Caroline Perez Camilo

**Avaliação da idade epigenética e
padrão de metilação do DNA em
dependentes de crack**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Psiquiatria

Orientador: Prof. Dr. Homero Pinto Vallada
Filho

Coorientadora: Profa. Dra. Helena Paula
Brentani

São Paulo

2020

Caroline Perez Camilo

**Avaliação da idade epigenética e
padrão de metilação do DNA em
dependentes de crack**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Psiquiatria

Orientador: Prof. Dr. Homero Pinto Vallada
Filho

Coorientadora: Profa. Dra. Helena Paula
Brentani

São Paulo

2020

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
Avaliação da idade epigenética e padrão de
metilação do DNA em dependentes de crack / Caroline
Perez Camilo. -- São Paulo, 2020.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Psiquiatria.
Orientador: Homero Pinto Vallada Filho.
Coorientadora: Helena Paula Brentani.

Descritores: 1.Ambiente 2.Crack 3.Dependência
química 4.Envelhecimento celular 5.Epigenômica
6.Metilação do DNA 7.Modelagem de equações
estruturais

USP/FM/DBD-330/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

Dedico essa tese aos meus pais, Ana Maria e Izilmar. Por todo seu amor, por todo apoio que me deram desde o início dessa jornada acadêmica e por toda dedicação empenhada na minha formação pessoal e profissional. Essa dedicatória é apenas uma singela homenagem, pois não seria possível expressar em palavras o quanto sou grata por ser sua filha. Obrigada.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por permitir que eu trilhasse esse caminho até esse momento e por nunca me abandonar. Por abençoar à mim e à minha família, por alimentar a minha fé e por me manter firme diante todas as dificuldade que encontrei ao longo do caminho.

Aos meus pais, Ana Maria e Izilmar. Imagino o quanto foi difícil educar aquela adolescente rebelde e ter paciência até que ela se tornasse a mulher que é hoje. Agradeço pelo amor, suporte e apoio incondicional que me deram no momento mais difícil que passei nessa trajetória, quando fui diagnosticada com depressão. O encerramento desse ciclo não seria possível sem vocês ao meu lado.

Ao meu irmão, Ronaldo. Obrigada por ser meu amigo, companheiro e a minha base. Deus me escolheu para ser sua irmã, para você ser parte de mim. E que sorte eu tenho por ter você. Que sorte eu tenho por ter sido cuidada e amada desde pequena por esse homem incrível, que até hoje se preocupa comigo e faz de tudo pra me fazer rir o tempo todo (mesmo eu sendo esse “potinho de ódio”). Obrigada pelos momentos que vivemos juntos, pelas risadas que compartilhamos e por cuidar de mim hoje e sempre.

À toda a família Perez. É uma honra ser membro dessa grande família. Agradeço pela felicidade dos nossos encontros, pelas risadas altas, pela bagunça e pelo amor e carinho que todos temos uns com os outros. Dona Berenice e Sr. Benedicto devem estar orgulhosos lá de cima, observando a família linda e unida que suas seis filhas construíram.

Ao orientador Professor Doutor Homero Vallada. Dentre altos e baixos, sou muito grata por essa trajetória de dez anos que tivemos como orientador e aluna. Seguirei agora um novo caminho, levando comigo todos os ensinamentos e toda experiência que me proporcionou. Agradeço por sempre incentivar minha evolução acadêmica e pessoal. Obrigada por toda essa história e pelo voto de confiança em me acolher como orientanda.

À co-orientadora Professora Doutora Helena Brentani. Que honra poder ser sua aluna, fazer parte da sua equipe, ter sua confiança e aprender com você todos os dias. Obrigada pelos ensinamentos, pelas cobranças e pelos conselhos.

Aos meus amigos. Que sorte eu tenho de ter vocês na minha vida (ou seria o contrário?). Brincadeiras à parte, vocês são essenciais em todos os momentos, da tristeza à felicidade, do drama aos momentos sérios. Obrigada por todos os momentos que vivemos, e por todos que estão por vir.

Aos amigos do “Panelinha”. Obrigada pelas conversas, pelas risadas, pelo ombro amigo e por todos os nossos encontros mensais para tomar um cafézinho. Agradeço o apoio de todos. Vocês fizeram os meus dias na Psiquiatria mais felizes.

Aos colegas do Departamento e Instituto de Psiquiatria do HCFMUSP. Em especial à equipe da pós graduação, Eliza e Isabel, por todo o apoio e ajuda durante esses anos de trabalho. Aos colegas do Laboratório de Patologia e do Grupo de Genética e Bioinformática. Agradeço pelo apoio, convívio e aprendizado durante o desenvolvimento e execução desse trabalho.

À CAPES: O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2013/00659-2) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

À todos aqueles que contribuíram, de alguma forma, para a realização deste trabalho.

Epígrafe

*“Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito debaixo do céu. Há tempo de nascer, e tempo de morrer; tempo de plantar, e tempo de arrancar o que se plantou; Tempo de matar, e tempo de curar; tempo de derrubar, e tempo de edificar; Tempo de chorar, e tempo de rir; tempo de prantear, e tempo de dançar; Tempo de espalhar pedras, e tempo de ajuntar pedras; tempo de abraçar, e tempo de afastar-se de abraçar; Tempo de buscar, e tempo de perder; tempo de guardar, e tempo de lançar fora; Tempo de rasgar, e tempo de coser; tempo de estar calado, e tempo de falar; Tempo de amar, e tempo de odiar; tempo de guerra, e tempo de paz.” **Eclesiastes - 3:1-8.***

Esta tese 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 Index Medicus*.

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Resumo

Abstract

1. APRESENTAÇÃO.....	1
2. INTRODUÇÃO	3
2.1. CAPÍTULO 1.....	4
2.1.1. <i>Epigenética</i>	<i>4</i>
2.1.2. <i>Metilação do DNA</i>	<i>5</i>
2.1.3. <i>Metilação do DNA e fatores ambientais</i>	<i>6</i>
2.1.4. <i>Relógio epigenético</i>	<i>7</i>
2.2. CAPÍTULO 2.....	10
2.2.1. <i>Dependência de crack</i>	<i>10</i>
2.2.2. <i>Influência de fatores ambientais na dependência de crack</i>	<i>10</i>
2.2.3. <i>Estudos genéticos e epigenéticos na dependência de crack</i>	<i>12</i>
2.3. CAPÍTULO 3.....	13
2.3.1. <i>Análise de mediação</i>	<i>13</i>
2.3.2. <i>Modelagem de equações estruturais</i>	<i>15</i>
2.3.3. <i>O uso de análises de mediação e SEM na avaliação da metilação do DNA, efeitos ambientais e uso/abuso de drogas.....</i>	<i>17</i>
3. JUSTIFICATIVA	19
4. OBJETIVOS	21
4.1. OBJETIVO GERAL.....	22
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
5. MATERIAIS E MÉTODOS	23
5.1. AMOSTRA	24
5.1.1. <i>Casos</i>	<i>24</i>
5.1.2. <i>Controles</i>	<i>25</i>
5.2. ENSAIO DE METILAÇÃO DO DNA DO GENOMA.....	25
5.3. ANÁLISE DA METILAÇÃO DO DNA.....	26
5.4. OBJETIVO ESPECÍFICO 1	27

5.4.1.	<i>Instrumentos de avaliação</i>	27
5.4.2.	<i>Estatística descritiva</i>	28
5.4.3.	<i>Relógio epigenético</i>	28
5.4.4.	<i>Mediação e modelagem de equações estruturais</i>	29
5.5.	OBJETIVO ESPECÍFICO 2	29
5.5.1.	<i>Análise de metilação diferencial</i>	29
5.6.	OBJETIVO ESPECÍFICO 3	30
5.6.1.	<i>Instrumentos de avaliação</i>	30
5.6.2.	<i>Estatística descritiva</i>	31
5.6.3.	<i>Relógio epigenético</i>	31
5.6.4.	<i>Mediação e modelagem de equações estruturais</i>	31
5.7.	OBJETIVO ESPECÍFICO 4	32
5.8.	APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	32
6.	RESULTADOS	33
6.1.	OBJETIVO ESPECÍFICO 1	34
6.1.1.	<i>Características clínicas e sociodemográficas</i>	34
6.1.2.	<i>Avaliação da idade metilômica e aceleração de idade</i>	37
6.1.3.	<i>Análise de mediação utilizando modelagem de equações estruturais</i>	38
6.2.	OBJETIVO ESPECÍFICO 2	47
6.2.1.	<i>Sítios e regiões diferencialmente metilados em dependentes de crack</i>	47
6.3.	OBJETIVO ESPECÍFICO 3	57
6.3.1.	<i>Características dos subgrupos de dependentes de crack</i>	57
6.3.2.	<i>Avaliação da idade metilômica e aceleração de idade</i>	58
6.3.3.	<i>Análise de mediação utilizando modelagem de equações estruturais</i>	59
6.4.	OBJETIVO ESPECÍFICO 4	61
6.4.1.	<i>Análise de metilação diferencial</i>	61
7.	DISCUSSÃO	62
7.1.	OBJETIVO ESPECÍFICO 1	63
7.2.	OBJETIVO ESPECÍFICO 2	66
7.3.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS 3 E 4	71
8.	CONCLUSÃO	73
9.	ANEXOS	75
10.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

Lista de figuras

	Pag.
Figura 1 - Avaliação da religiosidade dos dependentes de crack realizada com o instrumento <i>Duke Religion Index</i> (DUREL).....	35
Figura 2 - Avaliação da religiosidade do grupo controle realizada com o instrumento <i>Duke Religion Index</i> (DUREL).....	36
Figura 3 - Avaliação de qualidade de vida dos dependentes de crack realizada com o instrumento <i>World Health Organization Quality of Life-Brief instrument</i> (WHOQL-BRIEF).....	36
Figura 4 - Avaliação de qualidade de vida do grupo controle realizada com o instrumento <i>World Health Organization Quality of Life-Brief instrument</i> (WHOQL-BRIEF).....	37
Figura 5 - Avaliação da idade epigenética entre dependentes de crack e controles....	38
Figura 6 - Modelos conceituais propostos para a análise de mediação utilizando modelagem de equações estruturais.....	40
Figura 7 - Avaliação do modelo conceitual 1 com efeito total do uso de crack na AADiff.....	41
Figura 8 - Modelo final apresentado para o modelo conceitual 2.....	42
Figura 9 - Covariâncias entre as variáveis utilizadas na composição do modelo final apresentado para o modelo conceitual 2.....	43
Figura 10 - Modelo final apresentado para o modelo conceitual 3.....	45
Figura 11 - <i>Manhattan plot</i> mostrando a distribuição dos sítios de metilação entre dependentes de crack e controles.....	48
Figura 12 - <i>Volcano plot</i> mostrando a distribuição dos sítios de metilação entre dependentes de crack e controles em relação ao status de metilação.....	48
Figura 13 - Distribuição genômica dos sítios diferencialmente metilados (DMSs).....	50
Figura 14 - Distribuição dos sítios diferencialmente metilados (DMSs) em relação à ilhas CpG.....	50
Figura 15 - Representação gráfica das regiões diferencialmente metiladas (DMRs)....	51
Figura 16 - Vias biológicas identificadas para os genes relacionados aos sítios diferencialmente metilados (DMSs).....	54
Figura 17 - Processos biológicos identificados para os genes relacionados aos sítios diferencialmente metilados (DMSs)	55
Figura 18 - Processos biológicos não redundantes identificados para os genes relacionados aos sítios diferencialmente metilados (DMSs).....	56
Figura 19 - <i>Boxplot</i> mostrando a pontuação final da escala ETISR-SF para os subgrupos de dependentes de crack com e sem “eventos traumáticos”.....	57
Figura 20 - Avaliação da idade epigenética entre os subgrupos de dependentes de crack com “eventos traumáticos” e sem “eventos traumáticos”.....	59
Figura 21 - Modelos conceituais propostos para a análise de mediação utilizando modelagem de equações estruturais.....	60
Figura 22 - Modelos finais apresentados para os modelos conceituais 4 e 5.....	61

Lista de tabelas

	Pag.
Tabela 1 - Características sociodemográficas da amostra.....	34
Tabela 2 - Avaliação de Domínios de qualidade de vida (WHOQL-BRIEF).....	37
Tabela 3 - Índices de ajuste da análise de mediação utilizando modelagem de equações estruturais do modelo final apresentado para o modelo conceitual 2.....	44
Tabela 4 - Índices de ajuste da análise de mediação utilizando modelagem de equações estruturais do modelo final apresentado para o modelo conceitual 3.....	46
Tabela 5 – Sítios diferencialmente metilados (DMSs) com maior diferença de metilação entre dependentes de crack e controles.....	49
Tabela 6 – Regiões diferencialmente metiladas (DMRs) entre dependentes de crack e controles.....	52
Tabela 7 – Características dos subgrupos de dependentes de crack.....	58

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

%	Porcentagem	ETISR-SF	<i>Early Trauma Inventory Self Report-Short Form</i>
< / ≤	Menor / Menor ou igual	FCERI	<i>Fc-epsilon receptors</i>
> / ≥	Maior / Maior ou igual	FDR	<i>False discovery rate</i>
$\bar{X}$	Média	GO	<i>Gene ontology</i>
β / $\Delta\beta$	Beta / Delta Beta	IC	Intervalo de confiança
°C	Grau <i>Celsius</i>	IGR	Região intergênica
ε	Erro padrão	M	Variável mediadora
χ^2	Qui-quadrado	MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
a	Efeito indireto	Max / Min	Valor máximo / Valor mínimo
AA	<i>Age acceletarion</i> / Aceleração de idade	Md	Mediana
AADiff	<i>Age acceletarion Difference</i>	MINI	<i>Mini International Neuropsychiatric Interview</i>
AARes	<i>Age acceletarion Residuals</i>	ML	<i>Maximum-likelihood</i>
adjP	p-valor ajustado	N	Distribuição numérica
AIC	<i>Akaike information criterion</i>	NCAM	<i>Neural cell adhesion molecule</i>
AKT	<i>serine/threonine kinase 1</i>	NF- κ B	<i>Nuclear Factor kappa B</i>
b	Efeito indireto	pb	Pares de base
BH	<i>Benjamini-Hochberg</i>	PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
BIC	<i>Bayesian Information Criterion</i>	RMSEA	<i>Root mean square error of approximation</i>
c	Efeito total	SEM	<i>Structural Equation Modelling</i>
c'	Efeito direto	SF-36	<i>Short Form Health Survey</i>
CFI	<i>Comparative fit index</i>	SRMR	<i>Standardised root mean square residual</i>
CpG	Citosina - fosfato de ligação - Guanina'	TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
df	Graus de liberdade	TLI	<i>Tucker Lewis index</i>
DMR	Região diferencialmente metilada	TSS	<i>Transcription start site</i>
DMS	Sítio diferencialmente metilado	UTR	<i>Untranslated region</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico	v.	Versão
±DP	Desvio padrão	WHOQL-BRIEF	<i>World Health Organization Quality of Life-Brief instrument</i>
DUREL	<i>Duke Religion Index</i>	X	Variável independente
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>	Y	Variável dependente

Camilo CP. *Avaliação da idade epigenética e padrão de metilação do DNA em dependentes de crack* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

INTRODUÇÃO: A metilação do DNA têm a capacidade de medir o trabalho cumulativo feito pelo sistema de manutenção epigenética e determinar o impacto dos fatores ambientais no envelhecimento biológico. Em transtornos como a dependência de crack, a metilação do DNA têm sido utilizada como um importante mecanismo para compreender tanto a participação do substrato genético quanto a sua interação com os fatores ambientais no desenvolvimento da dependência. **OBJETIVOS:** Explorar alterações na metilação do DNA em dependentes de crack e avaliar se fatores ambientais estão associados com essas alterações através do uso de modelagem de equações estruturais (SEM). **MÉTODOS:** A metilação do DNA foi avaliada em 118 dependentes de crack e 98 controles saudáveis com o ensaio *Infinium MethylationEPIC BeadChip arrays (850K)*. Avaliamos dois modelos causais de mediação: 1) A relação entre a idade epigenética de dependentes de crack e controles mediada por fatores ambientais como fatores sociodemográficos, qualidade de vida, religiosidade e uso de álcool e outras drogas, e 2) A relação entre a idade epigenética de dependentes de crack, considerando a exposição dos indivíduos a eventos traumáticos e estressores, mediado por transtornos psiquiátricos. Adicionalmente, buscamos por sítios (DMSs) e regiões diferencialmente metilados (DMRs) entre dependentes de crack e indivíduos controle, e entre dependentes de crack expostos e não expostos a eventos traumáticos e estressores. **RESULTADOS:** Na avaliação entre casos e controles, observamos um aumento significativo na idade metilômica de dependentes de crack, assim como uma aceleração de idade maior para esse grupo (ambas com p-valor: $<0,001$). No entanto, os fatores ambientais não apresentaram mediação nessa relação. Foram identificados 597 (DMSs) (adjP $<0,001$) e 15 DMRs (FDR $<0,05$; $\Delta\beta \geq 5\%$) relacionados à dependência de crack, com genes diferencialmente metilados relacionados principalmente à vias de sinalização EGFR, vias de organização de cromatina, regulação de expressão gênica e regulação transcricional pela proteína TP53. Considerando a exposição de dependentes de crack a eventos traumáticos e estressores, não foi observada diferença significativa na idade metilômica e aceleração de idade e, conseqüentemente, não foi possível observar uma relação de mediação por transtornos psiquiátricos. Na análise de metilação diferencial,

não foram observados DMSs e DMRs relacionados à exposição de dependentes de crack a eventos traumáticos e estressores. **CONCLUSÕES:** Observamos que a dependência de crack está relacionada à uma aceleração de idade positiva, que reflete que o uso da droga faz com que esses indivíduos apresentem um envelhecimento biológico acelerado comparados à indivíduos controle. Além disso, observamos diferenças significativas no padrão de metilação do DNA de dependentes de crack, sendo a maioria possivelmente relacionada à um silenciamento gênico. Nossos resultados contribuem para uma melhor compreensão da neurobiologia da dependência de crack e trazem a perspectiva da identificação de novos biomarcadores que podem auxiliar em soluções mais eficazes de prevenção, diagnóstico e tratamento da dependência.

Descritores: Ambiente; Crack; Dependência química; Envelhecimento celular; Epigenômica; Metilação do DNA; Modelagem de equações estruturais.

Abstract

Camilo CP. *Epigenetic age and DNA methylation analysis in crack cocaine dependents* [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2020.

BACKGROUND: DNA methylation has the ability to measure the cumulative work done by the epigenetic maintenance system, and to determine the impact of environmental factors on biological aging. DNA methylation has been used as an important mechanism to better understand the interaction between the genetic and environment factors involved with crack dependent phenotype. **OBJECTIVES:** Investigate DNA methylation differences between crack dependents and healthy controls and evaluate its association with environmental factors through structural equation modeling (SEM). **METHODS:** We studied DNA methylation profiles of 128 crack dependents and 109 control subjects using the *Infinium MethylationEPIC BeadChip arrays (850K)*. Two SEM models were evaluated: 1) The relationship between epigenetic age in crack dependents and controls mediated by environment factors such as sociodemographics, quality of life, religiosity and use of alcohol and other drugs, and 2) The relationship between epigenetic age in crack dependents exposed and non-exposed to traumatic/stressor events mediated by psychiatric disorders. We also searched for differentially methylated sites (DMSs) and regions (DMRs) between crack/controls and crack exposed/non-exposed groups. **RESULTS:** Epigenetic age approach showed that both DNA methylation age and age acceleration were higher for the dependents group (p-value <0,001), although no mediation effect regarding environment factors has been observed. Comparison between crack dependents and controls revealed 597 DMSs (adjP <0,001) and 15 DMRs (FDR <0,05; $\Delta\beta \geq 5\%$), with differentially methylated genes mainly related to signaling by EGFR, chromatin organization pathways, gene expression regulation and transcriptional regulation by TP53. Considering crack dependents exposed and non-exposed to traumatic/stressor events, we did not observe differences in both DNA methylation age and age acceleration. Thus, we could not observe a mediation effect by psychiatric disorders. For differential methylation analysis we did not find DMSs and DMRs related to the exposure of crack dependents to traumatic/stressor events. **CONCLUSIONS:** We found that crack cocaine dependence is related with a positive age acceleration, which reflects that the use/abuse of this drug makes the individuals' biological age older compared to healthy controls. Moreover, we identified statistically

significant differences in DNA methylation patterns of crack cocaine dependents, mainly involved with gene silencing. Our results contribute to a better understanding of crack cocaine dependence neurobiology, bringing new perspectives about DNA methylation biological markers that could contribute to more effective solutions for prevention, diagnosis and drug dependence treatment.

Descriptors: Environmental; Crack cocaine; Drug dependence; Biological aging; Epigenomics; DNA methylation; Latent class analysis.

1. APRESENTAÇÃO

O epigenoma representa a capacidade de um organismo de se adaptar e evoluir por meio da expressão de um conjunto de características ou fenótipos desenvolvidos em resposta a estímulos ambientais ¹. Uma das principais modificações epigenéticas, a metilação do DNA, tem a capacidade medir o trabalho cumulativo realizado pelo sistema de manutenção epigenética, em um processo chamado de "idade epigenética". Esse mecanismo tem sido um marcador promissor para o estudo do desenvolvimento humano e envelhecimento, avaliando a idade biológica dos indivíduos com base nos níveis de metilação do DNA. Ademais, é capaz de determinar o impacto de fatores ambientais no processo de envelhecimento biológico ².

Drogas de abuso, como o crack, são capazes de alterar o padrão de metilação de DNA do genoma ³. A dependência de crack, assim como a maquinaria epigenética, também é afetada por fatores ambientais como condições socioeconômicas, adversidades sociais, qualidade de vida, exposição à estresse e comorbidades psiquiátricas ^{4,5}. No entanto, poucos estudos avaliaram em conjunto a influência dos fatores ambientais em alterações na metilação do DNA e dependência de crack. Nenhum estudo, até o momento, avaliou como essa relação pode afetar a idade epigenética dos indivíduos, deixando uma lacuna na literatura sobre essa temática.

Para avaliar o impacto da dependência de crack na idade epigenética e inferir como os fatores ambientais podem mediar essa relação, deve-se considerar a utilização de técnicas estatísticas capazes de avaliar essa relação de causa e efeito e a interação entre as variáveis, como análises de mediação e modelagem de equações estruturais.

O presente estudo foi desenvolvido com esse propósito. Apresentaremos a seguir uma introdução com a fundamentação teórica dos principais temas abordados no nosso estudo e, nas seções seguintes, os métodos e resultados obtidos na avaliação do impacto da dependência de crack e fatores ambientais na metilação do DNA.

2. INTRODUÇÃO

2.1 . CAPÍTULO 1

2.1.1. Epigenética

O termo ‘*epigenética*’ surgiu na década de 1940, com o biólogo e embriologista Conrad Waddington, como o “ramo da biologia que estuda as interações causais entre os genes e seus produtos que dão origem ao fenótipo” ⁶. Nesse sentido, genes ou exposições ambientais não seriam suficientes para explicar, por si só, o fenótipo de um indivíduo. Ao invés disso, seriam componentes de um sistema molecular complexo maior. Assim, a epigenética é uma importante abordagem para entender a influência e interação do ambiente sobre o genoma ^{7,8}.

Epigenética é um termo amplamente utilizado para descrever os processos moleculares que alteram a expressão de genes sem alterar a sequência de bases nucleotídicas do DNA (*Deoxyribonucleic Acid/ Ácido desoxirribonucléico*) ^{6,9}. Modificações epigenéticas podem ser herdadas tanto mitoticamente quanto meioticamente e desempenham um papel essencial na remodelação da estrutura global da cromatina, que por sua vez, regula a expressão gênica ^{6,10}. A cromatina é o complexo de DNA, histonas e proteínas (não histonas) no núcleo da célula. Em seu estado condensado, conhecido como heterocromatina, a cromatina é transcricionalmente inativa. Já em seu estado ativo, conhecido como eucromatina, a cromatina está descondensada, permitindo o acesso da maquinaria transcricional e promovendo a expressão gênica ^{8,11}.

A estrutura da cromatina é regulada por dois mecanismos principais, modificações pós-traducionais das histonas e metilação do DNA ⁶. As histonas são as proteínas em torno das quais o DNA é envolvido para formar o nucleossomo. Os núcleos das histonas são embalados por caudas aminoterminais e essas caudas são os locais de várias modificações pós-transcricionais, como acetilação, metilação, fosforilação, ubiquitinação, sumoilação e ADP-ribosilação. As modificações das histonas são mediadas pelas enzimas histona acetiltransferases (HATs) e histona deacetilases (HDACs) e desempenham um papel importante na regulação da transcrição, reparo e replicação do DNA, *splicing* alternativo e condensação cromossômica ^{8,10}. A metilação do DNA, mecanismo que será abordado no presente estudo, será discutido a seguir.

2.1.2. Metilação do DNA

A metilação do DNA é a modificação epigenética mais bem compreendida e a mais estável, quando comparada com as modificações das histonas, pois regula a plasticidade transcricional do genoma⁸. A metilação do DNA consiste na adição de um grupamento metil (CH₃) ao carbono da posição cinco da citosina (C). Essa reação é mediada pelas enzimas DNMT1 (DNA metiltransferase 1), DNMT3A (DNA metiltransferase 3 alpha) e DNMT3B (DNA metiltransferase 3 beta), que catalisam a transferência de um grupo metil da S-adenosil metionina, um cofactor enzimático, para o DNA⁸⁻¹⁰. A enzima DNMT1 é essencial para a manutenção dos padrões de metilação do DNA em células proliferativas. Essa enzima atua na replicação do DNA, reconhecendo os locais CpG metilados no DNA recém-replicado e copiando essa metilação para o local CpG da fita complementar. Além disso, em conjunto com as enzimas DNMT3A e DNMT3B, DNMT1 está envolvida na criação de novos padrões de metilação de DNA (metilação '*de novo*')^{9,12}.

A metilação do DNA ocorre principalmente em dinucleotídeos CpG, que são regiões em que uma citosina (C) precede uma guanina (G) na sequência de DNA ('C-fosfato de ligação-G')^{6,8,9}. Dinucleotídeos CpG podem estar agrupados em regiões conhecidas como ilhas CpG, que contém pelo menos 200 pares de base (pb) e um conteúdo C+G maior que 50%^{10,12}. Esses dinucleotídeos também podem ser encontrados em regiões localizadas nas margens das ilhas CpG, chamadas de '*shore*' (até 2.000 pb próximos à ilha) e '*shelf*' (de 2.000 a 4.000 pb próximos à ilha), e em regiões '*open sea*' (a partir de 4.000 pb). Em relação aos genes, dinucleotídeos CpG podem estar em regiões promotoras dos genes (sítios de início de transcrição - *transcription start site* - TSS200 e TSS1500, 5' UTR - *untranslated region* - e primeiro éxon), no corpo dos genes e na região 3' UTR^{13,14}.

A metilação também pode ocorrer em locais 'não-CG', ou seja, locais onde uma citosina (C) precede outras bases nitrogenadas, seja uma mesma citosina, adenina ou timina. A metilação em locais não-CG foi descrita em células-tronco, mas esse mecanismo permanece pouco compreendido¹⁰.

A metilação é comum em todo o genoma e aproximadamente 3% de todas as citosinas no DNA humano, e cerca de 70% dos 28 milhões de dinucleotídeos CpG, estão metilados¹⁰.

2.1.3. Metilação do DNA e fatores ambientais

Assim como toda a maquinaria epigenética, a metilação do DNA é um processo dinâmico por natureza e seus padrões podem mudar em resposta a influências ambientais e fatores de estilo de vida ⁴. Por influências ambientais consideram-se todos os fatores físicos, químicos, socioculturais e biológicos na vida de um indivíduo. O efeito de tais influências pode variar dependendo, por exemplo, do tempo de exposição, e operar em adição à outros fatores como suscetibilidade genética individual, idade, sexo e o próprio estilo de vida do indivíduo. A variação na metilação do DNA do genoma é causada, em grande parte, por fatores ambientais pré-natais e, ao longo da vida, por fatores ambientais específicos para cada indivíduo ^{15,16}. Já o conceito de ‘estilo de vida’ descreve o “modo de vida típico ou modo de vida característico de um indivíduo ou grupo” e inclui diversos fatores como alimentação, atividade física, envelhecimento, hábitos de trabalho, interação social e comportamento, condições de estresse, exposição à poluentes ambientais, tabagismo e consumo de álcool e outras drogas ^{17,18}.

Desde o ambiente periconcepcional ao nascimento, tanto influências maternas (dieta materna, tabagismo, saúde mental e o ambiente social) quanto paternas (consumo de álcool e exposição a produtos químicos tóxicos) podem alterar o perfil metilômico na prole. Ainda no período perinatal, por exemplo, cuidados maternos na infância influenciam nas alterações epigenéticas da criança em crescimento ^{1,19}. As experiências da infância podem modificar a neurobiologia do desenvolvimento e tais influências ambientais continuam a afetar os padrões de comportamento e resultados psicológicos na idade adulta. Com isso, fatores epigenéticos podem modular a biologia de um indivíduo tanto em um nível físico quanto emocional ¹. No período da adolescência, por exemplo, torna-se mais perceptível a interação entre alterações epigenéticas e determinantes sociais. Durante a puberdade ocorre a maturação de regiões do córtex pré-frontal, o que é conhecido por ser um desenvolvimento plástico vulnerável, sugerindo que algumas influências ambientais como o estresse podem desencadear doenças neuropsiquiátricas por meio de mecanismos epigenéticos ⁴. A partir dessa fase, e aplicando-se à fase adulta, não somente as influências ambientais mas também o estilo de vida dos indivíduos pode influenciar os mecanismos epigenéticos, como a metilação do DNA ^{1,17}. Além disso, a adolescência é a principal fase de contato dos indivíduos

com substâncias como álcool, cigarro e outras drogas, que por sua vez, também podem causar alterações na metilação do DNA ²⁰.

Diversos estudos têm sido realizados buscando avaliar como o uso/abuso de drogas como álcool, cigarro e outras drogas podem causar alterações na metilação do DNA ²¹. Para o consumo de álcool e cigarro, por exemplo, estudos demonstram que o uso/abuso dessas substâncias pode causar alterações no padrão de metilação do DNA ²²⁻²⁴. Alterações na metilação também foram observadas para o consumo de *cannabis* ^{25,26}, cocaína ²⁷⁻²⁹ e crack ³.

Como visto, mudanças na metilação do DNA podem ser diferentes do início da vida àquelas observadas mais tarde na vida. Alterações dinâmicas ocorrem desde o desenvolvimento embrionário até a idade adulta, quando a especificação de tecidos e órgãos são completados e o crescimento estabilizado ³⁰. Essas alterações dinâmicas durante a vida servem como um mecanismo importante para os organismos se adaptarem às mudanças ambientais externas e internas. No entanto, conforme o envelhecimento, tais alterações podem funcionar como mudanças adaptativas para responder, por exemplo, à exposição ao estresse ao longo da vida ^{4,31}. Uma medida promissora utilizada nos últimos anos para investigar a dinâmica entre o impacto de influências ambientais e estilo de vida nas assinaturas epigenéticas, como a metilação do DNA, é o biomarcador molecular conhecido como “relógio epigenético” ^{2,4,18}.

2.1.4. Relógio epigenético

O relógio epigenético é um ‘preditor’ que permite estimar a idade biológica dos indivíduos com base nos níveis de metilação do DNA ². Referido especificamente como ‘idade de metilação do DNA’ ou ‘idade metilômica’, esse método fornece uma estimativa precisa da idade em diferentes estágios da vida e permite a identificação de desvios substanciais da idade cronológica real dos indivíduos ³⁰. O estresse cumulativo ao longo da vida, por exemplo, tem sido relacionado ao envelhecimento epigenético ².

Horvath ³² propõe em seu método de relógio epigenético que a metilação do DNA tem a capacidade medir o trabalho cumulativo realizado pelo sistema de manutenção epigenética, sendo um marcador promissor para o estudo do desenvolvimento humano e envelhecimento, capaz de determinar o impacto de fatores ambientais no processo de envelhecimento biológico. Adicionalmente à idade metilômica, o relógio epigenético

pode estimar a ‘aceleração de idade’, que consiste na diferença entre a idade cronológica e idade metilômica e contém informações sobre os perfis de idade de metilação dos indivíduos^{32,33}. Essa estimativa é de extrema importância, pois é capaz de investigar como a idade metilômica estimada pode diferir entre indivíduos de mesma idade cronológica, determinando o impacto de fatores ambientais no envelhecimento biológico. Uma aceleração de idade positiva, por exemplo, sugere o envelhecimento biológico mais rápido do que o esperado com base na idade cronológica, enquanto aceleração de idade negativa sugere um envelhecimento mais lento do que seria de se esperar².

Diversos estudos têm observado a relação entre o relógio epigenético, influências ambientais e fatores de estilo de vida, principalmente sobre como tais fatores podem influenciar na aceleração da idade. Estudos em famílias mostraram que variações na idade metilômica podem ser melhor explicadas por fatores ambientais, em sua maioria por fatores ambientais pré-natais. No entanto, foi observado que a variância da idade metilômica aumenta com a idade cronológica, sendo pequena para recém-nascidos, maior para adolescentes e relativamente constante para adultos¹⁶. A exposição à adversidades no início da vida, como exposição à violência por exemplo, foi associada a um envelhecimento biológico acelerado em crianças e adolescentes³⁴⁻³⁶. Tang e colaboradores³⁷ demonstraram que crianças expostas à experiências adversas na infância (incluindo bullying, abuso e negligência emocional, abuso físico, abuso sexual e problemas relacionados aos pais) apresentaram aceleração da idade de metilação do DNA.

Influências ambientais como a situação socioeconômica dos indivíduos também está associada a um envelhecimento epigenético acelerado³⁸⁻⁴⁰. A aceleração de idade metilômica em adolescentes de famílias de baixa renda foi associada, inclusive, com o desenvolvimento alterado de estruturas cerebrais³⁸. Baixa cognição e estresse ao longo da vida foram associados com uma idade epigenética acelerada^{38,41,42}. Quanto ao estilo de vida, estudos demonstram que fatores como educação, atividade física, dieta equilibrada e baixo índice de massa corporal estão associados a uma lenta aceleração da idade^{43,44}. No sentido oposto, baixa escolaridade, alto índice de massa corporal e/ou obesidade, diabetes e uso de substâncias estão relacionados com uma aceleração de idade avançada^{21,43,45-47}.

Em relação ao uso de substâncias, o consumo leve à moderado de álcool foi associado negativamente com a aceleração de idade ^{48,49}, enquanto o uso/abuso dessa substância foi associado com idade epigenética acelerada ^{50,51}. Para o uso de cigarro os achados são controversos. Enquanto alguns estudos demonstram não haver associação entre o consumo de cigarro e uma aceleração de idade ^{43,52}, outros evidenciaram essa relação ^{47,53}, inclusive em órgãos respiratórios ⁵⁴. Em relação à cocaína e o crack, apesar de terem sido observadas diferenças na metilação do DNA, até o momento não foram realizados estudos avaliando como o uso/abuso dessas drogas pode afetar a idade epigenética dos indivíduos.

2.2. CAPÍTULO 2

2.2.1. *Dependência de crack*

A expansão e disseminação do consumo de crack vem se tornando um grave problema de saúde pública nos últimos trinta anos. Os primeiros relatos de uso de crack no Brasil são da década de 1980 ⁵⁵ e, desde então, seu uso se disseminou por todo o território nacional até os tempos atuais. Os últimos levantamentos epidemiológicos nacionais apontaram para cerca de 1,8 milhões de pessoas já tendo usado crack na vida e aproximadamente 250 mil pessoas tendo feito uso recente (últimos 6 meses) em cenas de uso do crack, conhecidas como ‘cracolândias’ ^{56,57}.

O crack é a forma ‘fumada’ da cocaína e é produzido a partir da pasta ou do cloridrato de cocaína ⁵⁸. Dentre as outras formas de uso da cocaína, como intranasal e venosa, o uso de crack se destaca pela velocidade e duração dos efeitos ⁵⁹. Ao fumar a pedra de crack, o vapor produzido é absorvido rapidamente pela mucosa e epitélio alveolar, atingindo a corrente sanguínea quase imediatamente ⁶⁰. Ao atingir a circulação sanguínea seus efeitos ocorrem instantaneamente (8 a 10 segundos), mas esses efeitos têm curta duração (5 - 10 minutos) ⁵⁹.

Ao atingir a circulação pulmonar a droga difunde – se ao ventrículo esquerdo, atingindo a circulação cerebral ⁶¹. O principal efeito do crack no Sistema Nervoso Central ocorre principalmente sobre o sistema mesolímbico – mesocortical, conhecido como sistema de recompensa, através do bloqueio de recaptação de dopamina na fenda sináptica pela inibição dos transportadores de dopamina ^{59,62}. Esse bloqueio faz com que a dopamina fique acumulada na fenda sináptica, causando uma sensação de euforia e bem estar ⁶³ e, para compensar esse aumento, os receptores pré-sinápticos são ativados, levando à uma diminuição na sua liberação ^{59,64}.

O conjunto de rápida e imediata duração dos efeitos do crack, associado à sensação de prazer, euforia e poder que a droga proporciona, faz com que os usuários sofram um grande potencial de dependência ⁵⁸.

2.2.2. *Influência de fatores ambientais na dependência de crack*

Além dos efeitos biológicos do crack, outros componentes contribuem para seu potencial de dependência, como os fatores ambientais ⁶⁵. A literatura em torno de

fatores ambientais considerados como ‘fatores de risco’ para a dependência de substâncias é ampla e envolve diferentes populações em todo o mundo. Alguns estudos com a população brasileira mostraram, por exemplo, que fatores socioeconômicos, vulnerabilidade social ⁶⁶, baixa escolaridade, baixa qualidade de vida, menor envolvimento religioso ⁵, problemas familiares e uso de outras substâncias ^{67,68} são fatores de risco associados ao uso de crack. Um estudo de base populacional realizado no município de Pelotas, Rio Grande do Sul, mostrou que usuários de crack apresentam pior qualidade de vida quando comparados à população em geral, principalmente em termos de saúde geral e física ⁵. Em outro estudo, realizado em sete estados brasileiros, pesquisadores observaram alta prevalência de exposição a eventos estressantes e condições psiquiátricas em usuários de crack ⁶⁷.

A exposição ao estresse tem sido cada vez mais reconhecida como um determinante da vulnerabilidade ao uso/abuso de substâncias. Adversidades no início da vida como abuso físico, emocional e sexual têm se correlacionado cada vez mais com um risco aumentado de uso de substâncias, principalmente na vida adulta ^{69,70}. Adversidades na infância, como abuso e negligência, podem influenciar a susceptibilidade à dependência de cocaína e crack ^{71,72}. Usuários de crack em tratamento em seis capitais brasileiras apresentaram relatos de experiências traumáticas tanto antes quanto depois do primeiro episódio de uso da droga. Esses mesmos usuários apresentaram comorbidades psiquiátricas com transtorno da personalidade anti-social e transtorno de estresse pós-traumático ⁷³. Comorbidades entre esses transtornos e o uso de crack também foram relatados em outros estudos ⁷⁴.

Além de serem considerados como preditores de iniciação do uso de crack, os transtornos psiquiátricos são frequentemente relacionados ao uso do crack. No entanto, quando o usuário já é portador de transtorno primário, a vulnerabilidade para outros transtornos se torna maior ⁷⁵. Transtornos de humor como depressão e ansiedade são as comorbidades psiquiátricas com maior prevalência no uso/abuso de crack, sendo os sintomas depressivos secundários ao consumo os mais prevalentes ⁷⁶. Ademais, o uso de crack têm sido relatado como um fator preditivo para ideação e tentativa de suicídio ⁷⁴. Outros importantes transtornos psiquiátricos também já foram associados ao uso/abuso de crack, como esquizofrenia, transtorno de conduta, transtorno desafiador de oposição, transtorno de déficit de atenção e hiperatividade ^{68,76}.

É importante ressaltar que, apesar dos diversos fatores de risco associados ao uso de crack, outros fatores ambientais podem reduzir a vulnerabilidade para o consumo da droga. Fatores como um ambiente familiar saudável, maiores níveis de escolaridade e religiosidade, por exemplo, são considerados positivos na redução de risco à dependência^{65,77}. Estudos têm demonstrado uma relação inversa entre a religiosidade e o uso/abuso de crack^{77,78}. O envolvimento religioso durante a infância e adolescência foi correlacionado ao início menos frequente do consumo de drogas antes dos 18 anos⁷⁹.

2.2.3. Estudos genéticos e epigenéticos na dependência de crack

Diversos estudos têm relatado, além das influências ambientais, a influência dos fatores genéticos na relação com a dependência química, como nos estudos em famílias, gêmeos e adotados^{8,80,81}. Nos últimos anos, diversos estudos têm sido realizados buscando genes candidatos que possam estar envolvidos em diferentes etapas relacionadas com a dependência de crack, sendo os mais estudados aqueles aqueles que integram o sistema de recompensa dopaminérgico. Stolf e colaboradores⁸²⁻⁸⁴ observaram alterações em variantes dos genes *DAT1* (*dopamine transporter gene*), *DRD2* (*dopamine receptor D2*) e *DRD4* (*dopamine receptor D4*) relacionadas com a dependência de crack. Outros autores observaram associação do gene *NR3C1* (*nuclear receptor subfamily 3 group C member 1*) e gravidade da depressão em mulheres com dependência de crack⁸⁵ e do gene *NR3C2* (*nuclear receptor subfamily 3 group C member 2*) com o risco de dependência de crack relacionado à negligência física na infância⁷². A interação desses genes foi associada à gravidade dos sintomas de abstinência de crack⁷².

Estudos avaliando a expressão gênica também evidenciaram associações significativas com o uso de crack, como uma expressão reduzida de mRNA do gene *FosB* (*FosB proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit*) em dependentes de crack comparados a controles⁸⁶ e um aumento no perfil de expressão gênica no córtex pré-frontal dorsolateral de dependentes de crack⁸⁷.

Finalmente, em relação à metilação do DNA, Camilo e colaboradores³ observaram diferenças no padrão de metilação de DNA de dependentes de cocaína e crack comparados à controles, identificando genes diferencialmente metilados previamente associados à dependência de cocaína.

2.3. CAPÍTULO 3

2.3.1. Análise de mediação

A análise de mediação é uma técnica estatística utilizada para avaliar o mecanismo pelo qual a relação entre uma variável independente (X) e uma variável dependente (Y) pode ser influenciada por uma terceira variável (o mediador). Assim, para uma variável ser considerada como ‘mediadora’, no momento em que ela é incluída em um modelo de regressão ($X > Y$), esta variável deve reduzir ou neutralizar o impacto da variável independente sobre a dependente⁸⁸. Se esse impacto for reduzido considera-se que a variável mediadora absorve parcialmente o efeito de X sobre Y e, se for nulo, significa que a variável mediadora absorve todo o efeito de X sobre Y, tornando essa mediação completa⁸⁹.

O modelo de mediação é um modelo direcional, pois presume-se que o mediador causa o resultado e não vice-versa, e é baseado em duas técnicas principais, equações de regressão e análise de caminhos (“*path analysis*”) ⁹⁰, no qual uma hipótese *a priori* é estabelecida considerando os efeitos total, direto e indireto do modelo de mediação. O efeito total (c) refere-se ao coeficiente de regressão preditor da variável independente na variável dependente, sem a inclusão da variável mediadora. O efeito indireto refere-se à dois coeficientes, (a) coeficiente preditor do impacto da variável independente na variável mediadora e (b) coeficiente preditor do impacto da variável mediadora na variável dependente. Em conjunto, os dois coeficientes de efeito indireto ($a*b$), medem o efeito estimado (ou quantidade) de mediação. Já o efeito direto (c') refere-se ao coeficiente preditor do impacto da variável independente sobre a variável dependente controlado pela variável mediadora (M) ⁹¹.

Diversas abordagens têm sido propostas para avaliar modelos de mediação, sendo as principais: análise dos caminhos, diferença entre os coeficientes, teste de *Sobel* e método *bootstrapping*.

Na análise dos caminhos são definidos quatro passos para avaliar os coeficientes: 1) O primeiro passo analisa o efeito total (c) através da associação entre X e Y, estabelecendo que existe um efeito que pode ser estimado; 2) O segundo passo analisa o efeito indireto ‘a’ através da associação entre X e M. Nesse passo deve-se considerar a variável M como variável dependente; 3) No terceiro passo é avaliado como a variável

M afeta Y (efeito indireto 'b'). Para isso, a variável Y é associada tanto à X quanto a M. Baron e Kenny ⁸⁸ sugerem que a associação entre M e Y não é suficiente para estabelecer uma relação de mediação, pois M e Y podem estar correlacionados por ambos serem causados por X. Assim, X deve ser controlada no estabelecimento do efeito do mediador em Y; 4) O quarto e último passo é derivado do passo anterior pois, ao avaliar o efeito de M em Y controlado por X, é possível observar se houve efeito de mediação. Para estabelecer que M faz a mediação entre X e Y, o efeito direto (c') deve ser zero, para uma mediação completa, ou reduzido para uma mediação parcial. No entanto, para que os efeitos de mediação sejam válidos por esse método, os caminhos a, b e c' devem ser estatisticamente significativos ⁸⁸.

A abordagem de diferença entre caminhos avalia a diferença entre os efeitos total e direto ($c - c'$). Nessa abordagem uma equação matemática por meio da distribuição *t* (com $n - 1$ grau(s) de liberdade) é utilizada para avaliar se existe mediação, considerando a correlação de M com Y, os erros padrão das relações c e c', e a estimativa de mediação dividida pelo erro padrão da equação ⁹².

O teste de *Sobel* é um método para determinar se a redução no efeito de Y, após incluir M no modelo, é uma redução significativa e, portanto, se o efeito da mediação é estatisticamente significativo. Assim, como na abordagem de análise dos caminhos, para esse teste todos os caminhos devem ser calculados e, se ambos os caminhos a e b forem significativos e c' for mais próximo de zero do que c, então o mediador M é considerado significativo. A tabela do teste z e distribuição bicaudal são utilizados como padrão neste teste, sendo o ponto de corte para que uma mediação seja aceita de $\alpha = 0,05$ ou $z = \pm 1,96$. Contudo, essa abordagem possui uma importante limitação, com o pressuposto de que a distribuição do produto entre os caminhos a e b seja normal ⁹³.

O método *bootstrapping* gera uma representação empírica da distribuição da amostra por reamostragem com reposição. Com essa abordagem é possível contornar a limitação do teste Sobel, com o cálculo do intervalo de confiança do produto de $a*b$. Assim, utilizando a estimativa de efeito indireto com as reamostragens, é calculado o intervalo de confiança de 95%. Se os valores dos efeitos diretos e indiretos estiverem dentro desses 95% a mediação é considerada presente. O método *bootstrapping* é indicado para números amostrais entre 20 e 80 ⁹¹.

2.3.2. Modelagem de equações estruturais

A modelagem de equações estruturais (SEM - *Structural Equation Modelling*) é uma técnica de análise estatística multivariada baseada também em análise de caminhos, mas que engloba a combinação de técnicas de análise fatorial e regressão linear múltipla⁹⁴. O objetivo de SEM é analisar a relação causal entre variáveis observadas e construtos latentes (variáveis que não são diretamente observadas ou medidas, mas inferidas a partir de variáveis observadas e/ou latentes)⁹⁵. Esse método pode ser utilizado tanto para modelos exploratórios, no qual as relações entre as variáveis não é estabelecido *a priori*, quanto confirmatórios, em que é estabelecida uma hipótese *a priori* da relação das variáveis observadas e variáveis latentes através de um diagrama de caminhos⁹⁶.

No método confirmatório, utilizado no presente estudo, o primeiro passo para análise SEM é identificar o problema a ser abordado e desenvolver uma hipótese sobre as relações entre as variáveis, baseado em conceitos teóricos ou resultados empíricos. Deve-se determinar a condição das relações, se uni ou bidirecionais, e o modelo conceitual através de um diagrama de caminho⁹⁴. Com o modelo conceitual identificado, o próximo passo é selecionar a estimativa de parâmetro para avaliação do mesmo. As principais estimativas são por máxima verossimilhança (ML - *maximum-likelihood*), utilizado com o pressuposto de normalidade, máxima verossimilhança pela média ajustada (MLM - *maximum-likelihood mean adjusted*) e máxima verossimilhança pela média e variância ajustadas (MLMV - *maximum-likelihood mean and variance adjusted*), sendo os dois últimos utilizados quando o pressuposto de normalidade não é válido⁹⁶.

O próximo passo é a determinação da adequação do modelo, para determinar o quanto o modelo se ajusta aos dados da amostra avaliada, que é realizado através de índices de ajuste. Diversos índices podem ser utilizados, assim, vamos citar os principais. Como índices de ajuste absoluto são considerados:

- Teste qui-quadrado (χ^2): Testa a hipótese nula de que o modelo proposto é válido para a população, ou seja, a hipótese nula é aceita quando o p-valor $>0,05$ ⁹⁷;

- Razão entre o teste qui-quadrado e graus de liberdade (χ^2/df): Compara a magnitude de χ^2 com o número de graus de liberdade, que é o valor esperado da distribuição da amostra. Para um ajuste de modelo ser considerado como "bom" ou "aceitável", a razão deve ser entre 0 e 2 e entre 2 e 3, respectivamente ⁹⁷;
- *Root mean square error of approximation* (RMSEA): Mede o ajuste geral do modelo proposto. Um bom ajuste de modelo é considerado com valor $\text{RMSEA} \leq 0,05$, enquanto valores entre 0,05 e 0,08 são considerados como um ajuste adequado e valores entre 0,08 e 0,10 como um ajuste medíocre. Valores $\text{RMSEA} > 0,10$ não são aceitáveis ⁹⁸. Hu e Bentler ⁹⁹ sugeriram um $\text{RMSEA} < 0,06$ como bom ajuste de modelo. Diferente dos demais índices de ajuste, RMSEA pode ser calculado com intervalo de confiança (IC). Para um ajuste exato, o limite inferior do IC deve ser zero, e para um ajuste próximo o limite inferior deve ser $< 0,05$ ⁹⁷;
- *Standardised root mean square residual* (SRMR): Medida baseada na diferença entre a correlação observada e a correlação prevista dos resíduos padronizados. SRMR deve ser $< 0,05$ para um bom ajuste e $< 0,10$ para um ajuste aceitável ⁹⁹;
- *Adjusted goodness-of-fit statistic* (AGFI): Calcula a proporção da variância pela covariância da população estimada e mostra o quanto o modelo consegue replicar a matriz de covariância observada, ajustando essa proporção é pelos graus de liberdade. AGFI deve ser $\geq 0,90$ para o modelo ser considerado bem ajustado ¹⁰⁰.

Índices de ajuste incrementais, ou índices de ajuste comparativos, também devem ser selecionados, pois comparam o modelo proposto com um modelo nulo ou de independência ⁹⁶. Os principais são:

- *Comparative fit index* (CFI): Mede a melhoria relativa do modelo proposto. Para um bom modelo, CFI deve ser $\geq 0,95$ ^{99,101};
- *Tucker Lewis index* (TLI): Medida da discrepância entre o valor χ^2 do modelo hipotético e o valor χ^2 do modelo independente. Para ser considerado um modelo aceitável, TLI deve ser $\geq 0,90$ ¹⁰².

Por fim, para a comparação entre diferentes modelos e seleção do mais plausível, quando for o caso, devemos selecionar os índices de ajuste de parcimônia ⁹⁷, sendo os principais os índices *Akaike information criterion* (AIC) e *Bayesian Information Criterion* (BIC). Ambos utilizam a probabilidade dado o ajuste de máxima verossimilhança do modelo e avaliam o desempenho do modelo considerando sua complexidade. AIC é baseado na aproximação assintótica que pode não ser válida para um determinado conjunto de dados, enquanto BIC é baseado na suposição de que os erros do modelo são independentes e normalmente distribuídos. Para a seleção do modelo que melhor se ajusta aos dados, deve-se considerar aquele com o menor valor de AIC e BIC dentre os modelos testados ¹⁰³.

Por fim, o modelo conceitual proposto é finalmente avaliado. No entanto, em muitos casos, o modelo proposto inicialmente não se adequa perfeitamente aos dados da amostra. Quando isso ocorre, etapas de ajuste e modificação do modelo podem ser realizadas, sempre considerando a fundamentação teórica utilizada na construção do modelo para realizar essas modificações ⁹⁴. Adicionalmente, é possível utilizar os índices de modificação (*'modification indices'*), que fornecem uma estimativa aproximada de como o χ^2 poderia melhorar no modelo proposto se um determinado parâmetro fosse alterado. Para cada índice de modificação observa-se uma alteração de parâmetros esperada correspondente e, avaliando-as em conjunto, é possível melhorar os índices de ajuste do modelo ¹⁰⁴.

2.3.3. O uso de análises de mediação e SEM na avaliação da metilação do DNA, efeitos ambientais e uso/abuso de drogas

Como visto anteriormente, influências ambientais estão relacionadas tanto com alterações na metilação do DNA quanto com a dependência de crack, e diversos estudos utilizando as técnicas de mediação e SEM têm sido realizados para avaliar essas relações.

Estudos com o uso de SEM foram relatados, por exemplo, para calcular a variância na metilação do DNA explicada por efeitos genéticos, efeitos ambientais compartilhados e não compartilhados em gêmeos monozigóticos e dizigóticos ¹⁰⁵, para investigar o efeito de baixa renda no envelhecimento epigenético associado à outros

fatores ambientais como educação, estado civil, dieta e consumo de álcool e tabaco ¹⁰⁶, entre muitos outros.

Em relação ao uso/abuso de drogas, SEM já foi utilizado para examinar os caminhos entre o uso de substâncias como álcool, maconha e cocaína e sofrimento psicológico de longo prazo ¹⁰⁷, para avaliar caminhos de predição ao uso de psicoestimulantes ¹⁰⁸ e prever fatores de risco mediadores da relação entre abuso e negligência na infância e uso de drogas ilícitas na idade adulta ¹⁰⁹. Especificamente em relação ao uso de crack, dois estudos interessantes foram encontrados, sendo o primeiro observando que o transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) pode prever o uso de crack em indivíduos com níveis médios e altos de agressão verbal ¹¹⁰, e o segundo demonstrando que a troca de sexo por crack em mulheres está associada ao abuso na infância e mediada, em parte, por sofrimento psicológico ¹¹¹.

3. JUSTIFICATIVA

Evidências crescentes sugerem que mecanismos epigenéticos, como a metilação do DNA, podem ser influenciados pela exposição a uma variedade de influências ambientais e fatores de estilo de vida. Em relação à dependência de crack, apesar de terem sido observadas diferenças na metilação do DNA, até o momento não foram realizados estudos avaliando como o uso/abuso dessa droga pode afetar a idade epigenética dos indivíduos, deixando uma lacuna na literatura. Para entender essas alterações e a complexa interação genético-ambiental na dependência de crack a modelagem de equações estruturais parece ser o método mais adequado.

Assim, diante o contexto apresentado, o presente estudo propõe avaliar o impacto da dependência de crack na idade epigenética e inferir como essa relação pode ser influenciada por fatores ambientais relacionados à dependência. 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.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Explorar alterações na metilação do DNA em dependentes de crack em um estudo de associação do epigenoma e avaliar se fatores ambientais estão associados com essas alterações através do uso de modelagem de equações estruturais.

4.2. Objetivos específicos

- Objetivo específico 1: Avaliar a idade epigenética de dependentes de crack em uma abordagem caso-controle, e se fatores ambientais podem atuar como mediador nessa avaliação;
- Objetivo específico 2: Avaliar sítios e regiões diferencialmente metilados entre dependentes de crack e indivíduos controle, assim como vias biológicas relacionadas a genes diferencialmente metilados;
- Objetivo específico 3: Avaliar a idade epigenética de dependentes de crack considerando a exposição dos indivíduos a eventos traumáticos e estressores, e se comorbidades psiquiátricas podem atuar como mediador nessa avaliação;
- Objetivo específico 4: Avaliar sítios e regiões diferencialmente metilados em dependentes de crack a exposição a eventos traumáticos e estressores, assim como vias biológicas relacionadas a genes diferencialmente metilados.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Amostra

5.1.1. Casos

O presente estudo é parte de um estudo epidemiológico concluído em 2014, intitulado “Perfil sociodemográfico e história natural do consumo de crack entre usuários de sete estados brasileiros e do Distrito Federal”, coordenado pelos Professores Ronaldo Laranjeira e Marcelo Ribeiro e com financiamento do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Edital MCT/CNPq Nº 41/2010) ¹. O estudo investigou a história natural do consumo de crack e fatores preditores de permanência e abandono do tratamento de usuários de crack internados para tratamento em comunidades terapêuticas de sete estados brasileiros e do Distrito Federal. Foi aplicada uma entrevista estruturada desenvolvida pela equipe de pesquisadores da Unidade de Pesquisa em Álcool e Drogas (UNIAD) | Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). A descrição detalhada do questionário encontra-se no Anexo A.

As entrevistas foram conduzidas nos primeiros dias após a admissão (internação) dos pacientes para tratamento nas comunidades terapêuticas. Foram entrevistados 653 pacientes que preencheram os critérios da Classificação Internacional de Doenças (CID-10) para dependência de crack. A partir desses, cerca de 542 pacientes aceitaram participar da coleta de material biológico (saliva), assinando um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). As amostras de saliva foram coletadas com o produto comercial *Oragene DNA OG-500 self-collection kit* (DNA Genotek, Ottawa, Ontario, Canada) e o DNA genômico foi extraído de acordo com as recomendações do fabricante.

A partir da amostra total de 542 pacientes, foram excluídos 52 pacientes por terem dados incompletos. Sendo o perfil do usuário de crack composto, em sua maioria, por indivíduos do sexo masculino ⁵⁷, optamos pela seleção desses indivíduos, excluindo da amostra 54 pacientes do sexo feminino. Das 436 amostras restantes, selecionamos os indivíduos que completaram os instrumentos de avaliação de interesse para o projeto (a seleção dos instrumentos será descrita para cada objetivo específico) e que apresentaram material biológico de boa qualidade. Assim, a amostra de casos selecionados para os ensaios de metilação foi constituída por 128 usuários de crack.

¹ <http://www.researchgate.net/publication/283153684>

5.1.2. Controles

O grupo controle é proveniente 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), que conta com mais de 2.000 indivíduos controle. Todos os indivíduos são voluntários que aceitaram se submeter à um questionário para investigação clínica, psiquiátrica e de uso substâncias químicas (fármacos e outras substâncias), e coleta de amostra biológica (sangue periférico ou saliva) para extração de DNA, assinando um TCLE. Para o presente projeto selecionamos indivíduos controle do sexo masculino, cuja amostra biológica coletada para extração de DNA foi a saliva, e que apresentavam as mesmas informações e instrumentos de avaliação do grupo de casos. Foram excluídos indivíduos que apresentavam relato de uso abusivo ou contato recente com drogas de potencial abuso (exceto álcool e cigarro) e alguma condição psiquiátrica atual ou história de internação psiquiátrica em algum momento da vida. A amostra de controles foi constituída por 109 indivíduos.

5.2. Ensaio de metilação do DNA do genoma

As amostras de DNA foram tratadas com bissulfito de sódio, que consiste na conversão de bases citosina não metiladas em uracila, enquanto as bases citosina metiladas permanecem inalteradas, com o kit *EZ DNA methylation* (Zymo Research, Irvine, California, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. O DNA bissulfito convertido foi desnaturado, neutralizado e amplificado por 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, precipitado com isopropanol, recolhido por centrifugação a 4 °C e ressuspenso em tampão. As amostras foram hibridizadas utilizando o ensaio *Infinium MethylationEPIC BeadChip arrays* (850K) (Illumina Inc), seguindo o protocolo de metilação *Illumina Infinium HD*.

Este ensaio interroga o status de 853.307 sítios de metilação, dos quais 850.3681 são CpGs, 2.280 não-CpGs e 59 são sondas de controle. Em relação à distribuição

genômica, 25,8% CpGs estão localizados em regiões promotoras, sendo 16% nos sítios de início da transcrição TSS200 e TSS1500, 9,4% em 5' UTR e 0,4% no primeiro éxon. Por fim, 40% CpGs estão localizados no corpo dos genes, 0,9% em 3' UTR e 33,3% em regiões intergênicas. A cobertura relacionada às ilhas CpG está dividida em 5,4% CpGs em ilhas, 16,4% em *shores e shelves* e 78,2% em regiões ‘*open sea*’¹⁴.

5.3. Análise da metilação do DNA

Os sinais de metilação do DNA digitalizadas no *scanner iScan Microarray Scanner (Illumina Inc)*, chamados de arquivos IDAT, foram obtidos através do software *GenomeStudio* (v.2011.1) (*Illumina Inc*) e as sondas foram anotadas utilizando o pacote *IlluminaHumanMethylationEPICanno.ilm10b2.hg19*^{II}. Os dados de metilação de DNA foram analisados no software R (*R Project for Statistical Computing Core Team*^{III}) utilizando o pacote *minfi*¹¹², disponível no projeto Bioconductor^{IV}. Na etapa de controle de qualidade foram removidas 17.587 sondas por apresentarem baixa detecção de fluorescência (p-valor >0,01), 27.017 sondas localizadas em SNPs (*Single nucleotide polymorphisms/* Polimorfismo de nucleotídeo único) (de acordo com o banco de dados dbSNP) e 40.500 sondas ‘*cross-reactive*’, sondas de reatividade cruzada que têm como alvo sequências repetitivas ou que co-hibridizam com sequências alternativas homólogas aos alvos pretendidos^{113,114}. Vinte e uma amostras foram excluídas por apresentarem baixa qualidade de hibridização, permanecendo assim 781.732 sondas em 216 amostras (118 casos e 98 controles) que foram utilizadas nas análises subsequentes. As intensidades de sinal das sondas *Infinium I* e *Infinium II* foram normalizadas com o método quantil¹¹⁵ e a correção de *background* foi realizada com o método ‘*noob*’ (*Normal-exponential convolution using out-of-band probes*)¹¹⁶. Os efeitos de lote (*array/slide*) foram corrigidos usando a função *ComBat*¹¹⁷ do pacote *ChAMP (Chip Analysis Methylation Pipeline)*¹¹⁸. A composição celular foi estimada usando a função *FlowSorted.Blood.EPIC* conforme implementado no pacote *minfi*¹¹². Para identificar a presença de potenciais fatores de confusão em quaisquer variáveis técnicas e biológicas não computadas na análise, utilizamos o pacote *SVA (Surrogate Variable Analysis)*¹¹⁹.

^{II} DOI: 10.18129/B9.bioc.IlluminaHumanMethylationEPICanno.ilm10b2.hg19

^{III} www.r-project.org

^{IV} <https://www.bioconductor.org/>

Os nível de metilação de cada CpG, chamados de valores Beta (β), assumem valores contínuos entre o intervalo 0 (não metilado) e 1 (completamente metilado), e são calculados pela razão entre os sinais de fluorescência a intensidade da sonda metilada e a intensidade total (soma das sondas metiladas e não metiladas)¹²⁰. As análises de metilação do DNA que serão apresentadas a seguir, para cada Objetivo Específico, foram realizadas a partir dos valores β .

5.4. Objetivo Específico 1

5.4.1. Instrumentos de avaliação

Para compor o banco de dados que seria utilizado para a avaliação deste primeiro objetivo, selecionamos a partir do questionário estruturado as informações e avaliações que foram coletadas tanto para o grupo de casos como para o grupo controle, para garantir que os grupos fossem comparáveis. Assim, selecionamos as variáveis sociodemográficas idade, etnia, escolaridade, estado civil e uso de outras drogas, e os seguintes instrumentos de avaliação:

- *Duke Religion Index (DUREL)*: Escala composta por cinco itens que avaliam a religiosidade por meio de três dimensões. O primeiro item avalia a religiosidade organizacional, referente à frequência que o indivíduo vai à igreja, templo ou outro encontro religioso. O segundo item avalia a religiosidade não organizacional, referente à frequência que o indivíduo dedica o seu tempo a atividades religiosas individuais. Os três últimos itens avaliam, em conjunto, a religiosidade intrínseca, que refere-se ao grau de compromisso ou motivação religiosa do indivíduo quanto à sua religiosidade¹²¹.

- *World Health Organization Quality of Life-Brief instrument (WHOQL-BRIEF)*: Instrumento proposto para avaliar a qualidade de vida dos indivíduos. É composto por duas questões que avaliam a percepção da qualidade de vida e a satisfação com a saúde e 24 facetas que compõem quatro domínios: físico – aborda questões sobre dor, fadiga, desconforto, qualidade do sono e mobilidade; psicológico - aborda aspectos sobre auto-estima, crenças pessoais, sentimentos e capacidades; relações sociais – aborda as relações e suporte social; meio ambiente - aborda questões sobre o ambiente físico, lar e recursos financeiros ¹²².

5.4.2. Estatística descritiva

Para a análise descritiva dos dados sociodemográficos e instrumentos de avaliação dos indivíduos, utilizamos média ($\bar{X}$)/desvio padrão ($\pm DP$). Variáveis categóricas foram avaliadas por distribuição numérica (n) e percentual (%). Para a comparação entre os grupos, variáveis contínuas foram analisadas pelos testes *t-student* e variáveis categóricas foram analisadas utilizando o teste qui-quadrado. As análises estatísticas foram realizadas no software R, considerando a significância estatística de p-valor <0,05 para todas as análises.

5.4.3. Relógio epigenético

A idade epigenética dos indivíduos foi avaliada a partir dos valores β com o método do relógio epigenético descrito por Horvath ³², que estima a idade molecular baseado nos níveis de metilação do DNA. Resumidamente, o método utiliza a média ponderada de 353 sítios CpGs (chamados de ‘*clock CpGs*’) e transforma esse dado no que o autor denomina como ‘idade de metilação’ (ou idade metilômica) através de uma função de calibração. Além da idade metilômica, esse método fornece a aceleração da idade (ou ‘*Age acceleration*’ - AA), que é calculada de duas formas: pela diferença entre a idade epigenética e cronológica dos indivíduos (conhecida como AA ‘*Difference*’), que vamos chamar pela sigla AADiff neste trabalho, e estimada a partir dos resíduos de um modelo de regressão linear da idade epigenética regredida pela idade cronológica (conhecida como AA ‘*Residuals*’), que vamos chamar pela sigla AARes.

5.4.4. Mediação e modelagem de equações estruturais

Para avaliar a relação dos fatores ambientais como mediador na idade epigenética de dependentes de crack, fizemos uma análise de mediação utilizando modelagem de equações estruturais. O modelo conceitual proposto foi definido com a medida de idade epigenética AADiff como variável dependente e os grupos caso e controle como variável independente. Para a variável mediadora, incluímos as variáveis sociodemográficas e os instrumentos de avaliação DUREL e WHOQL-BRIEF como parte de uma variável latente representando os fatores ambientais (Os modelos conceituais propostos e os diagramas de caminhos serão descritos detalhadamente na seção '6. Resultados - 6.1.3. Análise de mediação utilizando modelagem de equações estruturais').

Para avaliação do modelo proposto selecionamos a abordagem descrita por Baron e Kenny ⁸⁸ de análise dos caminhos. Como estimativa de parâmetro selecionamos a máxima verossimilhança (ML - *maximum-likelihood*) por se enquadrar melhor no nosso conjunto de dados ¹²³. Para os índices de ajuste absoluto, selecionamos o teste qui-quadrado (χ^2), razão entre o teste qui-quadrado e graus de liberdade (χ^2/df) ⁹⁷, *Root mean square error of approximation* (RMSEA) ^{98,99} e *Standardised root mean square residual* (SRMR) ⁹⁹. Em relação aos índices de ajuste comparativos, utilizamos ambos *Comparative fit index* (CFI) ^{99,101} e *Tucker Lewis index* (TLI) ¹⁰². Como índices de ajuste de parcimônia utilizamos os índices *Akaike information criterion* (AIC) e *Bayesian Information Criterion* (BIC) ¹⁰³.

A análise de mediação utilizando SEM foi realizada no *software* R utilizando o pacote *lavaan* ¹⁰⁴. Os resultados serão apresentados utilizando coeficientes e erros padronizados.

5.5. Objetivo Específico 2

5.5.1. Análise de metilação diferencial

Para a comparação de metilação do DNA entre os grupos de casos e controles, foi aplicado um modelo linear *Bayesiano* do pacote *limma* ¹²⁴ nos *M values* (*logit* dos valores β), sendo considerados como sítios diferencialmente metilados (DMSs) aqueles com p-valor ajustado (*adjP*) <0,001. Para identificar regiões diferencialmente metiladas

(DMRs) utilizamos o pacote *DMRcate*¹²⁵, considerando significativo FDR (*False discovery rate*) $<0,05$, diferença de metilação entre os grupos ($\Delta\beta$) $\geq 5\%$ e com, no mínimo, quatro CpGs.

Genes diferencialmente metilados, relacionados aos DMSs e DMRs, foram anotados funcionalmente no *ClueGO* (v.2.5.7)¹²⁶, um *plug-in* do software de visualização de redes de interação molecular *Cytoscape* (v.3.7.2)¹²⁷. O *ClueGO* integra termos de ontologia genética (GO – *gene ontology*) e cria uma rede de termos GO e vias biológicas funcionalmente organizadas. O enriquecimento dos genes foi realizado usando o banco de dados *Reactome*¹²⁸ com especificidade média de rede (p-valor $<0,05$). Para correção do p-valor foi utilizado o método BH (*Benjamini-Hochberg*), teste hipergeométrico bilateral e pelo menos cinco genes por categoria. Os termos GO foram repetidamente comparados, combinados em grupos funcionais e visualizados no *Cytoscape*¹²⁷.

5.6. Objetivo Específico 3

5.6.1. Instrumentos de avaliação

Para investigar a idade epigenética de dependentes de crack em relação à exposição dos indivíduos a eventos traumáticos e estressores, separamos o grupo de casos em dois subgrupos: I) Dependentes de crack com “eventos traumáticos” e II) dependentes de crack sem “eventos traumáticos”, de acordo com o instrumento ETISR-SF:

- *Early Trauma Inventory Self Report-Short Form* (ETISR-SF), uma escala que avalia a quantidade de eventos traumáticos e estressores na infância e adolescência. A escala é composta por 27 itens divididos em quatro dimensões: trauma geral, abordando itens como desastres naturais, acidentes, morte e doenças em pessoas próximos, uso de álcool/drogas e transtornos psiquiátricos em membros da família; abuso físico, incluindo tapas, empurrões e outras agressões; abuso emocional, com itens abordando atitudes de outras pessoas com os indivíduos de modo a afetar seu estado emocional; e abuso sexual¹²⁹.

A caracterização de transtornos psiquiátricos foi realizada com o instrumento MINI:

- *Mini International Neuropsychiatric Interview* (MINI): é uma entrevista diagnóstica estruturada que explora de modo padronizado os principais Transtornos Psiquiátricos do Eixo I do DSM-IV (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* - Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais). O MINI é dividido em módulos, cada um correspondendo a uma categoria diagnóstica¹³⁰.

5.6.2. Estatística descritiva

A análise descritiva foi realizada utilizando média/desvio padrão e distribuição numérica/percentual, como descrito anteriormente. A comparação foi realizada entre os subgrupos de dependentes de crack, sendo variáveis contínuas analisadas pelos testes *t-student* ou *U de Mann-Whitney*, conforme distribuição de normalidade avaliada pelo teste *Shapiro-Wilk*, e variáveis categóricas pelo teste qui-quadrado. As análises estatísticas foram realizadas no software R, considerando a significância estatística de p-valor <0,05.

5.6.3. Relógio epigenético

A idade epigenética dos indivíduos foi avaliada a partir dos valores β com o método do relógio epigenético descrito por Horvath³², como descrito anteriormente. Para cumprir o objetivo proposto também foi utilizada a aceleração da idade com as métricas AADiff e AARes.

5.6.4. Mediação e modelagem de equações estruturais

Para avaliar a relação entre a idade epigenética de dependentes de crack, divididos nos subgrupos dependentes de crack com “eventos traumáticos” e dependentes de crack sem “eventos traumáticos”, e se comorbidades psiquiátricas podem atuar como um mediador nessa relação, fizemos uma análise de mediação utilizando SEM. Para isso, criamos um do modelo conceitual considerando medidas de idade epigenética como variável dependente, os subgrupos de dependentes de crack (com “eventos traumáticos”

e sem “eventos traumáticos”) como variável independente e os transtornos psiquiátricos como variável mediadora dentro de um construto latente.

O modelo proposto foi avaliado pela abordagem de análise dos caminhos⁸⁸, a estimativa de parâmetro foi a máxima verossimilhança e os índices de ajuste foram os mesmos descritos para o Objetivo Específico 1, χ^2 , razão χ^2/df ⁹⁷, RMSEA⁹⁸, SRMR⁹⁹, CFI^{99,101}, TLI¹⁰², AIC e BIC¹⁰³, considerando a significância estatística estabelecida para cada índice de ajuste selecionado. A análise foi realizada no software R utilizando o pacote *lavaan*¹⁰⁴.

5.7. Objetivo Específico 4

Para a comparação de metilação do DNA entre os subgrupos de dependentes de crack, utilizamos os mesmos métodos descritos no Objetivo Específico 1, buscando por DMSs (adjP <0,001) e DMRs (FDR <0,05; $\Delta\beta \geq 5\%$; mínimo quatro CpGs). Genes diferencialmente metilados relacionados aos DMSs e DMRs foram anotados funcionalmente no *ClueGO* (v.2.5.7)¹²⁶, *plug-in* do software *Cytoscape* (v.3.7.2)¹²⁷.

5.8. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEP-FMUSP - CAAE 12539113.3.1001.0065/ Parecer 2.670.911).

6. RESULTADOS

6.1. Objetivo Específico 1

6.1.1. Características clínicas e sociodemográficas

A amostra final foi composta por 118 dependentes de crack e 98 controles. As características sociodemográficas são descritas na Tabela 1. Em resumo, casos e controles são todos do sexo masculino, em sua maioria brancos (casos – 65,3% e controles – 49,0%) e com média de idade de 31 ($\pm 7,0$) anos para os casos e 39 ($\pm 11,3$) para os controles. Os casos apresentaram nível educacional mais abaixo, com cerca de 63% tendo completado apenas o ensino fundamental, enquanto para o grupo controle, 50% completaram o ensino médio e 21% o ensino superior. Em relação ao estado civil, a maior parte dos casos se declarou solteiro (67%), enquanto a maior parte dos controles declarou-se casado legalmente (50%). Casos também declararam fazer uso de outras drogas e 52% indivíduos do grupo controle declararam fazer uso de álcool.

Tabela 1. Características sociodemográficas da amostra

		<i>Casos</i> <i>n = 118</i>	<i>Controles</i> <i>n = 98</i>	<i>p-valor</i>
Idade, $\bar{X} \pm DP$		31 $\pm 7,0$	39 $\pm 11,3$	<0,001 ^a
Etnia, n (%)	Branco	77 (65,3)	48 (49,0)	0,016 ^b
	Outros (Negro, Mulato, Pardo ou Asiático)	41 (34,7)	50 (51,0)	
Escolaridade, n (%)	Nunca estudou	-	1 (1,0)	<0,001 ^b
	Ensino fundamental incompleto	25 (21,2)	4 (4,1)	
	Ensino fundamental completo	21 (17,8)	4 (4,1)	
	Ensino médio incompleto	28 (23,7)	19 (19,4)	
	Ensino médio completo	16 (13,6)	31 (31,6)	
	Nível técnico incompleto	9 (7,6)	-	
	Nível técnico completo	13 (11,0)	7 (7,1)	
	Nível superior incompleto	5 (4,2)	11 (11,2)	
Estado civil, n (%)	Solteiro	79 (66,9)	30 (30,6)	<0,001 ^b
	Casado legalmente	12 (10,2)	49 (50,0)	
	Amasiado	15 (12,7)	10 (10,2)	
	Separado/divorciado	12 (10,2)	9 (9,2)	

Legenda: $\bar{X}$ – Média; DP – Desvio padrão

^a Teste t-student; ^b Teste qui-quadrado.

Continua

Tabela 1 (conclusão). Características sociodemográficas da amostra

Uso de drogas, n (%)	Cocaína	92 (77,9)	-	-
	Cannabis	74 (62,7)	-	-
	Cigarro	103 (87,3)	10 (10,2)	<0,001 ^b
	Álcool	98 (83,0)	51 (52,0)	<0,001 ^b
	Outros (Solventes, sedativos) [†]	32 (27,1)	2 (2,0)	<0,001 ^b

^a Teste *t*-student; ^b Teste qui-quadrado.

[†] Uma descrição detalhada sobre os solventes e sedativos listados no questionário estruturado encontra-se no Anexo A.

Em relação à religiosidade, a maior parte dos casos declarou frequentar igreja, templo ou outro encontro religioso ‘Mais do que uma vez por semana’ (30%), mas cerca de 37% declarou dedicar seu tempo à atividades religiosas individuais ‘Poucas vezes por mês’ (Figura 1). Para o grupo controle, 39% dos indivíduos declararam frequentar igreja, templo ou outro encontro religioso ‘Algumas vezes por ano’ e 43% declararam dedicar seu tempo à atividades religiosas individuais ‘Mais do que uma vez ao dia’ (Figura 2). As avaliações religiosidade organizacional e não organizacional apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos (χ^2 : 31,55; p-valor: <0,001 e χ^2 : 32,30; p-valor: <0,001, respectivamente). O grupo de casos apresentou média 6 ($\pm 2,4$) para religiosidade intrínseca, enquanto o grupo controle apresentou média 13 ($\pm 2,8$) (p-valor teste *U de Mann-Whitney*: <0,001).

Figura 1. Avaliação da religiosidade dos dependentes de crack realizada com o instrumento *Duke Religion Index* (DUREL)¹²¹. Os dados são apresentados em n (%). A: Religiosidade organizacional; B: Religiosidade não organizacional.

Figura 2. Avaliação da religiosidade do grupo controle realizada com o instrumento *Duke Religion Index* (DUREL)¹²¹. Os dados são apresentados em n (%). A: Religiosidade organizacional; B: Religiosidade não organizacional.

A avaliação da qualidade de vida mostrou que enquanto 54% dos casos avaliou a própria qualidade de vida como ‘Muito ruim’ ou ‘Ruim’ (29,7% e 24,6%, respectivamente) (Figura 3), 66% dos controles avaliou sua qualidade de vida como ‘Boa’ (Figura 4) (χ^2 : 82,53; p-valor: <0,001). Na avaliação de satisfação com a saúde, ambos os grupos declararam estar ‘Satisfeitos’, sendo 34% dos casos e 54% dos controles (Figuras 3 e 4) (χ^2 : 50,28; p-valor: <0,001). Em relação à avaliação dos domínios de qualidade de vida, o domínio ‘Físico’ se destacou com maior média para os casos ($16 \pm 2,8$) e o domínio ‘Meio ambiente’ com menor média para o grupo controle ($14 \pm 2,3$), mas apenas os domínios ‘Psicológico’ e ‘Relações sociais’ apresentaram diferença significativa entre os grupos (Tabela 2).

Figura 3. Avaliação de qualidade de vida dos dependentes de crack realizada com o instrumento *World Health Organization Quality of Life-Brief instrument* (WHOQL-BRIEF)¹²². Os dados são apresentados em n (%). A: Avaliação de qualidade de vida; B: Satisfação com a saúde.

Figura 4. Avaliação de qualidade de vida do grupo controle realizada com o instrumento *World Health Organization Quality of Life-Brief instrument* (WHOQL-BRIEF)¹²². Os dados são apresentados em n (%). A: Avaliação de qualidade de vida; B: Satisfação com a saúde.

Tabela 2. Avaliação de Domínios de qualidade de vida (WHOQL-BRIEF)^a

Domínio	Casos				Controles				p-valor ^b
	$\bar{X} \pm DP$	Md	Min	Max	$\bar{X} \pm DP$	Md	Min	Max	
Físico	16 ± 2,8	17	6	20	16 ± 2,3	16	9	20	0,445
Psicológico	14 ± 2,8	15	6	19	15 ± 1,8	15	8	20	0,019
Relações Sociais	14 ± 3,3	15	4	20	16 ± 2,8	16	7	20	<0,001
Meio Ambiente	14 ± 2,6	14	6	20	14 ± 2,3	13	4	18	0,122

Legenda: $\bar{X}$ – Média; DP – Desvio padrão; Md – Mediana; Min – Valor mínimo; Max – Valor máximo.

^a WHOQL-BRIEF - World Health Organization Quality of Life-Brief instrument

^b Teste U de Mann-Whitney

6.1.2. Avaliação da idade metilômica e aceleração de idade

A análise do relógio epigenético revelou que dependentes de crack apresentaram idade metilômica significativamente maior do que o grupo controle (p-valor: <0,001) (Figura 5B). Casos apresentaram média de idade cronológica de 31 ($\pm 7,0$) anos e tiveram um aumento de 6 anos para idade metilômica (37 $\pm 6,7$), enquanto o grupo controle apresentou aumento de apenas 2 anos, com 39 ($\pm 11,3$) de idade cronológica e 41 ($\pm 9,0$) de idade metilômica. No mesmo sentido, a proporção de indivíduos que apresentou idade metilômica mais velha do que a cronológica foi de 92% para o grupo de casos e 61% para o grupo controle (χ^2 : 30,5; p-valor: <0,001). Esse resultado é evidenciado pela aceleração de idade (AA), no qual observamos que os casos apresentaram AADiff maior do que o grupo controle (p-valor: <0,001) (Figura 5C). O

grupo de casos também apresentou envelhecimento maior em relação à AARes, embora nenhuma diferença estatística tenha sido observada (p-valor: 0,180) (Figura 5D).

Figura 5. Avaliação da idade epigenética entre dependentes de crack e controles. A: Idade cronológica.; B: Idade metilômica; C: Age acceleration Difference; D: Age acceleration Residuals.

6.1.3. Análise de mediação utilizando modelagem de equações estruturais

O primeiro passo para a avaliação da relação dos fatores ambientais como mediador na idade epigenética dos dependentes de crack foi a construção dos modelos conceituais. A construção dos modelos foi baseada tanto em premissas da literatura quanto nos resultados obtidos na avaliação da idade epigenética. Como citado para o objetivo proposto, definimos os grupos caso e controle como variável independente e AADiff como variável dependente. Esse primeiro modelo foi utilizado para avaliarmos o efeito total (c) entre essas variáveis antes da inclusão da variável mediadora (Figura 6A).

No segundo modelo conceitual, a proposta foi incluir a variável mediadora para avaliar como esta poderia estar influenciando no efeito da variável independente sobre a

variável dependente. Para isso, propusemos a variável mediadora como uma variável latente, englobando os fatores ambientais já relacionados na literatura, e disponíveis na nossa amostra, com a dependência de crack. Primeiro, criamos variáveis latentes para cada dimensão de dados da nossa amostra: ‘Sociodemográfico’ – incluindo etnia, escolaridade e estado civil; ‘Drogas’ – incluindo o uso de álcool, cigarro e outras drogas (Solventes e sedativos); ‘WHOQL-BRIEF’ – incluindo a avaliação de qualidade de vida, satisfação com a saúde e os quatro domínios de qualidade de vida (Físico, psicológico, relações sociais e meio ambiente. Essas três variáveis latentes integraram a variável latente principal ‘Fatores ambientais’. Na escala DUREL é indicado que as dimensões de religiosidade não sejam avaliadas em conjunto, como um escore total, mas analisadas separadamente ¹²¹. Assim, relacionamos cada dimensão (religiosidade organizacional, religiosidade não organizacional e religiosidade intrínseca) diretamente com a variável latente principal ‘Fatores ambientais’. A variável latente ‘Fatores ambientais’ foi incluída no modelo conceitual como variável mediadora para avaliarmos os efeitos indiretos (a - impacto da variável independente na variável mediadora; b - impacto da variável mediadora na variável dependente) e efeito direto (c’ - efeito causal direto da variável independente sobre a variável dependente controlado pela variável mediadora) (Figura 6B).

Um terceiro modelo conceitual foi proposto, também incluindo a variável mediadora como uma variável latente. Mas, para esse modelo, ao invés de utilizarmos diferentes variáveis latentes para cada dimensão de dados da nossa amostra, relacionamos todos os fatores ambientais diretamente com a variável latente principal ‘Fatores ambientais’. Como citado para o segundo modelo, essa variável latente ‘Fatores ambientais’ foi incluída no modelo conceitual como variável mediadora para avaliarmos seus efeitos direto e indiretos (Figura 6C).

Visto que AADiff é a diferença entre a idade metilômica e a idade cronológica dos indivíduos, a variável idade não foi incluída no modelo, pois esta estaria sendo medida duas vezes na análise.

Figura 6. Modelos conceituais propostos para a análise de mediação utilizando modelagem de equações estruturais. A: Modelo conceitual 1 - Avaliação do efeito total (c) do uso de crack na AADiff; B: Modelo conceitual 2 - Construção da variável latente 'Fatores ambientais' como mediadora. Avaliação dos efeitos indiretos (a - impacto do uso de crack na variável mediadora; b - impacto da variável mediadora na AADiff) e efeito direto (c' - efeito causal do uso de crack na AADiff controlado pela variável mediadora); C: Modelo conceitual 3 - Construção da variável latente 'Fatores ambientais' como mediadora. Avaliação dos efeitos indiretos (a e b) e efeito direto (c'); ε: Erro padrão.

Na avaliação do modelo conceitual 1, observamos um coeficiente de associação de efeito total (c) de 0,31 do uso de crack na AADiff (p-valor: 0,013) (Figura 7).

Figura 7. Avaliação do modelo conceitual 1 com efeito total (c) de 0,31 do uso de crack na AADiff.

Na avaliação inicial do modelo conceitual 2, o modelo proposto não se adequou ao nosso conjunto de dados, considerando os índices de ajuste do modelo (*dados não mostrados*). Assim, para a composição do modelo final, readequamos o modelo conceitual 2 fazendo alterações nas relações entre variáveis observadas e variáveis latentes e definimos as covariâncias entre as variáveis utilizadas na composição do modelo através dos índices de modificação (Figura 8). As variáveis escolaridade e estado civil foram retiradas do modelo, enquanto as variáveis uso de álcool, cigarro e outras drogas foram incorporadas na variável latente ‘Sociodemográfico’. E, a variável avaliação de qualidade de vida foi retirada do construto latente ‘WHOQL-BRIEF’.

Para uma melhor visualização do modelo final, as covariâncias são apresentadas separadamente na figura 9.

O modelo final se ajustou adequadamente aos dados da amostra de acordo com os índices de ajuste (Tabela 3). Podemos observar que o p-valor do χ^2 não atendeu ao valor de referência, enquanto todos os outros índices de ajuste satisfizeram às suas referências. Isso pode ser explicado pelo fato que o valor de χ^2 é diretamente influenciado pelo número amostral e complexidade do modelo. Assim, tendo em vista o modelo complexo proposto, o ajuste do p-valor do χ^2 poderia ser melhorado com um número amostral maior.

Figura 8. Modelo final apresentado para o modelo conceitual 2. Para cada caminho são apresentados os coeficientes de associação e o p-valor correspondente (entre parênteses). a: Efeito indireto do uso de crack na variável mediadora latente 'Fatores ambientais'; b: Efeito indireto da variável mediadora latente 'Fatores ambientais' na AADiff; c': Efeito direto do uso de crack na AADiff mediado pela variável latente 'Fatores ambientais'. *: *Baseline* na análise de associação.

Figura 9. Covariâncias entre as variáveis utilizadas na composição do modelo final apresentado para o modelo conceitual 2.

Tabela 3. Índices de ajuste da análise de mediação utilizando modelagem de equações estruturais do modelo final apresentado para o modelo conceitual 2

Índices	χ^2 (p-valor)	df	χ^2/df	RMSEA (IC ^a)	SRMR	CFI	TLI	AIC	BIC
Modelo final 2	112.14 (<0,001)	56	2,0	0,06 (0,5 - 0,9)	0,08	0,95	0,92	9541.45	9706.84

Nota. Valores de referência: χ^2 - p-valor >0,05; χ^2/df - entre 0 e 2: bom; RMSEA - entre 0,05 e 0,08: adequado; SRMR - <0,10: aceitável; CFI - $\geq 0,95$; TLI - $\geq 0,90$.

Legenda: df - graus de liberdade; RMSEA - Root mean square error of approximation; SRMR - Standardised root mean square residual; CFI - Comparative fit index; TLI - Tucker Lewis index; AIC - Akaike information criterion; BIC - Bayesian Information Criterion.

^a IC: Intervalo de confiança de 90%

Quanto à avaliação da mediação, observamos um coeficiente de associação de efeito indireto do uso de crack na variável mediadora latente ‘Fatores ambientais’ (a) de -0,59 (p-valor: 0,054) e coeficiente de efeito indireto da variável mediadora latente ‘Fatores ambientais’ na AADiff (b) de -0,08 (p-valor: 0,034). O efeito causal direto (c’) do uso de crack na AADiff mediado pela variável latente ‘Fatores ambientais’ apresentou um coeficiente de associação de 0,26 (p-valor: <0,001). No entanto, mesmo com o efeito direto (c’) tendo apresentado um coeficiente estatisticamente significativo, sugerindo um efeito de mediação parcial, de acordo com o método utilizado de análise dos caminhos, quando um dos caminhos de efeito indireto (a ou b) ou efeito direto (c’) não é significativo (p-valor <0,05), deve-se concluir que não existe um efeito de mediação^{88,131}.

Na avaliação do modelo conceitual 3, no qual a variável latente principal ‘Fatores ambientais’ foi composta por todos os fatores ambientais, sem o uso de outras variáveis latentes, observamos que o modelo proposto também não se adequou ao nosso conjunto de dados (*dados não mostrados*). Readequamos o modelo fazendo alterações nas variáveis observadas e definimos as covariâncias entre as variáveis utilizadas na composição do modelo através dos índices de modificação (Figura 10).

Figura 10. Modelo final apresentado para o modelo conceitual 3. Para cada caminho são apresentados os coeficientes de associação e o p-valor correspondente (entre parênteses). a: Efeito indireto do uso de crack na variável mediadora latente ‘Fatores ambientais’; b: Efeito indireto da variável mediadora latente ‘Fatores ambientais’ na AADiff; c’: Efeito direto do uso de crack na AADiff mediado pela variável latente ‘Fatores ambientais’. Setas na cor ‘azul’ indicam a covariância entre as variáveis. *: *Baseline* na análise de associação.

Para o modelo final 3 foram retiradas as variáveis religiosidade organizacional e não organizacional, meio ambiente e avaliação da qualidade de vida. O modelo se ajustou adequadamente aos dados da amostra de acordo com os índices de ajuste (Tabela 4). Ao contrário do que foi observado no modelo final 2, o p-valor do χ^2 para o modelo final 3 satisfaz sua referência. Considerando que ambos os modelos utilizaram o mesmo número amostral, esse resultado sugere a influência da complexidade do modelo na avaliação desse índice de ajuste. Outro ponto a ser notado refere-se aos demais índices de ajuste observados. Enquanto o modelo final 2 apresentou alguns índices de ajuste considerados como ‘adequados’ (exemplo, RMSEA entre 0,05 e 0,08), o modelo final 3 atingiu os pontos máximos de seus valores de referência. Usando como exemplo o RMSEA, o modelo final 3 foi considerado como bom (RMSEA $\leq 0,05$) e seu intervalo de confiança indica um ajuste exato do modelo aos dados da amostra. O índice de ajuste SRMR também apresentou diferença, sendo considerado como adequado para o modelo final 2 ($< 0,10$) e bom para o modelo final 3 ($< 0,05$).

Tabela 4. Índices de ajuste da análise de mediação utilizando modelagem de equações estruturais do modelo final apresentado para o modelo conceitual 3

Índices	χ^2 (p-valor)	df	χ^2/df	RMSEA (IC ^a)	SRMR	CFI	TLI	AIC	BIC
Modelo final 3	54.83 (0,331)	51	1,0	0,02 (0 - 0,5)	0,05	0,99	0,99	7905.72	8037.36

Nota. Valores de referência: χ^2 - p-valor $> 0,05$; χ^2/df - entre 0 e 2: bom; RMSEA - $\leq 0,05$: bom; SRMR - $< 0,05$: bom; CFI - $\geq 0,95$; TLI - $\geq 0,90$.

Legenda: df - graus de liberdade; RMSEA - Root mean square error of approximation; SRMR - Standardised root mean square residual; CFI - Comparative fit index; TLI - Tucker Lewis index; AIC - Akaike information criterion; BIC - Bayesian Information Criterion.

^a IC: Intervalo de confiança de 90%

Em relação à avaliação de mediação, o efeito indireto do uso de crack na variável mediadora latente ‘Fatores ambientais’ (a) obteve coeficiente de associação de -0,59 (p-valor: $< 0,001$). Observamos que desde a avaliação inicial do modelo conceitual proposto até a definição do modelo final 3, os caminhos indireto ‘b’, referente ao efeito da variável mediadora latente ‘Fatores ambientais’ na AADiff, e direto ‘c’’, referente ao efeito do uso de crack na AADiff mediado pela variável latente ‘Fatores ambientais’, não demonstraram significância estatística, mesmo após diversas readequações do

modelo conceitual. Os coeficientes de associação dos efeitos indireto (b) e direto (c') foram de -0,48 (p-valor: 0,165) e -0,14 (p-valor: 0,667), respectivamente. Esse resultado sugere que o uso de variáveis latentes englobando diferentes dimensões de dados, como utilizado no modelo final 2, pode dimensionar os efeitos de associação entre as variáveis observadas. Assim, apesar de o modelo final 3 atender a todos os índices de ajuste adequadamente, resultando em um ajuste exato do modelo proposto aos dados da amostra, não foi possível estabelecer uma relação dos fatores ambientais como mediador da dependência de crack na aceleração da idade metilômica. Finalmente, na comparação final dos dois modelos apresentados, o modelo mais plausível, de acordo com os índices de parcimônia AIC e BIC, é o modelo final 3.

6.2. Objetivo Específico 2

6.2.1. *Sítios e regiões diferencialmente metilados em dependentes de crack*

Na análise de metilação diferencial, para controlar os efeitos dos fatores ambientais, incluímos as variáveis clínicas e sociodemográficas como co-variáveis no modelo linear *bayesiano* de identificação de sítios diferencialmente metilados (DMSs) e regiões diferencialmente metiladas (DMRs) entre dependentes de crack e controles. Foram identificados 597 (DMSs) (adjP <0,001) (Figura 11), relacionados à 385 genes.

Desses DMSs, 262 estão hipometilados e 335 hipermetilados (casos em relação a controles) (Figura 12). A lista completa de DMSs é apresentada no Anexo B. Na tabela 5 apresentamos os DMSs com maior diferença de metilação ($\Delta\beta \geq 15\%$).

Figura 11. *Manhattan plot* mostrando a distribuição dos sítios de metilação entre dependentes de crack e controles. No eixo Y está representado o $-\log_{10}$ do p-valor e no eixo X os cromossomos. A linha vermelha representa o p-valor ajustado $<0,001$ para identificação dos sítios diferencialmente metilados.

Figura 12. *Volcano plot* mostrando a distribuição dos sítios de metilação entre dependentes de crack e controles em relação ao status de metilação - azul: Hipometilado; rosa: Hipermetilado. No eixo Y está representado o $-\log_{10}$ do p-valor e no eixo X os valores $\Delta\beta$. A linha vermelha representa o p-valor ajustado $<0,001$ para identificação dos sítios diferencialmente metilados.

Tabela 5. Sítios diferencialmente metilados (DMSs) com maior diferença de metilação entre dependentes de crack e controles

Probe ID	adjP	$\Delta\beta$	Coord. genômica (hg19)	Gene	Relação ao gene e ilha CpG
cg03382291	5.34E-04	-0.192	chr5:147580954	<i>SPINK6</i>	TSS1500 - <i>open sea</i>
cg25747320	4.70E-04	-0.183	chr14:31043362	<i>G2E3</i>	5'UTR - <i>open sea</i>
cg08267336	7.24E-04	-0.176	chr1:167298149	<i>POU2F1</i>	TSS200 - <i>open sea</i>
cg23577610	3.73E-04	-0.171	chr1:172078666	<i>DNM3</i>	Corpo do gene - <i>open sea</i>
cg00816480	5.03E-04	-0.167	chr12:70711895	<i>CNOT2</i>	Corpo do gene - <i>open sea</i>
cg05601847	9.95E-04	-0.164	chr4:83826691	<i>THAP9</i>	Corpo do gene - <i>open sea</i>
cg04980099	2.23E-04	-0.157	chr15:63836733	<i>USP3</i>	Corpo do gene - <i>open sea</i>
cg22348755	9.33E-04	-0.151	chr2:191991246	<i>STAT4</i>	Corpo do gene - <i>open sea</i>
cg18929316	5.36E-04	0.150	chr17:46176848	<i>CBX1</i>	5'UTR - <i>shore</i>
cg07703331	6.29E-04	0.155	chr13:21521930	<i>LINC00367</i>	Corpo do gene - <i>shore</i>
cg12839200	2.84E-04	0.156	chr11:71789642	<i>NUMA1</i>	Corpo do gene - <i>shore</i>
cg14818176	8.35E-04	0.159	chr17:73148480	<i>HN1</i>	5'UTR - <i>shore</i>
cg24247939	6.64E-04	0.163	chr2:61292081	<i>KIAA1841</i>	TSS1500 - <i>shore</i>
cg04800864	5.14E-04	0.175	chr22:43541019	<i>IGR</i>	IGR - <i>shore</i>

Legenda: Probe ID - Identificação da sonda; adjP - p-valor ajustado; $\Delta\beta$ - delta beta; chr - Cromossomo; IGR - Região intergênica.

Em relação à distribuição genômica, os DMSs estão distribuídos em regiões promotoras (TSS200, TSS1500, 5' UTR e primeiro éxon), corpo dos genes, 3' UTR e regiões intergênicas (Figura 13). E, em relação à distribuição de acordo com ilhas CpG, em ilhas, *shores*, *shelves* e regiões *open sea* (Figura 14). Podemos observar que cerca de 67% dos DMSs estão distribuídos no corpo de genes e regiões intergênicas (36% e 31%, respectivamente), com maior proporção em regiões *open sea*, que por sua vez, representam 63,5% das DMSs.

A comparação entre casos e controles revelou 15 regiões diferencialmente metiladas (DMRs) ($FDR < 0,05$; $\Delta\beta \geq 5\%$) com, no mínimo, quatro CpGs (Figura 15). Em relação à distribuição das DMRs, observamos que 60% estão distribuídas em regiões promotoras nas margens das ilhas CpG (*shores*) (30%) e em regiões *open sea* (30%) (Tabela 6).

Figura 13. Distribuição genômica dos 597 sítios diferencialmente metilados (DMSs) ($\text{adjP} < 0,001$). Os dados são apresentados em proporção (n) em relação ao *status* de metilação.

Figura 14. Distribuição dos 597 sítios diferencialmente metilados (DMSs) ($\text{adjP} < 0,001$) em relação às ilhas CpG. Os dados são apresentados em proporção (n) em relação ao *status* de metilação.

Figura 15. Representação gráfica das 15 regiões diferentemente metiladas (DMRs) ($FDR < 0,05$; $\Delta\beta \geq 5\%$) entre dependentes de crack (linha vermelha) e controles (linha preta).

Tabela 6. Regiões diferencialmente metiladas (DMRs) entre dependentes de crack e controles

DMR	FDR	$\Delta\beta$	Coord. genômica (hg19)	Gene	Relação ao gene	Relação à ilha CpG	CpGs
DMR_1	6.29E-09	-0.077	chr5:133703519-133703889	<i>CDKL3</i>	TSS1500; 5'UTR	shore	cg00946942; cg10592139; cg12960467; cg23304085
DMR_2	1.14E-04	-0.074	chr1:42384284-42384647	<i>HIVEP3</i>	TSS200; 5'UTR; 1stExon; Corpo do gene	shore	cg03884592; cg05570491; cg11769885; cg14996491; cg15644324; cg15937073; cg23762517; cg26038582
DMR_3	1.47E-09	-0.068	chr13:67802655-67802884	<i>PCDH9</i>	5'UTR; 1stExon	shore	cg05308107; cg14193434; cg26811832; cg27286120
DMR_4	2.29E-05	-0.052	chr12:1025529-1025772	<i>RAD52</i>	Corpo do gene	open sea	cg06357748; cg14602222; cg16884061; cg26282236
DMR_5	1.26E-05	-0.050	chr6:15505345-15506085	<i>JARID2</i>	Corpo do gene	open sea	cg03173502; cg14058851; cg23850913; cg24408769
DMR_6	2.72E-05	0.050	chr15:34516488-34517239	<i>TMEM85;</i> <i>EMC4</i>	TSS200; TSS1500	open sea	cg05180717; cg12949483; cg14433151; cg14560311; cg14847483; cg22549420; cg25494600
DMR_7	3.19E-03	0.051	chr10:29698368-29698462	<i>LOC387647</i>	TSS200	ilha	cg03496709; cg14970695; cg16162391; cg19109608
DMR_8	1.67E-04	0.051	chr17:77478569-77478927	<i>HRNBP3</i>	TSS200; TSS1500	open sea	cg08890067; cg10937408; cg14587335; cg16329014; cg20214871
DMR_9	2.49E-03	0.052	chr17:75789279-75789529	IGR	-	ilha; shore	cg02962952; cg05501509; cg05609335; cg13214295; cg22243109
DMR_10	6.33E-03	0.055	chr18:57566144-57566328	<i>PMAIP1</i>	TSS1500	shore	cg11957475; cg14685305; cg22549408; cg23084705
DMR_11	1.74E-03	0.056	chr14:56777451-56777525	IGR	-	open sea	cg04067042; cg08443549; cg20474450; cg21556470
DMR_12	1.29E-08	0.057	chr3:21792195-21793157	<i>ZNF385D</i>	TSS200; TSS1500; 5'UTR; 1stExon	open sea	cg00485194; cg00687135; cg02920129; cg08023500; cg14550518; cg15160624; cg17024919; cg18267381; cg18503679; cg21436456; cg26077378
DMR_13	3.79E-03	0.058	chr16:81254169-81254407	<i>PKD1L2</i>	TSS200; TSS1500	open sea	cg00674807; cg03406106; cg07091758; cg20109624
DMR_14	4.98E-05	0.063	chr13:111521981-111522314	<i>C13orf29;</i> <i>LINC00346</i>	Corpo do gene	open sea	cg03757805; cg04513422; cg14947070; cg16032841
DMR_15	9.40E-04	0.082	chr4:187125958-187126139	<i>CYP4V2</i>	Corpo do gene	open sea	cg02012338; cg09526685; cg10309005; cg23442198

Legenda: FDR - False discovery rate; $\Delta\beta$ - delta beta; chr - Cromossomo; IGR – Região intergênica.

Para a identificação de vias biológicas na comparação entre casos e controles, os genes diferencialmente metilados relacionados aos DMSs e DMRs foram anotados funcionalmente no *ClueGO* ¹²⁶ com o banco de dados *Reactome* ¹²⁸. Para os genes relacionados aos DMSs identificamos vias biológicas relacionadas às vias de sinalização EGFR (*Epidermal growth factor receptor*), NCAM (*Neural cell adhesion molecule*) e FCERI (*Fc-epsilon receptors*), regulação transcricional pela proteína TP53 (*tumor protein p53*), sinalização pelo receptor MET (também conhecido por HGFR - *hepatocyte growth factor receptor*) e metabolismo de proteínas. Também foram observadas vias de organização de cromatina, inclusive por processos protéicos como a ‘sumoilação’ (SUMO - *Small Ubiquitin-like Modifier*) (Figura 16).

Em relação aos processos biológicos, identificamos vias relacionadas principalmente à sinalização por ERBB (ou EGFR), I- κ B (*Inhibitory kappa B*) e NF- κ B (*Nuclear Factor kappa B*), regulação da atividade de PI3K (*Phosphatidylinositol 3-kinase*), organização da heterocromatina, regulação positiva de expressão gênica e silenciamento gênico por RNA (ácido ribonucleico), via de sinalização de apoptose em resposta ao dano ao DNA e dano ao DNA mediado por sinalização transducional da proteína P53, reorganização do citoesqueleto de actina e organização pós sináptica (Figuras 17 e 18).

Não foram identificados processos e vias biológicas para os genes diferencialmente metilados relacionados aos DMRs.

Figura 16. Vias biológicas identificadas para os genes relacionados aos sítios diferencialmente metilados (DMSs). A: Vias biológicas; B: Vias biológicas não redundantes e porcentagem de genes por via.

Figura 18. Processos biológicos não redundantes identificados para os genes relacionados aos sítios diferencialmente metilados (DMSs) e porcentagem de genes por processo.

6.3. Objetivo Específico 3

6.3.1. Características dos subgrupos de dependentes de crack

O grupo de 118 dependentes de crack foi dividido em dois subgrupos, de acordo com o instrumento ETISR-SF. A escala resultante desse instrumento resulta em um intervalo de 0 (indivíduos não foram submetidos a nenhum evento traumático) à 1 (indivíduos foram submetidos a todos os eventos traumáticos avaliados). Para o presente estudo, das 436 amostras do estudo principal (seção ‘5. Material e métodos – 5.5.1. Casos), além dos critérios de seleção já mencionados, consideramos a escala de eventos traumáticos e estressores. Para selecionar os indivíduos que iam compor os subgrupos, utilizamos os percentis 25 e 75 com o intuito de selecionar os valores extremos da escala. Assim, o subgrupo sem “eventos traumáticos” apresentou um pontuação de eventos traumáticos no intervalo de 1 à 14 ($11 \pm 7,0$; md= 12), enquanto o subgrupo com “eventos traumáticos” apresentou pontuação no intervalo de 20 à 26 ($22 \pm 1,6$; md=22) (Figura 19).

Figura 19. Boxplot mostrando a pontuação final da escala ETISR-SF para os subgrupos de dependentes de crack com e sem “eventos traumáticos”. *: Teste U de Mann-Whitney.

Em relação à avaliação de transtornos psiquiátricos, considerando que depressão e ansiedade são as comorbidades psiquiátricas com maior prevalência no uso/abuso de crack, avaliamos separadamente essas variáveis e, se o indivíduo apresentava mais algum transtorno de com o MINI, consideramos essa comorbidade como ‘outros transtornos’. Podemos observar que indivíduos do subgrupo sem “eventos traumáticos” apresentou mais comorbidade com transtornos psiquiátricos (Tabela 7).

Tabela 7. Características dos subgrupos de dependentes de crack

		<i>Com ‘eventos traumáticos’</i>	<i>Sem ‘eventos traumáticos’</i>	<i>p-valor</i>
		<i>n = 59</i>	<i>n = 59</i>	
Idade, $\bar{X} \pm DP$		32 $\pm$ 7,2	31 $\pm$ 6,8	0,413 ^a
Transtornos	Depressão	19 (32,2)	27 (45,8)	0,131 ^b
Psiquiátricos, n (%)	Ansiedade	11 (18,6)	19 (32,2)	0,091 ^b
	Outros	32 (54,2)	56 (94,9)	<0,001 ^b

^a *t-student*; ^b *Teste qui-quadrado*.

6.3.2. Avaliação da idade metilômica e aceleração de idade

Na análise do relógio epigenético observamos que, assim como na idade cronológica, o grupo com “eventos traumáticos” é um ano mais velho (32 $\pm$ 7,2) do que o grupo sem “eventos traumáticos” (31 $\pm$ 6,7) na idade metilômica (38 $\pm$ 6,6 e 36 $\pm$ 6,7, respectivamente) (p-valor: 0,180) (Figura 20). Esse resultado está em consonância com a AA, no qual observamos AADiff maior no grupo com “eventos traumáticos”, embora nenhuma diferença estatística ter sido observada (p-valor: 0,099) (Figura 20C). Apesar de também não apresentar diferença estatística (p-valor: 0,051), podemos observar que o grupo sem “eventos traumáticos” apresentou AARes negativa (Figura 20D).

Figura 20. Avaliação da idade epigenética entre os subgrupos de dependentes de crack com “eventos traumáticos” e sem “eventos traumáticos”. A: Idade cronológica.; B: Idade metilômica; C: *Age acceleration Difference*; D: *Age acceleration Residuals*.

6.3.3. Análise de mediação utilizando modelagem de equações estruturais

Na construção do modelo conceitual para a avaliação da relação entre a idade epigenética dos subgrupos de dependentes de crack, com “eventos traumáticos” e sem “eventos traumáticos”, definimos inicialmente essas variáveis como dependente e independente, respectivamente. Como não foi observada diferença estatística em ambos AADiff e AARes, definimos dois modelos conceituais para avaliar o efeito total (c) entre essas duas medidas e a variável independente (Figuras 21A e 21B).

Para avaliar comorbidades psiquiátricas como mediador nessa relação, criamos o modelos conceituais, com as variáveis depressão, ansiedade e outros transtornos como componentes de uma variável latente, que vamos chamar de ‘Transtornos psiquiátricos’. Com isso foi possível avaliar os efeitos indiretos (a - impacto da variável independente na variável mediadora; b - impacto da variável mediadora na variável dependente) e efeito direto (c’ - efeito causal direto da variável independente sobre a variável dependente controlado pela variável mediadora) (Figuras 21C e 21D).

Figura 21. Modelos conceituais propostos para a análise de mediação utilizando modelagem de equações estruturais. A: Modelo conceitual 4 - Avaliação do efeito total (c) de eventos traumáticos e estressores na AADiff; B: Modelo conceitual 5 - Avaliação do efeito total (c) de eventos traumáticos e estressores na AARes; C: Modelo conceitual 6 - Construção da variável latente ‘Transtornos psiquiátricos’ como mediadora. Avaliação dos efeitos indiretos (a - eventos traumáticos e estressores na variável mediadora; b - impacto da variável mediadora na AADiff) e efeito direto (c’ - efeito causal de eventos traumáticos e estressores na AADiff controlado pela variável mediadora); D: Modelo conceitual 7 - Construção da variável latente ‘Transtornos psiquiátricos’ como mediadora. Avaliação dos efeitos de eventos traumáticos e estressores na variável mediadora (a), impacto da variável mediadora na AARes (b) e efeito causal de eventos traumáticos e estressores na AARes controlado pela variável mediadora (c’). ϵ : Erro padrão.

Na avaliação do modelo final 4, observamos um coeficiente de associação de efeito total (c) de 0,13 de eventos traumáticos e estressores de dependentes de crack na AADiff, mas sem significância estatística (p-valor: 0,170) (Figura 22A). O mesmo foi observado para o modelo final 5, no qual o coeficiente de efeito total foi de 0,17, mas não significativo (p-valor: 0,055) (Figura 22B).

Figura 22. Modelos finais apresentados para os modelos conceituais 4 e 5. A: Modelo final 4 com efeito total (c) de eventos traumáticos e estressores na AADiff; B: Modelo final 5 com efeito total (c) de eventos traumáticos e estressores na AARes.

O primeiro pressuposto para a análise mediação é que a associação entre as variáveis dependente e independente (efeito total ‘c’) seja significativo, estabelecendo que existe um efeito que pode ser estimado. Como visto, esse pressuposto não foi cumprido e, conseqüentemente, não foi possível dar continuidade à avaliação das relações entre a variável latente mediadora ‘Transtornos psiquiátricos’, as medidas AADiff e AARes e os subgrupos de dependentes de crack com e sem “eventos traumáticos”.

6.4. Objetivo Específico 4

6.4.1. Análise de metilação diferencial

Na análise de metilação diferencial, incluímos como co-variáveis no modelo linear *bayesiano*, além das variáveis clínicas e sociodemográficas, os transtornos psiquiátricos, buscando controlar os efeitos dos fatores ambientais para a identificação de sítios (DMSs) e regiões diferencialmente metiladas (DMRs). No entanto, utilizando os mesmos parâmetros que foram utilizados na análise entre dependentes de crack e controles, não identificamos DMSs (adjP <0,001) e DMRs (FDR <0,05; $\Delta\beta \geq 5\%$) na comparação entre dependentes de crack com e sem “eventos traumáticos”.

7. DISCUSSÃO

A epigenética é um mecanismo dinâmico, capaz de modular a expressão gênica ao longo da vida em resposta a exposições ambientais ¹³². Diferentes abordagens epigenéticas têm sido utilizadas buscando elucidar a influência de fatores genéticos e ambientais em doenças complexas, como a dependência química. Mecanismos como a metilação do DNA estão associados com a plasticidade sináptica e formação da memória, bem como com respostas comportamentais à drogas de abuso ¹³³. No presente estudo, avaliamos não somente a relação entre a dependência de crack e a metilação do DNA, mas também como essa relação pode afetar a idade epigenética dos indivíduos. Os resultados observados serão discutidos a seguir.

7.1. Objetivo Específico 1

Estudos descrevendo o perfil do usuário de crack são realizados no Brasil há muitos anos, englobando diferentes populações, como crianças e adolescentes, estudantes universitários, pessoas em situação de rua, em ambientes de tratamento, entre outros, e em todas as regiões do país. Em sua maioria, os estudos descrevem o perfil do usuário de crack como homens com 30 anos ou menos, solteiros, com baixa escolaridade, desempregados e usuários de múltiplas drogas ^{134,135}. O último levantamento epidemiológico nacional, avaliando cenas de uso do crack, conhecidas como ‘cracolândias’, foi de acordo com o mesmo perfil relatado nos estudos anteriores ⁵⁷. É importante notar que uma característica divergente entre os estudos está relacionada à etnia dos usuários de crack. Enquanto alguns estudos relataram um perfil de usuários de etnia branca, como no nosso caso, outros descreveram os indivíduos em sua maioria de etnia ‘não branca’ (englobando pretos, pardos e mestiços) ^{57,136,137}.

As características da amostra de dependentes de crack utilizada no nosso estudo são condizentes com o perfil de usuários relatado nesses estudos, podendo ser considerada como representativa dessa população. Apesar de a nossa amostra ser proveniente de um estudo com usuários de crack internados para tratamento em comunidades terapêuticas, as características da amostra também são similares aos perfis descritos para dependentes de crack em tratamento, como em comunidades terapêuticas ^{136,138,139}, hospitais psiquiátricos e serviços ambulatoriais ^{66,137,140-143}.

Algumas características relacionadas ao perfil do usuário de crack, como fatores socioeconômicos, baixa escolaridade e uso de outras substâncias, também têm sido

associadas como um fator de risco associado ao uso do crack ⁶⁵. Outras características, como a religiosidade, espiritualidade e baixa qualidade de vida dos indivíduos, também têm sido cada vez mais relatadas como tendo uma forte relação com o uso/abuso de crack ^{78,79}. Em relação à religiosidade, foi demonstrado que usuários que foram mais frequentemente à serviços religiosos apresentavam menos dias de uso de crack ¹⁴⁴ e usuários com maior grau de compromisso quanto à sua religiosidade (religiosidade intrínseca) apresentavam desejo menos intenso pelo uso da droga ⁷⁹.

No presente estudo, os dependentes de crack apresentaram religiosidade intrínseca mais baixa do que o grupo controle. Quanto à dedicação do seu tempo a atividades religiosas individuais, a maioria dos casos relatou dedicar-se a essas atividades poucas vezes por mês. Os dependentes de crack relataram ir mais frequentemente à igreja, templo ou outro encontro religioso comparados ao grupo controle. No entanto, deve-se ressaltar que o tratamento em comunidades terapêuticas possui um forte componente religioso e espiritual, sendo os encontros religiosos parte importante do tratamento, o que pode superestimar esse último dado ⁷⁹. Um estudo avaliando a relação entre a espiritualidade de usuários de drogas e as taxas de remissão e recaída no tratamento para a dependência demonstrou que, para drogas como cocaína, heroína, álcool e maconha, usuários com baixa espiritualidade têm maiores taxas de recaída enquanto usuários com alta espiritualidade têm maiores taxas de remissão. No entanto, esses padrões não foram observados para o uso de crack ¹⁴⁵.

A religiosidade de dependentes de crack também foi relacionada com a qualidade de vida desses indivíduos. Usuários com maior grau de compromisso quanto à sua religiosidade apresentaram melhor qualidade de vida nos domínios físico, psicológico, social e ambiente de vida ⁷⁹. Por outro lado, estudos tem demonstrado que fatores como sexo, idade, estado civil, escolaridade e nível socioeconômico podem interferir negativamente na qualidade de vida dos usuários de crack ¹⁴⁶. Assim como para o nosso estudo, no qual observamos que dependentes de crack relataram sua qualidade de vida como 'ruim' através do instrumento WHOQOL-BREF, outros estudos utilizando esse instrumento observaram o mesmo desfecho, com escores menores da qualidade de vida para os usuários de crack ^{141,143,146}. O instrumento WHOQOL-BREF avalia a qualidade de vida geral, com a percepção do indivíduo sobre a sua posição na vida no contexto da cultura e dos sistemas de valores em que vive e em relação aos seus objetivos, expectativas, padrões e preocupações ¹²². Outro instrumento utilizado na literatura para

a avaliação da qualidade de vida de usuários de crack é o ‘Questionário de Qualidade de Vida SF-36’ (*Short Form Health Survey* 36), que avalia, de forma geral, a qualidade de vida relacionada à saúde, com a percepção do indivíduo sobre os efeitos de uma doença nas dimensões física, mental e social de seu bem-estar ¹⁴⁷. Utilizando esse instrumento, Falck e cols. ¹⁴⁸ observaram associações negativas entre a frequência de uso de crack todas as subescalas do SF-36 (capacidade funcional, estado geral de saúde, vitalidade, aspectos sociais, aspectos emocionais, saúde mental, componente físico, componente mental), exceto para aspectos físicos. Narvaez e cols. ⁵ observaram que usuários de crack apresentaram escores de qualidade de vida inferiores aos da população em geral, correspondendo a piores condições de saúde geral, física, emocional e mental. É interessante notar que 34% dos dependentes de crack da nossa amostra relataram estar satisfeitos quanto à sua saúde, o que, quando comparado ao grupo controle, está de acordo com dados descritos na literatura ¹⁴⁶. Mas, esse dado também traz a suposição de que a satisfação com a saúde desses indivíduos pode ter sido influenciada pelo fato de estarem em tratamento para a dependência durante o preenchimento do questionário, com melhores condições de saúde nesse momento.

As características descritas para a nossa amostra de dependentes de crack têm sido amplamente relacionadas não somente como ‘fatores de risco’ associados ao uso de crack ^{5,67,68}, mas também como contribuintes para um envelhecimento epigenético acelerado ^{21,43,47,50,51,53}. Buscando avaliar o impacto da dependência de crack na idade epigenética, dado que ainda não foi relatado na literatura, e inferir como essa relação pode ser influenciada por fatores ambientais relacionados à dependência, utilizamos modelagem de equações estruturais como um método confirmatório para avaliar essa relação.

Assim, após a avaliação das características da amostra e definição das variáveis que compõem os fatores ambientais no nosso estudo, avaliamos a idade epigenética dos indivíduos. Nossos resultados revelaram que dependentes de crack apresentaram idade metilômica maior do que o grupo controle. Estudos têm demonstrado que a idade metilômica pode prever a idade biológica dos indivíduos de forma mais eficiente do que a idade cronológica, além de prever a expectativa de vida e mortalidade ¹³². Adicionalmente, observamos uma aceleração de idade maior para os dependentes de crack (AADiff), assim como uma aceleração de idade positiva (AARes) comparado ao grupo controle. Uma idade de metilação do DNA acelerada reflete que a idade estimada

do indivíduo é maior do que o esperado (com base na idade cronológica) ^{2,30}. A diferença entre as idades epigenética e cronológica, conhecida como ‘*Age acceleration Difference*’ (AADiff), é também denominada na literatura como ‘aceleração da idade epigenética extrínseca’ e está relacionada com o envelhecimento do sistema imunológico ¹⁴⁹. Valores positivos de AADiff denotam um envelhecimento epigenético acelerado ¹⁴⁹ e, de acordo com nossos resultados, podemos observar que dependentes de crack apresentaram esse envelhecimento epigenético acelerado comparados à indivíduos controle. Já os resíduos de aceleração da idade, definidos como os resíduos de um modelo multivariado que faz a regressão da idade de metilação do DNA prevista na idade cronológica, chamados de ‘*Age acceleration Residuals*’ (AARes) ^{149,150}, são também denominados na literatura como ‘aceleração da idade epigenética intrínseca’. Diferente de AADiff, o cálculo da AARes leva em consideração a contagem celular ¹⁴⁹. Apesar de AARes não apresentar diferença estatisticamente significativa entre dependentes de crack e controles no presente estudo, em conjunto com os demais resultados de maior idade metilômica e AADiff, nossos resultados apresentam evidências de que dependentes de crack são biologicamente mais velhos.

Utilizando uma análise de mediação em um modelo de equações estruturais, observamos que, nos dois modelos finais apresentados (modelos 2 e 3), os fatores ambientais não atuaram como um mediador sobre o impacto da dependência de crack na aceleração de idade dos indivíduos. Em ambos os modelos, os fatores ambientais apresentaram associação negativa com os grupos de estudo e com a aceleração da idade, indicando relações inversas entre essas variáveis. Esse resultado é, no mínimo, curioso, pois as variáveis que englobam a variável latente “Fatores ambientais” foram previamente associadas ao uso de crack e à aceleração de idade epigenética, como citado anteriormente. Assim, era esperado uma associação positiva entre essas variáveis na nossa amostra, mas esse resultado não foi observado.

.

7.2. Objetivo Específico 2

Na análise de metilação diferencial, observamos sítios (DMSs) e regiões diferencialmente metiladas (DMRs) relacionados à dependência de crack. Os DMSs estavam, em sua maioria, hipermetilados e localizados no corpo dos genes, em regiões *open sea*, considerando a relação com ilhas CpG. O genoma humano apresenta um

padrão de hipermetilação, e a maioria dos CpG metilados são encontrados em corpos gênicos e regiões intergênicas ¹⁵¹. Esse padrão é responsável por preservar a integridade do genoma e diz respeito, principalmente, a regiões não gênicas correspondentes à heterocromatina que, por sua vez, está relacionada às vias de manutenção da metilação ¹³². A maioria dos corpos gênicos têm poucos CpGs, mas são extensivamente metilados ^{151,152}. No entanto, enquanto alguns estudos relacionam a metilação do corpo dos genes à transcrição ativa ¹⁵², outros sugerem que essa relação está presente somente em células em divisão, e que em células que não possuem essa característica, como no cérebro, a metilação do corpo do gene não está associada com a expressão do gene ¹⁵³. A metilação do DNA é um processo tecido específico, mas diversos estudos têm observado que a metilação do DNA na saliva é mais semelhante aos padrões de metilação do cérebro quando comparado às correlações entre sangue-cérebro e esfregaço bucal-cérebro, inclusive em estudos avaliando transtornos psiquiátricos ¹⁵⁴⁻¹⁵⁶. Com isso, podemos, possivelmente, estar observando um efeito de silenciamento gênico diante o padrão de metilação de dependentes de crack.

Dentre os DMSs com maior diferença de metilação observados, os DMSs hipermetilados estão presentes em regiões *shore*, que são as margens das ilhas CpG. A hipermetilação dessas regiões está relacionada com a expressão gênica reduzida ¹⁵³. Dois desses DMSs estão no corpo dos genes, mas a maioria está nas regiões promotoras 5'UTR e TSS1500. Em consonância com os dados anteriores, a metilação em regiões promotoras está associada a uma diminuição na transcrição ¹³³. Destacamos dois DMSs relacionados aos genes *CBX1* (*chromobox 1*) e *HN1* (ou *NOTCH1* - *notch receptor 1*). *CBX1* está associado à regulação da transcrição e ao controle epigenético da estrutura da cromatina, especificamente enriquecido na heterocromatina ¹⁵⁷, que é transcricionalmente inativa ⁸. Em consonância, identificamos vias e processos biológicos para os genes relacionados aos DMSs enriquecidos para vias de organização de cromatina, organização da heterocromatina e regulação de expressão e silenciamento gênico. Já o gene *NOTCH1*, relacionado com o fator de crescimento epidérmico (EGF), também está associado ao silenciamento do gene *AKT* (ou *AKT1* - *AKT serine/threonine kinase 1*), que por sua vez inibe a via de sinalização PI3K / AKT ¹⁵⁸. Observamos também o enriquecimento de processos biológicos relacionados à via de sinalização EGFR e regulação da atividade de PI3K. O fator de crescimento epidérmico está envolvido na regulação do desenvolvimento de diversos neurônios cerebrais,

incluindo neurônios dopaminérgicos. Ratos tratados com EGF apresentaram um aumento nas respostas à cocaína ¹⁵⁹. Em humanos, foi observado uma diminuição da expressão de EGFR (ou ERBB) em regiões do cérebro de pacientes com esquizofrenia, transtorno bipolar e depressão maior ¹⁶⁰. A via de sinalização PI3K / AKT foi relacionada ao aumento da atividade cerebral relacionado à recompensa pela ingestão de cocaína em modelos animais ¹⁶¹ à regiões diferencialmente metiladas em dependentes de cocaína e crack ³.

Quanto aos DMSs hipometilados, estes estão presentes, em sua maioria, em regiões intergênicas e *open sea*. Em regiões intergênicas um dos principais papéis da metilação do DNA é reprimir a expressão de elementos genéticos potencialmente nocivos que, se expressos são potencialmente prejudiciais, pois sua replicação e inserção podem levar à interrupção do gene e mutação do DNA ¹⁵³. Além disso, a hipometilação está associada a regiões heterocromáticas do genoma e à perda da integridade da heterocromatina, uma marca do envelhecimento relacionada à realocação da maquinaria epigenética em resposta a danos no DNA. No entanto, para que haja o reparo do DNA, é necessária uma quantidade significativa de remodelação da cromatina nos locais danificados ¹³².

Para os DMSs hipometilados com maior diferença de metilação entre dependentes de crack e controles, a maioria estava localizado no corpo dos genes e em regiões *open sea*. Dentre esses DMSs, destacamos alguns genes que serão descritos à seguir. Primeiro, o gene *G2E3* (*G2/M-phase specific E3 ubiquitin protein ligase*), que tem expressão responsiva a danos no DNA ¹⁶², achado que também foi enriquecido nos processos biológicos. A expressão de *G2E3* relacionada à danos no DNA está associada à regulação de p53 ¹⁶³, uma proteína responsável por manter a integridade do genoma ¹⁶⁴, mas também relacionada ao relaxamento de heterocromatina ¹³². p53 é um componente celular chave no controle da expressão gênica e sua atividade pode determinar como as células funcionam e respondem aos ambientes celulares ¹⁶⁵. Além disso, desempenha um papel importante na indução de estresse oxidativo e apoptose e sua depleção foi associada à diminuição da hepatotoxicidade induzida por cocaína em camundongos ¹⁶⁶ e proteção contra comportamentos de *kindling* (comportamento convulsivo) induzidos por cocaína ¹⁶⁷. O comportamentos de *kindling* induzido por cocaína aumenta a expressão de p53 no cérebro de camundongos, mais precisamente no hipocampo ¹⁶⁷. Curiosamente, identificamos em nossos resultados o gene *USP3*

(*ubiquitin specific peptidase 3*), relacionado a um DMS hipometilado com maior diferença de metilação, que interage com p53 e regula sua estabilidade. USP3 é um modificador de cromatina necessário para a estabilidade do genoma¹⁶⁸. A depleção de USP3 leva à degradação acelerada de p53 e sua reconstituição restaura a estabilidade da proteína¹⁶⁴. Esse gene também está relacionado com a ubiquitinação de proteínas SUMOizadas para modular suas funções, que por sua vez são enriquecidas em sítios locais de dano ao DNA¹⁶⁹. Outro gene hipometilado relacionado à DMS, e também associado à regulação de p53, é o *DNM3 (dinamina 3)*¹⁷⁰. Esse gene está envolvido na endocitose da vesícula sináptica¹⁷¹ e atinge expressão máxima no sistema nervoso central¹⁷², tendo sido previamente envolvido em transtornos psiquiátricos como transtorno obsessivo compulsivo e esquizofrenia¹⁷¹. Por fim, destacamos o gene hipometilado *STAT4 (signal transducer and activator of transcription 4)*, que atua como ativador da transcrição e é essencial na mediação de respostas inflamatórias através da via de sinalização JAK (*Janus quinase*) / STAT (*signal transducer and activator of transcription*)¹⁷³.

Resposta inflamatórias também estão relacionadas com as via de sinalização e processos biológicos enriquecidos em nossos resultados, como a via de sinalização FCERI, sinalização por NF-κB e atividade de PI3K¹⁷⁴. A via de sinalização PI3K, em especial, está envolvida na sobrevivência dos neurônios após estimulação com IL-18 (Interleucina 18)¹⁷⁵. Em relação à dependência de crack, foi observado que TNF-α (*Tumor Necrosis Factor –Alpha*), uma citocina pró-inflamatória¹⁷⁶, estava mais elevada em dependentes de crack com histórico de estresse precoce quando comparados à dependentes de crack sem esse histórico, além de prever positivamente a gravidade da abstinência¹⁷⁷. Em modelos animais, foi observado que NF-κB está associado com alterações no córtex pré-frontal de camundongos expostos repetidamente à cocaína¹⁷⁸. Além disso, NF-κB foi associado à neurotoxicidade induzida pela cocaína¹⁷⁹.

Em relação às DMRs identificadas no nosso estudo, a maioria estava hipermetilada em regiões promotoras, relacionada com ativação transcricional¹⁸⁰, e regiões *open sea*. E, apesar de não terem sido identificados processos e vias biológicas para os genes diferencialmente metilados relacionados às DMRs, esses genes estão relacionados a processos enriquecidos observados para os genes relacionados às DMSs no nosso estudo. Os genes *PMAIP1 (phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1)* e *LINC00346 (ou PRECSIT - p53 regulated carcinoma associated Stat3 activating long*

intergenic non-protein coding transcript), por exemplo, estão relacionados com apoptose induzida por p53 em células com DNA danificado^{181,182}, o que corrobora com o enriquecimento da via de sinalização de apoptose em resposta à dano ao DNA e dano ao DNA mediado por sinalização transducional da proteína p53. O gene *HIVEP3* (*HIVEP zinc finger 3*), atua como um fator de transcrição e é capaz de regular a transcrição mediada pelo NF-κB¹⁸³, outra via de sinalização enriquecida no nosso estudo. Finalmente, o gene *HRNBP3* – (*RBFOX3 RNA binding fox-1 homolog 3*), responsável pela produção do antígeno de núcleos neuronais (NeuN), tem sua maior expressão no sistema nervoso central e desempenha um papel proeminente no desenvolvimento do tecido neural e na regulação da função cerebral do adulto¹⁸⁴. Em nossos resultados, observamos o enriquecimento da via de sinalização NCAM, uma molécula de adesão de células neurais relacionada a diversos distúrbios neuropsiquiátricos em humanos. Em modelos animais, NCAM está associada à alterações comportamentais e ativação do córtex pré-frontal e do núcleo accumbens de camundongos em resposta aos efeitos da cocaína¹⁸⁵.

Comparando nossos achados com um estudo anterior que avaliou o padrão de metilação do DNA em dependentes de cocaína e crack³, observamos similaridades em genes e processos biológicos. Em relação às DMSs, observamos similaridade para os genes *TGFBR3* (*transforming growth factor, beta receptor III*) e *MAPK1* (*mitogen-activated protein kinase 1*), ambos hipometilados nos dois estudos. O gene *MAPK1*, em particular, faz parte da via MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), que é ativada pelo aumento na dopamina extracelular no estriado em resposta ao abuso de cocaína e desempenha um papel importante na regulação gênica por ativação direta de fatores de transcrição e remodelação da cromatina¹⁸⁶. O gene relacionado à DMR, *PCDH9* (*protocadherin 9*), também apresentou hipometilação em ambos os estudos. Esse gene tem um importante papel na adesão e reconhecimento celular e está associado com efeitos protetores contra a citotoxicidade induzida por cocaína em cérebro de ratos¹⁸⁷. Esse dado sugere que a hipometilação em genes relacionados à via MAPK e adesão e reconhecimento celular podem estar diretamente associadas à dependência de crack. Assim como o envolvimento das vias de sinalização PI3K / AKT e EGFR, como citado anteriormente.

7.3. Objetivos Específicos 3 e 4

A exposição ao estresse e a presença de transtornos psiquiátricos são reconhecidos como fatores relacionados à vulnerabilidade para a dependência química, inclusive para a dependência de crack. Diversos estudos relatam que experiências traumáticas no início da vida podem estar correlacionadas com um risco aumentado de uso de substâncias^{69,70}. O uso de crack foi relacionado, por exemplo, à situações de negligência e abuso emocional na infância, negligência e abuso físico, e abuso sexual^{66,72}. Grande parte dos estudos busca associar, além da exposição ao estresse, a presença de transtornos psiquiátricos relacionados ao uso do crack^{67,72,73}. A presença de um segundo diagnóstico psiquiátrico é comum entre usuários de cocaína e crack e pode aumentar a gravidade de ambas as doenças¹³⁴. Os transtornos mais prevalentes relacionados à dependência de crack são os transtornos de humor, como a ansiedade e a depressão^{66,74,138,139,142,188,189}, sendo esse último também relacionado como um sintoma secundário ao consumo da droga⁷⁶. Diante desse cenário, consideramos a importância de avaliar os dependentes de crack da nossa amostra em relação a exposição a eventos traumáticos e a presença de depressão, ansiedade e outros transtornos psiquiátricos. Para isso, consideramos a utilização de uma análise de mediação em um modelo de equações estruturais, que nos proporcionaria inferir o impacto de eventos traumáticos e estressores na idade epigenética dependentes de crack, dado que ainda não foi relatado na literatura, e como transtornos psiquiátricos poderiam mediar essa relação.

Na avaliação da idade epigenética da nossa amostra, não foi possível observar diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos para a idade metilômica e aceleração de idade. Apesar de o subgrupo sem “eventos traumáticos” apresentar AARes negativa, que pode estar relacionada à um envelhecimento epigenético mais lento do que o esperado^{149,150}. Curiosamente, esse grupo apresentou maior comorbidade com transtornos psiquiátricos em todas as categorias utilizadas. No entanto, esse dado difere da literatura, pois as maiores associações encontradas com comorbidade psiquiátricas estão relacionadas com a presença de trauma e/ou estresse na infância^{67,73,74}. Deve-se considerar que, diferente de outros estudos que avaliam se os indivíduos tiveram ou não traumas na infância, o instrumento utilizado no nosso estudo (ETISR-SF) avalia apenas a quantidade de eventos considerados como traumáticos e estressores vivenciados pelos indivíduos, não sendo capaz de determinar se os indivíduos são acometidos por traumas ou não¹²⁹. Essa questão também pode ter refletido na relação

entre os subgrupos de dependentes de crack e as medidas de aceleração de idade AADiff e AARes, na qual não foi possível observar associação entre essas variáveis. Sendo essa associação o pressuposto inicial para a realização da análise de mediação, esta não pôde ser realizada, inviabilizando a observação dos transtornos psiquiátricos como mediador, como era proposto para esse objetivo.

Contudo, destacamos um estudo realizado por Levandowski e cols.¹⁹⁰, que utilizou outra medida biológica para avaliar o impacto do uso do crack na senescência celular de mulheres dependentes, bem como a associação do crack ao estresse precoce, o comprimento telomérico. Os pesquisadores observaram que o grupo de dependentes de crack com estresse precoce tinha telômeros significativamente mais curtos do que o grupo de dependentes sem essa condição associada. Além disso, o comprimento telomérico foi negativamente correlacionado com abuso emocional. Embora seja amplamente relatado que o envelhecimento epigenético não está associado à senescência celular^{191,192}, estudos recentes têm relacionado ambas as medidas. Um estudo com adolescentes saudáveis mostrou que níveis mais baixos de metilação global do DNA estão associados a comprimentos de telômeros mais curtos na juventude¹⁹³. Outro estudo, avaliando cerca de 5.700 indivíduos, observou relações altamente significativas entre os níveis de metilação do DNA de 823 sítios CpG e o comprimento telomérico dos indivíduos¹⁹⁴. Chen e cols.¹⁹⁵ relatam que tanto o comprimento dos telômeros quanto a idade de metilação do DNA estão fortemente associados à idade cronológica.

Por fim, dados da literatura mostram que situações como estresse e negligência podem impactar nos padrões de metilação do DNA^{196,197}. Adversidades no início da vida, que aumentam o risco de distúrbios comportamentais na idade adulta, são governados pela metilação do DNA¹⁹⁶. Porém, na análise de metilação diferencial do nosso estudo, não foram observadas diferenças na metilação do DNA entre os subgrupos de dependentes de crack com e sem “eventos traumáticos”.

8. CONCLUSÃO

A metilação do DNA tem sido amplamente estudada no contexto das interações gene-ambiente. Como um processo altamente dinâmico, a metilação do DNA sofre alterações associadas a diversos fatores ambientais, como o uso/abuso de substâncias. No presente estudo observamos que a dependência de crack está relacionada à uma aceleração de idade positiva, que reflete que o uso da droga faz com que esses indivíduos apresentem um envelhecimento biológico acelerado comparados à indivíduos controle. Observamos também diferenças significativas no padrão de metilação do DNA de dependentes de crack, sendo a maioria possivelmente relacionada à um silenciamento gênico.

Observamos vias e processos biológicos previamente relacionados à dependência de cocaína e crack, como à via MAPK, via de sinalização PI3K / AKT e EGFR, e adesão e reconhecimento celular, o que reforça a importante relação dessas vias com o mecanismo genético-molecular da dependência de crack. Visto que a metilação do DNA avaliada em saliva é correlacionada aos padrões de metilação observados no cérebro, nossos resultados contribuem para um melhor entendimento da neurobiologia da dependência de crack.

Mudanças epigenéticas são, de forma geral, mecanismos reversíveis e trazem a perspectiva de que as estimativas de idade de metilação do DNA podem ser úteis para identificar ou validar intervenções. Adicionalmente, a identificação de biomarcadores de metilação do DNA na dependência de crack pode contribuir com soluções mais eficazes de prevenção, diagnóstico e tratamento da dependência.

9. ANEXOS

9.1. ANEXO A

Perfil sociodemográfico e história natural do consumo de crack entre usuários de sete estados brasileiros e do Distrito Federal

Coordenação Geral: Prof. Ronaldo Laranjeira

Coordenação Executiva: Prof. Marcelo Ribeiro de Araújo

Trata-se de um estudo observacional e prognóstico interessado na aferição de desfechos relacionados ao consumo de crack. Os principais objetivos desse estudo foram: observar a evolução do consumo de crack em coortes de usuários internados para tratamento em comunidades terapêuticas de sete estados brasileiros e do Distrito Federal - a maioria delas filiadas à Federação Brasileira de Comunidades Terapêuticas (FEBRACT), considerando como parâmetro a história natural do uso da substância; avaliar a relação entre as variáveis demográficas e de padrão consumo de crack e os desfechos de mau prognóstico, tais como manutenção do consumo de crack; avaliar os fatores de proteção e risco envolvidos tanto na evolução do consumo de crack, quanto na busca e adesão ao tratamento.

Uma entrevista estruturada foi desenvolvida pela equipe de pesquisadores da Unidade de Pesquisa em Álcool e Drogas (UNIAD) | Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), com o intuito de abordar aspectos relevantes da evolução dos pacientes estudados. O questionário estruturado foi dividido nas seguintes seções:

A) Estágios da vida e dados pessoais – Incluindo questões sociodemográficas, situação atual de moradia, convívio e relacionamento com os pais biológicos, adotivos ou cuidadores durante a infância e adolescência (quando o caso, convívio em um abrigo para crianças e adolescentes), relacionamento com irmãos e filhos, e antecedentes de uso de álcool e drogas entre os familiares;

B à D) Histórico dos 8 aos 11, 12 aos 14 e 15 aos 17 anos de idade, respectivamente – Abordando questões sobre o relacionamento do entrevistado com seus pais e amigos ao longo desses anos, assim como ambiente social, comportamento individual e acesso à drogas;

E) Atitude dos pais - Incluindo questões sobre a atitude dos pais do entrevistado durante a infância e adolescência, como opinião dos pais sobre o uso de álcool e drogas

e brigas e discussões entre os pais. A seção também abordou questões sobre o desempenho escolar dos entrevistados e dificuldades durante a fase de crescimento;

F e G) Histórico dos 18 aos 21 e 22 aos 25 anos de idade, respectivamente – Abordando o relacionamento do entrevistado com seus amigos, acesso à drogas e questões sobre a personalidade do indivíduo ao longo desses anos;

H) Substâncias psicoativas – Incluindo questões sobre o tempo de uso e padrão de consumo de crack, cocaína ‘cheirada’ (utilizada pela via intranasal) e ‘injetável’, tabaco, álcool, *cannabis* (maconha e haxixe), calmantes benzodiazepínicos, anfetamínicos, *ecstasy*, alucinógenos (LSD e ‘chá de cogumelo’), solventes (‘cola de sapateiro’, ‘loló’, ‘lança-perfume’, tolueno e clorofórmio) e derivados do ópio (heroína, morfina, codeína e meperidina). A seção ainda incluiu as escalas: *Cocaine Craving Questionnaire* (CCQ-B) - Versão Brasileira Adaptada para o Crack, para avaliação da fissura pelo crack ^{198,199}; Teste de Fagerström para avaliação de dependência à nicotina ²⁰⁰; *Car, Relax, Alone, Forget, Friends, Trouble* (CRAFT) para rastreio do consumo de álcool de alto risco entre crianças e adolescentes ²⁰¹; e *Alcohol Use Disorders Identification Test* (AUDIT) para avaliação do padrão de uso de álcool ²⁰²;

I) Complicações do uso de drogas – Abordando questões sobre a ocorrência de danos e/ou acidentes ocasionados durante ou após o uso de drogas, incluindo a ocorrência de overdose;

J) Envolvimento em atividades ilegais – Abordando questões sobre envolvimento com a polícia ou com o sistema judiciário, como detenção e condenação, ou com atividades ilícitas, incluindo envolvimento para sustento próprio ou com intuito de conseguir dinheiro para comprar drogas;

K) Contato com o narcotráfico no último mês – Abordando quais os meios utilizados pelo entrevistado para aquisição do crack, incluindo a forma de pagamento pela droga, e prestação de serviço ao tráfico de drogas;

L) Ganhos e sustento – Abordando a fonte do dinheiro do entrevistado para seu sustento mensal antes da internação;

M) Seção tratamento – Incluindo questões sobre o tratamento atual na comunidade terapêutica (internação compulsória ou voluntária e os motivos que levaram o entrevistado a procurar por esse tratamento) e tratamentos pregressos, seja em comunidade terapêutica ou outros meios de tratamento;

N) Investigação clínica – Questões sobre a saúde física do entrevistado e investigação de doenças crônicas (hipertensão, diabetes, asma e reumatismo) e outras doenças como AIDS, hepatite, sífilis e tuberculose;

O) Religiosidade – Abordando questões sobre as crenças religiosas. A seção ainda incluiu a escala de religiosidade *Duke Religious Index* (DUREL) ¹²¹;

P) Autoestima - Abordando questões sobre os sentimentos e satisfação do entrevistado com relação à ele mesmo;

Q) Comportamento sexual - Abordando questões sobre orientação sexual, a importância das relações sexuais para o entrevistado e práticas sexuais em troca de drogas;

R) Trauma e estresse – Para a avaliação sobre o histórico de traumas foi utilizado o questionário *Early Trauma Inventory Self-Report Short Form* (ETISR-SF) ¹²⁹;

S) Motivação - Abordando questões sobre a opinião do entrevistado acerca do seu problema com drogas e suas expectativas sobre o tratamento atual;

T) Qualidade de vida - Para a avaliação sobre a qualidade de vida (antes da internação atual) foi utilizado o questionário *World Health Organization Quality of Life* (WHOQOL-BREF) ¹²²;

U) Investigação psiquiátrica – A seção incluiu questões sobre o uso de medicamentos psiquiátricos e a entrevista psiquiátrica padronizada *Mini International Neuropsychiatric Interview* (MINI) ¹³⁰;

V) Funcionamento global do entrevistado – Os entrevistadores avaliaram os entrevistados através da escala Avaliação Global de Funcionamento (AGF) ²⁰³.

X) Opinião do entrevistador sobre o entrevistado – Os entrevistadores avaliaram os entrevistados quanto às suas reações e emoções durante a entrevista, colaboração e compreensão acerca da mesma.

9.2. ANEXO B

Tabela Anexo B. Sítios diferencialmente metilados (DMSs) entre dependentes de crack e controles

Probe ID	adjP	β Controles	β Casos	$\Delta\beta$	Coord. genômica (hg19)	Gene	Relação ao gene_ilha CpG
cg03382291	5.34E-04	0.373	0.181	-0.192	chr5:147580954	<i>SPINK6</i>	TSS1500 - open sea
cg25747320	4.70E-04	0.338	0.155	-0.183	chr14:31043362	<i>G2E3</i>	5'UTR - open sea
cg08267336	7.24E-04	0.381	0.204	-0.176	chr1:167298149	<i>POU2F1</i>	TSS200 - open sea
cg23577610	3.73E-04	0.369	0.199	-0.171	chr1:172078666	<i>DNM3</i>	Corpo do gene - open sea
cg00816480	5.03E-04	0.341	0.174	-0.167	chr12:70711895	<i>CNOT2</i>	Corpo do gene - open sea
cg05601847	9.95E-04	0.365	0.200	-0.164	chr4:83826691	<i>THAP9</i>	Corpo do gene - open sea
cg04980099	2.23E-04	0.306	0.150	-0.157	chr15:63836733	<i>USP3</i>	Corpo do gene - open sea
cg22348755	9.33E-04	0.298	0.147	-0.151	chr2:191991246	<i>STAT4</i>	Corpo do gene - open sea
cg05575921	1.73E-04	0.743	0.594	-0.149	chr5:373378	<i>AHRR</i>	Corpo do gene - shore
cg04171753	5.24E-04	0.276	0.128	-0.148	chr18:33045127	<i>IGR</i>	IGR - open sea
cg21247889	1.87E-04	0.279	0.132	-0.146	chr16:79485198	<i>IGR</i>	IGR - open sea
cg06466659	6.69E-04	0.287	0.141	-0.145	chr2:213990963	<i>IKZF2</i>	Corpo do gene - open sea
cg17243480	3.17E-04	0.376	0.231	-0.145	chr9:108980845	<i>IGR</i>	IGR - open sea
cg12689670	9.49E-04	0.290	0.148	-0.142	chr1:183009347	<i>LAMC1</i>	Corpo do gene - open sea
cg14976084	3.95E-04	0.489	0.351	-0.138	chr3:10204012	<i>IGR</i>	IGR - shelf
cg12274324	4.53E-04	0.292	0.154	-0.138	chr9:125583959	<i>PDCL</i>	Corpo do gene - open sea
cg02316792	5.42E-04	0.261	0.127	-0.134	chr4:10686457	<i>CLNK</i>	TSS200 - open sea
cg11246419	9.10E-04	0.277	0.143	-0.134	chr8:91180189	<i>IGR</i>	IGR - open sea
cg09654536	5.43E-04	0.420	0.298	-0.122	chr4:160027458	<i>IGR</i>	IGR - shelf
cg02575483	6.54E-04	0.274	0.155	-0.119	chr6:117826706	<i>DCBLD1</i>	Corpo do gene - open sea
cg16506300	9.49E-04	0.224	0.107	-0.117	chr16:12444635	<i>SNX29</i>	Corpo do gene - open sea
cg03038869	6.58E-04	0.262	0.149	-0.113	chr15:67286614	<i>IGR</i>	IGR - open sea
cg12565636	8.16E-04	0.223	0.111	-0.112	chr8:39797497	<i>IDO2</i>	Corpo do gene - open sea
cg10287032	5.03E-04	0.237	0.125	-0.111	chr2:24552676	<i>ITSN2</i>	5'UTR - open sea
cg17050747	6.56E-04	0.251	0.141	-0.110	chr5:89427766	<i>IGR</i>	IGR - open sea
cg10518264	8.70E-04	0.219	0.111	-0.107	chr6:32909440	<i>HLA-DMB</i>	TSS1500 - open sea
cg01015401	7.24E-04	0.232	0.126	-0.106	chr4:129630613	<i>IGR</i>	IGR - open sea
cg17699374	6.58E-04	0.199	0.097	-0.102	chr22:37403802	<i>C22orf33</i>	5'UTR - open sea
cg18559386	8.16E-04	0.219	0.119	-0.100	chr10:14604648	<i>FAM107B</i>	5'UTR - open sea
cg17405687	9.79E-04	0.193	0.093	-0.100	chr4:124778531	<i>LINC01091</i>	Corpo do gene - open sea
cg26423680	9.49E-04	0.207	0.108	-0.099	chr3:168960390	<i>MECOM</i>	5'UTR - open sea
cg14051805	9.79E-04	0.210	0.112	-0.098	chr15:39917220	<i>FSIP1</i>	Corpo do gene - open sea
cg27200006	8.76E-04	0.269	0.179	-0.090	chr22:25003854	<i>GGT1</i>	5'UTR - open sea
cg24069884	4.53E-04	0.218	0.128	-0.090	chr13:111116765	<i>COL4A2</i>	Corpo do gene - open sea
cg08290733	8.33E-05	0.189	0.101	-0.088	chr6:10519310	<i>IGR</i>	IGR - open sea
cg13149979	9.16E-04	0.194	0.107	-0.087	chr16:75139595	<i>ZNRF1</i>	Corpo do gene - open sea
cg13749900	2.36E-04	0.767	0.681	-0.086	chr16:3687835	<i>IGR</i>	IGR - open sea
cg15910252	3.73E-04	0.404	0.319	-0.085	chr2:28904192	<i>IGR</i>	IGR - open sea
cg23699414	1.73E-04	0.199	0.115	-0.085	chr5:3601762	<i>IGR</i>	IGR - island
cg09072199	8.76E-04	0.184	0.101	-0.084	chr1:28507653	<i>PTAFR</i>	5'UTR - open sea
cg24497361	2.12E-04	0.474	0.391	-0.083	chr11:3858493	<i>RHOG</i>	5'UTR - shelf
cg17728974	5.92E-04	0.205	0.124	-0.081	chr6:105403577	<i>LIN28B</i>	TSS1500 - shelf
cg09273975	2.34E-04	0.162	0.084	-0.078	chr17:37139595	<i>IGR</i>	IGR - open sea
cg19996654	4.82E-04	0.747	0.670	-0.077	chr14:56403510	<i>IGR</i>	IGR - open sea
cg10566303	6.69E-04	0.194	0.118	-0.076	chr4:57702948	<i>IGR</i>	IGR - open sea
cg12252378	3.55E-04	0.175	0.099	-0.076	chr2:9748413	<i>YWHAQ</i>	Corpo do gene - open sea
cg05082708	5.90E-04	0.162	0.086	-0.076	chr4:4765299	<i>IGR</i>	IGR - open sea
cg07800265	8.33E-05	0.189	0.114	-0.076	chr15:43219076	<i>IGR</i>	IGR - open sea
cg15997130	8.15E-04	0.171	0.096	-0.075	chr1:24165203	<i>IGR</i>	IGR - open sea
cg03338962	6.56E-04	0.165	0.091	-0.074	chr14:35673382	<i>KIAA0391</i>	Corpo do gene - open sea
cg03916245	3.73E-04	0.163	0.089	-0.074	chr14:64770272	<i>ESR2</i>	5'UTR - open sea
cg08128168	7.24E-04	0.152	0.079	-0.073	chr12:32575853	<i>IGR</i>	IGR - open sea
cg15689991	6.47E-04	0.172	0.098	-0.073	chr12:65019329	<i>RASSF3</i>	Corpo do gene - open sea
cg08810700	8.15E-04	0.889	0.906	0.018	chr14:73453942	<i>ZFYVE1</i>	TSS1500 - open sea
cg01519820	5.72E-04	0.889	0.907	0.018	chr11:107400934	<i>ALKBH8</i>	Corpo do gene - open sea

Legenda: Probe ID - Identificação da sonda; adjP - p-valor ajustado; β – valor beta; $\Delta\beta$ - delta beta;
chr - Cromossomo; IGR – Região intergênica.

continua

Tabela Anexo B (continuação). Sítios diferencialmente metilados (DMSs) entre dependentes de crack e controles

Probe ID	adjP	β Controles	β Casos	$\Delta\beta$	Coord. genômica (hg19)	Gene	Relação ao gene_ilha CpG
cg04750756	3.73E-04	0.194	0.121	-0.073	chr7:65495996	IGR	IGR - open sea
cg01103911	5.00E-04	0.163	0.090	-0.073	chr2:29044463	SPDYA	Corpo do gene - open sea
cg01303199	8.33E-05	0.187	0.114	-0.072	chr7:129017393	AHCYL2	Corpo do gene - open sea
cg05457768	9.78E-04	0.278	0.206	-0.072	chr6:28751790	IGR	IGR - shelf
cg04608991	6.56E-04	0.166	0.095	-0.071	chr8:124469165	IGR	IGR - open sea
cg24339570	1.26E-04	0.168	0.097	-0.071	chr17:65685799	PITPNC1	Corpo do gene - open sea
cg21790695	6.83E-04	0.139	0.069	-0.071	chr10:35070092	PAR3	Corpo do gene - open sea
cg17737314	2.55E-06	0.191	0.121	-0.070	chr1:44114355	KDM4A	TSS1500 - shore
cg05460226	9.19E-04	0.310	0.240	-0.070	chr17:8804279	PIK3R5	Corpo do gene - open sea
cg22695532	8.98E-04	0.156	0.087	-0.069	chr1:84158538	IGR	IGR - open sea
cg08792700	6.56E-04	0.356	0.287	-0.069	chr9:86911279	SLC28A3	Corpo do gene - open sea
cg06134956	8.11E-04	0.160	0.091	-0.069	chr7:91576047	AKAP9	Corpo do gene - open sea
cg06826971	5.03E-04	0.177	0.108	-0.069	chr20:30048464	IGR	IGR - open sea
cg22431400	1.51E-04	0.158	0.089	-0.069	chr12:12480953	IGR	IGR - open sea
cg07609883	8.70E-04	0.170	0.102	-0.068	chr7:35749209	IGR	IGR - open sea
cg16943816	2.22E-04	0.157	0.090	-0.068	chr6:111551664	IGR	IGR - open sea
cg04272872	5.03E-04	0.222	0.155	-0.067	chr7:148659845	IGR	IGR - open sea
cg16018211	3.73E-04	0.205	0.138	-0.067	chr19:52489829	ZNF350	5'UTR - open sea
cg01991785	6.54E-04	0.192	0.125	-0.067	chr17:78549280	RPTOR	Corpo do gene - open sea
cg02048334	1.47E-04	0.133	0.066	-0.066	chr16:28560833	IGR	IGR - open sea
cg26875626	6.56E-04	0.129	0.063	-0.065	chr4:153021529	IGR	IGR - open sea
cg01373201	9.07E-04	0.138	0.074	-0.065	chr10:81054018	ZMIZ1	Corpo do gene - open sea
cg03437769	8.09E-04	0.156	0.091	-0.065	chr2:28937060	IGR	IGR - open sea
cg04657325	9.22E-04	0.197	0.133	-0.065	chr4:185435601	IGR	IGR - open sea
cg19188297	2.89E-04	0.158	0.095	-0.063	chr12:51219239	IGR	IGR - open sea
cg03107123	3.94E-04	0.143	0.079	-0.063	chr19:19083366	IGR	IGR - open sea
cg00622815	8.87E-04	0.148	0.084	-0.063	chr20:46084231	IGR	IGR - open sea
cg19572324	4.05E-04	0.141	0.078	-0.063	chr12:100623863	IGR	IGR - open sea
cg23497020	1.19E-04	0.175	0.112	-0.063	chr12:50616562	LIMA1	Corpo do gene - open sea
cg21814550	8.70E-04	0.160	0.097	-0.063	chr14:53170147	IGR	IGR - shelf
cg02115282	3.95E-04	0.139	0.077	-0.062	chr2:25745241	DTNB	Corpo do gene - open sea
cg10296406	2.07E-04	0.127	0.065	-0.062	chr4:40182240	IGR	IGR - open sea
cg20988331	8.66E-04	0.126	0.065	-0.061	chr11:60955214	IGR	IGR - open sea
cg06037077	6.07E-04	0.748	0.687	-0.061	chr7:75862177	SRRM3	5'UTR - shelf
cg14094256	7.24E-04	0.182	0.121	-0.061	chr6:24767197	IGR	IGR - open sea
cg26543959	6.56E-04	0.162	0.101	-0.061	chr21:19051458	IGR	IGR - open sea
cg25849916	1.19E-04	0.129	0.068	-0.061	chr8:95825854	IGR	IGR - open sea
cg17614826	3.73E-04	0.128	0.067	-0.060	chr16:30461250	IGR	IGR - open sea
cg08460732	4.95E-04	0.215	0.154	-0.060	chr2:10256302	IGR	IGR - shelf
cg06965839	3.21E-04	0.621	0.561	-0.060	chr17:3303148	ORIE1	TSS1500 - open sea
cg12205358	9.39E-05	0.123	0.063	-0.059	chr1:95221354	LINC01057	Corpo do gene - open sea
cg23314189	5.03E-04	0.149	0.090	-0.059	chr8:41287793	IGR	IGR - open sea
cg12028969	5.43E-04	0.142	0.084	-0.058	chr11:34393189	IGR	IGR - open sea
cg06894134	4.89E-04	0.243	0.185	-0.057	chr6:85476921	IGR	IGR - shelf
cg08412188	3.73E-04	0.127	0.071	-0.056	chr7:74074356	GTF2I	5'UTR - shore
cg09938516	4.48E-04	0.152	0.096	-0.056	chr19:55957628	IGR	IGR - shelf
cg13739025	8.99E-04	0.156	0.100	-0.056	chr9:125572818	IGR	IGR - open sea
cg10102968	1.73E-04	0.124	0.069	-0.055	chr20:48381842	IGR	IGR - open sea
cg06422757	8.99E-04	0.190	0.134	-0.055	chr6:36409495	PXT1	5'UTR - shore
cg13713667	5.53E-04	0.140	0.085	-0.055	chr14:78057532	SPTLC2	Corpo do gene - open sea
cg01067635	8.99E-04	0.130	0.076	-0.054	chr1:45196876	IGR	IGR - open sea
cg10087036	8.42E-04	0.143	0.089	-0.054	chr16:19130461	ITPR1PL2	1stExon - shelf
cg18457224	1.78E-04	0.123	0.070	-0.053	chr11:116976910	IGR	IGR - open sea
cg19559506	6.35E-04	0.173	0.120	-0.053	chr10:16587199	IGR	IGR - open sea
cg05783998	9.34E-04	0.143	0.090	-0.053	chr6:74295921	IGR	IGR - open sea
cg18886147	9.48E-04	0.883	0.901	0.018	chr12:1609741	LOC100292680	Corpo do gene - open sea
cg06161948	3.55E-04	0.903	0.921	0.018	chr19:33592011	GPATCH1	Corpo do gene - open sea

Legenda: Probe ID - Identificação da sonda; adjP - p-valor ajustado; β - valor beta; $\Delta\beta$ - delta beta;
chr - Cromossomo; IGR - Região intergênica.

continua

Tabela Anexo B (continuação). Sítios diferencialmente metilados (DMSs) entre dependentes de crack e controles

Probe ID	adjP	β Controles	β Casos	$\Delta\beta$	Coord. genômica (hg19)	Gene	Relação ao gene_ilha CpG
cg12075928	7.36E-04	0.707	0.654	-0.053	chr8:141801307	PTK2	Corpo do gene - open sea
cg13529282	8.76E-04	0.155	0.103	-0.053	chrX:23652439	IGR	IGR - open sea
cg12793863	6.32E-04	0.773	0.720	-0.053	chr6:109612628	IGR	IGR - shore
cg18036270	2.89E-04	0.142	0.090	-0.052	chr11:125384310	IGR	IGR - open sea
cg08400933	7.46E-04	0.202	0.150	-0.052	chr15:65596744	IGR	IGR - shelf
cg12229388	6.18E-04	0.127	0.075	-0.052	chr10:70088219	PBLD	5'UTR - shelf
cg16637427	9.43E-04	0.180	0.128	-0.052	chr15:89456971	MFGE8	TSS1500 - shore
cg13156336	7.85E-04	0.123	0.071	-0.051	chr11:61938979	IGR	IGR - open sea
cg22763040	4.53E-04	0.162	0.110	-0.051	chr12:50615251	LIMA1	Corpo do gene - open sea
cg16783745	5.43E-04	0.114	0.063	-0.051	chr8:120879530	IGR	IGR - open sea
cg01561839	4.48E-04	0.124	0.074	-0.050	chr1:224521239	IGR	IGR - shelf
cg22822822	9.79E-04	0.129	0.079	-0.050	chr8:17010106	IGR	IGR - shelf
cg01245356	5.81E-04	0.129	0.079	-0.050	chr1:28559620	DNAJC8	TSS200 - shore
cg10597543	8.33E-05	0.842	0.792	-0.050	chr17:62389031	IGR	IGR - open sea
cg17605068	8.33E-05	0.113	0.063	-0.050	chr10:70088173	PBLD	5'UTR - shelf
cg02061431	9.03E-04	0.109	0.059	-0.050	chr1:92150549	TGFBR3	Corpo do gene - open sea
cg25082677	5.14E-04	0.150	0.101	-0.050	chr17:67565280	IGR	IGR - open sea
cg20630456	3.73E-04	0.117	0.068	-0.049	chr18:43542576	EPG5	Corpo do gene - open sea
cg17078326	9.41E-04	0.684	0.636	-0.048	chr4:4509338	STX18	Corpo do gene - open sea
cg08073979	9.68E-04	0.114	0.066	-0.048	chrX:119632157	IGR	IGR - open sea
cg04244170	6.45E-04	0.119	0.071	-0.048	chr3:100116021	TOMM70A	Corpo do gene - shelf
cg12478874	9.99E-04	0.113	0.065	-0.047	chr15:80263632	BCL2A1	1stExon - open sea
cg24837911	1.73E-04	0.112	0.065	-0.047	chr12:49595071	IGR	IGR - open sea
cg27553372	9.06E-07	0.123	0.076	-0.047	chr12:120731091	IGR	IGR - open sea
cg02858642	9.22E-04	0.121	0.074	-0.047	chr1:202312902	IGR	IGR - shore
cg19521414	8.49E-04	0.114	0.067	-0.047	chr1:28559596	DNAJC8	TSS200 - island
cg07457402	8.99E-04	0.156	0.109	-0.047	chr2:179279443	MIRS48N	Corpo do gene - shore
cg18550212	3.73E-04	0.118	0.072	-0.046	chr11:63435428	ATL3	Corpo do gene - shelf
cg05880324	6.47E-04	0.147	0.102	-0.046	chr16:12990586	IGR	IGR - shelf
cg01253321	9.49E-04	0.131	0.085	-0.045	chr17:5322267	RPAIN	TSS1500 - shore
cg21750785	6.48E-04	0.109	0.064	-0.045	chr6:117819571	DCBLD1	Corpo do gene - open sea
cg19432600	3.73E-04	0.093	0.048	-0.045	chr12:31789697	IGR	IGR - open sea
cg17320944	5.03E-04	0.188	0.143	-0.045	chr12:81855113	PPFIA2	5'UTR - open sea
cg08762410	3.73E-04	0.104	0.060	-0.044	chr12:7708497	IGR	IGR - open sea
cg24130348	3.53E-04	0.146	0.102	-0.044	chr22:41682824	RANGAP1	TSS1500 - shore
cg26991596	8.35E-04	0.123	0.081	-0.042	chr18:77440820	CTDP1	TSS1500 - shore
cg15241773	4.48E-04	0.121	0.079	-0.042	chr13:85470475	IGR	IGR - open sea
cg07394019	9.07E-04	0.092	0.049	-0.042	chr11:61146265	IGR	IGR - open sea
cg17882584	6.56E-04	0.101	0.059	-0.042	chr3:42067316	IGR	IGR - open sea
cg20428512	2.23E-04	0.095	0.054	-0.042	chr6:29621441	IGR	IGR - shelf
cg20525088	8.41E-04	0.087	0.046	-0.041	chr13:112859484	IGR	IGR - open sea
cg08152058	7.30E-04	0.095	0.054	-0.041	chr20:33999335	UQCC	Corpo do gene - open sea
cg24482496	4.40E-04	0.101	0.060	-0.041	chr17:30228390	UTP6	Corpo do gene - shore
cg27353361	8.02E-04	0.099	0.058	-0.041	chr6:108145420	SCML4	1stExon - open sea
cg12537452	9.79E-04	0.089	0.049	-0.040	chr2:202023279	CFLAR-AS1	TSS1500 - open sea
cg06762477	9.54E-04	0.123	0.083	-0.040	chr2:206951646	INO80D	TSS1500 - shore
cg26720491	9.79E-04	0.097	0.057	-0.040	chr1:167517766	CREG1	Corpo do gene - open sea
cg14843013	9.79E-04	0.094	0.054	-0.040	chr18:61111956	IGR	IGR - open sea
cg03142458	9.13E-04	0.094	0.055	-0.040	chr1:204476256	IGR	IGR - open sea
cg23076476	9.00E-04	0.196	0.157	-0.039	chr11:26353484	ANO3	TSS200 - shore
cg11710314	9.49E-04	0.172	0.134	-0.038	chrX:48980265	GPKOW	TSS200 - island
cg07813134	8.15E-04	0.114	0.076	-0.038	chr12:55329199	IGR	IGR - open sea
cg15819914	6.75E-04	0.096	0.058	-0.038	chr1:155474162	ASH1L	Corpo do gene - open sea
cg21784254	5.43E-04	0.077	0.040	-0.037	chr13:108922428	TNFSF13B	1stExon - open sea
cg02929956	5.03E-04	0.098	0.061	-0.037	chr14:74111258	DNALI	TSS1500 - shore
cg03519031	5.47E-04	0.908	0.926	0.019	chr2:74980612	IGR	IGR - shore
cg06999384	1.98E-04	0.898	0.916	0.019	chr2:62053528	FAM161A	3'UTR - open sea

Legenda: Probe ID - Identificação da sonda; adjP - p-valor ajustado; β - valor beta; $\Delta\beta$ - delta beta;
chr - Cromossomo; IGR - Região intergênica.

continua

Tabela Anexo B (continuação). Sítios diferencialmente metilados (DMSs) entre dependentes de crack e controles

Probe ID	adjP	β Controles	β Casos	$\Delta\beta$	Coord. genômica (hg19)	Gene	Relação ao gene_ilha CpG
cg09366641	6.56E-04	0.098	0.061	-0.036	chr1:153643528	<i>ILF2</i>	TSS200 - island
cg22332884	6.47E-04	0.117	0.081	-0.036	chrX:48980256	<i>GPLOW</i>	TSS200 - island
cg04509607	5.09E-04	0.121	0.085	-0.036	chr15:91538344	<i>PRC1</i>	TSS1500 - shore
cg06972810	5.47E-04	0.075	0.039	-0.036	chr8:24272697	<i>LOC101929294</i>	Corpo do gene - open sea
cg05877528	4.65E-04	0.086	0.052	-0.034	chr22:26875552	<i>HPS4</i>	TSS200 - shelf
cg03178820	9.64E-04	0.126	0.092	-0.034	chr2:190627986	<i>OSGEPL1</i>	TSS200 - open sea
cg07488576	6.47E-04	0.072	0.039	-0.033	chr2:192711481	<i>SDPR</i>	1stExon - open sea
cg10337377	6.65E-04	0.131	0.098	-0.033	chr16:55746561	<i>IGR</i>	IGR - open sea
cg21010044	9.45E-04	0.093	0.061	-0.033	chr11:46615819	<i>AMBRA1</i>	TSS1500 - shore
cg05134616	8.27E-04	0.094	0.062	-0.032	chr6:30509458	<i>GNL1</i>	3'UTR - open sea
cg16797277	3.78E-04	0.081	0.049	-0.032	chr15:79152920	<i>IGR</i>	IGR - open sea
cg08110170	2.07E-04	0.110	0.079	-0.031	chr11:72474129	<i>STARD10</i>	Corpo do gene - open sea
cg18650462	6.70E-04	0.125	0.094	-0.031	chr17:9479287	<i>CFAP52</i>	TSS1500 - shore
cg21691367	3.73E-04	0.089	0.058	-0.031	chr6:151325642	<i>MTHFD1L</i>	Corpo do gene - open sea
cg24562746	8.60E-04	0.093	0.062	-0.030	chr19:44598112	<i>ZNF224</i>	TSS1500 - shore
cg21912319	5.04E-04	0.112	0.082	-0.030	chr6:27799567	<i>HIST1H4K</i>	TSS1500 - shore
cg07339236	6.07E-04	0.082	0.051	-0.030	chr20:50312490	<i>ATP9A</i>	Corpo do gene - open sea
cg14141380	8.37E-04	0.138	0.108	-0.030	chr7:20826721	<i>SP8</i>	TSS1500 - shore
cg12689529	3.73E-04	0.099	0.070	-0.029	chr11:126335883	<i>KIRREL3</i>	Corpo do gene - open sea
cg15200793	5.99E-04	0.121	0.092	-0.029	chr2:42722317	<i>KCNQ3</i>	TSS1500 - shore
cg21285431	3.94E-04	0.086	0.058	-0.029	chr10:79789707	<i>POLR3A</i>	TSS1500 - shore
cg14530184	3.73E-04	0.876	0.848	-0.028	chr9:117177141	<i>DFNB31</i>	Corpo do gene - open sea
cg00485194	9.07E-04	0.096	0.069	-0.027	chr3:21792684	<i>ZNF385D</i>	1stExon - open sea
cg23501171	3.53E-04	0.081	0.055	-0.026	chr1:11968028	<i>IGR</i>	IGR - open sea
cg02018408	8.76E-04	0.103	0.076	-0.026	chr16:25269986	<i>ZKSCAN2</i>	TSS1500 - shore
cg04456219	5.72E-04	0.093	0.067	-0.026	chr7:17274337	<i>IGR</i>	IGR - open sea
cg14759064	5.03E-04	0.098	0.073	-0.025	chr5:140026603	<i>NDUFA2</i>	Corpo do gene - shore
cg18153279	3.73E-04	0.064	0.039	-0.025	chr12:112825216	<i>IGR</i>	IGR - open sea
cg01593345	2.23E-04	0.067	0.042	-0.025	chr12:12932730	<i>APOLD1</i>	Corpo do gene - open sea
cg19470964	4.48E-04	0.098	0.073	-0.025	chr15:91203934	<i>LINC01585</i>	Corpo do gene - open sea
cg03883941	4.48E-04	0.062	0.037	-0.025	chr11:33384058	<i>IGR</i>	IGR - open sea
cg01616228	8.87E-04	0.078	0.053	-0.025	chr6:21857295	<i>CASC15</i>	Corpo do gene - open sea
cg24473500	7.13E-04	0.083	0.058	-0.025	chr7:871436	<i>UNC84A</i>	5'UTR - open sea
cg16593229	8.12E-04	0.074	0.049	-0.025	chr22:18122303	<i>BCL2L13</i>	5'UTR - shore
cg15470936	2.23E-04	0.097	0.072	-0.025	chr16:5666398	<i>LINC01570</i>	TSS200 - open sea
cg17738628	7.36E-04	0.142	0.118	-0.024	chr15:67155520	<i>IGR</i>	IGR - open sea
cg06777853	3.94E-04	0.078	0.055	-0.024	chr14:61201602	<i>MNAT1</i>	1stExon - open sea
cg17821168	8.01E-04	0.110	0.086	-0.023	chr3:127175050	<i>IGR</i>	IGR - shore
cg10428791	4.48E-04	0.085	0.062	-0.023	chr20:62580620	<i>UCKL1</i>	Corpo do gene - open sea
cg11017057	5.81E-04	0.081	0.058	-0.023	chr3:51706056	<i>TEX264</i>	5'UTR - shore
cg17899718	8.87E-04	0.063	0.040	-0.022	chr22:22171121	<i>MAPK1</i>	Corpo do gene - open sea
cg10391636	6.47E-04	0.065	0.042	-0.022	chr2:225222267	<i>IGR</i>	IGR - open sea
cg27294460	9.14E-04	0.866	0.844	-0.022	chr3:29738423	<i>RBMS3</i>	Corpo do gene - open sea
cg01520972	5.03E-04	0.069	0.046	-0.022	chr14:65450614	<i>IGR</i>	IGR - shelf
cg23271831	9.79E-04	0.066	0.044	-0.022	chr7:94024254	<i>COL1A2</i>	1stExon - open sea
cg13836518	5.99E-04	0.080	0.058	-0.022	chr9:100883593	<i>CORO2A</i>	3'UTR - shore
cg14788726	3.73E-04	0.073	0.052	-0.021	chr16:27191053	<i>IGR</i>	IGR - open sea
cg11592094	6.75E-04	0.898	0.877	-0.021	chr15:74033089	<i>C15orf59</i>	Corpo do gene - open sea
cg07309361	5.99E-04	0.061	0.041	-0.020	chr3:52001477	<i>PCBP4</i>	TSS200 - open sea
cg04856043	4.22E-04	0.078	0.059	-0.020	chr2:20851304	<i>HS1BP3</i>	TSS1500 - shore
cg13179085	3.53E-04	0.063	0.044	-0.019	chr12:93963345	<i>SOCS2</i>	TSS1500 - shore
cg11847459	4.48E-04	0.061	0.042	-0.019	chr14:36789488	<i>MBIP</i>	Corpo do gene - open sea
cg13220287	8.28E-04	0.078	0.060	-0.018	chr6:126102072	<i>IGR</i>	IGR - open sea
cg07190229	6.83E-04	0.071	0.052	-0.018	chr8:142377361	<i>GPR20</i>	1stExon - open sea
cg25598530	9.01E-04	0.066	0.048	-0.018	chr1:148193376	<i>IGR</i>	IGR - open sea
cg18269801	4.48E-04	0.900	0.919	0.019	chr17:35732756	<i>ACACA</i>	5'UTR - open sea
cg01837631	9.06E-04	0.848	0.867	0.019	chr16:68340409	<i>SLC7A6OS</i>	Corpo do gene - shelf

Legenda: Probe ID - Identificação da sonda; adjP - p-valor ajustado; β - valor beta; $\Delta\beta$ - delta beta; chr - Cromossomo; IGR - Região intergênica.

continua

Tabela Anexo B (continuação). Sítios diferencialmente metilados (DMSs) entre dependentes de crack e controles

Probe ID	adjP	β Controles	β Casos	$\Delta\beta$	Coord. genômica (hg19)	Gene	Relação ao gene_ilha CpG
cg06051491	5.01E-04	0.797	0.779	-0.018	chr9:79034422	IGR	IGR - open sea
cg22018051	5.81E-04	0.112	0.094	-0.018	chr1:154943349	SHC1	5'UTR - shelf
cg13013965	8.60E-04	0.053	0.036	-0.017	chr14:105557111	IGR	IGR - shelf
cg19329408	1.90E-04	0.068	0.051	-0.017	chr3:132379034	UBA5	TSS200 - shore
cg22189357	9.35E-04	0.049	0.032	-0.017	chr1:24136425	HMGCL	Corpo do gene - open sea
cg00359181	2.41E-04	0.067	0.051	-0.017	chr2:38893519	GALM	Corpo do gene - open sea
cg21238221	8.07E-04	0.064	0.047	-0.016	chr14:68162436	RDH11	1stExon - open sea
cg00407093	7.24E-04	0.060	0.044	-0.016	chr9:23826461	ELAVL2	TSS1500 - shelf
cg23681213	9.06E-04	0.066	0.049	-0.016	chr14:74180391	PNMA1	1stExon - shore
cg13695535	1.26E-04	0.055	0.040	-0.016	chr5:66124603	MAST4	1stExon - open sea
cg05877694	9.45E-04	0.062	0.047	-0.015	chr11:128775743	KCNJ5	5'UTR - open sea
cg18362489	4.48E-04	0.050	0.035	-0.015	chr11:46143434	PHF21A	TSS1500 - open sea
cg21161138	9.22E-04	0.637	0.621	-0.015	chr5:399360	AHRR	Corpo do gene - open sea
cg21745165	9.49E-04	0.799	0.784	-0.015	chr19:49319447	HSD17B14	Corpo do gene - shelf
cg13826447	5.47E-04	0.062	0.047	-0.015	chr17:46019006	PNPO	5'UTR - open sea
cg10702789	1.01E-04	0.057	0.042	-0.015	chr6:12958127	PHACTR1	Corpo do gene - open sea
cg11271605	9.79E-04	0.040	0.026	-0.015	chr7:87936282	STEAP4	TSS200 - open sea
cg10316474	9.41E-04	0.048	0.034	-0.014	chr22:39410068	APOBEC3C	TSS200 - open sea
cg12542281	9.87E-04	0.053	0.039	-0.014	chr13:33113069	N4BP2L2	TSS200 - open sea
cg16252705	5.14E-04	0.046	0.032	-0.014	chr14:23025981	IGR	IGR - open sea
cg27143082	5.03E-04	0.058	0.044	-0.014	chr6:31744628	C6orf27	5'UTR - open sea
cg18292999	8.12E-04	0.051	0.038	-0.013	chr20:47893669	ZNFX1	5'UTR - shore
cg17498615	8.09E-04	0.050	0.037	-0.013	chr13:97874551	MBNL2	TSS200 - open sea
cg21262854	9.22E-04	0.043	0.030	-0.013	chr7:92861612	CCDC132	TSS200 - open sea
cg06541188	9.79E-04	0.051	0.038	-0.013	chr1:206643735	IKBKE	TSS200 - open sea
cg14471560	5.03E-04	0.049	0.036	-0.013	chr2:99225332	C2orf64	TSS1500 - shore
cg26784596	3.95E-04	0.055	0.042	-0.013	chr3:140769814	SPSB4	TSS1500 - shore
cg07316978	8.70E-04	0.893	0.881	-0.012	chr6:157529107	ARID1B	3'UTR - open sea
cg04982748	4.53E-04	0.041	0.029	-0.012	chr12:66696283	HELB	TSS200 - open sea
cg27149567	3.73E-04	0.863	0.851	-0.012	chr21:47314725	PCBP3	Corpo do gene - shelf
cg07211155	3.73E-04	0.857	0.845	-0.012	chr2:144359756	ARHGAP15	Corpo do gene - open sea
cg06948947	9.22E-04	0.050	0.038	-0.011	chr7:72993313	TBL2	TSS1500 - island
cg20031457	8.12E-04	0.047	0.037	-0.010	chr14:21150335	IGR	IGR - shore
cg04920574	9.22E-04	0.049	0.039	-0.010	chr6:84569242	CYB5R4	TSS200 - shore
cg12971526	9.01E-04	0.041	0.032	-0.010	chr19:36001401	DMKN	5'UTR - open sea
cg00446722	9.79E-04	0.919	0.910	-0.009	chr8:97620628	SDC2	Corpo do gene - open sea
cg01767202	8.15E-04	0.035	0.026	-0.009	chr14:36789886	MBIP	TSS200 - open sea
cg09247880	4.48E-04	0.049	0.041	-0.008	chr6:30028651	ZNRD1	TSS1500 - shore
cg05409276	9.48E-04	0.037	0.029	-0.008	chr17:73400549	GRB2	5'UTR - shore
cg02843856	5.16E-04	0.033	0.025	-0.007	chr4:8581972	GPR78	TSS1500 - shore
cg02044738	7.24E-04	0.035	0.028	-0.007	chr3:119182380	TMEM39A	5'UTR - open sea
cg06746101	4.48E-04	0.037	0.033	-0.004	chr15:79603771	TMED3	Corpo do gene - island
cg07634902	8.36E-04	0.033	0.029	-0.004	chr11:93517282	MED17	TSS200 - shore
cg15980752	6.59E-04	0.029	0.026	-0.004	chr1:155178398	THBS3	TSS1500 - shore
cg27087212	1.73E-04	0.907	0.908	0.000	chr5:56908877	LINC0003	Corpo do gene - open sea
cg25499687	8.76E-04	0.027	0.029	0.002	chrX:133507336	PHF6	TSS200 - island
cg23474890	8.44E-04	0.868	0.871	0.002	chr12:122467179	BCL7A	Corpo do gene - open sea
cg00334424	8.99E-04	0.810	0.814	0.004	chr2:145559337	TEX41	Corpo do gene - open sea
cg08254771	9.43E-04	0.935	0.940	0.005	chr7:73386116	IGR	IGR - open sea
cg07541312	9.79E-04	0.938	0.944	0.006	chr19:47565457	IGR	IGR - open sea
cg13629659	8.12E-04	0.905	0.912	0.007	chr1:23664628	HNRNPR	5'UTR - open sea
cg05418331	6.56E-04	0.931	0.938	0.007	chr5:79927572	DHFR	Corpo do gene - open sea
cg12172391	7.90E-04	0.927	0.935	0.008	chr1:35643363	IGR	IGR - open sea
cg26475594	4.48E-04	0.924	0.931	0.008	chr19:35260608	ZNF599	Corpo do gene - shelf
cg12434848	9.22E-04	0.918	0.926	0.008	chr2:86620618	IGR	IGR - open sea
cg02975953	8.07E-04	0.846	0.865	0.018	chr16:88553483	ZFPM1	Corpo do gene - shore
cg19126251	1.73E-04	0.890	0.908	0.018	chr13:31103494	IGR	IGR - open sea

Legenda: Probe ID - Identificação da sonda; adjP - p-valor ajustado; β - valor beta; $\Delta\beta$ - delta beta;
chr - Cromossomo; IGR - Região intergênica.

continua

Tabela Anexo B (continuação). Sítios diferencialmente metilados (DMSs) entre dependentes de crack e controles

Probe ID	adjP	β Controles	β Casos	$\Delta\beta$	Coord. genômica (hg19)	Gene	Relação ao gene_ilha CpG
cg05693313	9.79E-04	0.913	0.922	0.009	chr7:148710922	<i>PDIA4</i>	Corpo do gene - open sea
cg26369315	9.48E-04	0.928	0.936	0.009	chr10:134912228	<i>GPR123</i>	Corpo do gene - island
cg02591563	9.71E-04	0.903	0.912	0.009	chr10:65046179	<i>JMJD1C</i>	Corpo do gene - open sea
cg19851413	8.37E-04	0.840	0.849	0.009	chr17:9371130	<i>STX8</i>	Corpo do gene - open sea
cg05646066	5.43E-04	0.934	0.944	0.010	chrX:16840741	<i>TXLNG</i>	Corpo do gene - open sea
cg00950421	3.73E-04	0.931	0.941	0.010	chr2:208663033	<i>IGR</i>	IGR - open sea
cg16228039	9.06E-04	0.874	0.884	0.010	chr15:88535619	<i>NTRK3</i>	Corpo do gene - open sea
cg00548971	9.41E-04	0.900	0.911	0.011	chr7:47754734	<i>IGR</i>	IGR - open sea
cg06976209	9.14E-04	0.880	0.891	0.011	chr3:15457528	<i>METTL6</i>	Corpo do gene - open sea
cg06722397	8.85E-04	0.883	0.894	0.011	chr1:7839884	<i>VAMP3</i>	3'UTR - shelf
cg11254527	8.76E-04	0.899	0.911	0.012	chr1:35873695	<i>ZMYM4</i>	Corpo do gene - open sea
cg06142142	6.58E-04	0.895	0.906	0.012	chr10:115938512	<i>TDRD1</i>	TSS1500 - shore
cg20324595	8.15E-04	0.893	0.905	0.012	chr1:62889861	<i>IGR</i>	IGR - open sea
cg21037155	9.49E-04	0.905	0.917	0.012	chr17:37616956	<i>CDK12</i>	TSS1500 - shore
cg11664673	8.17E-04	0.928	0.940	0.012	chr10:28824590	<i>WAC</i>	Corpo do gene - shore
cg02711904	5.03E-04	0.915	0.928	0.013	chr9:33364624	<i>NFX1</i>	Corpo do gene - open sea
cg06592137	2.07E-04	0.925	0.938	0.013	chr17:56029300	<i>CUEDC1</i>	5'UTR - shelf
cg02331812	5.47E-04	0.918	0.931	0.013	chr11:118842932	<i>FOXR1</i>	Corpo do gene - island
cg09103769	9.66E-04	0.904	0.918	0.013	chr1:5803246	<i>IGR</i>	IGR - open sea
cg04345694	8.25E-04	0.900	0.914	0.014	chr8:8439596	<i>IGR</i>	IGR - open sea
cg17608456	8.35E-04	0.835	0.849	0.014	chr10:14599023	<i>FAM107B</i>	5'UTR - open sea
cg17943624	8.87E-04	0.911	0.925	0.014	chr8:48424300	<i>SPIDR</i>	Corpo do gene - open sea
cg15503706	7.21E-04	0.923	0.937	0.014	chr17:35679212	<i>ACACA</i>	Corpo do gene - open sea
cg06452086	5.05E-04	0.913	0.927	0.014	chr3:149686266	<i>PFN2</i>	Corpo do gene - shore
cg12204245	5.03E-04	0.879	0.893	0.014	chr13:114321214	<i>GRK1</i>	TSS1500 - open sea
cg18656644	6.07E-04	0.923	0.937	0.014	chr19:41058885	<i>SPTBN4</i>	Corpo do gene - shore
cg17996603	3.64E-04	0.889	0.903	0.014	chr2:110959266	<i>NPHP1</i>	Corpo do gene - shelf
cg04532381	6.75E-04	0.897	0.911	0.014	chr17:9359598	<i>STX8</i>	Corpo do gene - open sea
cg16612400	9.87E-04	0.913	0.928	0.015	chr17:60231895	<i>IGR</i>	IGR - open sea
cg05814257	5.43E-04	0.904	0.919	0.015	chr2:37032869	<i>VIT</i>	Corpo do gene - shelf
cg04933384	5.03E-04	0.920	0.935	0.015	chr15:50840217	<i>USP50</i>	TSS1500 - open sea
cg20152459	9.22E-04	0.905	0.920	0.015	chr8:126009481	<i>SQLE</i>	TSS1500 - shore
cg26210451	4.48E-04	0.894	0.909	0.015	chr7:70592898	<i>IGR</i>	IGR - shelf
cg13878116	9.22E-04	0.906	0.921	0.015	chr15:55881607	<i>PYGO1</i>	TSS1500 - shore
cg27490029	4.48E-04	0.892	0.907	0.015	chr17:35774430	<i>TADA2A</i>	Corpo do gene - open sea
cg18287300	2.41E-04	0.913	0.928	0.015	chr5:112249428	<i>REEP5</i>	Corpo do gene - open sea
cg27452844	9.91E-04	0.896	0.912	0.015	chr2:170331892	<i>IGR</i>	IGR - shelf
cg16957581	9.99E-04	0.898	0.913	0.016	chr7:128441085	<i>CCDC136</i>	Corpo do gene - open sea
cg13108397	8.15E-04	0.894	0.910	0.016	chr15:91263157	<i>BLM</i>	5'UTR - shelf
cg00166601	9.87E-04	0.864	0.880	0.016	chr3:43407807	<i>IGR</i>	IGR - shelf
cg13399299	4.96E-04	0.888	0.904	0.016	chr3:172185412	<i>IGR</i>	IGR - open sea
cg18865222	6.75E-04	0.805	0.821	0.016	chr22:46300025	<i>IGR</i>	IGR - open sea
cg18981227	1.79E-04	0.894	0.911	0.016	chrX:68072547	<i>IGR</i>	IGR - open sea
cg00847238	8.70E-04	0.906	0.922	0.016	chr6:108250709	<i>SEC63</i>	ExonBnd - open sea
cg25238704	9.47E-04	0.901	0.918	0.016	chr11:4168221	<i>IGR</i>	IGR - open sea
cg11829458	8.07E-04	0.915	0.931	0.017	chr9:79781863	<i>IGR</i>	IGR - open sea
cg14740901	3.73E-04	0.901	0.918	0.017	chr9:102874024	<i>INVS</i>	Corpo do gene - open sea
cg06230220	5.14E-04	0.892	0.909	0.017	chr1:54990547	<i>IGR</i>	IGR - open sea
cg05038676	9.79E-04	0.897	0.914	0.017	chr2:28712128	<i>IGR</i>	IGR - open sea
cg06485000	8.15E-04	0.891	0.908	0.017	chr17:78881721	<i>RPTOR</i>	Corpo do gene - shore
cg27106448	7.84E-04	0.884	0.901	0.017	chr22:42869970	<i>IGR</i>	IGR - open sea
cg02530753	5.43E-04	0.889	0.906	0.017	chr17:65955867	<i>BPTF</i>	Corpo do gene - open sea
cg22489875	4.70E-04	0.899	0.916	0.017	chr20:33343193	<i>NCOA6</i>	Corpo do gene - open sea
cg06609182	5.70E-04	0.926	0.944	0.018	chr4:3235000	<i>HTT</i>	Corpo do gene - open sea
cg26069632	2.86E-04	0.889	0.906	0.018	chr7:29739014	<i>IGR</i>	IGR - open sea
cg02018930	6.65E-04	0.859	0.878	0.018	chr12:53413966	<i>EIF4B</i>	Corpo do gene - open sea
cg04719116	9.66E-04	0.893	0.912	0.018	chr22:41360860	<i>RBX1</i>	Corpo do gene - open sea

Legenda: Probe ID - Identificação da sonda; adjP - p-valor ajustado; β - valor beta; $\Delta\beta$ - delta beta;
chr - Cromossomo; IGR - Região intergênica.

continua

Tabela Anexo B (continuação). Sítios diferencialmente metilados (DMSs) entre dependentes de crack e controles

Probe ID	adjP	β Controles	β Casos	$\Delta\beta$	Coord. genômica (hg19)	Gene	Relação ao gene_ilha CpG
cg16266893	5.26E-04	0.873	0.893	0.020	chr1:39451509	IGR	IGR - open sea
cg22925694	6.56E-04	0.864	0.884	0.020	chr2:65340428	RAB1A	Corpo do gene - open sea
cg17557257	8.40E-04	0.867	0.887	0.020	chr17:15425106	TVP23C- CDRT4	Corpo do gene - open sea
cg15885324	9.14E-04	0.661	0.681	0.020	chr17:42982107	IGR	IGR - open sea
cg08247297	7.24E-04	0.876	0.897	0.020	chr21:46917541	COL18A1	Corpo do gene - shore
cg03541903	9.77E-04	0.832	0.852	0.020	chr5:130651434	CDC42SE2	5'UTR - open sea
cg26336235	5.43E-04	0.905	0.925	0.020	chr1:199918027	IGR	IGR - open sea
cg18394881	7.84E-04	0.882	0.902	0.021	chr1:3512777	MEGF6	Corpo do gene - shore
cg16868941	5.90E-04	0.884	0.904	0.021	chr13:73675742	IGR	IGR - open sea
cg12021430	9.22E-04	0.875	0.895	0.021	chr7:156952445	UBE3C	Corpo do gene - open sea
cg22664874	9.54E-04	0.897	0.918	0.021	chr4:71599063	RUFY3	TSS1500 - open sea
cg01671333	6.56E-04	0.892	0.913	0.021	chr17:1545307	SCARF1	Corpo do gene - shore
cg12512173	9.61E-04	0.898	0.919	0.021	chr13:111936059	ARHGEF7	Corpo do gene - shore
cg07392941	2.41E-04	0.889	0.910	0.021	chr2:206888934	INO80D	Corpo do gene - open sea
cg25367509	6.56E-04	0.893	0.915	0.021	chr12:56702547	IGR	IGR - open sea
cg06840801	2.12E-04	0.871	0.893	0.022	chr8:42552719	CHRN3	1stExon - open sea
cg15039577	4.28E-04	0.880	0.901	0.022	chr3:194389125	LSG1	Corpo do gene - shelf
cg20438509	6.03E-04	0.883	0.905	0.022	chr7:100737189	IGR	IGR - open sea
cg14192191	9.49E-04	0.876	0.898	0.022	chr9:15502633	PSIP1	Corpo do gene - open sea
cg24034620	9.79E-04	0.847	0.869	0.022	chr19:37936081	ZNF569	5'UTR - open sea
cg21199772	5.01E-04	0.879	0.902	0.022	chr9:99157100	ZNF367	ExonBnd - open sea
cg07520419	8.76E-04	0.877	0.899	0.022	chr11:71943187	INPPL1	Corpo do gene - open sea
cg07358627	5.14E-04	0.881	0.904	0.022	chr4:170836967	IGR	IGR - open sea
cg00379615	5.03E-04	0.840	0.863	0.023	chr8:81895014	PAG1	Corpo do gene - open sea
cg02918879	9.79E-04	0.846	0.869	0.023	chrX:123127175	STAG2	5'UTR - open sea
cg04430866	5.03E-04	0.878	0.902	0.023	chr16:89739680	IGR	IGR - open sea
cg22079827	6.07E-04	0.750	0.773	0.023	chr1:114656043	SYT6	Corpo do gene - open sea
cg09548990	3.73E-04	0.868	0.892	0.023	chr4:39747702	UBE2K	Corpo do gene - open sea
cg13621463	9.34E-04	0.806	0.830	0.024	chr1:4999436	IGR	IGR - open sea
cg12537195	5.01E-04	0.895	0.919	0.024	chr15:70327180	IGR	IGR - shore
cg10469481	9.41E-04	0.760	0.785	0.024	chr3:126083942	IGR	IGR - open sea
cg17843208	5.01E-04	0.892	0.916	0.024	chr17:61933428	TCAM1	TSS1500 - open sea
cg12102682	9.13E-04	0.887	0.912	0.024	chr17:1123836	IGR	IGR - open sea
cg16316054	4.48E-04	0.869	0.894	0.025	chr4:185480838	IGR	IGR - open sea
cg13246941	8.37E-04	0.836	0.860	0.025	chr3:41878377	ULK4	Corpo do gene - open sea
cg09534800	3.73E-04	0.884	0.909	0.025	chr16:4522192	NMRAL1	Corpo do gene - shore
cg05411520	5.03E-04	0.888	0.913	0.025	chr1:200640507	DDX59	TSS1500 - shore
cg06773054	4.22E-04	0.859	0.884	0.025	chr15:59563393	MYO1E	Corpo do gene - open sea
cg05324787	2.12E-04	0.879	0.905	0.026	chr11:9455809	IPO7	Corpo do gene - open sea
cg13550702	4.48E-04	0.872	0.898	0.026	chr6:123277681	IGR	IGR - open sea
cg02075238	1.01E-04	0.850	0.876	0.026	chr11:65494847	IGR	IGR - open sea
cg07384147	7.87E-04	0.839	0.866	0.027	chr4:8273940	HTRA3	Corpo do gene - shore
cg06859941	8.15E-04	0.849	0.876	0.027	chr21:43844348	UBASH3A	Corpo do gene - open sea
cg27291842	4.22E-04	0.904	0.931	0.027	chr12:123265481	CCDC62	Corpo do gene - open sea
cg08289375	9.14E-04	0.859	0.886	0.027	chr13:114172939	TMCO3	Corpo do gene - open sea
cg15777013	5.43E-04	0.818	0.845	0.027	chr15:65989475	DENND4A	Corpo do gene - open sea
cg25423631	4.48E-04	0.842	0.869	0.028	chr5:138551266	IGR	IGR - open sea
cg14655858	8.33E-05	0.859	0.886	0.028	chr8:37978472	ASH2L	Corpo do gene - open sea
cg10274696	8.17E-04	0.825	0.853	0.028	chr7:40260671	C7orf10	Corpo do gene - open sea
cg08042092	8.99E-04	0.086	0.114	0.028	chr5:175815846	NOP16	TSS200 - island
cg08917022	5.43E-04	0.857	0.885	0.028	chr5:623259	CEP72	Corpo do gene - island
cg08204093	9.22E-04	0.857	0.885	0.028	chr12:123686537	MPHOSPH9	Corpo do gene - open sea
cg13024564	2.23E-04	0.878	0.906	0.028	chr11:126862306	KIRREL3	Corpo do gene - open sea
cg26646208	8.83E-04	0.868	0.897	0.029	chr2:170583963	PHOSPHO2- KLHL23	5'UTR - open sea
cg11148957	6.64E-04	0.823	0.852	0.029	chr1:7540638	CAMTA1	Corpo do gene - open sea
cg07343707	8.76E-04	0.843	0.872	0.029	chr2:240110301	HDAC4	Corpo do gene - shore

Legenda: Probe ID - Identificação da sonda; adjP - p-valor ajustado; β – valor beta; $\Delta\beta$ - delta beta;
chr - Cromossomo; IGR – Região intergênica.

continua

Tabela Anexo B (continuação). Sítios diferencialmente metilados (DMSs) entre dependentes de crack e controles

Probe ID	adjP	β Controles	β Casos	$\Delta\beta$	Coord. genômica (hg19)	Gene	Relação ao gene_ilha CpG
cg06310844	3.73E-04	0.248	0.277	0.029	chr19:33072506	<i>PDCD5</i>	Corpo do gene - island
cg18089482	6.87E-04	0.877	0.907	0.030	chr20:35580972	<i>SAMHD1</i>	TSS1500 - shore
cg19439285	8.15E-04	0.841	0.871	0.030	chr4:37814459	<i>IGR</i>	IGR - open sea
cg23942887	4.16E-04	0.834	0.864	0.030	chr3:10079106	<i>FANCD2</i>	Corpo do gene - open sea
cg04497003	8.94E-04	0.846	0.876	0.030	chr7:99144379	<i>FAM200A</i>	Corpo do gene - shelf
cg13426829	5.26E-04	0.269	0.299	0.030	chr6:124124875	<i>NKAIN2</i>	TSS200 - island
cg00360866	7.24E-04	0.806	0.836	0.030	chr15:65627661	<i>IGDCC3</i>	Corpo do gene - open sea
cg02747169	6.04E-04	0.871	0.902	0.030	chr17:72982851	<i>CDR2L</i>	TSS1500 - shore
cg15891603	5.99E-04	0.863	0.893	0.031	chr9:96394134	<i>PHF2</i>	Corpo do gene - open sea
cg23476801	6.85E-04	0.874	0.906	0.032	chr4:140037891	<i>ELF2</i>	Corpo do gene - shore
cg05317610	9.07E-04	0.877	0.909	0.032	chr1:29015158	<i>GMEB1</i>	Corpo do gene - open sea
cg10612751	2.67E-04	0.867	0.899	0.032	chr4:169751983	<i>PALLD</i>	Corpo do gene - shore
cg16572957	4.62E-04	0.858	0.890	0.032	chr1:2799354	<i>IGR</i>	IGR - open sea
cg14779090	8.12E-04	0.716	0.748	0.032	chr19:9083943	<i>MUC16</i>	1stExon - open sea
cg09402329	5.43E-04	0.824	0.857	0.033	chr14:31349788	<i>COCH</i>	ExonBnd - open sea
cg26688472	9.14E-04	0.204	0.236	0.033	chr2:203638928	<i>ICA1L</i>	3'UTR - island
cg02156021	3.73E-04	0.836	0.869	0.033	chr17:46142260	<i>IGR</i>	IGR - open sea
cg06070346	6.52E-04	0.845	0.878	0.033	chr6:139180683	<i>ECT2L</i>	Corpo do gene - open sea
cg13363124	9.49E-04	0.875	0.908	0.033	chr22:45182017	<i>ARHGAP8</i>	5'UTR - island
cg19060612	6.47E-04	0.866	0.899	0.033	chr1:171450804	<i>IGR</i>	IGR - shelf
cg13660596	5.04E-04	0.764	0.797	0.033	chr12:74928835	<i>IGR</i>	IGR - shelf
cg23587258	7.24E-04	0.871	0.904	0.033	chr12:112506593	<i>NAA25</i>	Corpo do gene - open sea
cg25208258	9.13E-04	0.789	0.822	0.033	chr18:14336385	<i>LOC284233</i>	TSS1500 - open sea
cg05198960	8.94E-04	0.844	0.877	0.033	chr12:133309102	<i>ANKLE2</i>	Corpo do gene - island
cg19144502	9.71E-04	0.853	0.887	0.034	chr14:35777813	<i>PSMA6</i>	5'UTR - open sea
cg13890597	4.12E-04	0.864	0.898	0.034	chr1:161481847	<i>FCGR2A</i>	Corpo do gene - open sea
cg19748181	8.70E-04	0.822	0.857	0.035	chr20:58106111	<i>IGR</i>	IGR - open sea
cg18839879	5.03E-04	0.811	0.847	0.035	chr6:34635606	<i>C6orf106</i>	Corpo do gene - open sea
cg01678313	9.98E-04	0.868	0.904	0.036	chr3:13083892	<i>IQSEC1</i>	Corpo do gene - open sea
cg17811563	9.49E-04	0.815	0.851	0.036	chr2:58568835	<i>IGR</i>	IGR - open sea
cg12288267	5.99E-04	0.864	0.900	0.036	chr3:196318719	<i>IGR</i>	IGR - open sea
cg02724203	4.48E-04	0.860	0.897	0.036	chr12:1204071	<i>ERC1</i>	Corpo do gene - open sea
cg14418992	6.56E-04	0.819	0.856	0.037	chr3:169866747	<i>PHC3</i>	Corpo do gene - open sea
cg06667316	8.66E-04	0.851	0.888	0.037	chr19:11550036	<i>PRKCSH</i>	Corpo do gene - shelf
cg02687150	6.29E-04	0.832	0.870	0.037	chr11:15932485	<i>IGR</i>	IGR - open sea
cg15031162	6.64E-04	0.826	0.863	0.037	chr16:68349632	<i>PRMT7</i>	5'UTR - open sea
cg09391998	8.95E-04	0.839	0.877	0.038	chr11:113688523	<i>USP28</i>	Corpo do gene - open sea
cg15658543	4.48E-04	0.800	0.837	0.038	chr7:3026309	<i>CARD11</i>	5'UTR - open sea
cg14337129	8.82E-04	0.869	0.907	0.038	chr9:131594230	<i>IGR</i>	IGR - shore
cg19756470	8.87E-04	0.850	0.888	0.038	chr2:61832623	<i>IGR</i>	IGR - open sea
cg27639283	4.48E-04	0.798	0.837	0.038	chr19:9412868	<i>ZNF699</i>	Corpo do gene - open sea
cg03975346	6.58E-04	0.829	0.867	0.038	chr11:9455774	<i>IPO7</i>	Corpo do gene - open sea
cg10032289	4.40E-04	0.850	0.888	0.038	chr11:9455054	<i>IPO7</i>	Corpo do gene - open sea
cg06371374	6.52E-04	0.746	0.785	0.039	chr3:128120212	<i>EEFSEC</i>	Corpo do gene - open sea
cg13711144	9.79E-04	0.822	0.862	0.040	chr7:107218933	<i>BCAP29</i>	TSS1500 - shore
cg18016444	6.18E-04	0.828	0.868	0.040	chr4:3093377	<i>HTT</i>	Corpo do gene - open sea
cg08677657	4.48E-04	0.803	0.843	0.041	chr6:149885006	<i>IGR</i>	IGR - shelf
cg07048375	9.48E-04	0.829	0.870	0.041	chr2:44464956	<i>IGR</i>	IGR - open sea
cg14460558	9.79E-04	0.868	0.909	0.041	chr9:90795554	<i>IGR</i>	IGR - island
cg07945682	5.03E-04	0.803	0.844	0.041	chr17:65467821	<i>PITPNC1</i>	Corpo do gene - open sea
cg16824024	9.87E-04	0.819	0.860	0.041	chr3:73092158	<i>PPP4R2</i>	Corpo do gene - open sea
cg24102700	7.56E-04	0.810	0.852	0.042	chr17:3721585	<i>C17orf85</i>	Corpo do gene - open sea
cg11340806	8.11E-04	0.831	0.873	0.042	chr11:9291322	<i>IGR</i>	IGR - open sea
cg07405570	4.48E-04	0.822	0.864	0.042	chr12:7111582	<i>LPCAT3</i>	Corpo do gene - open sea
cg09427429	5.26E-04	0.772	0.815	0.043	chr2:128450658	<i>IGR</i>	IGR - shelf
cg16671570	9.49E-04	0.835	0.878	0.043	chrX:24080372	<i>EIF2S3</i>	Corpo do gene - open sea
cg08707253	5.99E-04	0.808	0.851	0.043	chr12:53979663	<i>ATF7</i>	Corpo do gene - open sea

Legenda: Probe ID - Identificação da sonda; adjP - p-valor ajustado; β - valor beta; $\Delta\beta$ - delta beta;
chr - Cromossomo; IGR - Região intergênica.

continua

Tabela Anexo B (continuação). Sítios diferencialmente metilados (DMSs) entre dependentes de crack e controles

Probe ID	adjP	β Controles	β Casos	$\Delta\beta$	Coord. genômica (hg19)	Gene	Relação ao gene_ilha CpG
cg18647382	5.03E-04	0.821	0.864	0.043	chr3:183298319	IGR	IGR - open sea
cg01456626	9.79E-04	0.758	0.802	0.044	chr17:38611497	IGFBP4	Corpo do gene - open sea
cg23736895	7.00E-04	0.768	0.813	0.044	chr6:13848212	IGR	IGR - open sea
cg15377630	6.56E-04	0.790	0.835	0.045	chrX:16844007	TXLNG	Corpo do gene - open sea
cg07232688	6.64E-04	0.795	0.840	0.045	chr1:100644688	LRRC39	TSS1500 - open sea
cg02341953	2.86E-04	0.798	0.843	0.045	chr8:23045389	IGR	IGR - open sea
cg22935319	6.07E-04	0.737	0.782	0.046	chr17:38545021	TOP2A	3'UTR - open sea
cg23072571	5.26E-04	0.828	0.874	0.046	chr19:54291978	MIR373	Corpo do gene - open sea
cg04673882	3.94E-04	0.842	0.888	0.046	chr12:112506752	NAA25	Corpo do gene - open sea
cg08202575	5.36E-04	0.789	0.836	0.047	chr7:82355489	IGR	IGR - open sea
cg06031041	7.47E-04	0.797	0.845	0.047	chr7:4810741	FOKK1	3'UTR - shelf
cg06076564	3.73E-04	0.785	0.832	0.048	chr4:77977334	CCNI	Corpo do gene - open sea
cg18965086	7.68E-04	0.833	0.881	0.048	chr1:109619546	TAF13	TSS1500 - shore
cg00520305	9.79E-04	0.754	0.805	0.051	chr3:149325760	WWTR1	Corpo do gene - open sea
cg14313797	5.99E-04	0.786	0.837	0.051	chr10:12497957	CAMK1D	Corpo do gene - open sea
cg06409490	3.73E-04	0.779	0.831	0.052	chr19:36897639	ZFP82	Corpo do gene - open sea
cg23442804	8.76E-04	0.795	0.849	0.054	chr1:220266433	IARS2	TSS1500 - shore
cg21129401	3.40E-04	0.763	0.817	0.054	chr3:152978761	IGR	IGR - open sea
cg17239848	6.95E-05	0.541	0.596	0.055	chr20:58586687	CDH26	Corpo do gene - open sea
cg10878998	3.53E-04	0.170	0.226	0.056	chr18:71959092	CYB5A	1stExon - island
cg03361504	8.94E-04	0.768	0.824	0.056	chr7:150868190	IGR	IGR - shore
cg00201819	9.49E-04	0.815	0.871	0.056	chr10:134910421	GPR123	Corpo do gene - shore
cg21194785	5.42E-04	0.792	0.849	0.057	chr22:29105478	CHEK2	Corpo do gene - open sea
cg15363973	4.40E-04	0.847	0.905	0.058	chr7:886836	UNC84A	Corpo do gene - island
cg14369333	5.92E-04	0.780	0.839	0.059	chr6:107449782	IGR	IGR - open sea
cg00344738	5.81E-04	0.788	0.847	0.059	chr12:101753988	UTP20	Corpo do gene - open sea
cg26189523	9.01E-04	0.808	0.868	0.060	chr9:124310938	IGR	IGR - shore
cg23470478	8.70E-04	0.789	0.849	0.060	chr19:9433826	ZNF559	TSS1500 - shore
cg06454983	3.53E-04	0.769	0.829	0.060	chr18:12418005	SLMO1	Corpo do gene - shelf
cg21030160	9.14E-04	0.701	0.762	0.060	chr13:31256790	IGR	IGR - open sea
cg23906204	3.87E-04	0.843	0.903	0.061	chr1:161110860	IGR	IGR - island
cg07595203	6.39E-04	0.678	0.739	0.061	chr11:2721480	KCNQ1OT1	TSS1500 - island
cg13827444	9.66E-04	0.835	0.895	0.061	chr3:72201951	LINC00870	Corpo do gene - open sea
cg02854791	9.67E-04	0.720	0.782	0.062	chr7:157776477	PTPRN2	Corpo do gene - open sea
cg05383842	3.73E-04	0.750	0.812	0.062	chr12:8072929	SLC2A3	3'UTR - open sea
cg01024878	9.34E-04	0.741	0.805	0.064	chr9:96356546	MIR548AU	TSS1500 - open sea
cg10748867	5.03E-04	0.784	0.848	0.064	chr1:19577036	MRT04	TSS1500 - shore
cg09460500	5.03E-04	0.780	0.845	0.065	chr5:134077921	CAMLG	Corpo do gene - shelf
cg06421658	9.55E-04	0.793	0.858	0.066	chr5:68710528	MARVELD2	TSS1500 - shore
cg25219674	9.99E-04	0.721	0.787	0.066	chr3:184972683	EHHADH	TSS1500 - shore
cg01805493	9.45E-04	0.722	0.787	0.066	chr17:40979684	IGR	IGR - shelf
cg18459342	7.87E-04	0.275	0.342	0.066	chr8:81084056	TPD52	TSS1500 - island
cg10437787	6.83E-04	0.764	0.831	0.067	chr17:7904871	GUCY2D	TSS1500 - shore
cg19271013	6.48E-04	0.762	0.829	0.067	chr16:78131862	WVOX	TSS1500 - shore
cg19928340	3.26E-04	0.807	0.874	0.067	chr7:1809352	IGR	IGR - island
cg12884247	8.41E-04	0.714	0.782	0.068	chrX:70511422	NONO	5'UTR - open sea
cg02911203	6.49E-04	0.780	0.848	0.068	chr5:72236857	IGR	IGR - open sea
cg01960413	9.01E-04	0.768	0.838	0.070	chr1:23343542	IGR	IGR - shelf
cg20353344	6.75E-04	0.769	0.839	0.070	chr11:65489582	RNASEH2C	TSS1500 - shore
cg00968893	9.79E-04	0.713	0.784	0.071	chr12:49655634	IGR	IGR - shelf
cg03818793	2.40E-04	0.233	0.304	0.071	chr18:24129558	KCTD1	TSS1500 - island
cg05150224	3.53E-04	0.702	0.774	0.072	chr16:58587227	CNOT1	Corpo do gene - open sea
cg17375381	5.90E-04	0.707	0.779	0.073	chr3:11685729	VGLL4	TSS1500 - shore
cg12598455	7.84E-04	0.720	0.794	0.073	chr16:19077221	LOC102723385	Corpo do gene - shore
cg05586540	2.86E-04	0.764	0.837	0.073	chr6:43046201	PTK7	Corpo do gene - shore
cg02641277	7.84E-04	0.735	0.810	0.075	chr4:186350279	C4orf47	TSS1500 - shelf
cg10965596	4.13E-04	0.780	0.855	0.075	chr2:27348263	ABHD1	Corpo do gene - shore

Legenda: Probe ID - Identificação da sonda; adjP - p-valor ajustado; β - valor beta; $\Delta\beta$ - delta beta;
chr - Cromossomo; IGR - Região intergênica.

continua

Tabela Anexo B (continuação). Sítios diferencialmente metilados (DMSs) entre dependentes de crack e controles

Probe ID	adjP	β Controles	β Casos	$\Delta\beta$	Coord. genômica (hg19)	Gene	Relação ao gene_ilha CpG
cg19030737	9.87E-04	0.722	0.798	0.076	chr1:226927988	<i>ITPKB</i>	TSS1500 - shore
cg18739791	5.34E-04	0.734	0.810	0.076	chr5:134169007	<i>IGR</i>	IGR - open sea
cg07944916	6.75E-04	0.763	0.839	0.077	chr2:9697398	<i>ADAM17</i>	TSS1500 - shore
cg05941652	9.49E-04	0.704	0.781	0.077	chr18:21273909	<i>LAMA3</i>	Corpo do gene - shelf
cg05358095	4.48E-04	0.734	0.812	0.078	chr7:73269115	<i>IGR</i>	IGR - shore
cg24421839	5.90E-04	0.722	0.800	0.078	chr15:85111313	<i>UBE2QP1</i>	Corpo do gene - shelf
cg02944903	6.65E-04	0.651	0.730	0.078	chr18:2664728	<i>SMCHD1</i>	Corpo do gene - open sea
cg15096488	8.12E-04	0.683	0.761	0.078	chr2:43848605	<i>IGR</i>	IGR - open sea
cg12180316	4.40E-04	0.753	0.833	0.081	chr17:80681317	<i>FN3KRP</i>	Corpo do gene - open sea
cg07517688	6.03E-04	0.569	0.650	0.081	chr14:70118078	<i>SUSD6</i>	5'UTR - open sea
cg15802429	5.57E-04	0.770	0.851	0.081	chr17:16291531	<i>IGR</i>	IGR - shore
cg17587610	5.47E-04	0.738	0.820	0.082	chr11:61195387	<i>CPSF7</i>	Corpo do gene - shore
cg00837060	8.15E-04	0.769	0.851	0.082	chr14:23234275	<i>OXAIL</i>	TSS1500 - shore
cg26421413	6.88E-05	0.745	0.828	0.083	chr1:200640542	<i>DDX59</i>	TSS1500 - shore
cg12417176	4.48E-04	0.782	0.865	0.083	chr15:55788778	<i>DYX1C1</i>	Corpo do gene - shore
cg09676484	9.71E-04	0.720	0.803	0.083	chr17:49232155	<i>NME1</i>	5'UTR - shore
cg19214746	5.03E-04	0.736	0.820	0.083	chr12:122879564	<i>CLIP1-ASI</i>	TSS1500 - open sea
cg17784876	4.53E-04	0.653	0.737	0.084	chr1:39464086	<i>AKIRIN1</i>	Corpo do gene - open sea
cg03105206	5.33E-04	0.733	0.818	0.085	chr10:126315291	<i>FAM53B</i>	Corpo do gene - open sea
cg15050328	6.35E-04	0.723	0.810	0.087	chr3:124448651	<i>UMPS</i>	TSS1500 - shore
cg15482621	4.48E-04	0.580	0.667	0.087	chr6:86259651	<i>SNX14</i>	Corpo do gene - open sea
cg07646209	7.94E-04	0.711	0.799	0.088	chr19:58240321	<i>ZNF671</i>	TSS1500 - shore
cg00576967	7.24E-04	0.737	0.826	0.089	chr1:200640177	<i>DDX59</i>	TSS1500 - shore
cg18555528	5.03E-04	0.675	0.765	0.089	chr10:103125699	<i>BTRC</i>	Corpo do gene - open sea
cg08976738	3.94E-04	0.718	0.808	0.090	chr15:80873380	<i>MIR5572</i>	TSS200 - open sea
cg26419869	4.48E-04	0.683	0.773	0.090	chr1:182923215	<i>C1orf14</i>	TSS1500 - shore
cg06521359	6.75E-04	0.608	0.699	0.090	chr1:203767572	<i>ZC3H11A</i>	5'UTR - shelf
cg00375025	2.34E-04	0.761	0.852	0.091	chr3:155860932	<i>KCNAB1</i>	1stExon - open sea
cg20343599	6.56E-04	0.694	0.784	0.091	chr10:64038483	<i>IGR</i>	IGR - open sea
cg01589054	5.03E-04	0.746	0.837	0.091	chr3:11744933	<i>VGLL4</i>	5'UTR - shore
cg02272574	4.48E-04	0.635	0.727	0.092	chr8:39790735	<i>IGR</i>	IGR - open sea
cg05624196	8.15E-04	0.695	0.788	0.094	chr3:195310883	<i>APOD</i>	1stExon - open sea
cg09443855	7.83E-04	0.763	0.858	0.095	chr22:41602903	<i>L3MBTL2</i>	Corpo do gene - shore
cg13520531	8.02E-04	0.620	0.715	0.095	chr19:2268580	<i>OAZ1</i>	TSS1500 - shore
cg13160071	5.53E-04	0.658	0.754	0.096	chr8:136202301	<i>IGR</i>	IGR - open sea
cg21954085	4.48E-04	0.559	0.656	0.097	chr7:156664673	<i>LMBR1</i>	Corpo do gene - open sea
cg19949673	5.03E-04	0.690	0.787	0.097	chr9:128067348	<i>GAPVD1</i>	ExonBnd - open sea
cg25801499	8.11E-04	0.647	0.745	0.097	chr17:60760293	<i>MRC2</i>	Corpo do gene - shelf
cg22779330	6.56E-04	0.619	0.716	0.098	chr11:69061911	<i>MYEOV</i>	5'UTR - open sea
cg20971133	6.07E-04	0.752	0.850	0.099	chr5:180699332	<i>IGR</i>	IGR - shore
cg22457516	1.73E-04	0.697	0.796	0.099	chr11:83393422	<i>DLG2</i>	1stExon - open sea
cg06875255	1.87E-04	0.676	0.776	0.101	chr2:71787827	<i>DYSF</i>	Corpo do gene - island
cg22264420	8.99E-04	0.704	0.808	0.103	chr11:8891370	<i>ST5</i>	5'UTR - shore
cg25206992	8.85E-04	0.680	0.783	0.103	chr3:185555472	<i>IGR</i>	IGR - open sea
cg22954146	1.87E-04	0.705	0.809	0.104	chr1:20835272	<i>MUL1</i>	TSS1500 - shore
cg18761380	4.96E-04	0.657	0.761	0.104	chr1:245186137	<i>EFCAB2</i>	Corpo do gene - open sea
cg06371658	6.75E-04	0.681	0.788	0.107	chr3:10292843	<i>TATDN2</i>	Corpo do gene - shore
cg26443995	9.49E-04	0.518	0.626	0.108	chr2:187560059	<i>FAM171B</i>	Corpo do gene - shore
cg08198430	6.56E-04	0.641	0.749	0.108	chr14:24733757	<i>TGMI</i>	TSS1500 - open sea
cg16797462	3.73E-04	0.709	0.820	0.111	chr19:54269910	<i>IGR</i>	IGR - shore
cg09295738	5.36E-04	0.674	0.786	0.112	chr11:113659244	<i>IGR</i>	IGR - shore
cg02999029	3.53E-04	0.703	0.816	0.113	chr20:50555339	<i>IGR</i>	IGR - open sea
cg06965610	5.43E-04	0.580	0.692	0.113	chr8:28994608	<i>KIF13B</i>	Corpo do gene - open sea
cg08269941	7.24E-04	0.703	0.816	0.113	chr21:38337048	<i>HLCS</i>	5'UTR - shore
cg10628634	5.99E-04	0.646	0.760	0.114	chr6:17713043	<i>IGR</i>	IGR - open sea
cg21125452	6.64E-04	0.647	0.761	0.114	chr8:120846352	<i>TAF2</i>	TSS1500 - shore
cg07649114	9.48E-04	0.666	0.780	0.114	chr7:150494998	<i>TMEM176B</i>	5'UTR - shore

Legenda: Probe ID - Identificação da sonda; adjP - p-valor ajustado; β - valor beta; $\Delta\beta$ - delta beta;
chr - Cromossomo; IGR - Região intergênica.

continua

Tabela Anexo B (conclusão). Sítios diferencialmente metilados (DMSs) entre dependentes de crack e controles

Probe ID	adjP	β Controles	β Casos	$\Delta\beta$	Coord. genômica (hg19)	Gene	Relação ao gene_ilha CpG
cg22585255	6.47E-04	0.659	0.773	0.114	chr11:57519288	<i>BTBD18</i>	TSS200 - shore
cg10088939	9.66E-04	0.708	0.822	0.114	chr7:99101050	<i>ZKSCAN5</i>	TSS1500 - shore
cg06781828	5.93E-04	0.734	0.849	0.115	chr6:169310581	<i>IGR</i>	IGR - island
cg25149391	8.76E-04	0.636	0.754	0.118	chr11:68520448	<i>MTL5</i>	TSS1500 - shore
cg02384475	5.56E-04	0.676	0.796	0.121	chr13:23414242	<i>IGR</i>	IGR - shore
cg08685564	3.17E-04	0.564	0.685	0.121	chr2:242239656	<i>HDLBP</i>	5'UTR - open sea
cg05837928	8.85E-04	0.658	0.780	0.122	chr18:51744202	<i>MBD2</i>	Corpo do gene - open sea
cg03169087	2.07E-04	0.631	0.754	0.123	chr11:86747930	<i>TMEM135</i>	TSS1500 - shore
cg19226080	3.73E-04	0.605	0.728	0.123	chr4:39480565	<i>LOC401127</i>	TSS1500 - shore
cg14874893	9.22E-04	0.702	0.825	0.123	chr19:50225303	<i>IGR</i>	IGR - shore
cg17162808	6.56E-04	0.676	0.801	0.125	chr20:33266296	<i>PIGU</i>	TSS1500 - shore
cg09123455	1.73E-04	0.542	0.668	0.126	chr16:69362128	<i>IGR</i>	IGR - shore
cg06895885	7.24E-04	0.541	0.669	0.128	chr8:101169464	<i>SPAG1</i>	TSS1500 - shore
cg07375254	9.34E-04	0.644	0.773	0.129	chr5:148941007	<i>IGR</i>	IGR - open sea
cg24707290	3.73E-04	0.588	0.722	0.134	chr1:109421497	<i>GPSM2</i>	5'UTR - shore
cg03354414	8.85E-04	0.658	0.795	0.137	chr19:55546118	<i>GP6</i>	Corpo do gene - shore
cg03148503	8.33E-05	0.625	0.763	0.138	chr18:10588980	<i>IGR</i>	IGR - shore
cg25902639	3.53E-04	0.562	0.700	0.138	chr19:15312605	<i>NOTCH3</i>	TSS1500 - shore
cg07494499	9.89E-04	0.565	0.703	0.138	chr17:837017	<i>NXN</i>	Corpo do gene - open sea
cg18781901	3.42E-04	0.551	0.691	0.140	chr17:80375155	<i>C17orf101</i>	Corpo do gene - shore
cg20978997	3.94E-04	0.551	0.692	0.141	chr10:75253729	<i>PPP3CB</i>	5'UTR - shore
cg00997655	8.33E-05	0.653	0.795	0.142	chr5:125929132	<i>ALDH7A1</i>	Corpo do gene - shore
cg03273574	1.73E-04	0.616	0.759	0.143	chr17:57286182	<i>SMG8</i>	TSS1500 - shore
cg13434525	8.70E-04	0.606	0.752	0.146	chr13:98627196	<i>IPO5</i>	Corpo do gene - shore
cg18929316	5.36E-04	0.599	0.749	0.150	chr17:46176848	<i>CBX1</i>	5'UTR - shore
cg07703331	6.29E-04	0.602	0.757	0.155	chr13:21521930	<i>LINC00367</i>	Corpo do gene - shore
cg12839200	2.84E-04	0.568	0.725	0.156	chr11:71789642	<i>NUMA1</i>	Corpo do gene - shore
cg14818176	8.35E-04	0.580	0.740	0.159	chr17:73148480	<i>HN1</i>	5'UTR - shore
cg24247939	6.64E-04	0.502	0.665	0.163	chr2:61292081	<i>KIAA1841</i>	TSS1500 - shore
cg04800864	5.14E-04	0.579	0.754	0.175	chr22:43541019	<i>IGR</i>	IGR - shore

Legenda: Probe ID - Identificação da sonda; adjP - p-valor ajustado; β – valor beta; $\Delta\beta$ - delta beta; chr - Cromossomo; IGR – Região intergênica.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

1. Kanherkar RR, Bhatia-Dey N, Csoka AB. Epigenetics across the human lifespan. *Front Cell Dev Biol.* 2014;2:49.
2. Horvath S, Raj K. DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing. *Nat Rev Genet.* 2018;19(6):371-384.
3. Camilo C, Maschietto M, et al. Genome-wide DNA methylation profile in the peripheral blood of cocaine and crack dependents. *Braz J Psychiatry.* 2019;41(6):485-493.
4. Mancilla VJ, Peeri NC, Silzer T, et al. Understanding the Interplay Between Health Disparities and Epigenomics. *Front Genet.* 2020;11:903.
5. Narvaez JC, Pechansky F, et al. Quality of life, social functioning, family structure, and treatment history associated with crack cocaine use in youth from the general population. *Braz J Psychiatry.* 2015;37(3):211-218.
6. Lester BM, Conradt E, Marsit C. Introduction to the Special Section on Epigenetics. *Child Dev.* 2016;87(1):29-37.
7. Ladd-Acosta C, Fallin MD. The role of epigenetics in genetic and environmental epidemiology. *Epigenomics.* 2016;8(2):271-283.
8. Wong CC, Mill J, Fernandes C. Drugs and addiction: an introduction to epigenetics. *Addiction.* 2011;106(3):480-489.
9. Feinberg AP. The Key Role of Epigenetics in Human Disease Prevention and Mitigation. *N Engl J Med.* 2018;378(14):1323-1334.
10. Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol.* 2010;28(10):1057-1068.
11. Tsankova N, Renthal W, Kumar A, Nestler EJ. Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci.* 2007;8(5):355-367.
12. Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E. Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell.* 2007;128(4):635-638.
13. Rechache NS, Wang Y, Stevenson HS, et al. DNA methylation profiling identifies global methylation differences and markers of adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(6):E1004-1013.
14. Moran S, Arribas C, Esteller M. Validation of a DNA methylation microarray for 850,000 CpG sites of the human genome enriched in enhancer sequences. *Epigenomics.* 2016;8(3):389-399.
15. Li S, Wong EM, Dugué PA, et al. Genome-wide average DNA methylation is determined in utero. *Int J Epidemiol.* 2018;47(3):908-916.
16. Li S, Nguyen TL, Wong EM, et al. Genetic and environmental causes of variation in epigenetic aging across the lifespan. *Clin Epigenetics.* 2020;12(1):158.
17. Alegría-Torres JA, Baccarelli A, Bollati V. Epigenetics and lifestyle. *Epigenomics.* 2011;3(3):267-277.
18. Motta V, Bonzini M, et al. Epigenetics applied to epidemiology: investigating environmental factors and lifestyle influence on human health. *Med Lav.* 2017;108(1):10-23.
19. Gurusamy N, Rajasingh J. Modern human lifestyle prejudices epigenetic changes to cuddle diseases. *Ann Transl Med.* 2019;7(5):82.
20. Marques ACPR, Cruz MS. O adolescente e o uso de drogas. *Brazilian Journal of Psychiatry.* 2000;22:32-36.
21. Mahna D, Puri S, Sharma S. DNA methylation signatures: Biomarkers of drug and alcohol abuse. *Mutat Res.* 2018;777:19-28.
22. Zhao R, Zhang R, Li W, et al. Genome-wide DNA methylation patterns in discordant sib pairs with alcohol dependence. *Asia Pac Psychiatry.* 2013;5(1):39-50.
23. Zhang R, Miao Q, Wang C, et al. Genome-wide DNA methylation analysis in alcohol dependence. *Addict Biol.* 2013;18(2):392-403.
24. Wilson R, Wahl S, Pfeiffer L, et al. The dynamics of smoking-related disturbed methylation: a two time-point study of methylation change in smokers, non-smokers and former smokers. *BMC Genomics.* 2017;18(1):805.
25. Murphy SK, Itchon-Ramos N, Visco Z, et al. Cannabinoid exposure and altered DNA methylation in rat and human sperm. *Epigenetics.* 2018;13(12):1208-1221.
26. Gerra MC, Jayanthi S, Manfredini M, et al. Gene variants and educational attainment in cannabis use: mediating role of DNA methylation. *Transl Psychiatry.* 2018;8(1):23.
27. Land MA, Ramesh D, Miller AL, et al. Methylation Patterns of the. *Front Psychiatry.* 2020;11:532.
28. Vaillancourt K, Yang J, Chen GG, et al. Cocaine-related DNA methylation in caudate neurons alters 3D chromatin structure of the IRXA gene cluster. *Mol Psychiatry.* 2020.
29. Shu C, Justice AC, Zhang X, et al. DNA methylation mediates the effect of cocaine use on HIV severity. *Clin Epigenetics.* 2020;12(1):140.
30. Raj K. Chapter 4 - The Epigenetic Clock and Aging. In: Moskalev A, Vaiserman AM, eds. *Epigenetics of Aging and Longevity.* Vol 4. Boston: Academic Press; 2018:95-118.

31. Xiao FH, Wang HT, Kong QP. Dynamic DNA Methylation During Aging: A "Prophet" of Age-Related Outcomes. *Front Genet.* 2019;10:107.
32. Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol.* 2013;14(10):R115.
33. Simpkin AJ, Hemani G, Suderman M, et al. Prenatal and early life influences on epigenetic age in children: a study of mother-offspring pairs from two cohort studies. *Hum Mol Genet.* 2016;25(1):191-201.
34. Colich NL, Rosen ML, Williams ES, McLaughlin KA. Biological aging in childhood and adolescence following experiences of threat and deprivation: A systematic review and meta-analysis. *Psychol Bull.* 2020;146(9):721-764.
35. Sumner JA, Colich NL, Uddin M, et al. Early Experiences of Threat, but Not Deprivation, Are Associated With Accelerated Biological Aging in Children and Adolescents. *Biol Psychiatry.* 2019;85(3):268-278.
36. Jovanovic T, Vance LA, Cross D, et al. Exposure to Violence Accelerates Epigenetic Aging in Children. *Sci Rep.* 2017;7(1):8962.
37. Tang R, Howe LD, et al. Adverse childhood experiences, DNA methylation age acceleration, and cortisol in UK children: a prospective population-based cohort study. *Clin Epigenetics.* 2020;12(1):55.
38. Hoare J, Stein DJ, Heany SJ, et al. Accelerated epigenetic aging in adolescents from low-income households is associated with altered development of brain structures. *Metab Brain Dis.* 2020;35(8):1287-1298.
39. Barcelona de Mendoza V, Huang Y, Crusto CA, Sun YV, Taylor JY. Perceived Racial Discrimination and DNA Methylation Among African American Women in the InterGEN Study. *Biol Res Nurs.* 2018;20(2):145-152.
40. Lawrence KG, Kresovich JK, O'Brien KM, et al. Association of Neighborhood Deprivation With Epigenetic Aging Using 4 Clock Metrics. *JAMA Netw Open.* 2020;3(11):e2024329.
41. Marioni RE, Shah S, McRae AF, et al. The epigenetic clock is correlated with physical and cognitive fitness in the Lothian Birth Cohort 1936. *Int J Epidemiol.* 2015;44(4):1388-1396.
42. Zannas AS, Arloth J, Carrillo-Roa T, et al. Lifetime stress accelerates epigenetic aging in an urban, African American cohort: relevance of glucocorticoid signaling. *Genome Biol.* 2015;16:266.
43. Cavalli G, Heard E. Advances in epigenetics link genetics to the environment and disease. *Nature.* 2019;571(7766):489-499.
44. Quach A, Levine ME, Tanaka T, et al. Epigenetic clock analysis of diet, exercise, education, and lifestyle factors. *Aging (Albany NY).* 2017;9(2):419-446.
45. de Toro-Martín J, Guénard F, Tchernof A, et al. Body mass index is associated with epigenetic age acceleration in the visceral adipose tissue of subjects with severe obesity. *Clin Epigenetics.* 2019;11(1):172.
46. Amenyah SD, Ward M, Strain JJ, et al. Nutritional Epigenomics and Age-Related Disease. *Curr Dev Nutr.* 2020;4(7):nzaa097.
47. Dugué PA, Bassett JK, Joo JE, et al. Association of DNA Methylation-Based Biological Age With Health Risk Factors and Overall and Cause-Specific Mortality. *Am J Epidemiol.* 2018;187(3):529-538.
48. Beach SR, Dogan MV, Lei MK, et al. Methylomic Aging as a Window onto the Influence of Lifestyle: Tobacco and Alcohol Use Alter the Rate of Biological Aging. *J Am Geriatr Soc.* 2015;63(12):2519-2525.
49. Lei MK, Beach SR, Dogan MV, Philibert RA. A pilot investigation of the impact of smoking cessation on biological age. *Am J Addict.* 2017;26(2):129-135.
50. Rosen AD, Robertson KD, Hlady RA, et al. DNA methylation age is accelerated in alcohol dependence. *Transl Psychiatry.* 2018;8(1):182.
51. Luo A, Jung J, Longley M, et al. Epigenetic aging is accelerated in alcohol use disorder and regulated by genetic variation in APOL2. *Neuropsychopharmacology.* 2020;45(2):327-336.
52. Levine ME, Hosgood HD, Chen B, et al. DNA methylation age of blood predicts future onset of lung cancer in the women's health initiative. *Aging (Albany NY).* 2015;7(9):690-700.
53. Lei MK, Gibbons FX, Simons RL, et al. The Effect of Tobacco Smoking Differs across Indices of DNA Methylation-Based Aging in an African American Sample: DNA Methylation-Based Indices of Smoking Capture These Effects. *Genes (Basel).* 2020;11(3).
54. Wu X, Huang Q, Javed R, et al. Effect of tobacco smoking on the epigenetic age of human respiratory organs. *Clin Epigenetics.* 2019;11(1):183.
55. Dunn J, Laranjeira RR, Da Silveira DX, et al. Crack cocaine: an increase in use among patients attending clinics in São Paulo: 1990-1993. *Subst Use Misuse.* 1996;31(4):519-527.
56. Abdalla RR, Madruga CS, et al. Prevalence of cocaine use in Brazil: data from the II Brazilian

- national alcohol and drugs survey (BNADS). *Addict Behav.* 2014;39(1):297-301.
57. Bastos FI, Berton 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 2014.
 58. Ribeiro de Araújo M, Laranjeira R. *O Tratamento do usuário de crack.* 2012.
 59. Lizasoain I, Moro MA, Lorenzo P. Cocaína: aspectos farmacológicos. *Adicciones.* 2002;14:57-64.
 60. Terra Filho M, Yen CC, Santos UdP, Muñoz DR. Pulmonary alterations in cocaine users. *Sao Paulo Medical Journal.* 2004;122:26-31.
 61. Jones RT. Pharmacokinetics of cocaine: considerations when assessing cocaine use by urinalysis. *NIDA Res Monogr.* 1997;175:221-234.
 62. Chasin AAdM, Silva ESd, Carvalho VM. Estimulantes do Sistema Nervoso Central. In: Oga S, Camargo MMdA, Batistuzzo JAdO, eds. *Fundamentos de Toxicologia.* 4 ed. São Paulo: Atheneu 2014.
 63. Kreek MJ, Bart G, Lilly C, et al. Pharmacogenetics and human molecular genetics of opiate and cocaine addictions and their treatments. *Pharmacol Rev.* 2005;57(1):1-26.
 64. Brunton LL, Chabner BA, Knollmann BC. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman - 12.ed.* McGraw Hill Brasil; 2012.
 65. Associação Brasileira de Psiquiatria. Abuso e dependência: crack. *Revista da Associação Médica Brasileira.* 2012;58:138-140.
 66. Miguel AQC, Madruga CS, Cogo-Moreira H, et al. Sociodemographic Characteristics, Patterns of Crack Use, Concomitant Substance Use Disorders, and Psychiatric Symptomatology in Treatment-Seeking Crack-Dependent Individuals in Brazil. *J Psychoactive Drugs.* 2018;50(4):367-372.
 67. Pachado MP, Scherer JN, Guimarães LSP, et al. Markers for Severity of Problems in Interpersonal Relationships of Crack Cocaine Users from a Brazilian Multicenter Study. *Psychiatr Q.* 2018;89(4):923-936.
 68. Pianca TG, Rohde LA, Rosa RL, et al. Crack Cocaine Use in Adolescents: Clinical Characteristics and Predictors of Early Initiation. *J Clin Psychiatry.* 2016;77(10):e1205-e1210.
 69. Forster GL, Anderson EM, et al. Negative consequences of early-life adversity on substance use as mediated by corticotropin-releasing factor modulation of serotonin activity. *Neurobiol Stress.* 2018;9:29-39.
 70. Edalati H, Krank MD. Childhood Maltreatment and Development of Substance Use Disorders: A Review and a Model of Cognitive Pathways. *Trauma Violence Abuse.* 2016;17(5):454-467.
 71. Carliner H, Keyes KM, McLaughlin KA, et al. Childhood Trauma and Illicit Drug Use in Adolescence: A Population-Based National Comorbidity Survey Replication-Adolescent Supplement Study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2016;55(8):701-708.
 72. Rovaris DL, Mota NR, Bertuzzi GP, et al. Corticosteroid receptor genes and childhood neglect influence susceptibility to crack/cocaine addiction and response to detoxification treatment. *J Psychiatr Res.* 2015;68:83-90.
 73. Stoffel CMMB, Felix Henrique PK, Flavio P, et al. Crack users and violence. What is the relationship between trauma, antisocial personality disorder and posttraumatic stress disorder? *Addict Behav.* 2019;98:106012.
 74. Narvaez JC, Jansen K, Pinheiro RT, et al. Psychiatric and substance-use comorbidities associated with lifetime crack cocaine use in young adults in the general population. *Compr Psychiatry.* 2014;55(6):1369-1376.
 75. Haasen C, Prinzleve M, et al. Relationship between cocaine use and mental health problems in a sample of European cocaine powder or crack users. *World Psychiatry.* 2005;4(3):173-176.
 76. Narvaez JCM, Ornell F, Kessler F, et al. Chapter 57 - Comorbidities Associated With the Use and Misuse of Crack Cocaine. In: Preedy VR, ed. *The Neuroscience of Cocaine.* San Diego: Academic Press; 2017:567-576.
 77. Palamar JJ, Ompad DC. Demographic and socioeconomic correlates of powder cocaine and crack use among high school seniors in the United States. *Am J Drug Alcohol Abuse.* 2014;40(1):37-43.
 78. Geppert C, Bogenschütz MP, Miller WR. Development of a bibliography on religion, spirituality and addictions. *Drug Alcohol Rev.* 2007;26(4):389-395.
 79. Rezende-Pinto A, Moreira-Almeida A, et al. The effect of religiosity during childhood and adolescence on drug consumption patterns in adults addicted to crack cocaine. *BJPsych Open.* 2018;4(5):324-331.
 80. Bergen SE, Gardner CO, Kendler KS. Age-related changes in heritability of behavioral phenotypes over adolescence and young adulthood: a meta-analysis. *Twin Res Hum Genet.* 2007;10(3):423-433.

81. Kendler KS, Schmitt E, Aggen SH, Prescott CA. Genetic and environmental influences on alcohol, caffeine, cannabis, and nicotine use from early adolescence to middle adulthood. *Arch Gen Psychiatry*. 2008;65(6):674-682.
82. Stolf AR, Szobot CM, Halpern R, et al. 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.
83. Stolf AR, Cupertino RB, Müller D, et al. Effects of DRD2 splicing-regulatory polymorphism and DRD4 48 bp VNTR on crack cocaine addiction. *J Neural Transm (Vienna)*. 2019;126(2):193-199.
84. Stolf AR, Müller D, Schuch JB, et al. Association between the Intron 8 VNTR Polymorphism of the DAT1 Gene and Crack Cocaine Addiction. *Neuropsychobiology*. 2017;75(3):141-144.
85. Rovaris DL, Aroche AP, da Silva BS, et al. Glucocorticoid receptor gene modulates severity of depression in women with crack cocaine addiction. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2016;26(9):1438-1447.
86. Anders QS, Klauss J, Rodrigues LCM, Nakamura-Palacios EM. mRNA Expression in Peripheral Blood Lymphocytes in Drug Addicted Patients. *Front Pharmacol*. 2018;9:1205.
87. Lehrmann E, Oyler J, Vawter MP, et al. Transcriptional profiling in the human prefrontal cortex: evidence for two activational states associated with cocaine abuse. *Pharmacogenomics J*. 2003;3(1):27-40.
88. Baron RM, Kenny DA. The moderator-mediator variable distinction in social psychological research: conceptual, strategic, and statistical considerations. *J Pers Soc Psychol*. 1986;51(6):1173-1182.
89. Mackinnon DP, Warsi G, Dwyer JH. A Simulation Study of Mediated Effect Measures. *Multivariate Behav Res*. 1995;30(1):41.
90. Wright S. On the Nature of Size Factors. *Genetics*. 1918;3(4):367-374.
91. Hayes A. The Simple Mediation Model. In: *Introduction to Mediation, Moderation, and Conditional Process Analysis: A Regression-Based Approach*. New York, NY: Guilford Press; 2013:85-122.
92. MacKinnon DP, Lockwood CM, Hoffman JM, West SG, Sheets V. A comparison of methods to test mediation and other intervening variable effects. *Psychol Methods*. 2002;7(1):83-104.
93. Sobel ME. Asymptotic Confidence Intervals for Indirect Effects in Structural Equation Models. *Sociological Methodology*. 1982;13:290-312.
94. Beran TN, Violato C. Structural equation modeling in medical research: a primer. *BMC Res Notes*. 2010;3:267.
95. Hox J, Bechger T. An Introduction to Structural Equation Modeling. *Family Science Review*. 1999;11.
96. Kline R. *Principles And Practice Of Structural Equation Modeling*. 2010.
97. Schermelleh-Engel K, Moosbrugger H, Müller H. Evaluating the Fit of Structural Equation Models: Tests of Significance and Descriptive Goodness-of-Fit Measures. *Methods of Psychological Research Online*. 2003;8:23-74.
98. Browne MW, Cudeck R. Alternative Ways of Assessing Model Fit. In: Bollen KA, Long JS, eds. *Testing structural equation models*. Vol 21. Newbury Park, CA: Sage; 1993:136-162.
99. Hu Lt, Bentler PM. Cutoff criteria for fit indexes in covariance structure analysis: Conventional criteria versus new alternatives. *Structural Equation Modeling: A Multidisciplinary Journal*. 1999;6(1):1-55.
100. Tabachnick BG, Fidell LS. *Using multivariate statistics, 5th ed*. Boston, MA: Allyn & Bacon/Pearson Education; 2007.
101. Hu Lt, Bentler PM. Fit indices in covariance structure modeling: Sensitivity to underparameterized model misspecification. *Psychological Methods*. 1998;3(4):424-453.
102. Tucker LR, Lewis C. A reliability coefficient for maximum likelihood factor analysis. *Psychometrika*. 1973;38(1):1-10.
103. Aho K, Derryberry D, Peterson T. Model selection for ecologists: the worldviews of AIC and BIC. *Ecology*. 2014;95(3):631-636.
104. Rosseel Y. lavaan: An R Package for Structural Equation Modeling. *Journal of Statistical Software; Vol 1, Issue 2 (2012)*. 2012.
105. Hannon E, Knox O, Sugden K, et al. Characterizing genetic and environmental influences on variable DNA methylation using monozygotic and dizygotic twins. *PLoS Genet*. 2018;14(8):e1007544.
106. Simons RL, Lei MK, Beach SR, et al. Economic hardship and biological weathering: The epigenetics of aging in a U.S. sample of black women. *Soc Sci Med*. 2016;150:192-200.
107. Green KM, Zebrak KA, Robertson JA, Fothergill KE, Ensminger ME. Interrelationship of substance use and psychological distress over the life course among a cohort of urban African

- Americans. *Drug Alcohol Depend.* 2012;123(1-3):239-248.
108. Becoña E, López-Durán A, Fernández del Río E, et al. Can we predict psychostimulant use in youths? A study with structural equation modeling analysis. *Adicciones.* 2012;24(4):339-346.
 109. Wilson HW, Widom CS. A prospective examination of the path from child abuse and neglect to illicit drug use in middle adulthood: the potential mediating role of four risk factors. *J Youth Adolesc.* 2009;38(3):340-354.
 110. Odell AP, Reynolds GL, Fisher DG, et al. Attention Deficit Hyperactivity Disorder, Aggression, and Illicit Stimulant Use: Is This Self-Medication? *J Nerv Ment Dis.* 2017;205(5):372-379.
 111. Edwards JM, Halpern CT, Wechsberg WM. Correlates of exchanging sex for drugs or money among women who use crack cocaine. *AIDS Educ Prev.* 2006;18(5):420-429.
 112. Aryee MJ, Jaffe AE, Corrada-Bravo H, et al. Minfi: a flexible and comprehensive Bioconductor package for the analysis of Infinium DNA methylation microarrays. *Bioinformatics.* 2014;30(10):1363-1369.
 113. McCartney DL, Walker RM, Morris SW, McIntosh AM, Porteous DJ, Evans KL. Identification of polymorphic and off-target probe binding sites on the Illumina Infinium MethylationEPIC BeadChip. *Genom Data.* 2016;9:22-24.
 114. Pidsley R, Zotenko E, Peters TJ, et al. Critical evaluation of the Illumina MethylationEPIC BeadChip microarray for whole-genome DNA methylation profiling. *Genome Biol.* 2016;17(1):208.
 115. 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):325-341.
 116. Triche TJ, Weisenberger DJ, Van Den Berg D, Laird PW, Siegmund KD. Low-level processing of Illumina Infinium DNA Methylation BeadArrays. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(7):e90.
 117. Johnson WE, Li C, Rabinovic A. Adjusting batch effects in microarray expression data using empirical Bayes methods. *Biostatistics.* 2007;8(1):118-127.
 118. Tian Y, Morris TJ, Webster AP, et al. ChAMP: updated methylation analysis pipeline for Illumina BeadChips. *Bioinformatics.* 2017;33(24):3982-3984.
 119. Teschendorff AE, Zhuang J, Widschwendter M. Independent surrogate variable analysis to deconvolve confounding factors in large-scale microarray profiling studies. *Bioinformatics.* 2011;27(11):1496-1505.
 120. Du P, Zhang X, Huang CC, et al. Comparison of Beta-value and M-value methods for quantifying methylation levels by microarray analysis. *BMC Bioinformatics.* 2010;11:587.
 121. Moreira-Almeida A, Peres M, Aloe F, Lotufo Neto F, Koenig H. Versão em português da Escala de Religiosidade da Duke: DUREL. *Rev psiquiatr clín.* 2008;35(1):31-32.
 122. Fleck MP, Louzada S, Xavier M, et al. [Application of the Portuguese version of the abbreviated instrument of quality life WHOQOL-bref]. *Rev Saude Publica.* 2000;34(2):178-183.
 123. Maydeu-Olivares A. Maximum Likelihood Estimation of Structural Equation Models for Continuous Data: Standard Errors and Goodness of Fit. *Structural Equation Modeling: A Multidisciplinary Journal.* 2017;24:1-12.
 124. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(7):e47.
 125. Peters TJ, Buckley MJ, Statham AL, et al. De novo identification of differentially methylated regions in the human genome. *Epigenetics Chromatin.* 2015;8:6.
 126. Bindea G, Mlecnik B, Hackl H, et al. ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics.* 2009;25(8):1091-1093.
 127. Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 2003;13(11):2498-2504.
 128. Fabregat A, Sidiropoulos K, Garapati P, et al. The Reactome pathway Knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(D1):D481-487.
 129. Osório FL, Salum GA, Donadon MF, Forni-Dos-Santos L, Loureiro SR, Crippa JA. Psychometrics properties of early trauma inventory self report - short form (ETISR-SR) for the Brazilian context. *PLoS One.* 2013;8(10):e76337.
 130. Amorim P. Mini International Neuropsychiatric Interview (MINI): validação de entrevista breve para diagnóstico de transtornos mentais. *Brazilian Journal of Psychiatry.* 2000;22:106-115.

131. Iacobucci D, Saldanha N, Deng X. A Meditation on Mediation: Evidence That Structural Equations Models Perform Better Than Regressions. *Journal of Consumer Psychology*. 2007;17(2):139-153.
132. Ciccarone F, Tagliatesta S, Caiafa P, Zampieri M. DNA methylation dynamics in aging: how far are we from understanding the mechanisms? *Mech Ageing Dev*. 2018;174:3-17.
133. Brown AN, Feng J. Drug Addiction and DNA Modifications. *Adv Exp Med Biol*. 2017;978:105-125.
134. Duailibi LB, Ribeiro M, Laranjeira R. Profile of cocaine and crack users in Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*. 2008;24:s545-s557.
135. Moreira MR, Fernandes FMB, Ribeiro JM, Franco Neto TdL. A review of Brazilian scientific output on crack - contributions to the political agenda. *Ciência & Saúde Coletiva*. 2015;20:1047-1062.
136. Madalena TS, Sartes LMA. Usuários de crack em tratamento em Comunidades Terapêuticas: perfil e prevalência. *Arquivos Brasileiros de Psicologia*. 2018;70:21-36.
137. Guimarães RA, de Oliveira Landgraf de Castro V, do Valle Leone de Oliveira SM, et al. Gender differences in patterns of drug use and sexual risky behaviour among crack cocaine users in Central Brazil. *BMC Psychiatry*. 2017;17(1):412.
138. Danieli RV, Ferreira MBM, Nogueira JM, Oliveira LNdc, Cruz EMTNd, Araújo Filho GMd. Perfil sociodemográfico e comorbidades psiquiátricas em dependentes químicos acompanhados em comunidades terapêuticas. *Jornal Brasileiro de Psiquiatria*. 2017;66:139-149.
139. Scheffer M, Pasa G, Almeida R. Alcohol, Cocaine, and Crack dependence and psychiatric disorders. *Psicologia: Teoria e Pesquisa*. 2010;26:533-541.
140. da Cunha SM, Araujo RB, Bizarro L. Profile and pattern of crack consumption among inpatients in a Brazilian psychiatric hospital. *Trends Psychiatry Psychother*. 2015;37(3):126-132.
141. Marques TC, Sarracini KL, Cortellazzi KL, et al. The impact of oral health conditions, socioeconomic status and use of specific substances on quality of life of addicted persons. *BMC Oral Health*. 2015;15:38.
142. Castro Neto AGd, Silva DCNd, Figueiroa MdS. Main mental disorders in crack-cocaine users treated at Psychosocial Care Centers for Alcohol and Drugs in the city of Recife, Brazil. *Trends in Psychiatry and Psychotherapy*. 2016;38:227-233.
143. Paiva CB, Ferreira IB, Bosa VL, Narvaez JCdM. Depression, anxiety, hopelessness and quality of life in users of cocaine/crack in outpatient treatment. *Trends in Psychiatry and Psychotherapy*. 2017;39:34-42.
144. Cucciare MA, Han X, Curran GM, Booth BM. Associations Between Religiosity, Perceived Social Support, and Stimulant Use in an Untreated Rural Sample in the U.S.A. *Subst Use Misuse*. 2016;51(7):823-834.
145. Schoenthaler SJ, Blum K, Braverman ER, et al. NIDA-Drug Addiction Treatment Outcome Study (DATOS) Relapse as a Function of Spirituality/Religiosity. *J Reward Defic Syndr*. 2015;1(1):36-45.
146. Moreira TeC, Figueiró LR, Fernandes S, et al. Quality of life of users of psychoactive substances, relatives, and non-users assessed using the WHOQOL-BREF. *Cien Saude Colet*. 2013;18(7):1953-1962.
147. Laguardia J, Campos MR, Travassos C, Najar AL, Anjos LAd, Vasconcellos MM. Brazilian normative data for the Short Form 36 questionnaire, version 2. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. 2013;16:889-897.
148. Falck RS, Wang J, Carlson RG, Siegal HA. Crack-cocaine use and health status as defined by the SF-36. *Addict Behav*. 2000;25(4):579-584.
149. Vyas CM, Hazra A, Chang SC, et al. Pilot study of DNA methylation, molecular aging markers and measures of health and well-being in aging. *Transl Psychiatry*. 2019;9(1):118.
150. Zhang Q, Vallerga CL, Walker RM, et al. Improved precision of epigenetic clock estimates across tissues and its implication for biological ageing. *Genome Med*. 2019;11(1):54.
151. Meng H, Cao Y, Qin J, et al. DNA methylation, its mediators and genome integrity. *Int J Biol Sci*. 2015;11(5):604-617.
152. Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet*. 2012;13(7):484-492.
153. Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*. 2013;38(1):23-38.
154. Braun PR, Han S, Hing B, et al. Genome-wide DNA methylation comparison between live human brain and peripheral tissues within individuals. *Transl Psychiatry*. 2019;9(1):47.
155. Smith AK, Kilaru V, Klengel T, et al. DNA extracted from saliva for methylation studies of psychiatric traits: evidence tissue specificity and relatedness to brain. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2015;168B(1):36-44.

156. Abdolmaleky HM, Pajouhanfar S, Faghankhani M, Joghataei MT, Mostafavi A, Thiagalingam S. Antipsychotic drugs attenuate aberrant DNA methylation of DTNBP1 (dysbindin) promoter in saliva and post-mortem brain of patients with schizophrenia and Psychotic bipolar disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2015;168(8):687-696.
157. Charaka V, Tiwari A, Pandita RK, Hunt CR, Pandita TK. Role of HP1 β during spermatogenesis and DNA replication. *Chromosoma.* 2020;129(3-4):215-226.
158. Zhu B, Huang YQ. [Effects of Silencing AKT Gene by shRNA on Proliferation, Apoptosis and Notch1 Signal Pathway in Jeko-1 Cells]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* 2015;23(3):679-683.
159. Mizuno M, Malta RS, Nagano T, Nawa H. Conditioned place preference and locomotor sensitization after repeated administration of cocaine or methamphetamine in rats treated with epidermal growth factor during the neonatal period. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1025:612-618.
160. Sokolov BP. Oligodendroglial abnormalities in schizophrenia, mood disorders and substance abuse. Comorbidity, shared traits, or molecular phenocopies? *Int J Neuropsychopharmacol.* 2007;10(4):547-555.
161. Corominas M, Roncero C, Ribases M, Castells X, Casas M. Brain-derived neurotrophic factor and its intracellular signaling pathways in cocaine addiction. *Neuropsychobiology.* 2007;55(1):2-13.
162. Brooks WS, Banerjee S, Crawford DF. G2E3 is a nucleo-cytoplasmic shuttling protein with DNA damage responsive localization. *Exp Cell Res.* 2007;313(4):665-676.
163. Crawford DF, Piwnica-Worms H. The G(2) DNA damage checkpoint delays expression of genes encoding mitotic regulators. *J Biol Chem.* 2001;276(40):37166-37177.
164. Fu S, Shao S, Wang L, et al. USP3 stabilizes p53 protein through its deubiquitinase activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;492(2):178-183.
165. Vaquerizas JM, Kummerfeld SK, Teichmann SA, Luscombe NM. A census of human transcription factors: function, expression and evolution. *Nat Rev Genet.* 2009;10(4):252-263.
166. Mai HN, Sharma G, Sharma N, et al. Genetic depletion of p53 attenuates cocaine-induced hepatotoxicity in mice. *Biochimie.* 2019;158:53-61.
167. Mai HN, Sharma N, Jeong JH, et al. P53 knockout mice are protected from cocaine-induced kindling behaviors via inhibiting mitochondrial oxidative burdens, mitochondrial dysfunction, and proapoptotic changes. *Neurochem Int.* 2019;124:68-81.
168. Nicassio F, Corrado N, Vissers JH, et al. Human USP3 is a chromatin modifier required for S phase progression and genome stability. *Curr Biol.* 2007;17(22):1972-1977.
169. Kumar R, González-Prieto R, Xiao Z, Verlaan-de Vries M, Vertegaal ACO. The STUbL RNF4 regulates protein group SUMOylation by targeting the SUMO conjugation machinery. *Nat Commun.* 2017;8(1):1809.
170. Zhang Z, Chen C, Guo W, Zheng S, Sun Z, Geng X. DNM3 Attenuates Hepatocellular Carcinoma Growth by Activating P53. *Med Sci Monit.* 2016;22:197-205.
171. Costas J, Carrera N, Alonso P, et al. Exon-focused genome-wide association study of obsessive-compulsive disorder and shared polygenic risk with schizophrenia. *Transl Psychiatry.* 2016;6:e768.
172. Romeu A, Arola L. Classical dynamin DNM1 and DNM3 genes attain maximum expression in the normal human central nervous system. *BMC Res Notes.* 2014;7:188.
173. Yang C, Mai H, Peng J, Zhou B, Hou J, Jiang D. STAT4: an immunoregulator contributing to diverse human diseases. *Int J Biol Sci.* 2020;16(9):1575-1585.
174. Xian Z, Jin G, Li H, et al. Imperatorin Suppresses Anaphylactic Reaction and IgE-Mediated Allergic Responses by Inhibiting Multiple Steps of Fc ϵ RI Signaling in Mast Cells: IMP Alleviates Allergic Responses in PCA. *Biomed Res Int.* 2019;2019:7823761.
175. Yasuda K, Nakanishi K, Tsutsui H. Interleukin-18 in Health and Disease. *Int J Mol Sci.* 2019;20(3).
176. Kraychete DC, Calasans MTdA, Valente CML. Citocinas pró-inflamatórias e dor. *Revista Brasileira de Reumatologia.* 2006;46:199-206.
177. Levandowski ML, Viola TW, Wearick-Silva LE, et al. Early life stress and tumor necrosis factor superfamily in crack cocaine withdrawal. *J Psychiatr Res.* 2014;53:180-186.
178. Wang Y, Teng H, Sapozhnikov DM, Du Q, Zhao M. Transcriptome Sequencing Reveals Candidate NF- κ B Target Genes Involved in Repeated Cocaine Administration. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2018;21(7):697-704.
179. López-Pedrajas R, Ramírez-Lamelas DT, Muriach B, et al. Cocaine promotes oxidative stress and microglial-macrophage activation in rat cerebellum. *Front Cell Neurosci.* 2015;9:279.

180. Smith J, Sen S, Weeks RJ, Eccles MR, Chatterjee A. Promoter DNA Hypermethylation and Paradoxical Gene Activation. *Trends Cancer*. 2020;6(5):392-406.
181. Voss AK, Strasser A. The essentials of developmental apoptosis. *F1000Res*. 2020;9.
182. Michalak EM, Villunger A, Adams JM, Strasser A. In several cell types tumour suppressor p53 induces apoptosis largely via Puma but Noxa can contribute. *Cell Death Differ*. 2008;15(6):1019-1029.
183. Hu H, Kahrizi K, Musante L, et al. Genetics of intellectual disability in consanguineous families. *Mol Psychiatry*. 2019;24(7):1027-1039.
184. Duan W, Zhang YP, Hou Z, et al. Novel Insights into NeuN: from Neuronal Marker to Splicing Regulator. *Mol Neurobiol*. 2016;53(3):1637-1647.
185. Kähler B, Romswinkel EV, Jakovcevski M, Moses A, Schachner M, Morellini F. Hyperfunction of the stress response system and novelty-induced hyperactivity correlate with enhanced cocaine-induced conditioned place preference in NCAM-deficient mice. *Addict Biol*. 2020:e12887.
186. Bami-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):1323-1335.
187. Hayase T, Yamamoto Y, Yamamoto K, Muso E, Shiota K. Microarray profile analysis of toxic cocaine-induced alterations in the expression of mouse brain gene sequences: a possible 'protective' effect of buprenorphine. *J Appl Toxicol*. 2004;24(1):15-20.
188. Lai HM, Cleary M, Sitharthan T, Hunt GE. Prevalence of comorbid substance use, anxiety and mood disorders in epidemiological surveys, 1990-2014: A systematic review and meta-analysis. *Drug Alcohol Depend*. 2015;154:1-13.
189. Paiva CB, Ferreira IB, Bosa VL, Narvaez JC. Depression, anxiety, hopelessness and quality of life in users of cocaine/crack in outpatient treatment. *Trends Psychiatry Psychother*. 2017;39(1):34-42.
190. Levandowski ML, Tractenberg SG, de Azeredo LA, et al. Crack cocaine addiction, early life stress and accelerated cellular aging among women. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2016;71:83-89.
191. Zubakov D, Liu F, Kokmeijer I, et al. Human age estimation from blood using mRNA, DNA methylation, DNA rearrangement, and telomere length. *Forensic Sci Int Genet*. 2016;24:33-43.
192. Lowe D, Horvath S, Raj K. Epigenetic clock analyses of cellular senescence and ageing. *Oncotarget*. 2016;7(8):8524-8531.
193. Dong Y, Huang Y, Gutin B, Raed A, Zhu H. Associations between Global DNA Methylation and Telomere Length in Healthy Adolescents. *Sci Rep*. 2017;7(1):4210.
194. Lee Y, Sun D, Ori APS, et al. Epigenome-wide association study of leukocyte telomere length. *Aging (Albany NY)*. 2019;11(16):5876-5894.
195. Chen BH, Carty CL, Kimura M, et al. Leukocyte telomere length, T cell composition and DNA methylation age. *Aging (Albany NY)*. 2017;9(9):1983-1995.
196. Rustad SR, Papale LA, Alisch RS. DNA Methylation and Hydroxymethylation and Behavior. *Curr Top Behav Neurosci*. 2019;42:51-82.
197. Weder N, Zhang H, Jensen K, et al. Child abuse, depression, and methylation in genes involved with stress, neural plasticity, and brain circuitry. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2014;53(4):417-424.e415.
198. Araujo RB, Pedrosa RS, Castro MdGTd. Adaptação transcultural para o idioma português do Cocaine Craving Questionnaire - Brief. *Archives of Clinical Psychiatry (São Paulo)*. 2010;37:195-198.
199. Araujo RB, Castro MdGTd, Pedrosa RS, et al. Psychometric validation of Cocaine Craving Questionnaire-Brief – Brazilian Crack Adapted Version inpatients dependents. *Jornal Brasileiro de Psiquiatria*. 2011;60:233-239.
200. Meneses-Gaya IC, Zuardi AW, Loureiro SR, Crippa JA. Psychometric properties of the Fagerström Test for Nicotine Dependence. *J Bras Pneumol*. 2009;35(1):73-82.
201. Pereira BA, Schram PF, Azevedo RC. [Evaluation of the Brazilian version of the CRAFFT/CESARE scale for screening drug use by adolescents]. *Cien Saude Colet*. 2016;21(1):91-99.
202. Lima CT, Freire AC, Silva AP, Teixeira RM, Farrell M, Prince M. Concurrent and construct validity of the audit in an urban Brazilian sample. *Alcohol Alcohol*. 2005;40(6):584-589.
203. Association AP. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders : DSM-III-R*. Washington, DC: American Psychiatric Association; 1987.