência de cocaína (Guindalini et al., 2005; Guindalini et al., 2006(a); Guindalini et al., 2006(b); Guindalini et al., 2007; Guindalini et al., 2008). Em 2006, Cunha apresentou a sua dissertação sobre o papel dos genes que codificam a *MAO-A*, *COMT* e *5-HTT* na dependência de cocaína (Cunha, 2006). Recentemente, Negrão e colaboradores relataram a importância de variantes do gene que codifica a butirilcolinesterase no comportamento de abuso/dependência de crack/cocaína (Negrão et al., 2013).

Casos. Os usuários/dependentes de cocaína/ crack participaram originalmente de um estudo para avaliação do perfil de usuários graves de cocaína na cidade de São Paulo (Dunn, Laranjeira, 1999), aprovado pelo Comitê de Ética Médica da Escola Paulista de Medicina – UNIFESP. Esse estudo foi realizado pelo Centro de Estudos de Epidemiologia Clínica (GRIDEC) e pela Unidade de Pesquisa em Álcool e Drogas (UNIAD), ambos pertencentes à Escola Paulista de Medicina (EPM) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), com a participação de sete serviços de atendimento a dependentes de drogas na região metropolitana de São Paulo: Casa de Saúde Santana, Centro Psiquiátrico de São Bernardo do Campo, Hospital Geral de Taipas, Sanatório Charcot, Hospital Psiquiátrico da Água Funda, Comunidade Terapêutica Bezerra de Menezes e a Unidade de Pesquisa em Álcool e Drogas (UNIAD) em regime ambulatorial. Esses serviços foram selecionados por um levantamento de instituições de saúde especializadas no atendimento hospitalar a usuários/dependentes de drogas na região metropolitana de São Paulo, durante o ano de 1996, baseado no Sistema de Informações Hospitalares do Sistema Único de Saúde (SIH/SUS) do Ministério da Saúde.

A identificação dos serviços foi baseada no registro de internações de pacientes com qualquer diagnóstico da Classificação Internacional de Doenças, nona edição (CID 9, então vigente) relacionado ao uso de substâncias químicas. Inicialmente, foram detectadas 36 instituições e a partir desse resultado, foram selecionadas aquelas que apresentaram pelo menos 50 internações no ano de 1996. Serviços não conveniados ao SUS que apresentaram mais de 50 internações ou atendimentos em 12 meses também foram selecionados. Após este processo, todos

os serviços selecionados receberam um ofício com a cópia e justificativa do projeto e uma solicitação para realização da pesquisa em suas enfermarias/ ambulatório.

Os pacientes submetidos a tratamento nestas instituições, de ambos os sexos, com mais de 17 anos, moradores da região metropolitana de São Paulo e em condições físicas e mentais de participarem da entrevista foram selecionados. Pacientes com história exclusiva de dependência de álcool ou drogas de administração por via oral foram excluídos. Todos os pacientes selecionados satisfizeram os critérios de dependência de cocaína a partir das diretrizes da CID10, complementados por informações colhidas a partir de um questionário desenvolvido e validado em uma população de dependentes químicos em São Paulo (Dunn, Laranjeira, 2000). Este questionário foi respondido por cada paciente a partir de uma entrevista conduzida individual e reservadamente no local do tratamento psiquiátrico pela equipe de trabalho do projeto anteriormente treinada e sob supervisão do pesquisador responsável por essa sessão do trabalho. As informações sobre dados sócio-demográficos desses indivíduos, assim como o uso de drogas lícitas e ilícitas, início do uso de cocaína, transições na via de administração da droga e atividades criminais foram descritas na tese de doutoramento já citada (Guindalini, 2005). Resumidamente, essa amostra é constituída na sua maioria por indivíduos do sexo masculino (95%) e solteiros (60%), tendo cursado o primeiro grau ou menos (62%) e predominantemente caucasianos (70%). No que tange à droga de escolha, 70% fazem tanto uso de cocaína inalada como na forma fumada, o crack. Em relação à criminalidade, 53% do total da amostra relata ter sido detida pelo menos uma vez durante a vida.

Controles. Os controles utilizados nesse estudo são indivíduos voluntários que foram recrutados no Banco de Sangue do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (PROSANGUE). Todos os voluntários doadores de sangue são submetidos a um questionário para investigação de doenças contagiosas e uso de substâncias químicas (fármacos e outras substâncias). Indivíduos com relato de história pregressa de uso abusivo ou contato recente com qualquer droga de potencial abuso são impedidos de realizar a doação. Durante o ato de coleta de sangue, uma breve entrevista complementar com cada doador foi realizada, investigando a presença de algum diagnóstico psiquiátrico ao longo da vida. Doadores que apresentaram informações positivas para alguma condição psiquiátrica atual ou com história de internação psiquiátrica em algum momento da vida foram excluídos do estudo.

Coleta de amostras e extração de DNA. A avaliação e coleta de material biológico foi realizada no período de agosto de 1997 e cada paciente (casos e controles) assinou um termo de consentimento após esclarecimentos sobre os objetivos do projeto. Foram coletados 35 ml de sangue periférico de cada paciente, com material estéril e descartável (Tubos *Vacutainer*). Destes 35 ml de sangue, 27 ml (sem anticoagulante) foram destinados a exames sorológicos pertinentes a outros estudos associados e 8 ml contendo EDTA (anti-coagulante) foram preservados para a extração de DNA. O DNA genômico foi extraído a partir do sangue total utilizando – se os métodos se Fenol/Clorofórmio ou “*Salting Out*”, descrito por Miller et al. (1988). Após a extração, a viabilidade de material extraído foi visualizada em gel de agarose 0,8% e a concentração foi obtida por leitura em espectrofotômetro Gene Quant (*Amersham Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, New Jersey, USA*).

ANEXO B. Aprovação do pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina - FMUSP

APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 07/05/2014, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 143/13 intitulado: “ESTUDOS EPIGENÉTICOS EM DEPENDENTES DE CRACK” apresentado pelo Departamento de PSQUIATRIA

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 466/12).

Pesquisador (a) Responsável: Homero Pinto Vallada Filho

Pesquisador (a) Executante: Caroline Perez Camilo

CEP-FMUSP, 09 de Maio de 2014.

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

ANEXO C.

Tabela 1 - Relação dos sítios e genes hipermetilados ($adjP < 10^{-5}$)

Probe ID	adj.P.Val	CHR	Gene	Relação ao gene_ilha CpG	β Casos	β Controles	$\Delta\beta$
cg14091531	3,01E-007	1	PDPN	IGR - Ilha	0,822	0,805	0,02
cg03511735	6,72E-006	8	PTP4A3	IGR - shelf	0,893	0,868	0,02
cg01934856	1,20E-006	1	CASZ1	Corpo do gene - Ilha	0,877	0,851	0,03
cg02431780	3,15E-006	5	LOC648987	IGR - open sea	0,661	0,633	0,03
cg04736453	1,14E-008	16	EEF2K	IGR - shelf	0,815	0,786	0,03
cg01747978	2,03E-006	7	GJC3	IGR - open sea	0,842	0,813	0,03
cg10335230	3,87E-006	11	LOC283177	IGR - shelf	0,680	0,650	0,03
cg17113878	5,84E-006	1	VPS45	Corpo do gene - shelf	0,887	0,856	0,03
cg00471142	6,21E-006	19	LRFN1	TSS1500 - shore	0,903	0,871	0,03
cg12190125	7,57E-007	12	OR9K2	IGR - open sea	0,618	0,585	0,03
cg08849635	5,26E-006	10	SFRP5	TSS1500 - shore	0,631	0,598	0,03
cg11569703	3,07E-008	11	OVOL1	Corpo do gene - shore	0,829	0,796	0,03
cg09507215	4,89E-006	13	ATP11A	Corpo do gene - shelf	0,741	0,707	0,03
cg00642607	5,08E-006	10	PFKP	IGR - open sea	0,886	0,852	0,03
cg21671386	8,65E-006	11	DRD2	3'UTR - open sea	0,846	0,810	0,04
cg24904863	9,97E-006	8	MIR4472-1	IGR - open sea	0,749	0,711	0,04
cg04607032	5,47E-006	17	SEPT9	IGR - open sea	0,895	0,857	0,04
cg26758810	1,10E-007	6	RP11-162J8.2	IGR - shelf	0,802	0,764	0,04
cg24007084	1,03E-007	17	FOXN1	TSS200 - open sea	0,783	0,745	0,04
cg12619612	1,10E-007	7	SLC12A9	IGR - shelf	0,912	0,874	0,04
cg02578321	1,12E-007	1	C1orf229	TSS200 - shore	0,714	0,674	0,04
cg13315471	2,63E-008	2	TMEM214	Corpo do gene - shelf	0,717	0,677	0,04
cg03528519	6,68E-006	1	SCP2	3'UTR - open sea	0,821	0,780	0,04
cg23681110	2,78E-006	8	TRAPPC9	Corpo do gene - open sea	0,811	0,770	0,04
cg00962799	1,92E-008	X	SSX8	TSS200 - open sea	0,731	0,689	0,04
cg04282029	7,63E-008	1	SV2A	TSS1500 - open sea	0,839	0,796	0,04
cg10839502	3,30E-008	10	DIP2C	Corpo do gene - shelf	0,874	0,831	0,04
cg02158565	5,15E-007	7	AGAP3	Corpo do gene - shelf	0,794	0,750	0,04
cg00811382	2,78E-006	7	LMTK2	Corpo do gene - shelf	0,897	0,853	0,04
cg13801510	1,48E-006	6	RNASET2	IGR - Ilha	0,644	0,600	0,04
cg23995169	2,95E-009	2	SRBD1	5'UTR - shelf	0,778	0,733	0,04
cg24141153	7,17E-008	19	CBLC	IGR - shelf	0,852	0,806	0,05
cg04205664	5,62E-008	7	CLEC2L	Corpo do gene - shore	0,291	0,246	0,05
cg25426044	1,52E-011	8	GEM	IGR - open sea	0,765	0,719	0,05
cg11961642	6,21E-006	12	DNAH10	Corpo do gene - Ilha	0,842	0,795	0,05
cg19890431	1,63E-007	11	ART5	3'UTR - shelf	0,634	0,585	0,05

Legenda: Probe ID - Identificação da sonda; adj.P.Val - p-valor ajustado; CHR - Cromossomo;
 $\Delta\beta$ - Delta Beta.

continua

Tabela 1 (cont.) - Relação dos sítios e genes hipermetilados ($adjP < 10^{-5}$)

Probe ID	adj.P.Val	CHR	Gene	Relação ao gene_ilha CpG	β - Casos	β - Controles	$\Delta\beta$
cg21886089	7,72E-007	7	WBSCR17	Corpo do gene - open sea	0,754	0,704	0,05
cg25333056	1,80E-010	10	TUBGCP2	Corpo do gene - shelf	0,745	0,694	0,05
cg07009968	5,12E-008	15	MIR1469	IGR - open sea	0,569	0,518	0,05
cg01959896	2,95E-007	6	PDSS2	Corpo do gene - open sea	0,884	0,831	0,05
cg00800759	6,23E-009	16	CRYM	5'UTR - shelf	0,572	0,517	0,05
cg14923379	1,45E-006	X	FAM123B	5'UTR - shelf	0,808	0,751	0,06
cg04581293	3,22E-010	3	CCNL1	IGR - shelf	0,730	0,673	0,06
cg27404272	4,39E-006	2	MIR2467	IGR - shore	0,803	0,746	0,06
cg18219180	6,17E-007	2	ICOS	TSS1500 - open sea	0,808	0,750	0,06
cg04945626	2,15E-007	4	RP3-513G18.2	IGR - shelf	0,864	0,806	0,06
cg04930982	3,79E-008	6	UST	Corpo do gene - shelf	0,895	0,835	0,06
cg04224041	4,80E-006	4	CTBP1	Corpo do gene - shore	0,791	0,731	0,06
cg16975981	1,14E-008	X	PAGE5	5'UTR - open sea	0,654	0,593	0,06
cg01810623	8,42E-006	12	IL26	IGR - open sea	0,761	0,699	0,06
cg07086224	8,03E-006	2	FAM82A1	Corpo do gene - open sea	0,790	0,728	0,06
cg11158902	6,51E-011	4	MAN2B2	IGR - open sea	0,731	0,666	0,07
cg16101278	5,94E-007	6	LY86	Corpo do gene - open sea	0,337	0,271	0,07
cg07449447	1,36E-015	14	SAMD4A	Corpo do gene - shore	0,750	0,684	0,07
cg25612480	7,55E-010	8	UBE2V2	TSS1500 - shore	0,521	0,454	0,07
cg18301538	9,85E-007	10	GBF1	Corpo do gene - open sea	0,770	0,703	0,07
cg26288370	4,95E-008	6	KIAA1244	Corpo do gene - shelf	0,862	0,795	0,07
cg20001070	1,55E-007	7	UPP1	5'UTR - shore	0,317	0,250	0,07
cg02771392	1,02E-012	7	ZNF273	TSS1500 - open sea	0,624	0,556	0,07
cg13701768	5,97E-009	9	PAX5	Corpo do gene - Ilha	0,835	0,765	0,07
cg02732134	2,30E-011	10	DNMBP	5'UTR - open sea	0,501	0,430	0,07
cg06631999	7,96E-013	1	STMN1	Corpo do gene - open sea	0,895	0,823	0,07
cg25009327	2,85E-013	7	ZNF425	Corpo do gene - shelf	0,292	0,219	0,07
cg06106839	3,15E-012	12	TUBA1C	IGR - open sea	0,812	0,739	0,07
cg21565415	3,45E-008	11	MUPCDH	Corpo do gene - shore	0,526	0,452	0,07
cg05106659	2,44E-010	4	PET112L	TSS1500 - shore	0,879	0,805	0,07
cg26706961	6,25E-013	2	OLA1	IGR - open sea	0,709	0,634	0,07
cg02047661	4,34E-006	3	RRP9	TSS1500 - shore	0,696	0,621	0,08
cg13810766	2,14E-013	7	PRKAG2	Corpo do gene - open sea	0,413	0,337	0,08
cg01219670	2,06E-009	7	ZP3	Corpo do gene - open sea	0,727	0,651	0,08
cg14221700	6,65E-008	1	KCNA2	IGR - shelf	0,685	0,608	0,08
cg02246683	2,61E-007	8	NCOA2	5'UTR - open sea	0,792	0,714	0,08
cg09656541	7,39E-007	10	C10orf118	5'UTR - shore	0,390	0,311	0,08
cg08169830	1,78E-010	7	LMTK2	Corpo do gene - shore	0,808	0,729	0,08
cg13610622	3,51E-009	10	USP6NL	Corpo do gene - shore	0,820	0,740	0,08

Legenda: Probe ID - Identificação da sonda; adj.P.Val - p-valor ajustado; CHR - Cromossomo;

continua

 $\Delta\beta$ - Delta Beta.

Tabela 1 (conclusão) - Relação dos sítios e genes hipermetilados ($adjP < 10^{-5}$)

Probe ID	adj.P.Val	CHR	Gene	Relação ao gene_ilha CpG	β - Casos	β - Controles	$\Delta\beta$
cg25884442	2,81E-013	12	VWF	Corpo do gene - open sea	0,545	0,464	0,08
cg07437919	8,85E-009	8	SLC45A4	Corpo do gene - shore	0,428	0,348	0,08
cg07892139	2,90E-008	X	UBE2DNL	IGR - shelf	0,745	0,664	0,08
cg14269096	1,05E-010	18	ZNF532	5'UTR - shore	0,756	0,673	0,08
cg24044028	6,01E-006	12	E2F7	IGR - open sea	0,772	0,688	0,08
cg01074676	8,41E-008	14	C14orf135	3'UTR - open sea	0,747	0,664	0,08
cg00192773	3,84E-010	16	MAPK3	Corpo do gene - shelf	0,704	0,618	0,09
cg11049075	1,15E-007	17	HDAC5	5'UTR - shore	0,672	0,584	0,09
cg14495033	6,23E-009	9	EHMT1	Corpo do gene - shore	0,686	0,597	0,09
cg14380444	5,44E-006	1	RERE	Corpo do gene - open sea	0,610	0,519	0,09
cg07343790	4,47E-008	13	ATP11A	Corpo do gene - open sea	0,263	0,170	0,09
cg03027241	3,40E-017	20	KCNQ1	3'UTR - Ilha	0,471	0,378	0,09
cg15285494	6,37E-008	4	FAT1	IGR - shore	0,644	0,550	0,09
cg08257600	3,21E-013	19	ADCK4	Corpo do gene - shelf	0,740	0,646	0,09
cg21937244	1,26E-015	14	CDC42BPB	Corpo do gene - Ilha	0,735	0,640	0,10
cg22534759	8,52E-008	10	KIF5B	IGR - shelf	0,739	0,642	0,10
cg04250181	8,66E-011	12	SLCO1B3	5'UTR - open sea	0,763	0,665	0,10
cg14497545	7,46E-020	4	MAML3	Corpo do gene - open sea	0,482	0,379	0,10
cg04623165	1,23E-011	2	MIR4261	IGR - open sea	0,724	0,621	0,10
cg14387505	7,36E-008	16	AHSP	TSS1500 - open sea	0,507	0,404	0,10
cg27379715	5,83E-017	2	SNTG2	IGR - open sea	0,650	0,545	0,10
cg01736133	1,80E-013	4	LOC645513	IGR - open sea	0,699	0,594	0,11
cg02308712	2,07E-018	12	C12orf80	IGR - open sea	0,616	0,508	0,11
cg05648964	5,20E-010	12	RIMKLB	IGR - open sea	0,724	0,616	0,11
cg15897635	2,78E-014	1	MARK1	IGR - shelf	0,418	0,309	0,11
cg03726791	2,90E-016	2	THAP4	Corpo do gene - open sea	0,711	0,601	0,11
cg03150409	1,38E-010	4	WHSC1	5'UTR - open sea	0,553	0,440	0,11
cg05590156	3,15E-012	5	TRIO	Corpo do gene - open sea	0,769	0,647	0,12
cg01287788	1,58E-017	2	SNORD94	TSS200 - open sea	0,630	0,507	0,12
cg23797200	7,57E-018	17	NKIRAS2	Corpo do gene - shelf	0,518	0,392	0,13
cg19933985	1,50E-017	5	SPRY4	IGR - shelf	0,667	0,524	0,14
cg01775802	8,34E-015	14	RGS6	Corpo do gene - open sea	0,416	0,268	0,15
cg10633981	2,50E-018	11	C11orf58	3'UTR - open sea	0,647	0,482	0,17

Legenda: Probe ID - Identificação da sonda; adj.P.Val - p-valor ajustado; CHR - Cromossomo; $\Delta\beta$ - Delta Beta.

Tabela 2 - Relação dos sítios e genes hipometilados ($adjP < 10^{-5}$)

Probe ID	adj.P.Val	CHR	Gene	Relação ao gene_ilha CpG	β Casos	β Controles	$\Delta\beta$
cg11878675	3,43296E-18	2	DGUOK	gene	0,203	0,342	-0,14
cg17479131	2,47874E-22	7	LOC401431	1º Éxon - Ilha	0,484	0,625	-0,14
cg03252499	2,8652E-14	11	OR8B8	IGR - Ilha	0,502	0,638	-0,14
cg12065531	2,15621E-17	6	RING1	5'UTR - shore	0,214	0,334	-0,12
cg07920855	1,28445E-11	1	IVNS1ABP	TSS200 - Ilha	0,236	0,354	-0,12
cg04981696	4,43768E-13	16	ABCC1	IGR - Ilha	0,337	0,452	-0,12
cg01994308	3,58687E-16	8	PLAG1	1º Éxon - Ilha	0,536	0,642	-0,11
cg17528648	3,49649E-14	5	OSMR	IGR - open sea	0,151	0,251	-0,10
cg17520314	1,62727E-13	17	NPLOC4	IGR - open sea	0,262	0,360	-0,10
cg01684248	2,74647E-19	16	FOXF1	5'UTR - open sea	0,465	0,564	-0,10
cg23505966	1,29034E-13	3	CEP97	IGR - shore	0,135	0,233	-0,10
cg19015611	7,10001E-13	2	VAX2	TSS1500 - shore	0,679	0,777	-0,10
cg19349861	1,67445E-21	11	OPCML	IGR - Ilha	0,252	0,348	-0,10
cg21107223	1,69536E-10	15	MPI	TSS200 - shore	0,157	0,250	-0,09
cg07920148	1,11823E-14	11	HIPK3	1º Éxon - Ilha	0,264	0,357	-0,09
cg22603710	8,83752E-10	3	EPHB1	TSS200 - shore	0,295	0,385	-0,09
cg10684905	8,26326E-11	12	TULP3	TSS200 - Ilha	0,194	0,284	-0,09
cg17258551	2,89463E-15	19	KCNN1	Corpo do gene - shore	0,287	0,376	-0,09
cg18089569	9,4739E-14	11	CALCA	IGR - Ilha	0,311	0,400	-0,09
cg05887304	1,9078E-11	X	PRPS2	Corpo do gene - shore	0,381	0,468	-0,09
cg06009330	2,43957E-17	2	PCYOX1	1º Éxon - Ilha	0,282	0,368	-0,09
cg02711976	9,65577E-13	1	NCDN	TSS200 - Ilha	0,195	0,279	-0,08
cg18048953	2,02527E-13	12	CDKN1B	5'UTR - Ilha	0,461	0,545	-0,08
cg06348038	5,9471E-11	1	IL20	1º Éxon - Ilha	0,226	0,309	-0,08
cg11815057	1,52824E-13	1	NPR1	1º Éxon - Ilha	0,345	0,428	-0,08
cg05629721	4,68261E-17	6	PSMB8	1º Éxon - Ilha	0,199	0,280	-0,08
cg08081407	1,49557E-15	3	ARF4	TSS200 - Ilha	0,353	0,433	-0,08
cg01204305	3,93526E-15	3	AMIGO3	5'UTR - Ilha	0,509	0,589	-0,08
cg10810752	4,85917E-14	1	TAL1	TSS200 - Ilha	0,231	0,309	-0,08
cg12484756	4,515E-10	19	ILF3	TSS1500 - Ilha	0,109	0,186	-0,08
cg03909902	3,27274E-15	12	PRDM4	5'UTR - Ilha	0,327	0,403	-0,08
cg07392601	3,8734E-18	9	LOC100272217	Corpo do gene - shelf	0,165	0,241	-0,08
cg02181963	1,48341E-12	13	CARS2	TSS1500 - Ilha	0,224	0,300	-0,08
cg20095036	4,19028E-14	4	FBXW7	5'UTR - Ilha	0,228	0,303	-0,07
cg01801101	1,29334E-17	7	AMZ1	TSS200 - shore	0,248	0,322	-0,07
cg04957198	4,62992E-15	10	PRTFDC1	1º Éxon - Ilha	0,228	0,301	-0,07
cg19423543	8,85868E-14	5	NKX2-5	Corpo do gene - Ilha	0,154	0,227	-0,07
cg10373645	5,75264E-15	2	DUSP11	TSS1500 - Ilha	0,167	0,239	-0,07

Legenda: Probe ID - Identificação da sonda; adj.P.Val - p-valor ajustado; CHR - Cromossomo; $\Delta\beta$ - Delta Beta.

continua

Tabela 2 (cont.) - Relação dos sítios e genes hipometilados ($adjP < 10^{-5}$)

Probe ID	adj.P.Val	CHR	Gene	Relação ao gene_ilha CpG	β Casos	β Controles	$\Delta\beta$
cg23894553	5,6601E-10	22	ZNRF3	TSS1500 - Ilha	0,169	0,240	-0,07
cg17074213	3,20066E-11	1	TGFBR3	IGR - open sea	0,262	0,334	-0,07
cg11921473	2,85548E-15	2	POLR2D	TSS200 - Ilha	0,141	0,212	-0,07
cg07761912	7,49287E-11	1	TORIAIP2	IGR - Ilha	0,241	0,312	-0,07
cg23606385	1,21421E-15	7	AGFG2	5'UTR - Ilha	0,224	0,295	-0,07
cg18528640	7,95699E-11	1	MSTO1	5'UTR - Ilha	0,307	0,377	-0,07
cg08118344	1,39181E-11	1	RAP1GAP	TSS200 - Ilha	0,397	0,467	-0,07
cg04438595	1,69558E-11	1	SPEN	Corpo do gene - shelf	0,317	0,386	-0,07
cg05047319	1,27019E-12	11	TMEM135	5'UTR - Ilha	0,232	0,300	-0,07
cg14078059	1,60191E-09	12	TBC1D30	TSS1500 - shore	0,120	0,188	-0,07
cg15534212	2,16221E-09	5	CPEB4	Corpo do gene - Ilha	0,228	0,295	-0,07
cg14787155	4,71485E-11	3	DZIP3	1º Éxon - Ilha	0,267	0,334	-0,07
cg25826973	6,61646E-13	6	EHMT2	Corpo do gene - shore	0,114	0,180	-0,07
cg11932961	1,96867E-12	4	PHF17	1º Éxon - Ilha	0,186	0,252	-0,07
cg07737236	4,30557E-16	3	C3orf57	5'UTR - shore	0,242	0,307	-0,06
cg26250609	3,52091E-10	11	GSTP1	TSS200 - open sea	0,351	0,414	-0,06
cg02008544	1,17955E-12	8	TNFRSF10B	1º Éxon - Ilha	0,225	0,288	-0,06
cg02266452	3,43754E-09	11	ANKRD42	Corpo do gene - Ilha	0,290	0,352	-0,06
cg01469421	1,88955E-15	19	ZNF419	TSS1500 - shore	0,292	0,355	-0,06
cg24449302	5,1438E-12	15	MAP2K1	5'UTR - shore	0,312	0,375	-0,06
cg21786114	1,5994E-09	6	EHMT2	TSS200 - shore	0,309	0,371	-0,06
cg01073178	5,09326E-19	12	TESC	TSS1500 - Ilha	0,314	0,376	-0,06
cg03518179	9,86057E-11	1	MEF2D	1º Éxon - Ilha	0,129	0,191	-0,06
cg07089783	2,92887E-10	10	ZEB1	Corpo do gene - Ilha	0,315	0,376	-0,06
cg05258489	6,56118E-16	8	CHD7	1º Éxon - shore	0,262	0,323	-0,06
cg21685750	2,46979E-10	2	STRN	Corpo do gene-open sea	0,112	0,172	-0,06
cg22876894	2,50894E-11	20	LOC100289473	Corpo do gene - shore	0,278	0,338	-0,06
cg03519263	3,55784E-12	14	RNASE4	TSS1500 - Ilha	0,183	0,243	-0,06
cg17104026	4,46162E-09	20	STK4	Corpo do gene - shore	0,193	0,253	-0,06
cg14100214	3,16836E-11	7	ZNF273	5'UTR - Ilha	0,407	0,466	-0,06
cg25858983	4,66174E-12	17	UBTF	TSS200 - shore	0,265	0,323	-0,06
cg17958798	2,57842E-13	17	YBX2	IGR - shelf	0,213	0,271	-0,06
cg02228815	1,95902E-10	15	KLF13	5'UTR - Ilha	0,293	0,351	-0,06
cg07705810	1,28152E-10	5	MYO10	TSS1500 - Ilha	0,194	0,251	-0,06
cg12839172	1,82072E-13	4	PROM1	TSS200 - shore	0,276	0,332	-0,06
cg22352273	5,5752E-19	2	SCLY	TSS1500 - shore	0,318	0,374	-0,06
cg17139369	1,88849E-12	19	MARCH2	TSS200 - Ilha	0,110	0,165	-0,06
cg10708793	5,96064E-11	17	DHX58	TSS1500 - open sea	0,164	0,219	-0,05

Legenda: Probe ID - Identificação da sonda; adj.P.Val - p-valor ajustado; CHR - Cromossomo; $\Delta\beta$ - Delta Beta.

continua

Tabela 2 (cont.) - Relação dos sítios e genes hipometilados ($adjP < 10^{-5}$)

Probe ID	adj.P.Val	CHR	Gene	Relação ao gene_ilha CpG	β Casos	β Controles	$\Delta\beta$
cg01525244	1,00859E-17	22	CBX7	TSS1500 - Ilha	0,257	0,311	-0,05
cg22256027	1,97198E-10	4	MSX1	IGR - Ilha	0,278	0,332	-0,05
cg00513467	1,49201E-12	9	KLHL9	TSS1500 - Ilha	0,207	0,260	-0,05
cg15825264	9,66257E-10	17	ELP2P	TSS200 - Ilha	0,096	0,149	-0,05
cg12810548	1,23901E-09	4	SNORA26	Corpo do gene - shore	0,267	0,320	-0,05
cg25422943	2,7842E-09	13	PCDH9	1º Éxon - Ilha	0,168	0,221	-0,05
cg02204205	1,12512E-10	7	GRB10	1º Éxon - Ilha	0,233	0,284	-0,05
cg08161947	9,72917E-11	12	AEBP2	IGR - Ilha	0,265	0,315	-0,05
cg25152348	2,1221E-18	22	NCAPH2	TSS200 - Ilha	0,428	0,478	-0,05
cg02581963	3,61889E-10	10	C10orf75	1º Éxon - Ilha	0,106	0,156	-0,05
cg26979339	3,97847E-09	12	RIC8B	Corpo do gene - shore	0,363	0,412	-0,05
cg12753606	1,73231E-09	6	MYB	IGR - Ilha	0,145	0,193	-0,05
cg14409559	2,34865E-09	8	MSC	IGR - open sea	0,151	0,199	-0,05
cg16676413	7,15537E-12	7	STX1A	TSS200 - Ilha	0,151	0,199	-0,05
cg09844907	5,51541E-17	16	MPV17L	5'UTR - shore	0,386	0,434	-0,05
cg02490708	6,58945E-11	1	MIR5087	5'UTR - Ilha	0,111	0,158	-0,05
cg24109273	4,5565E-09	6	YIPF3	Corpo do gene - shelf	0,119	0,166	-0,05
cg02850329	4,29727E-09	1	RCAN3	IGR - shore	0,253	0,299	-0,05
cg20982606	6,04856E-18	12	UNG	IGR - Ilha	0,380	0,425	-0,05
cg22843446	3,06131E-12	11	ASAM	TSS200 - shelf	0,238	0,283	-0,04
cg19934366	1,23546E-09	17	C17orf68	1º Éxon - Ilha	0,164	0,208	-0,04
cg24769879	8,82276E-11	19	CCDC61	TSS1500 - Ilha	0,230	0,274	-0,04
cg11853667	1,75092E-10	3	VGLL4	Corpo do gene - Ilha	0,140	0,183	-0,04
cg08206623	3,37994E-12	11	CDKN1C	Corpo do gene - shore	0,418	0,461	-0,04
cg12855008	3,13585E-11	22	DGCR6	IGR - shore	0,120	0,160	-0,04
cg04937402	3,28728E-12	14	PPP1R3E	TSS1500 - shore	0,107	0,146	-0,04
cg14414971	1,79454E-09	7	SDK1	Corpo do gene - shore	0,120	0,159	-0,04
cg09700085	1,95232E-12	3	SLC6A20	TSS200 - Ilha	0,348	0,386	-0,04
cg23842796	4,14084E-09	1	C1orf61	TSS1500 - Ilha	0,120	0,158	-0,04
cg06808467	3,57753E-19	18	LOC339290	IGR - shelf	0,392	0,430	-0,04
cg23681311	1,07174E-10	22	MAPK1	TSS1500 - Ilha	0,087	0,125	-0,04
cg20544651	1,064E-11	15	SCG3	TSS200 - shore	0,253	0,290	-0,04
cg12026095	1,86823E-12	19	FTL	TSS200 - Ilha	0,404	0,441	-0,04
cg03468541	9,46574E-13	14	ZC3H14	TSS1500 - shore	0,388	0,424	-0,04
cg03864326	1,29885E-09	16	PSKH1	5'UTR - open sea	0,112	0,148	-0,04
cg17458653	2,2241E-11	2	MIR548N	1º Éxon - shore	0,153	0,189	-0,04
cg06082548	1,00601E-11	10	NKX6-2	TSS200 - Ilha	0,452	0,488	-0,04
cg18008019	9,28998E-11	13	ZIC2	Corpo do gene - shore	0,291	0,327	-0,04

Legenda: Probe ID - Identificação da sonda; adj.P.Val - p-valor ajustado; CHR - Cromossomo; $\Delta\beta$ - Delta Beta.

continua

Tabela 2 (conclusão) - Relação dos sítios e genes hipometilados ($adjP < 10^{-5}$)

Probe ID	adj.P.Val	CHR	Gene	Relação ao gene_ilha CpG	β Casos	β Controles	$\Delta\beta$
cg05920635	3,76707E-09	6	<i>HCRT2</i>	Corpo do gene - shore	0,207	0,241	-0,03
cg26618056	5,07028E-09	16	<i>LOC554206</i>	5'UTR - Ilha	0,279	0,311	-0,03
cg10246531	7,42059E-10	16	<i>CYBA</i>	5'UTR - Ilha	0,287	0,318	-0,03
cg25229015	4,38624E-09	15	<i>WDR61</i>	1º Éxon - Ilha	0,086	0,117	-0,03
cg15699874	4,83329E-09	11	<i>TIRAP</i>	TSS200 - Ilha	0,131	0,162	-0,03
cg03972606	2,01726E-10	2	<i>HJURP</i>	Corpo do gene - shore	0,838	0,869	-0,03
cg05484393	3,67842E-09	3	<i>RPL22L1</i>	5'UTR - Ilha	0,186	0,216	-0,03
cg21295467	5,53991E-09	11	<i>VWA5A</i>	IGR - Ilha	0,083	0,113	-0,03
cg05570707	2,01181E-12	2	<i>C2orf44</i>	5'UTR - Ilha	0,131	0,161	-0,03
cg17940190	1,04035E-11	20	<i>ADNP</i>	Corpo do gene - Ilha	0,180	0,208	-0,03
cg11706469	2,50629E-11	10	<i>FGF8</i>	Corpo do gene - Ilha	0,288	0,315	-0,03
cg22768502	2,9161E-09	6	<i>PRSS35</i>	TSS1500 - Ilha	0,125	0,152	-0,03
cg13003239	9,05145E-12	3	<i>WDR6</i>	Corpo do gene - shore	0,492	0,518	-0,03
cg01320048	3,66013E-09	10	<i>VWA2</i>	TSS200 - Ilha	0,424	0,449	-0,02
cg10679076	1,16493E-09	22	<i>CYTSA</i>	1º Éxon - Ilha	0,090	0,114	-0,02
cg11085408	1,54487E-09	3	<i>PRKCI</i>	TSS200 - Ilha	0,207	0,230	-0,02
cg23033759	4,38757E-09	14	<i>C14orf109</i>	5'UTR - open sea	0,077	0,101	-0,02
cg14047339	1,96346E-09	6	<i>RUNX2</i>	TSS200 - Ilha	0,459	0,483	-0,02
cg14165241	6,09526E-11	9	<i>SPTAN1</i>	5'UTR - open sea	0,089	0,112	-0,02
cg07630649	3,29558E-09	16	<i>GABARAPL2</i>	TSS200 - shore	0,088	0,110	-0,02
cg22793136	4,38288E-09	12	<i>PLXNC1</i>	1º Éxon - Ilha	0,252	0,273	-0,02
cg21313137	3,107E-09	20	<i>SNX21</i>	TSS200 - open sea	0,156	0,176	-0,02
cg13898548	3,95694E-10	5	<i>PDLIM7</i>	TSS200 - Ilha	0,102	0,122	-0,02
cg15901997	1,00617E-09	18	<i>MEX3C</i>	TSS200 - Ilha	0,057	0,078	-0,02
cg27066239	2,44569E-09	7	<i>FAM40B</i>	1º Éxon - Ilha	0,090	0,110	-0,02
cg14911132	4,45249E-09	11	<i>FADS2</i>	5'UTR - Ilha	0,185	0,205	-0,02
cg26797661	2,97315E-10	1	<i>LYSMD1</i>	Corpo do gene - Ilha	0,125	0,143	-0,02
cg05134026	1,28607E-09	14	<i>TTC5</i>	TSS200 - Ilha	0,137	0,154	-0,02

Legenda: Probe ID - Identificação da sonda; adj.P.Val - p-valor ajustado; CHR - Cromossomo; $\Delta\beta$ - Delta Beta.

ANEXO D.

Figura 1- Processos biológicos e moleculares (GO-*Gene ontology*) hiper-representados anotando os genes funcionalmente usando o *WebGestalt* (Wang et al., 2013).

Tabela 1 - Genes hiper-representados na rede de interação de proteínas usando o *WebGestalt* (Wang et al., 2013)

Database: PPI (Protein Interaction Network Module Analysis)		
C=173; O=10; E=2.19; R=4.56; rawP=7.24e-05; adjP=0.0014		
	Gene	Nome do gene
1	MSX1	<i>msh homeobox 1</i>
2	RUNX2	<i>runt-related transcription factor 2</i>
3	AEBP2	<i>AE binding protein 2</i>
4	EHMT2	<i>euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 2</i>
5	EHMT1	<i>euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 1</i>
6	KLF13	<i>Kruppel-like factor 13</i>
7	ZEB1	<i>zinc finger E-box binding homeobox 1</i>
8	OVOL1	<i>ovo-like 1(Drosophila)</i>
9	CTBP1	<i>C-terminal binding protein 1</i>
10	TAL1	<i>T-cell acute lymphocytic leukemia 1</i>

Legenda: Database: PPI (Protein Interaction Network Module Analysis) - Base de dados Módulo de análise de interação de proteínas em rede; C - número de genes de referência na categoria; O - número de genes no conjunto de genes e na categoria; E - número esperado na categoria; R: relação de enriquecimento; rawP - p-valor de teste hipergeométrico; adjP: p-valor ajustado pelo ajuste de múltiplo teste.

Tabela 2 - Genes hiper-representados na análise de associação a droga glutathiona usando o *WebGestalt* (Wang et al., 2013)

Database: drug Nome: glutathiona		
C=341; O=10; E=1.91; R=5.23; rawP=2.61e-05; adjP=0.0001		
	Gene	Nome do gene
1	CYBA	<i>cytochrome b-245, alpha polypeptide</i>
2	STX1A	<i>syntaxin 1A (brain)</i>
3	KLF13	<i>Kruppel-like factor 13</i>
4	MAPK1	<i>mitogen-activated protein kinase 1</i>
5	GSTP1	<i>glutathione S-transferase pi 1</i>
6	CTBP1	<i>C-terminal binding protein 1</i>
7	HDAC5	<i>histone deacetylase 5</i>
8	NCOA2	<i>nuclear receptor coactivator 2</i>
9	ABCC1	<i>ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 1</i>
10	MAPK3	<i>mitogen-activated protein kinase 3</i>

Legenda: Database: drug (Drug association analysis) - Base de dados Análise de associação a droga; C - número de genes de referência na categoria; O - número de genes no conjunto de genes e na categoria; E - número esperado na categoria; R: relação de enriquecimento; rawP - p-valor de teste hipergeométrico; adjP: p-valor ajustado pelo ajuste de múltiplo teste.

Tabela 3 - Genes hiper-representados na análise de associação a droga adenosina usando o *WebGestalt* (Wang et al., 2013)

Database: drug Nome: adenosina		
C=477; O=9; E=2.68; R=3.36; rawP=0.0016; adjP=0.0032		
Gene	Nome do gene	
1	<i>KIF5B</i>	<i>kinesin family member 5B</i>
2	<i>PRKAG2</i>	<i>protein kinase, AMP-activated, gamma 2 non-catalytic subunit</i>
3	<i>POLR2D</i>	<i>polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide D</i>
4	<i>OLA1</i>	<i>Obg-like ATPase 1</i>
5	<i>ATP11A</i>	<i>ATPase, class VI, type 11A</i>
6	<i>NCAPH2</i>	<i>non-SMC condensin II complex, subunit H2</i>
7	<i>NPLOC4</i>	<i>nuclear protein localization 4 homolog (S. cerevisiae)</i>
8	<i>EEF2K</i>	<i>eukaryotic elongation factor-2 kinase</i>
9	<i>ABCC1</i>	<i>ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 1</i>

Legenda: Database: drug (Drug association analysis) - Base de dados Análise de associação a droga; C - número de genes de referência na categoria; O - número de genes no conjunto de genes e na categoria; E - número esperado na categoria; R: relação de enriquecimento; rawP - p-valor de teste hipergeométrico; adjP: p-valor ajustado pelo ajuste de múltiplo teste.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agrawal A, Lynskey MT. Are there genetic influences on addiction: evidence from family, adoption and twin studies. *Addiction*. 2008;103(7):1069-81.

Ahrens S, Markett S, Breckel TP, Behler O, Reuter M, Thiel CM. Modulation of nicotine effects on selective attention by DRD2 and CHRNA4 gene polymorphisms. *Psychopharmacology (Berl)*. 2015. pii: S0278-5846(15)00122-0.

Anier K, Malinovskaja K, Aonurm-Helm A, Zharkovsky A, Kalda A. DNA methylation regulates cocaine-induced behavioral sensitization in mice. *Neuropsychopharmacology*. 2010;35(12):2450-61.

Anier K, Zharkovsky A, Kalda A. S-adenosylmethionine modifies cocaine-induced DNA methylation and increases locomotor sensitization in mice. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2013;16(9):2053-66.

Balan S, Iwayama Y, Maekawa M, Toyota T, Ohnishi T, Toyoshima M, Shimamoto C, Esaki K, Yamada K, Iwata Y, Suzuki K, Ide M, Ota M, Fukuchi S, Tsujii M, Mori N, Shinkai Y, Yoshikawa T. Exon resequencing of H3K9 methyltransferase complex genes, EHMT1, EHTM2 and WIZ, in Japanese autism subjects. *Mol Autism*. 2014;5(1):49.

Bastos FI, Bertoni N. *Pesquisa Nacional sobre o uso de crack: quem são os usuários de crack e/ou similares do Brasil? Quantos são nas capitais brasileiras?*. Rio de Janeiro: Editora ICICT/FIOCRUZ. 2014. 228 p.

Bertran-Gonzalez J, Bosch C, Maroteaux M, Matamales M, Hervé D, Valjent E, Girault JA. Opposing patterns of signaling activation in dopamine D1 and D2 receptor-expressing striatal neurons in response to cocaine and haloperidol. *J Neurosci*. 2008;28(22):5671-85.

Bibikova M, Barnes B, Tsan C, Ho V, Klotzle B, Le JM, Delano D, Zhang L, Schroth GP, Gunderson KL, Fan JB, Shen R. High Density DNA Methylation Array with Single CpG Site Resolution. *Genomics*. 2011;98(4):288-95.

Bibikova M, Lin Z, Zhou L, Chudin E, Garcia EW, Wu B, Doucet D, Thomas NJ, Wang Y, Vollmer E, Goldmann T, Seifart C, Jiang W, Barker DL, Chee MS, Floros J, Fan JB. High-throughput DNA methylation profiling using universal bead arrays. *Genome Res*. 2006;16(3):383-93.

Bierut LJ, Dinwiddie SH, Begleiter H, Crowe RR, Hesselbrock V, Nurnberger JI Jr, Porjesz B, Schuckit MA, Reich T. Familial transmission of substance dependence: alcohol, marijuana, cocaine, and habitual smoking: a report from the Collaborative Study on the Genetics of Alcoholism. *Arch Gen Psychiatry*. 1998;55(11):982-8.

Bloch PJ, Nall AH, Weller AE, Ferraro TN, Berrettini WH, Kampman KM, Pettinati HM, Dackis CA, O'Brien CP, Oslin DW, Lohoff FW. Association analysis between polymorphisms in the dopamine D3 receptor (DRD3) gene and cocaine dependence. *Psychiatr Genet*. 2009;19(5):275-6.

Bock C. Analysing and interpreting DNA methylation data. *Nat Rev Genet*. 2012;13(10):705-19.

Brami-Cherrier K, Roze E, Girault JA, Betuing S, Caboche J. Role of the ERK/MSK1 signalling pathway in chromatin remodelling and brain responses to drugs of abuse. *J Neurochem*. 2009;108(6):1323-35.

Butcher LM, Beck S. Probe Lasso: a novel method to rope in differentially methylated regions with 450K DNA methylation data. *Methods*. 2015;72:21-8.

Carlini EA, Galduróz JC, Noto AR, Carlini CM, Oliveira LG, Nappo SA, Moura YG, Sanchez ZVDM. *II levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país - 2005*. São Paulo: Centro Brasileiro sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID), Escola Paulista de Medicina. 2007.

Carlini EA, Galduróz JC, Noto AR, Nappo SA. *I Levantamento Domiciliar sobre o Uso de Drogas Psicotrópicas no Brasil: Estudo Envolvendo as 107 Maiores Cidades do País – 2001*. São Paulo: Centro Brasileiro sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID), Escola Paulista de Medicina. 2001a.

Carlini EA, Nappo SA, Galduróz JCF, Noto AR. Drogas Psicotrópicas: o que são e como agem. *Revista IMESC*. 2001b;(3):9-35.

Carlini EA, Noto AR, Sanchez ZVDM, Carlini CM, Locatelli DP, Abeid LR, Amato TC, Opaleye ES, Tondowski CS, Moura YC. *VI Levantamento Nacional sobre o Consumo de Drogas Psicotrópicas entre Estudantes do Ensino Fundamental e Médio das Redes Pública e Privada de Ensino nas 27 Capitais Brasileiras - 2010*. São Paulo: Centro Brasileiro sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID), Escola Paulista de Medicina. 2010.

Chasin AAM, Silva ES, Carvalho VM. Estimulantes do Sistema Nervoso Central. In: Oga S, Camargo MMA, Batistuzzo JA. *Fundamentos de Toxicologia*. 3a ed. São Paulo: Atheneu; 2008:353-74.

Chen AC, LaForge KS, Ho A, McHugh PF, Kellogg S, Bell K, Schluger RP, Leal SM, Kreek MJ. Potentially functional polymorphism in the promoter region of prodynorphin gene may be associated with protection against cocaine dependence or abuse. *Am J Med Genet*. 2002;114(4):429-35.

Cheung I, Shulha HP, Jiang Y, Matevossian A, Wang J, Weng Z, Akbarian S. Developmental regulation and individual differences of neuronal H3K4me3 epigenomes in the prefrontal cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(19):8824-9.

Chung D, Gao F, Jegga AG, Das SK. Estrogen mediated epithelial proliferation in the uterus is directed by stromal Fgf10 and Bmp8a. *Mol Cell Endocrinol*. 2015;400:48-60.

Colizzi M, Iyegbe C, Powell J, Ursini G, Porcelli A, Bonvino A, Taurisano P, Romano R, Masellis R, Blasi G, Morgan C, Aitchison K, Mondelli V, Luzzi

S, Kolliakou A, David A, Murray RM, Bertolino A, Forti MD. Interaction Between Functional Genetic Variation of DRD2 and Cannabis Use on Risk of Psychosis. *Schizophr Bull.* 2015. pii: sbv032.

Covington HE 3rd, Maze I, Sun H, Bomze HM, DeMaio KD, Wu EY, Dietz DM, Lobo MK, Ghose S, Mouzon E, Neve RL, Tamminga CA, Nestler E. A role for repressive histone methylation in cocaine-induced vulnerability to stress. *Neuron.* 2011;71(4):656-70.

Cunha NS. *Estudo de genes de susceptibilidade à dependência de cocaína: o papel da MAO-A, COMT e 5-HTT.* Dissertação de mestrado. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2006.

Dahl JP, Weller AE, Kampman KM, Oslin DW, Lohoff FW, Ferraro TN, O'Brien CP, Berrettini WH. Confirmation of the association between a polymorphism in the promoter region of the prodynorphin gene and cocaine dependence. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2005;139B(1):106-8.

Davies MN, Volta M, Pidsley R, Lunnon K, Dixit A, Lovestone S, Coarfa C, Harris RA, Milosavljevic A, Troakes C, Al-Sarraj S, Dobson R, Schalkwyk LC, Mill J. Functional annotation of the human brain methylome identifies tissue-specific epigenetic variation across brain and blood. *Genome Biol.* 2012;13(6):R43.

Dedeurwaerder S, Defrance M, Bizet M, Calonne E, Bontempi G, Fuks F. A comprehensive overview of Infinium HumanMethylation450 data processing. *Brief Bioinform.* 2014;15(6):929-41.

Delis F, Rombola C, Bellezza R, Rosko L, Grandy DK, Volkow ND, Thanos PK. Regulation of ethanol intake under chronic mild stress: roles of dopamine receptors and transporters. *Front Behav Neurosci.* 2015;9:118.

Dias A, Vieira D, Gomes L, Araújo M, Laranjeira R. Longitudinal Outcomes Among a Cohort of Crack Users After 12 Years from Treatment Discharge. *Journal of Addictive Diseases.* 2011;30(3):271-280.

DiNieri JA, Wang X, Szutorisz H, Spano SM, Kaur J, Casaccia P, Dow-Edwards D, Hurd YL. Maternal cannabis use alters ventral striatal dopamine D2 gene regulation in the offspring. *Biol Psychiatry*. 2011;70(8):763-9.

Doi A, Park IH, Wen B, Murakami P, Aryee MJ, Irizarry R, Herb B, Ladd-Acosta C, Rho J, Loewer S, Miller J, Schlaeger T, Daley GQ, Feinberg AP. Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. *Nat Genet*. 2009;41(12):1350-3.

Du P, Zhang X, Huang CC, Jafari N, Kibbe WA, Hou L, Lin SM. Comparison of Beta-value and M-value methods for quantifying methylation levels by microarray analysis. *BMC Bioinformatics*. 2010;11:587.

Duaux E, Krebs MO, Loo H, Poirier MF. Genetic vulnerability to drug abuse. *Eur Psychiatry*. 2000;15(2):109-14.

Duncan LE, Keller MC. A critical review of the first 10 years of candidate gene-by-environment interaction research in psychiatry. *Am. J. Psychiatry*, 2011;168:1041-49.

Dunn J, Laranjeira RR, Silveira DX, Formigoni MLOS, Ferri CP. Crack cocaine: an increase in use among patients attending clinics in São Paulo: 1990-1993. *Subst Use Misuse*. 1996;31(4):519-27.

Dunn J, Laranjeira RR. Transitions in the route of cocaine administration - characteristics, direction and associated variables. *Addiction*. 1999;94(6):813-24.

Dyson MT, Roqueiro D, Monsivais D, Ercan CM, Pavone ME, Brooks DC, Kakinuma T, Ono M, Jafari N, Dai Y, Bulun SE. Genome-wide DNA methylation analysis predicts an epigenetic switch for GATA factor expression in endometriosis. *PLoS Genet*. 2014;10(3):e1004158.

Dzierba CD, Bi Y, Dasgupta B, Hartz RA, Ahuja V, Cianchetta G, Kumi G, Dong L, Aleem S, Fink C, Garcia Y, Green M, Han J, Kwon S, Qiao Y, Wang J, Zhang

Y, Liu Y, Zipp G, Liang Z, Burford N, Ferrante M, Bertekap R, Lewis M, Cacace A, Grace J, Wilson A, Nouraldeen A, Westphal R, Kimball D, Carson K, Bronson JJ, Macor JE. Design, synthesis, and evaluation of phenylglycinols and phenyl amines as agonists of GPR88. *Bioorg Med Chem Lett*. 2015;25(7):1448-52.

Ellenhorn MJ. *Ellenhorn's medical toxicology: diagnosis and treatment of human poisoning*. 2 ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1997.

Escohotado A. *A historia de las drogas*. v. 3. Madrid: Alianza Editorial, 1998.

Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet*. 2007;8(4):286-98.

Feng J, Nestler EJ. Epigenetic mechanisms of drug addiction. *Curr Opin Neurobiol*. 2013;23(4):521-8.

Feng J, Shao N, Szulwach KE, Vialou V, Huynh J, Zhong C, Le T, Ferguson D, Cahill ME, Li Y, Koo JW, Ribeiro E, Labonte B, Laitman BM, Estey D, Stockman V, Kennedy P, Couroussé T, Mensah I, Turecki G, Faull KF, Ming GL, Song H, Fan G, Casaccia P, Shen L, Jin P, Nestler EJ. Role of Tet1 and 5-hydroxymethylcytosine in cocaine action. *Nat Neurosci*. 2015;18(4):536-44.

Ferguson SM, Fasano S, Yang P, Brambilla R, Robinson TE. Knockout of ERK1 enhances cocaine-evoked immediate early gene expression and behavioral plasticity. *Neuropsychopharmacology*. 2006;31(12):2660-8.

Fernández-Castillo N, Ribasés M, Roncero C, Casas M, Gonzalvo B, Cormand B. Association study between the DAT1, DBH and DRD2 genes and cocaine dependence in a Spanish sample. *Psychiatr Genet*. 2010;20(6):317-20.

Ferri CP, Gossop M. Route of cocaine administration: patterns of use and problems among a Brazilian sample. *Addict Behav*. 1999;24:815–821.

Ferri CP, Laranjeira RR, da Silveira DA, Dunn J, Formigoni ML. Increase in the search for treatment by crack users in 2 outpatient clinics at the city of Sao Paulo from 1990 to 1993. *Rev Assoc Med Bras.* 1997;43:25–28.

Fortin JP. Illumina 450k: A microarray for the study of DNA methylation. 2013. Disponível em: <http://www.biostat.jhsph.edu/~lcollado/misc/genomics/GWG_JPF> Acesso em 23 jan. 2015

Fragou D, Zanos P, Kouidou S, Njau S, Kitchen I, Bailey A, Kovatsi L. Effect of chronic heroin and cocaine administration on global DNA methylation in brain and liver. *Toxicol Lett.* 2013;218(3):260-5.

Galduróz JC, Noto AR, Carlini EA. *IV Levantamento sobre o uso de drogas entre estudantes de 1º e 2º graus em 10 capitais brasileiras - 1997.* São Paulo: Centro Brasileiro sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID), Escola Paulista de Medicina. 1997.

Galduróz JC, Noto AR, Fonseca AM, Carlini EA. *V levantamento nacional sobre o consumo de drogas psicotrópicas entre estudantes do ensino fundamental e médio da rede pública de ensino nas 27 capitais brasileiras - 2004.* São Paulo: Centro Brasileiro sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID), Escola Paulista de Medicina. 2004.

Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol.* 1987;196(2):261-82.

Gelernter J, Kranzler HR. Genetics of drug dependence. *Dialogues Clin Neurosci.* 2010;12(1):77–84.

Gelernter J, Panhuysen C, Weiss R, Brady K, Hesselbrock V, Rounsaville B, Poling J, Wilcox M, Farrer L, Kranzler HR. Genomewide linkage scan for cocaine dependence and related traits: significant linkages for a cocaine-related trait and cocaine-induced paranoia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2005;136B(1):45-52.

Gelernter J, Kranzler H, Satel SL. No association between D2 dopamine receptor (DRD2) alleles or haplotypes and cocaine dependence or severity of cocaine

dependence in European- and African-Americans. *Biol Psychiatry*. 1999;45(3):340-5.

Giannini AL, Gao Y, Bijlmakers MJ. T-cell regulator RNF125/TRAC-1 belongs to a novel family of ubiquitin ligases with zinc fingers and a ubiquitin-binding domain. *Biochem J*. 2008;410(1):101-11.

Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E. Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell*. 2007;128(4):635-8.

Guindalini C, Collier D, Laranjeira R, Barrett TB, Kelsoe J, Castelo A, Vallada H, Breen G. Association analysis of GRK3 gene promoter variants in cocaine abuse. *Psychiatr Genet*. 2007;17(4):239-42.

Guindalini C, Howard M, Haddley K, Laranjeira R, Collier D, Ammar N, Craig I, O'Gara C, Bubbs VJ, Greenwood T, Kelsoe J, Asherson P, Murray RM, Castelo A, Quinn JP, Vallada H, Breen G. A dopamine transporter gene functional variant associated with cocaine abuse in a Brazilian sample. *Proc Natl Acad Sci*. 2006(b);103(12):4552-7.

Guindalini C, Laranjeira R, Collier D, Messas G, Vallada H, Breen G. Dopamine-beta hydroxylase polymorphism and cocaine addiction. *Behav Brain Funct*. 2008;4:1.

Guindalini C, O'Gara C, Laranjeira R, Collier D, Castelo A, Vallada H, Breen G. A GSTP1 functional variant associated with cocaine dependence in a Brazilian population. *Pharmacogenet Genomics*. 2005;15(12):891-3.

Guindalini C, Vallada H, Breen G, Laranjeira R. Concurrent crack and powder cocaine users from Sao Paulo: do they represent a different group? *BMC Public Health*. 2006(a);6:10

Gynther LM, Carey G, Gottesman II, Vogler GP. A twin study of non-alcohol substance abuse. *Psychiatry Res*. 1995;56(3):213-20.

Heard K, Palmer R, Zahniser NR. Mechanisms of acute cocaine toxicity. *Open Pharmacol J.* 2008;2(9):70-78.

Hillemacher T, Frieling H, Buchholz V, Hussein R, Bleich S, Meyer C, John U, Bischof A, Rumpf HJ. Alterations in DNA-Methylation of the Dopamine-Receptor 2 gene are associated with abstinence and health care utilization in individuals with a lifetime history of pathologic gambling. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2015

Horvath S, Zhang Y, Langfelder P, Kahn RS, Boks MP, van Eijk K, van den Berg LH, Ophoff RA. Aging effects on DNA methylation modules in human brain and blood tissue. *Genome Biol.* 2012;13(10):R97.

Houseman EA, Accomando WP, Koestler DC, Christensen BC, Marsit CJ, Nelson HH, Wiencke JK, Kelsey KT. DNA methylation arrays as surrogate measures of cell mixture distribution. *BMC Bioinformatics.* 2012;13:86.

Irizarry RA, Ladd-Acosta C, Wen B, Wu Z, Montano C, Onyango P, Cui H, Gabo K, Rongione M, Webster M, Ji H, Potash JB, Sabunciyan S, Feinberg AP. The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nat Genet.* 2009;41(2):178-86.

Jaffe AE, Irizarry RA. Accounting for cellular heterogeneity is critical in epigenome-wide association studies. *Genome Biol.* 2014;15(2):R31.

Johnson WE, Li C, Rabinovic A. Adjusting batch effects in microarray expression data using empirical Bayes methods. *Biostatistics.* 2007;8(1):118-27.

Jones RT. Pharmacokinetics of cocaine: considerations when assessing cocaine use by urinalyses. *NIDA Res Monogr.* 1997;175:221-34.

Karch SB. *A brief history of cocaine: from inca monarchs to Cali cartels: 500 years of cocaine dealing.* Boca Raton: Taylor & Francis; 2006.

Karolchik D, Barber GP, Casper J, Clawson H, Cline MS, Diekhans M, Dreszer TR, Fujita PA, Guruvadoo L, Haeussler M, Harte RA, Heitner S, Hinrichs AS, Learned K, Lee BT, Li CH, Raney BJ, Rhead B, Rosenbloom KR, Sloan CA, Speir ML, Zweig AS, Haussler D, Kuhn RM, Kent WJ. The UCSC Genome Browser database: 2014 update. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(Database issue):D764-70.

Kendler KS, Karkowski LM, Neale MC, Prescott CA. Illicit psychoactive substance use, heavy use, abuse, and dependence in a US population-based sample of male twins. *Arch Gen Psychiatry.* 2000;57(3):261-9.

Koob GF, LeMoal M. Psychostimulants. In: Koob GF, LeMoal M. *Neurobiology of Addiction*. London: Academic Press; 2006. p.69-120.

Kreek MJ, Bart G, Lilly C, LaForge KS, Nielsen DA. Pharmacogenetics and human molecular genetics of opiate and cocaine addictions and their treatments. *Pharmacol Rev.* 2005;57(1):1-26.

Lane S, Green C, Steinberg J, Ma L, Schmitz J, Rathnayaka N, Bandak S, Ferre S, Moeller F. Cardiovascular and Subjective Effects of the Novel Adenosine A(2A) Receptor Antagonist SYN115 in Cocaine Dependent Individuals. *J Addict Res Ther.* 2012;S1. pii: 009.

Langbehn DR, Cadoret RJ, Caspers K, Troughton EP, Yucuis R. Genetic and environmental risk factors for the onset of drug use and problems in adoptees. *Drug Alcohol Depend.* 2003;69(2):151-67.

LaPlant Q, Nestler EJ. CRACKing the histone code: cocaine's effects on chromatin structure and function. *Horm Behav.* 2011;59(3):321-30.

Laranjeira R, Madruga CS, Pinsky I, Caetano R, Mitsuhiro SS, Castello G. *II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas (II LENAD)* - 2012. São Paulo: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Políticas Públicas do Álcool e Outras Drogas (INPAD), Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). 2014.

Laranjeira R, Pinsky I, Zaleski M, Caetano R. *I Levantamento Nacional sobre os padrões de consumo de álcool na população brasileira (I LENAD)* – 2006. São Paulo: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Políticas Públicas do Álcool e Outras Drogas (INPAD), Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). 2007.

Lawhorn C, Edusei E, Zhou Y, Ho A, Kreek MJ. Acute binge pattern cocaine administration induces region-specific effects in D1-r- and D2-r-expressing cells in eGFP transgenic mice. *Neuroscience*. 2013;253:123-31.

Lee KW, Kim Y, Kim AM, Helmin K, Nairn AC, Greengard P. Cocaine-induced dendritic spine formation in D1 and D2 dopamine receptor-containing medium spiny neurons in nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(9):3399-404.

Lehrmann E, Oyler J, Vawter MP, Hyde TM, Kolachana B, Kleinman JE, Huestis MA, Becker KG, Freed WJ. Transcriptional profiling in the human prefrontal cortex: evidence for two activational states associated with cocaine abuse. *Pharmacogenomics J*. 2003;3(1):27-40.

Lencz T, Malhotra AK. Targeting the schizophrenia genome: a fast track strategy from GWAS to clinic. *Mol Psychiatry*. 2015.

Leonard L, DeRubeis E, Pelude L, Medd E, Birkett N, J Seto . "I inject less as I have easier access to pipes": injecting, and sharing of crack-smoking materials, decline as safer crack-smoking resources are distributed. *Int J Drug Policy*., 2008;19(3):255-64.

Levrán O, Randesi M, da Rosa JC, Ott J, Rotrosen J, Adelson M, Kreek MJ. Overlapping dopaminergic pathway genetic susceptibility to heroin and cocaine addictions in african americans. *Ann Hum Genet*. 2015;79(3):188-98.

Lizasoain I, Moro MA, Lorenzo P. Cocaína: aspectos farmacológicos. *Adicciones*. 2002;14(1):57-64.

Lohoff FW, Bloch PJ, Hodge R, Nall AH, Ferraro TN, Kampman KM, Dackis CA, O'Brien CP, Pettinati HM, Oslin DW. Association analysis between

polymorphisms in the dopamine D2 receptor (DRD2) and dopamine transporter (DAT1) genes with cocaine dependence. *Neurosci Lett*. 2010;473(2):87-91.

Lohoff FW, Weller AE, Bloch PJ, Nall AH, Ferraro TN, Kampman KM, Pettinati HM, Oslin DW, Dackis CA, O'Brien CP, Berrettini WH. Association between the catechol-O-methyltransferase Val158Met polymorphism and cocaine dependence. *Neuropsychopharmacology*. 2008;33(13):3078-84.

Lopes LV, Sebastião AM, Ribeiro JA. Adenosine and related drugs in brain diseases: present and future in clinical trials. *Curr Top Med Chem*. 2011;11(8):1087-101.

Ma Y, Yuan W, Jiang X, Cui WY, Li MD. Updated findings of the association and functional studies of DRD2/ANKK1 variants with addictions. *Mol Neurobiol*. 2015 Feb;51(1):281-99.

Madrigano J, Baccarelli A, Mittleman MA, Sparrow D, Vokonas PS, Tarantini L, Schwartz J. Aging and epigenetics: longitudinal changes in gene-specific DNA methylation. *Epigenetics*. 2012;7(1):63-70.

Marques ACPR, Ribeiro M, Laranjeira R, Andrada NC. Abuso e Dependência: Crack. *Rev. Assoc. Med. Bras*. 2012;58(2):141-53.

Mata RC. *Inventario de la coca*. Lima: Academia Nacional de Historia; 2003.

Maunakea AK, Nagarajan RP, Bilenky M, Ballinger TJ, D'Souza C, Fouse SD, Johnson BE, Hong C, Nielsen C, Zhao Y, Turecki G, Delaney A, Varhol R, Thiessen N, Shchors K, Heine VM, Rowitch DH, Xing X, Fiore C, Schillebeeckx M, Jones SJ, Haussler D, Marra MA, Hirst M, Wang T, Costello JF. Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters. *Nature*. 2010;466(7303):253-7.

Maze I, Chaudhury D, Dietz DM, Von Schimmelmann M, Kennedy PJ, Lobo MK, Sullivan SE, Miller ML, Bagot RC, Sun H, Turecki G, Neve RL, Hurd YL, Shen L, Han MH, Schaefer A, Nestler EJ. G9a influences neuronal subtype specification in striatum. *Nat Neurosci*. 2014;17(4):533-9.

Maze I, Covington HE 3rd, Dietz DM, LaPlant Q, Renthall W, Russo SJ, Mechanic M, Mouzon E, Neve RL, Haggarty SJ, Ren Y, Sampath SC, Hurd YL, Greengard P, Tarakhovsky A, Schaefer A, Nestler EJ. Essential role of the histone methyltransferase G9a in cocaine-induced plasticity. *Science*. 2010;327(5962):213-6.

McLean CY, Bristor D, Hiller M, Clarke SL, Schaar BT, Lowe CB, Wenger AM, Bejerano G. GREAT improves functional interpretation of cis-regulatory regions. *Nat Biotechnol*. 2010;28(5):495-501.

McQuown SC, Wood MA. Epigenetic Regulation in Substance Use Disorders. *Curr Psychiatry Rep*. 2010;12(2):145–153.

Mejia D, Posada CE. *Cocaine Production and Trafficking: What Do We Know?*. Colombia: World Bank Policy Research Working Paper Series; 2008.

Menon S, Buteri J, Roy B, Murrell M, Quinlan S, Macmillan JC, Lea RA, Haupt LM, Griffiths LR. Association study of calcitonin gene-related polypeptide-alpha (CALCA) gene polymorphism with migraine. *Brain Res*. 2011;1378:119-24.

Merikangas KR, Stolar M, Stevens DE, Goulet J, Preisig MA, Fenton B, Zhang H, O'Malley SS, Rounsaville BJ. Familial transmission of substance use disorders. *Arch Gen Psychiatry*. 1998;55(11):973-9.

Messas G, Meira-Lima I, Turchi M, Franco O, Guindalini C, Castelo A, Laranjeira R, Vallada H. Association study of dopamine D2 and D3 receptor gene polymorphisms with cocaine dependence. *Psychiatr Genet*. 2005;15(3):171-4.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.*, 1988;16(3):1215.

MINISTÉRIO DA SAÚDE - Secretaria de Atenção à Saúde: Departamento de Ações Programáticas Estratégicas - Área Técnica de Saúde Mental, Álcool e outras Drogas. *Abordagens Terapêuticas a Usuários de Cocaína/Crack no Sistema Único de Saúde*. 2010.

Morris TJ, Beck S. Analysis pipelines and packages for Infinium HumanMethylation 450 BeadChip (450k) data. *Methods*. 2015;72:3-8.

Morris TJ, Butcher LM, Feber A, Teschendorff AE, Chakravarthy AR, Wojdacz TK, Beck S. ChAMP: 450k Chip Analysis Methylation Pipeline. *Bioinform*. 2014;30(3):428-30.

Nappo SA, Galduróz JC, Noto AR. Uso do “crack” em São Paulo: fenômeno emergente?. *Rev ABP-APAL* 1994;16 (2):75-83.

Negrão AB, Pereira AC, Guindalini C, Santos HC, Messas GP, Laranjeira R, Vallada H. Butyrylcholinesterase genetic variants: association with cocaine dependence and related phenotypes. *PLoS One*. 2013;8(11):e80505.

Negrete JC. Cocaine problems in the coca-growing countries of South America. *Ciba Found Symp*. 1992;166:40-56.

Nelson EC, Heath AC, Lynskey MT, Agrawal A, Henders AK, Bowdler LM, Todorov AA, Madden PA, Moore E, Degenhardt L, Martin NG, Montgomery GW. PTSD risk associated with a functional DRD2 polymorphism in heroin-dependent cases and controls is limited toamphetamine-dependent individuals. *Addict Biol*. 2014;19(4):700-7.

Nestler EJ. Epigenetic mechanisms of drug addiction. *Neuropharmacology*. 2014;76 Pt B:259-68.

Nielsen DA, Utrankar A, Reyes JA, Simons DD, Kosten TR. Epigenetics of drug abuse: predisposition or response. *Pharmacogenomics*. 2012;13(10):1149-60.

Noble EP, Blum K, Khalsa ME, Ritchie T, Montgomery A, Wood RC, Fitch RJ, Ozkaragoz T, Sheridan PJ, Anglin MD, Paredes A, Treiman LJ, Sparkes RS. Allelic association of the D2 dopamine receptor gene with cocaine dependence. *Drug Alcohol Depend*. 1993;33(3):271-85.

Nordlund J, Bäcklin CL, Zachariadis V, Cavelier L, Dahlberg J, Öfverholm I, Barbany G, Nordgren A, Övernäs E, Abrahamsson J, Flaegstad T, Heyman MM, Jónsson ÓG, Kanerva J, Larsson R, Palle J, Schmiegelow K, Gustafsson MG, Lönnerholm G, Forestier E, Syvänen AC. DNA methylation-based subtype prediction for pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Clin Epigenetics*. 2015;7(1):11

Noto AR, Galduróz JC, Nappo SA, Carlini EA. *Levantamento nacional sobre o uso de drogas entre crianças e adolescentes em situação de rua nas 27 capitais brasileiras - 2003*. São Paulo: Centro Brasileiro sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID), Escola Paulista de Medicina. 2003.

Noto AR, Nappo S, Galduróz JCF, Mattei R, Carlini EA. *IV Levantamento sobre o uso de drogas entre crianças e adolescentes em situação de rua de seis capitais brasileiras - 1997*. São Paulo: Centro Brasileiro sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID), Escola Paulista de Medicina. 1997.

Nurnberger JI Jr, Koller DL, Jung J, Edenberg HJ, Foroud T, Guella I, Vawter MP, Kelsoe JR; Psychiatric Genomics Consortium Bipolar Group. Identification of pathways for bipolar disorder: a meta-analysis. *JAMA Psychiatry*. 2014;71(6):657-64.

O'Brien CP. Drogagem e Uso Abusivo de Drogas. In: Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*: Goodman & Gilman. 11a ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil; 2006. p.543–62.

Oliveira LG, Nappo SA. Crack na cidade de São Paulo: acessibilidade, estratégias de mercado e formas de uso. *Rev psiquiatr clín*. 2008;35(6): 212-18.

Oliveira LG, Alberghini DG, Santos Bd, Andrade AG. Polydrug use among college students in Brazil: a nationwide survey. *Rev Bras Psiquiatr*. 2013;35(3):221-30.

Oliveira NFP, Planello ACP, Andia DC, Pardo APS. Metilação de DNA e Câncer. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 2010;56(4):493-499.

Patkar AA, Berrettini WH, Hoehe M, Hill KP, Sterling RC, Gottheil E, Weinstein SP. No association between polymorphisms in the serotonin transporter gene and susceptibility to cocaine dependence among African-American individuals. *Psychiatr Genet*. 2002;12(3):161-4.

Paul BD, Lalani S, Bosy T, Jacobs AJ, Huestis MA. Concentration profiles of cocaine, pyrolytic methyl ecgonidine and thirteen metabolites in human blood and urine: determination by gas chromatography-mass spectrometry. *Biomed Chromatogr*. 2005;19(9):677-88.

Pearson-Fuhrhop KM, Dunn EC, Mortero S, Devan WJ, Falcone GJ, Lee P, Holmes AJ, Hollinshead MO, Roffman JL, Smoller JW, Rosand J, Cramer SC. Dopamine genetic risk score predicts depressive symptoms in healthy adults and adults with depression. *PLoS One*. 2014;9(5):e93772.

Pidsley R, Wong CCY, Volta M, Lunnon K, Mill J, Schalkwyk LC. A data-driven approach to preprocessing Illumina 450K methylation array data. *BMC Genomics*. 2013;14:293.

Pierce RC, Pierce-Bancroft AF, Prasad BM. Neurotrophin-3 contributes to the initiation of behavioral sensitization to cocaine by activating the Ras/Mitogen-activated protein kinase signal transduction cascade. *J Neurosci*. 1999;19(19):8685-95.

Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol*. 2010;28(10):1057-68.

Rakyan VK, Beyan H, Down TA, Hawa MI, Maslau S, Aden D, Daunay A, Busato F, Mein CA, Manfras B, Dias KR, Bell CG, Tost J, Boehm BO, Beck S, Leslie RD. Identification of type 1 diabetes-associated DNA methylation variable positions that precede disease diagnosis. *PLoS Genet*. 2011;7(9):e1002300.

Reinarman C, Levine HG. The crack attack: politics and media in the crack scare. In: Reinarman C, Levine HG. *Crack in America: demons drugs and social justice*. Berkeley: University of California Press; 1997. p.18-52.

Ribeiro M, Nudelman ED, Rezende EP, Yamauchi R. Farmacologia do consumo de crack. In: Ribeiro M, Laranjeira R. *O tratamento do usuário de crack*. 2 ed. Porto Alegre: Artmed; 2012. p.117-42.

Rivera MA, Aufderheide AC, Cartmell LW, Torres CM, Langsjoen O. Antiquity of coca – leaf chewing in the south central Andes: a 3000 year archaeological record of coca – leaf chewing from northern Chile. *J. Psychoactive Drugs*. 2005;37(4):455-8.

Robison AJ, Nestler EJ. Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction. *Nat Rev Neurosci*. 2011;12(11):623-37.

Rubinfeld H, Seger R. The ERK cascade: a prototype of MAPK signaling. *Mol Biotechnol*. 2005;31(2):151-74.

Sarter B, Long TI, Tsong WH, Koh WP, Yu MC, Laird PW. Sex differential in methylation patterns of selected genes in Singapore Chinese. *Hum Genet.*, 2005;117(4):402-3.

Savitz J, Hodgkinson CA, Martin-Soelch C, Shen PH, Szczepanik J, Nugent AC, Herscovitch P, Grace AA, Goldman D, Drevets WC. DRD2/ANKK1 Taq1A polymorphism (rs1800497) has opposing effects on D2/3 receptor binding in healthy controls and patients with major depressive disorder. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2013;16(9):2095-101.

Shlyueva D, Stampfel G, Stark A. Transcriptional enhancers: from properties to genome-wide predictions. *Nat Rev Genet*. 2014;15(4):272-86.

Silva LVER, Malbergier A, Stempliuk VA, Andrade AG. Fatores associados ao consumo de álcool e drogas entre estudantes universitários. *Rev. Saúde Pública*. 2006; 40(2):280-288.

Smith ML, Baggerly KA, Bengtsson H, Ritchie ME, Hansen KD. Illuminaio: An open source IDAT parsing tool for Illumina microarrays. *F1000Res*. 2013;2:264.

Stolf AR, Szobot CM, Halpern R, Akutagava-Martins GC, Müller D, Guimaraes LS, Kessler FH, Pechansky F, Roman T. Crack cocaine users show differences in genotype frequencies of the 3' UTR variable number of tandem repeats of the dopamine transporter gene (DAT1/SLC6A3). *Neuropsychobiology*. 2014;70(1):44-51.

Thermo Fisher Scientific. NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer: V1.0 User Manual. 2009. Disponível em: <<http://icob.sinica.edu.tw/pubweb/biochem/Core%20Facilities/Data/R401-core/NanoDrop%202000%20User%20Manual.pdf>>. Acesso em 15 set. 2014.

Touleimat N, Tost J. Complete pipeline for Infinium(®) Human Methylation 450K BeadChip data processing using subset quantile normalization for accurate DNA methylation estimation. *Epigenomics*. 2012;4(3):325-41.

Tristán-Noguero A, Fernández-Castillo N, Roncero C, Sánchez-Mora C, Ramos-Quiroga JA, Daigre C, Egido A, Alvarós J, Prat G, Casas M, Cormand B, Ribasés M. Lack of association between the LPR and VNTR polymorphisms of the serotonin transporter gene and cocaine dependence in a Spanish sample. *Psychiatry Res*. 2013;210(3):1287-9.

Tsankova N, Renthal W, Kumar A, Nestler EJ. Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci*. 2007;8(5):355-67.

Tsuang MT, Lyons MJ, Eisen SA, Goldberg J, True W, Lin N, Meyer JM, Toomey R, Faraone SV, Eaves L. Genetic influences on DSM-III-R drug abuse and dependence: a study of 3,372 twin pairs. *Am J Med Genet*. 1996;67(5):473-7.

UNODC – United Nations Office on Drugs and Crime. *Coca cultivation in the andean region: a survey of Bolivia, Colombia and Peru*. Bogotá: ONU; 2009.

UNODC – United Nations Office on Drugs and Crime. *Colombia coca cultivation survey*. Bogotá: ONU; 2008.

Urban NB, Martinez D. Neurobiology of addiction: insight from neurochemical imaging. *Psychiatr Clin North Am.* 2012;35(2):521-41.

Uys JD, Knackstedt L, Hurt P, Tew KD, Manevich Y, Hutchens S, Townsend DM, Kalivas PW. Cocaine-induced adaptations in cellular redox balance contributes to enduring behavioral plasticity. *Neuropsychopharmacology.* 2011;36(12):2551-60.

Valjent E, Pascoli V, Svenningsson P, Paul S, Enslen H, Corvol JC, Stipanovich A, Caboche J, Lombroso PJ, Nairn AC, Greengard P, Hervé D, Girault JA. Regulation of a protein phosphatase cascade allows convergent dopamine and glutamate signals to activate ERK in the striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(2):491-6.

Vassoler FM, Byrnes EM, Pierce RC. The impact of exposure to addictive drugs on future generations: Physiological and behavioral effects. *Neuropharmacology.* 2014;76:269-75.

Wagner GA, Oliveira LG, Barroso LP, Nishimura R, Ishihara LM, Stempluk VA, Duarte PCAV, Andrade AG . Drug use in college students: a 13-year trend. *Rev. Saúde Pública.* 2012; 46(3):497-504.

Walton E, Hass J, Liu J, Roffman JL, Bernardoni F, Roessner V, Kirsch M, Schackert G, Calhoun V, Ehrlich S. Correspondence of DNA Methylation Between Blood and Brain Tissue and its Application to Schizophrenia Research. *Schizophr Bull.* 2015. pii: sbv074.

Waltrick-Zambuzzi MR, Vieira TCS, Romanos HF, Macedo EE, Granjeiro JM, Kuchler EC. Evaluation of yield, purity and integrity of genomic dna in different protocols buccal cell collection. *Int J Dent.*, 2012;11(1):12-18.

Wang J, Duncan D, Shi Z, Zhang B. WEB-based GENE SeT AnaLysis Toolkit (WebGestalt): update 2013. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(Web Server issue):W77-83.

Washton AM. *Cocaine Addiction: Treatment, Recovery, and Relapse Prevention.* v. 1. New York: W.W.Norton & Company; 1989.

Wells L, Opacka-Juffry J, Fisher D, Ledent C, Hourani S, Kitchen I. In vivo dopaminergic and behavioral responses to acute cocaine are altered in adenosine A(2A) receptor knockout mice. *Synapse*. 2012;66(5):383-90.

Wong CC, Mill J, Fernandes C. Drugs and addiction: an introduction to epigenetics. *Addiction*. 2011;106(3):480-9.

Wu MC, Joubert BR, Kuan PF, Håberg SE, Nystad W, Peddada SD, London SJ. A systematic assessment of normalization approaches for the Infinium 450K methylation platform. *Epigenetics*. 2014;9(2):318-29.

Yao J, Pan YQ, Ding M, Pang H, Wang BJ. Association between DRD2 (rs1799732 and rs1801028) and ANKK1 (rs1800497) polymorphisms and schizophrenia: a meta-analysis. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2015;168B(1):1-13

Yoon G, Westermeyer J, Warwick M, Kuskowski MA. Substance use disorders and adoption: findings from a national sample. *PLoS One*. 2012;7(11):e49655.

Yuferov V, Levran O, Proudnikov D, Nielsen DA, Kreek MJ. Search for genetic markers and functional variants involved in the development of opiate and cocaine addiction and treatment. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1187:184-207.

Zaparte A, Viola TW, Grassi-Oliveira R, da Silva Morrone M, Moreira JC, Bauer ME. Early abstinence of crack-cocaine is effective to attenuate oxidative stress and to improve antioxidant defences. *Psychopharmacology (Berl)*. 2015;232(8):1405-13.

Zhou Z, Yuan Q, Mash DC, Goldman D. Substance-specific and shared transcription and epigenetic changes in the human hippocampus chronically exposed to cocaine and alcohol. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(16):6626-31.