

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**VARIAÇÕES GENÉTICAS, DE METILAÇÃO E DESFECHOS  
PERINATAIS EM RECÉM-NASCIDOS COM EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL  
A CRACK / COCAÍNA NO RIO GRANDE DO SUL**

**Autora: Alejandra Rojas Gomez**

**Orientadora: Lavínia Schuler-Faccini**

**Coorientadora: Fernanda Sales Luiz Vianna**

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

**Porto Alegre**

**Março 2017**

Esse trabalho é parte do Instituto Nacional de Genética Médica Populacional (INaGeMP) e foi realizado no Laboratório de Genética Médica Populacional e Evolução do Departamento de Genética da UFRGS, com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

A aluna recebeu bolsa de estudos concedida pelo CNPq, vinculada ao Programa de Estudantes-Convênio de Pós-Graduação (PEC-PG)

## **AGRADECIMENTOS**

À professora Lavínia, por me receber de braços abertos e ajudar a realizar um sonho há muito tempo desejado.

À Thayne pela paciência para me ensinar...quando crescer quero ser como a Thayne. À Fernanda pela ajuda desde o começo do projeto.

À Cláudia e Víctor pela dedicação ao trabalhar com uma população muitas vezes esquecida, sem vocês este trabalho não teria sido possível. Ao Victor por partir rumo à Ítaca.

A todos os colegas do Lab 113 pelo apoio e otimismo. A Bruna, Augusto e Perpétua pela ajuda nos experimentos e apresentações.

Ao Gabriel, Ágata e Mustafá pelo carinho e companhia.

A mis amigos de Colombia y a toda mi familia, especialmente a mis papás y hermana, por su amor incondicional.

# Sumário

AGRADECIMENTOS	3
Lista de Abreviaturas	6
Resumo	9
Abstract	10
CAPÍTULO I	11
1. INTRODUÇÃO:	11
1.1 Crack: generalidades	11
1.2 Crack no Mundo	12
1.3 Chegada do crack no Brasil	13
1.4 Metabolismo da cocaína	14
1.5 Efeitos da exposição pré-natal ao crack/cocaína	15
1.5.1 Alterações na gravidez	15
1.5.2 Alterações na prole	15
1.5.2.1 Momento da exposição	19
1.5.2.2 Diferenças do efeito pré-natal da cocaína entre sexos.	20
1.5.2.3 Vias fisiopatológicas da cocaína pré-natal	22
1.6 Cocaína/crack e epigenética	24
1.6.1 Efeitos epigenéticos da exposição pré-natal ao crack/cocaína: modelos animais	26
1.6.1.1 Cérebro e sistema nervoso central	26
1.6.1.2 Coração	28
1.6.1.2.1 Sítio de ligação do fator de transcrição AP-1	28
1.6.1.2.2 Sítio de ligação do fator de transcrição fator de transcrição Sp1	32
1.6.1.2.3 Gene candidato <i>PRKCε</i>	33
Família PRKC	33
Gene PRKCE	34
Função	34
Modelo Animal	36
1.7 Variações genéticas e desfechos em recém-nascidos expostos à cocaína	36
Gene ABCB1	37
CAPÍTULO II	39

2	JUSTIFICATIVA	39
2.1	OBJETIVOS PRINCIPAIS	40
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
2.3	MATERIAIS E MÉTODOS	41
2.3.1	Delineamento do Estudo	41
2.3.2	Sujeitos do estudo	41
2.3.3	Aspectos Éticos	42
2.3.4	Análises Laboratoriais	42
2.3.4.1	Coleta e Extração de DNA	42
2.3.4.2	Análises de Metilação de DNA	42
2.3.4.3	Análise de polimorfismo ABCB1	46
2.3.4.4	Análise estatística	46
	CAPÍTULO III	47
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
3.1.1	Caracterização dos participantes de pesquisa	47
3.1.1.1	Consumo de crack e outras substâncias.	50
3.1.2	Análise de metilação	51
3.1.2.1	Identificação dos locais de ligação de fatores de transcrição.	52
3.1.2.2	Identificação de ilhas CpG	52
3.1.2.3	Confirmação da PCR	54
3.1.2.4	Eficiência da conversão	54
3.1.2.5	Polimorfismos na região não traduzida (UTR) e exon 1 de PRKCE	55
3.1.2.6	Porcentagem de metilação em bebês expostos e não expostos ao crack/cocaína pré-natalmente.	59
3.1.3	Polimorfismo <i>ABCB1</i>	64
3.1.3.1	Polimorfismo nas mães	64
3.1.3.2	Polimorfismo nos bebês	69
3.1.3.2.1	Desfechos neonatais adversos e o polimorfismo	71
	CAPÍTULO IV	80
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	80
4.1	REFERÊNCIAS	81

## Lista de Abreviaturas

ABCB1	<i>ATP Binding Cassette Subfamily B Member 1</i>
AE	ecgonidina
AEME	anidroecgonina metil éster
AP-1	<i>activator protein 1</i>
ASSIST	<i>Alcohol, Smoking and Substance Involvement Screening Test</i>
<i>BChE</i>	butirilcolinesterase
<i>BDNF</i>	fator neurotrófico derivado do cérebro
<i>COMT</i>	catecol-O-metiltransferase
DNMT3A	DNA metil transferase 3A
DNMT3B	DNA metil transferase 3B
<i>DYRK3</i>	<i>Dual Specificity Tyrosine Phosphorylation Regulated Kinase 3</i>
EPC	exposição pré-natal ao crack/cocaína
<i>FKBP5</i>	<i>FK506 binding protein 5 - proteína de ligação ao FK506</i>
GABA	ácido gama-aminobutírico
GATA4	GATA binding protein 4

GMP	progenitor de granulócitos/macrófagos
gp-P	glicoproteína de permeabilidade
<i>GPR73</i>	<i>prokineticin receptor-1</i> - receptor de procinetina 1
<i>GTF3c1</i>	<i>General Transcription Factor IIIC Subunit 1</i>
HHA	eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
HSD11B	11 $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 1
IL-10	Interleucina 10
IL1B	interleucina-1-beta
IL-6	Interleucina 6
IR	isquemia- reperfusão
LPS	lipopolissacárido
<i>MeCP2</i>	proteína de ligação Metil CpG 2
<i>MTAP6</i>	microtubule-associated protein 6
NK	<i>natural killer</i>
<i>NR3C1</i>	receptor glicocorticóide
<i>PLK2</i>	<i>Serine/threonine-protein kinase</i> – proteína quinase serina treonina
<i>PRKCE</i>	<i>Protein kinase C epsilon</i> – proteína quinase c épsilon

<i>PTPN5</i>	<i>Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 5</i>
RBC	glóbulos vermelhos
sAA	alfa-amilase salivar
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> - Polimorfismo de nucleotídeo único
Sp1	<i>specificity protein 1</i> - proteína de especificidade 1
TDAH	transtorno de déficit de atenção e hiperatividade
TFBS	Sítios prováveis de ligação de fatores de transcrição
TNFA	fator de necrose tumoral-alfa
UTR	<i>Untranslated region</i> - região não traduzida
VE	Ventrículo esquerdo

## Resumo

O consumo de crack/cocaína no Brasil é um problema de saúde pública que se agrava nos últimos anos. Tanto fatores epigenéticos, como polimorfismos de suscetibilidade a teratógenos são uma área ainda pouco explorada e em estudos com exposição pré-natal à cocaína em humanos. Estudos em ratos mostram mudanças na metilação do gene da proteína quinase C épsilon (*PRKCE*) nos corações da prole exposta à cocaína. Por outro lado o gene *ABCB1* que codifica a glicoproteína P pode influenciar o efeito pré-natal do crack/cocaína, dado que já foi associado com menor proteção fetal contra potenciais teratógenos. Assim, os principais objetivos do presente estudo foram: (1) investigar o padrão de metilação do DNA da região reguladora do gene *PRKCE* em bebês expostos ao crack/cocaína em comparação com bebês não expostos e; (2) estudar em pares mãe-bebê de expostos e não expostos, o polimorfismo C3435T do gene *ABCB1* e a presença de desfechos adversos perinatais. A metilação foi avaliada através da conversão por bissulfito em amostras de DNA de 19 bebês expostos e 12 não expostos, porém não foi detectada metilação em nenhum destes. O polimorfismo de *ABCB1* foi testado em 45 mulheres usuárias de crack e 43 bebês, e em 89 mulheres não usuárias e 42 bebês. Nas mulheres autodeclaradas brancas foi encontrada diferença entre as frequências alélicas (T:0,59 usuárias; 0,36 não usuárias;  $p=0,019$ ). Em num modelo de alelo de risco dominante (CT+TT), a diferença se manteve ( $p=0,042$ ), sugerindo que a presença do alelo T possa estar associada ao consumo de droga. Não foi encontrada associação entre o polimorfismo da mãe ou do bebê e a presença de desfechos adversos perinatais no bebê (baixo peso, crescimento fetal intrauterino, prematuridade). No entanto, genótipos com o alelo T foram mais frequentes em mães brancas cujos bebês foram hospitalizados ( $p<0,001$ ) e nos bebês hospitalizados ( $p<0,001$ ). Isto pode indicar que a presença do alelo T estaria envolvido numa maior vulnerabilidade do bebê ao uso de substâncias durante a gravidez. Estudos com números amostrais maiores serão necessários para confirmar esta hipótese.

## Abstract

Crack cocaine use in Brazil is a public health problem that has worsened in recent years. Epigenetic factors and polymorphisms of susceptibility to teratogens have not yet been explored in studies with humans exposed to crack/cocaine. Studies in rats show changes in the promoter methylation of the protein kinase C epsilon (*Prkce*) gene in the hearts of exposed offspring. On the other hand, the *ABCB1* gene encoding the P-glycoprotein may influence the prenatal effect of crack/cocaine, since it has been associated with less fetal protection against potential teratogens. Therefore, the main objectives of the present study were: (1) to investigate the DNA methylation pattern of the regulatory region of the *PRKCε* gene in babies exposed to crack / cocaine compared to the methylation patterns of unexposed babies; (2) to study the C3435T polymorphism of the *ABCB1* gene in exposed and unexposed mother-infant pairs and the presence of adverse perinatal outcomes. Methylation was evaluated in 19 exposed and 12 unexposed infants, but no methylation was detected in either group. The *ABCB1* polymorphism was tested in 45 female crack users and 43 babies, and in 89 non-users women and 42 babies. A difference was found between the allelic frequencies in self-reported white women (T:0.59 users; 0.36 nonusers,  $p=0.019$ ). In a dominant risk allele model (CT+TT), this difference persisted, suggesting that the presence of the T allele associated with drug use. No association was found between the polymorphisms of the mother or the baby and the presence of adverse outcomes in the infants (low birth weight, fetal intrauterine growth, prematurity). However, genotypes with the T allele were more frequent in white mothers whose infants were hospitalized ( $p<0.001$ ) and in hospitalized infants ( $p <0.001$ ). This may be an indication that the presence of the T allele would be involved in a greater vulnerability of the baby to the use of substances during pregnancy. Studies with larger samples will be needed to confirm this hypothesis.

# **CAPÍTULO I**

## **1. INTRODUÇÃO:**

### **1.1 Crack: generalidades**

O crack é uma substância psicoativa euforizante (estimulante), preparada à base da mistura da pasta de cocaína com bicarbonato de sódio (Conselho, 2011), que pode ser obtida de várias maneiras (figura 1). Após tratamentos químicos, o resultado é uma pedra, de cor branca ou amarelada, dependendo dos ingredientes utilizados e sua proporção. Essa pedra possui os mesmos princípios ativos da cocaína, porém com alguns efeitos diferentes. Por ser volátil, pode ser fumada, atingindo o sistema nervoso central em segundos, tornando-se uma droga muito potente (Domanico, 2006, citado por Camargo, 2014).

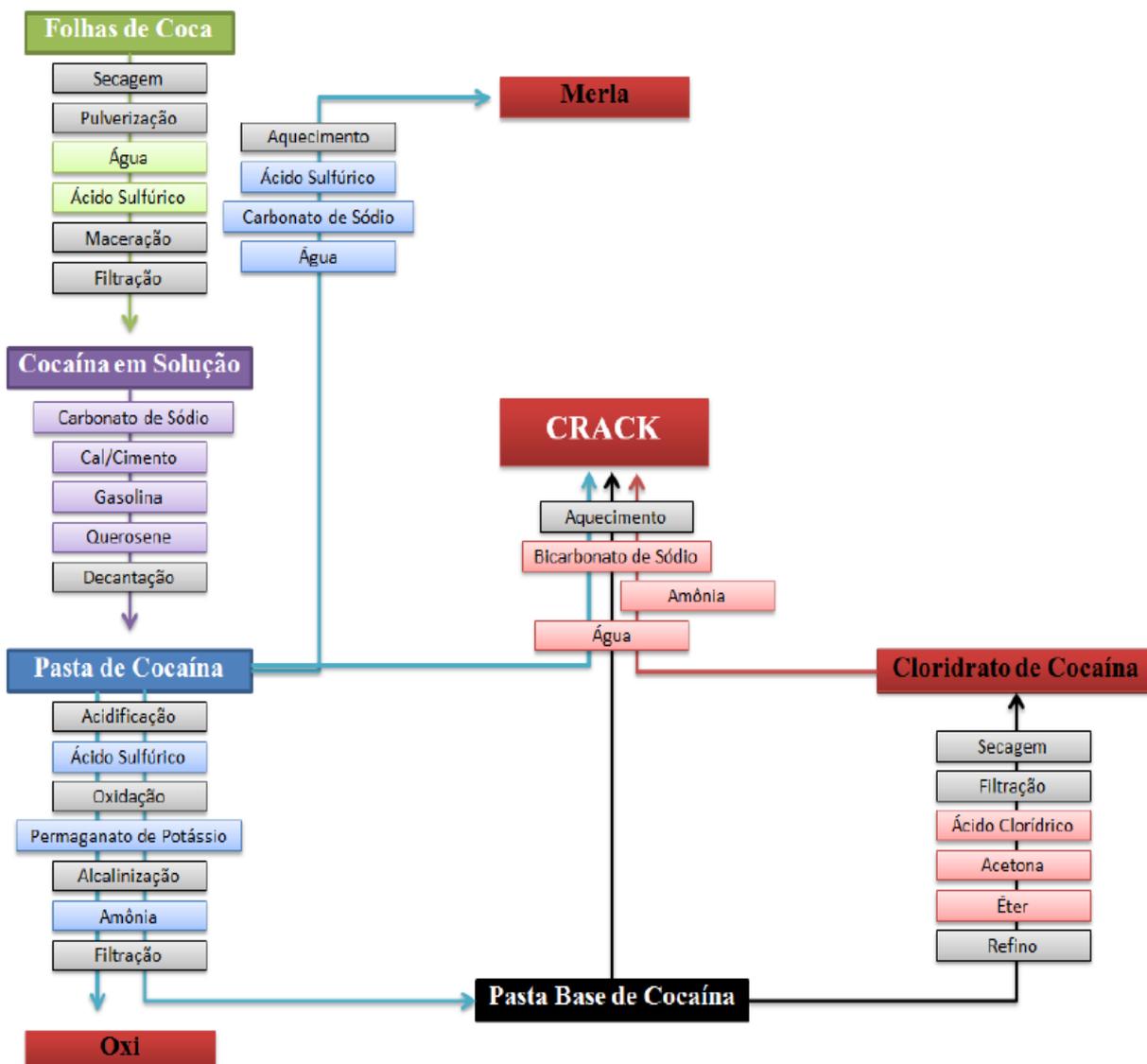
Fumar crack pode ocasionar vários tipos de danos. São frequentes os problemas respiratórios causados pela inspiração de partículas sólidas ao fumar essa droga. Por ser um estimulante, leva também à perda de apetite, insônia e agitação motora. Estes efeitos dificultam, por sua vez, a ingestão de alimentos, podendo levar à desnutrição e desidratação. Observa-se também outros sintomas, como rachaduras nos lábios, causados pela falta de ingestão de água e de salivagem, além de queimaduras nos dedos e, em alguns usuários, no nariz, causadas pela chama usada para fumar o crack (Domanico, 2006).

Com o término das sensações de bem-estar, surgem os efeitos negativos da droga, associados à abstinência e necessidade de maior consumo da substância. Alguns dos efeitos causados pelo uso do crack são: dilatação das pupilas, hipertensão, convulsões, sudorese, tremores intensos, taquicardia e até mesmo o coma (Camargo, 2014). Em geral, a cocaína, apresenta riscos tais como transtornos neurológicos e psiquiátricos e morte por overdose (Ribeiro et al, 2010).

## 1.2 Crack no Mundo

A cocaína foi isolada das folhas de coca em 1859 e em 1883 já era testada no exército alemão como estimulante. A partir da década de 1970, a difusão do uso de drogas na classe média americana e européia impulsionou a retomada do pó por aspiração. Porém, o alto preço manteve o seu uso confinado a uma parte da população. O crack, uma forma fumável de cocaína, surgiu ao redor de 1980 entre setores carentes dos Estados Unidos. O cloridrato de cocaína era dissolvido em água, adicionava-se bicarbonato de sódio, aquecia-se a mistura que, ao secar, adquiria a forma de pedras. O crack ao ser aceso libera um vapor que é em grande parte cocaína pura (Domanico, 2006).

O crack logo se tornou muito popular e em virtude do fumo ser uma forma mais eficiente de levar a droga ao cérebro. A diminuição da quantidade de cocaína necessária para produzir um efeito forte possibilitou uma redução considerável no preço. Muitas vezes, os insumos químicos necessários para a transformação da pasta base em cocaína, não estavam prontamente disponíveis devido ao controle governamental exercido sobre a sua comercialização. Para evitar maiores perdas financeiras, os traficantes passaram a produzir uma forma menos pura e barata. O aumento no consumo do crack é de certo modo, um resultado da política antidrogas, uma vez que a ausência dos componentes químicos levou os comerciantes de drogas ao uso de cocaína fumada (Domanico, 2006).



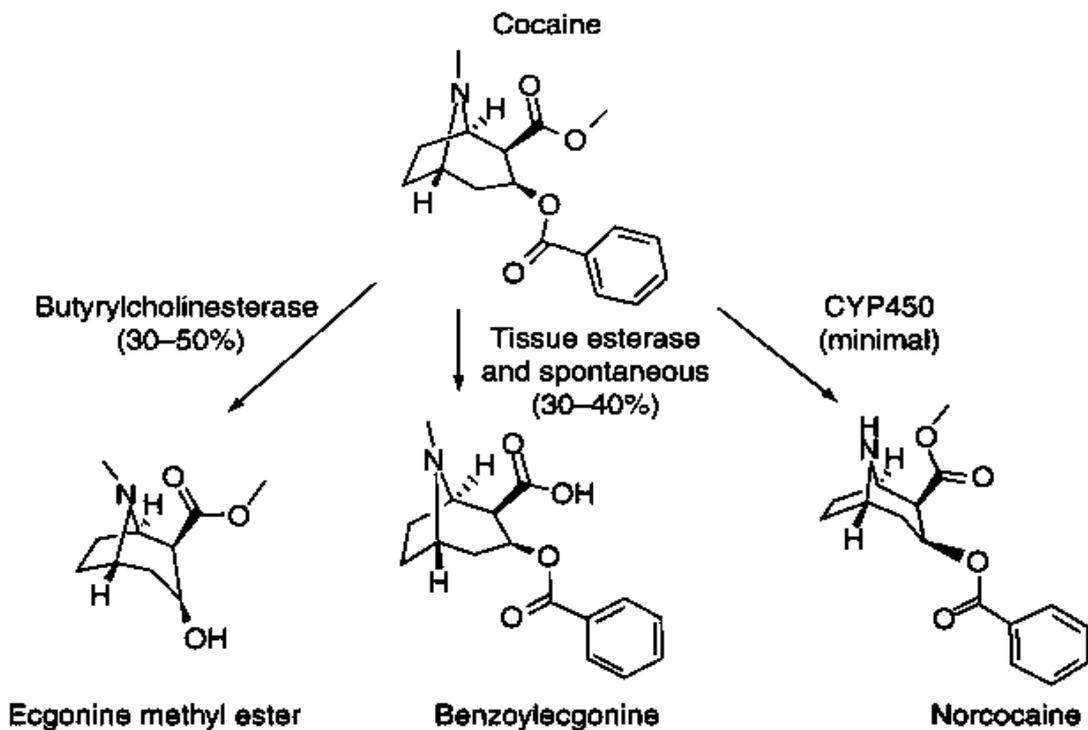
**Figura 1.** Etapas de processos físico/químicos para obtenção de cocaína e de seus produtos a partir de folha de coca. (Camilo 2015).

### 1.3 Chegada do crack no Brasil

A primeira apreensão de crack no Brasil foi feita pela Polícia Civil de São Paulo em 1991, apesar do crack ter sido relatado no país desde 1989 (Inciardi, 1993 citado por Gonçalves & Nappo, 2015). Considerando o cenário mundial, o Brasil responde atualmente por 20% do consumo, e é o maior mercado do mundo (De Freitas, 2014). Em 2013, o consumo de crack/cocaína foi de 2,2% na população total, excluindo o grupo de idosos (Abdalla, 2014).

## 1.4 Metabolismo da cocaína

A butirilcolinesterase (BChE) metaboliza a cocaína (Figura 2), e variantes genéticas do gene *BCHE* alteram a sua atividade catalítica. Lockridge (2015) lista 75 variantes genéticas da BChE e relata que alguns indivíduos não têm BChE ativa mas são sujeitos saudáveis. No entanto, já foi sugerido que indivíduos deficientes em BChE podem ser intoxicados gravemente por uma dose de cocaína que é tolerada por outros, embora esta hipótese não tenha sido comprovada. A BChE está a caminho de se tornar um medicamento aprovado pela FDA para o tratamento de abuso de cocaína (Lockridge, 2015) e resultados de Negrão et al. (2013) sugerem que o genótipo AA do rs1803274 é um fator de risco para o uso de crack.



**Figura 2.** Metabolismo da cocaína (Schindler et al. 2012)

Por outro lado, considerando que o crack é a cocaína sob formulação molecular distinta do pó de cocaína, sua ação no organismo é similar. No entanto, há um metabólito que diferencia a via pulmonar das demais vias: o metilecgonidina, também chamado de anidroecgonina metil éster (AEME), que ocorre a partir da pirólise da cocaína. Assim, indivíduos que usam o crack, além da exposição à cocaína também estão expostos a essa substância (Paul et al., 2005 citado por Camilo 2015). A extensão da biotransformação desta molécula depende da atividade das enzimas responsáveis por sua biotransformação nos órgãos e esta decresce na seguinte ordem: fígado, pulmões, rins e cérebro. A AEME é biotransformada rapidamente, tanto por hidrólise enzimática pela enzima BChE quanto por processos não enzimáticos, produzindo ecgonidina (AE) que é excretado na urina (García, 2014).

## **1.5 Efeitos da exposição pré-natal ao crack/cocaína**

### **1.5.1 Alterações na gravidez**

O uso materno da cocaína foi associado com descolamento prematuro da placenta (Addis et al. 2001, Burkett et al. 1994 citado por Bhuvanewar et al. 2008), o qual é provavelmente causado por vasoespasmo e hipóxia, embora este possa estar mais associado ao uso frequente e episódico de cocaína (*binge*) do que ao uso esporádico. Também são observadas: ruptura prematura de membranas, parto prematuro e convulsões maternas. As contrações uterinas são comumente causadas pela cocaína, talvez devido à ação  $\beta$ -agonista nos receptores  $\beta_2$  do útero (Little et al. 2001, citado por Bhuvanewar et al. 2008)).

### **1.5.2 Alterações na prole**

Algumas das primeiras pesquisas sugeriram um fenótipo muito grave em crianças expostas à cocaína no útero (Chasnoff et al. 1985, 1987). As crianças foram descritas como emocionalmente perturbadas, com deficiência cognitiva, menos propensas a interagir socialmente, e com mais chance de ocorrência da síndrome de morte súbita do lactente. Assim, o termo "crack-baby" foi

introduzido para descrever as crianças expostas à cocaína pré-natal. No entanto, estes estudos originais tinham fatores de confusão como amostras muito pequenas, consumo concomitante de outras drogas, estado nutricional deficiente e outros problemas psicossociais (Thompson et al., 2009).

Em uma revisão realizada por Ross et al. (2015) são listados estudos bem controlados que demonstraram que a exposição pré-natal à cocaína de fato afeta o crescimento físico fetal e resulta em aumento de nascimentos prematuros e restrição do crescimento generalizada - incluindo baixo peso ao nascer, circunferência cefálica menor e restrição de crescimento para a idade gestacional (Bateman et al. 2000, Covington et al., 2002; Mayes et al., 2003, Gouin et al., 2011, Lumeng et al. 2007; Richardson et al. 2007, Bigsby et al. Al, 2011; Aghamohammadi & Zafari, 2016). Na mesma revisão, alterações de comportamento infantil foram documentadas, incluindo maior excitabilidade, nervosismo, entre outros (Singer et al., 2000, Lester et al., 2002, Tronick et al., 2005, Martin et al. 2016,). Além disso, o estudo longitudinal de Cleveland (Singer, 2015), encontrou que a exposição pré-natal à cocaína estava relacionada a um menor QI de organização perceptiva, processamento de informação visual e espacial, atenção, linguagem, função executiva e regulação do comportamento durante o início da adolescência.

Por outro lado, estão os achados de um estudo longitudinal que examinou o impacto da exposição à cocaína no útero sobre o desenvolvimento neurológico (*The Miami Prenatal Cocaine Study MPCCS*). Os participantes, 476 crianças afro-americanas, foram recrutados a partir de nascimentos a termo, entre novembro de 1990 e julho 1993 na Universidade de Miami. Metade das mães consumia drogas de forma frequente e a outra metade não. O estudo, ainda em andamento, deu origem a vários artigos científicos. A análise comparativa entre o grupo de expostos e não expostos mostrou o seguinte:

- Maior prevalência de deficiências na linguagem aos sete anos de idade

(Bandstra et al., 2004).

- Menor qualidade na interação mãe-filho durante a primeira infância (três e cinco anos de idade) (Mansoor et al., 2012)
- Maior prevalência de deficiência de aprendizagem aos sete anos de idade (Morrow et al. 2006).
- Menor controle de comportamento aos sete anos (Accornero et al. 2011).
- Ausência de associação entre exposição à cocaína pré-natal e risco de doença cardiometabólica em afro-americanos com idades entre 18 e 20 anos. (Messiah et al. 2015).

Lagasse et al. (2011) observaram que a exposição pré-natal à cocaína aumentou a probabilidade de obesidade em 561 crianças de 9 anos, no Estudo de Estilo de Vida Materna (*Maternal Lifestyle Study MLS*). A análise logística multivariada revelou que as crianças expostas à cocaína, mas não ao álcool, tinham 4 vezes mais probabilidade de serem obesas (OR 4,11, IC 2,04-9,76).

Numa revisão em 2010 realizada por Lester & Lagaster, foram identificados 42 estudos publicados sobre o comportamento e desenvolvimento das crianças com exposição pré-natal à cocaína entre quatro e treze anos de idade. A maioria dos estudos (n = 34) foram publicados entre 2004 e 2008. A revisão desses 42 estudos sugere que existem efeitos exclusivos da exposição à cocaína pré-natal em crianças em uma série de domínios, incluindo problemas de comportamento, atenção, linguagem e cognição. Em psicopatologia, fisiologia e desempenho motor, poucos estudos foram publicados. É importante notar que, em geral, os efeitos observados foram a partir de amostras razoavelmente grandes, com ajuste para as variáveis de confusão, sugerindo que estes são "verdadeiros" efeitos da cocaína.

O uso recreativo de cocaína durante a gravidez resulta em um fenótipo de

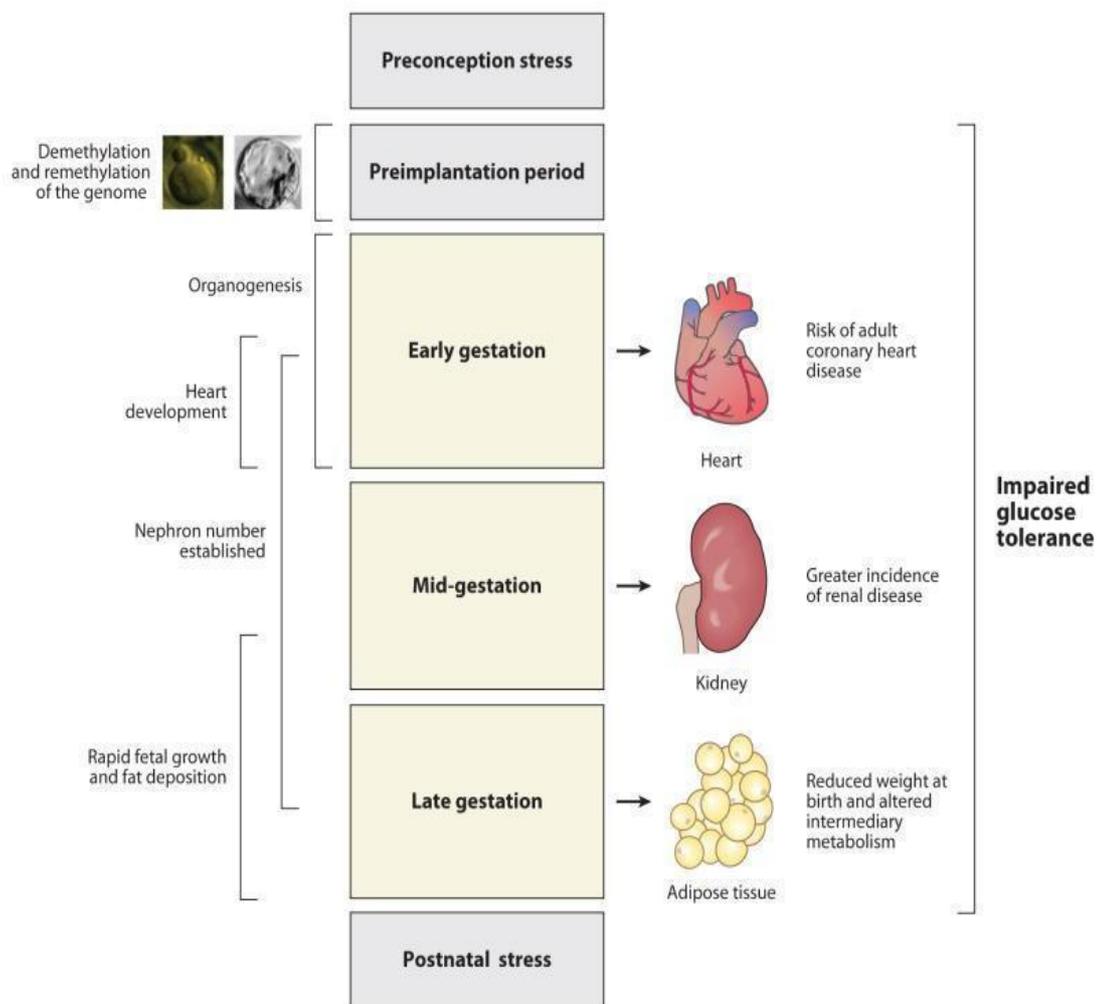
desenvolvimento que se assemelha ao transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH), embora de forma sutil (Levine et al. 2008).

Existe risco aumentado de infecção pelo HIV e outros agentes infecciosos através da transmissão vertical da mãe para o feto devido à vasculopatia induzida pela cocaína. Esta mesma vasculopatia reduz a eficácia da barreira hematoencefálica fetal, facilitando a exposição fetal a outras substâncias teratogênicas - um problema clinicamente significativo, uma vez que a cocaína raramente é usada sozinha por aqueles com dependência (Bhuvanewar, 2008)

Finalmente, uma ampla revisão dos efeitos da cocaína pré-natal no neurodesenvolvimento foi realizada por Martin et al. (2016) incluindo pesquisas em humanos e em animais. Na revisão são abordados os principais efeitos no comportamento, na anatomia do cérebro e os mecanismos envolvidos (neurotransmissores, migração neuronal, morte celular e neurogêneses, a cocaína suprimiu a transição da fase G1 à fase S). Os pesquisadores salientam que os modelos animais de exposição pré-natal à cocaína (EPC) sugerem que a cocaína realmente altera o desenvolvimento do cérebro levando a défices comportamentais e cognitivos a longo prazo. Esses modelos animais permitem controlar os fatores de confusão, como o uso de múltiplas drogas maternas que são limitações inevitáveis de estudos em humanos. Esses animais também permitem explorar mudanças epigenéticas e efeitos transgeracionais de EPC através de seus efeitos em células germinativas.

### **1.5.2.1 Momento da exposição**

Pesquisas sobre o momento da exposição à cocaína com relação aos resultados maternos e fetais sugerem que os efeitos perinatais da cocaína durante o primeiro trimestre estão associados à diminuição da circunferência cefálica e menor memória de curto prazo entre crianças, comportamento delinquente de crianças e adolescentes, idade precoce da iniciação sexual e iniciação de outro consumo de substâncias na adolescência. Os exames de uso perinatal de cocaína durante o segundo e terceiro trimestres são relativamente raros, possivelmente devido a subnotificação (Forray, 2015). Como tal, é necessária mais investigação nesta área, no entanto a informação disponível sobre estresse pré-natal devido a outros fatores pode ser útil para populações como a desta dissertação, dado que o consumo de drogas não é o único estressor presente (ver a maior presença de psicopatologias nas usuárias de crack (Mardini et al. 2016) Por exemplo, os resultados de estresse devido a desastres naturais sugerem que cada momento da gravidez apresenta uma janela de vulnerabilidade para alguma forma de desenvolvimento. Na figura 3, é mostrado períodos de sensibilidade durante a gravidez segundo os dados de uma coorte holandesa.



**Figura 3.** Períodos críticos de sensibilidade durante a gravidez humana para o desenvolvimento de componentes da síndrome metabólica mais tarde na vida. Os diferentes efeitos do estresse durante a gravidez podem ser explicados pelos eventos celulares que ocorrem durante determinados períodos de gravidez. Os dados foram obtidos a partir da coorte holandesa sujeitos a fome extrema. (Rinaudo & Wang 2012)

### 1.5.2.2 Diferenças do efeito pré-natal da cocaína entre sexos.

Outro ponto importante da cocaína pré-natal são os efeitos dependentes do gênero que é um fenômeno comum, não só após exposição pré-natal ao crack/cocaína, mas em geral após o estresse *in utero* (Glover 2015).

Estas diferenças nos efeitos do estresse pré-natal podem ser causadas por

múltiplos mecanismos que não são claramente compreendidos. Além das diferenças nos esteróides sexuais, esses efeitos podem estar relacionados com variações na ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), diferenças nas respostas ao estresse oxidativo e, no caso de camundongos, a taxa de crescimento pós-natal mais rápida de machos em comparação com fêmeas (Rinaudo & Wang 2012).

A seguir, relatam-se alguns estudos que mostram as diferenças entre sexos do efeito pré-natal da cocaína.

Em um estudo longitudinal realizado por Chaplin et al. (2015) foram examinadas múltiplas medidas bio-comportamentais, incluindo a frequência cardíaca, pressão arterial, emoção e cortisol salivar e alfa-amilase salivar (sAA), em resposta a um estressor em 193 adolescentes (14 a 17 anos), metade dos quais tiveram exposição pré-natal à cocaína (EPC). O consumo de drogas ao longo da vida deles foi avaliado com auto-relato, entrevista e toxicologia. Os achados sugerem perfis distintos de risco comportamental entre mulheres e homens com EPC e indicam que seria útil direcionar ações preventivas às mulheres com respostas de estresse elevadas e em meninos com baixas respostas ao estresse, para prevenir transtornos de uso de substâncias.

Além disso, estudos de indivíduos com exposição pré-natal à cocaína, indicam problemas gerais de função executiva em crianças de 12 anos com maiores quantidades de exposição pré-natal; em particular, as mulheres tiveram maiores problemas com atividades de memória de trabalho e organização (Minnes et al., 2014 citado por Rose et al. 2015). Carmody et al. (2011) documentaram que a exposição à cocaína afetou a atenção e o desempenho de controle inibitório em homens, mas não em mulheres, com idades entre 6, 9 e 11 anos.

Mardini et al. (2016), trabalhando com uma amostra que inclui os indivíduos estudados neste projeto, encontraram uma diferença significativa

entre os sexos nos casos, onde a mediana de IL-6 (perfil pró-inflamatório) foi significativamente maior nos meninos do que nas meninas.

Embora o nível médio de IL-10 (perfil anti-inflamatório) também tenha sido maior em meninos recém-nascidos com história de exposição a crack/cocaína no útero do que em meninas expostas, essa diferença não atingiu significância estatística ( $p = 0,14$ ). Interessantemente, não se encontraram diferenças significativas para IL-10 ( $p = 0,42$ ) ou IL-6 ( $p = 0,33$ ) ao analisar os recém-nascidos controle isoladamente.

Resumindo os achados deste estudo, entre os recém-nascidos expostos, os de sexo masculino foram particularmente vulneráveis à ativação inflamatória.

Os mecanismos neurobiológicos que levam às diferenças dependentes do sexo na disrupção da função executiva após a cocaína pré-natal, não são entendidos; no entanto, esta é uma consideração importante para futuras investigações.

### **1.5.2.3 Vias fisiopatológicas da cocaína pré-natal**

Em geral, os efeitos da cocaína sobre o desenvolvimento fetal mencionados anteriormente, são explicados ao longo de duas vias fisiopatológicas principais: efeitos neuroquímicos e, efeitos vasoconstritores. Lester & Padbury (2009) propuseram uma terceira fisiopatologia em que é alterada a programação fetal gerando efeitos adversos a longo prazo por alteração do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA). Este modelo explicaria, nas crianças com exposição pré-natal à cocaína, as mudanças comportamentais a longo prazo, vulnerabilidade ao uso de substâncias na adolescência, o maior índice de massa corporal, entre outros. No entanto, alterações do HHA também explicariam desfechos perinatais como a restrição de crescimento intrauterino e

o alto nível de cortisol na urina de bebês prematuros expostos à cocaína (Lester & Padbury 2009). Além disso, mudanças na metilação de genes associados ao eixo (*HSD11B*, *NR3C1*, *FKBP5*) já foram associadas com estresse pré-natal (Klengel et al. 2013, Palma-Gudiel, et al. 2015) e peso ao nascimento (Green et al. 2015, Filiberto et al. 2011). De forma similar, o gene catecol-O-metiltransferase (*COMT*), que codifica uma enzima que está envolvida numa das principais vias de degradação dos transmissores de catecolaminas, tem uma expressão gênica regulada epigeneticamente (Swift-Scanlan et al. 2014) e ao ser uma enzima-chave reguladora de estrógenos, poderia estar envolvida nas diferenças observadas entre homens e mulheres após a exposição pré-natal à cocaína.

Outra forma de explicar as alterações clínicas que persistem na idade adulta, é o fenômeno de encurtamento de telômeros (Levandowski, 2016; Mardini 2016). O comprimento dos telômeros dos recém-nascidos já mostrou associação negativa significativa com o estresse materno (Marchetto, 2016).

Finalmente, pode ser útil considerar os mecanismos associados com estresse pré-natal em geral. Rinaudo & Wang (2012) propõe que os efeitos podem estar relacionados com os seguintes mecanismos:

- a) resposta celular ao estresse (por exemplo, alterações epigenéticas, disfunção mitocondrial, resposta à proteína desdobrada, estresse oxidativo, expressão diferencial dos fatores de transcrição),
- b) alterações na morfologia do órgão adulto ou no número de células (ex: Adaptando-se a um ambiente subótimo, o organismo troca o desenvolvimento de órgãos menos essenciais, como o rim (massa de nefrona) e o pâncreas (massa de células  $\beta$ ), para o desenvolvimento de órgãos mais essenciais como o cérebro).
- c) respostas tissulares ou sistêmicas (por exemplo, alterações na placenta

ou nas vias endócrinas, em particular o eixo HHA, ou na rede reguladora do apetite) e

(d) uma combinação dos anteriores.

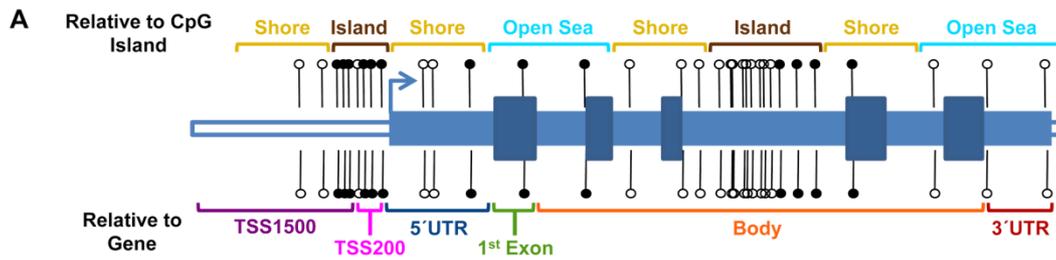
## 1.6 Cocaína/crack e epigenética

A epigenética é um mecanismo chave pelo qual o ambiente pode influenciar e interagir com a genética e envolve modificações que não alteram a sequência de DNA. Vários estudos mostram que a exposição pré-natal a drogas produz alterações epigenéticas que resultam em profundas alterações na fisiologia e no comportamento da prole (Vassoler, Byrnes & Pierce 2014).

Para o estudo dessas modificações é necessário considerar que no padrão de metilação que ocorre nos dinucleotídeos CpG no genoma humano, distingue-se duas frações com propriedades distintas:

- uma fração principal (~98%), em que as CpGs são relativamente pouco frequentes (em média por 1 per 100 pb) mas altamente metiladas (aproximadamente 80% de todos os locais CpG)
- uma fração menor, conhecida como ilhas CpG (<2%), que compreende trechos curtos de DNA (~1,000 pb) onde os dinucleotídeos CpG são frequentes (~ 1 por 10 pb) e livres de metilação. Em geral, as ilhas são definidas como tendo pelo menos 200 pb de comprimento e com um conteúdo de G + C de 50% e uma frequência de CpG (observada / esperada [o / e]) de 0,6 (Illingworth & Bird 2009).

As regiões localizadas nas margens das ilhas, também podem ser chamadas de *shore* até 200 pb, *shelf* de 2000 a 400 pb e *open sea* a mais de 400 pb (Figura 4).



**Figura 4.** Distribuição de regiões em relação ao gene e a ilha CpG. Fonte: Dyson et al. 2014

Embora as ilhas CpG estejam muitas vezes livre de metilação, há circunstâncias em que se tornam fortemente metiladas, e isso invariavelmente se correlaciona com silenciamento de qualquer promotor dentro da ilha (Illingworth et al. 2008).

A administração aguda de cocaína aumenta a metilação do DNA, aumenta os níveis de DNA metil transferase 3A (DNMT3A), DNMT3B, e da proteína de ligação Metil CpG 2 (MeCP2) a promotores específicos de genes o que diminui a expressão dos genes no nucleus accumbens (Anier et al., 2010 citado por Sadri-Vakili 2014), que é uma área envolvida no sistema de recompensa do cérebro. Além da metilação do DNA, a cocaína modifica outras marcas epigenéticas como a acetilação e metilação das histonas e altera os microRNAs (Sadri-Vakili, 2014).

O mecanismo pelo qual a cocaína induz alterações na metilação do DNA permanece desconhecido. Pensa-se que a cocaína exerça os seus efeitos biológicos através da interferência da recaptação pré-sináptica dos neurotransmissores de monoamina da fenda sináptica. Os aumentos dramáticos nas concentrações de dopamina sináptica ou outras monoaminas provoca, assim, os efeitos

comportamentais, incluindo o efeito motor, cardiovascular, e efeitos psicológicos. A dopamina e outras monoaminas têm sido associadas com efeitos teratogênicos em animais (Reinoso BS, Undie AS, Levitt, 1996 citado por Novikova et al, 2008). Os dados existentes são insuficientes para estabelecer ou afastar uma ligação entre a metilação do DNA e os possíveis efeitos teratogênicos das catecolaminas. Na mesma linha, falta ser determinado se a administração de cocaína materna nestas doses experimentais é capaz de atravessar a barreira placentária e alterar os níveis de transmissor monoamina no cérebro fetal suficientemente para mediar estes tipos de alterações epigenéticas. (Novikova et al, 2008).

### ***1.6.1 Efeitos epigenéticos da exposição pré-natal ao crack/cocaína: modelos animais***

Considerando que as marcas epigenéticas variam entre tecidos, serão listados abaixo os principais resultados achados discriminando entre diferentes órgãos, com ênfase no coração e sangue que é o principal interesse do trabalho.

#### **1.6.1.1 Cérebro e sistema nervoso central**

Modelos animais confirmam que a exposição pré-natal à cocaína resulta em mudanças específicas permanentes a nível comportamental, celular e molecular (Thompson et al. 2009). Um modelo de exposição pré-natal à cocaína intravenosa no coelho é muito similar ao perfil farmacocinético de consumidores humanos (Parlaman et al. 2007). Este foi usado para estudar uma série de alterações altamente específicas, incluindo o teor de ácido gama-aminobutírico (GABA) no córtex, expressão de proteína de ligação de cálcio e as alterações morfológicas nas células piramidais. Esses achados celulares e moleculares foram observados apenas em áreas corticais ricas em dopamina, que estão intimamente

envolvidas em tarefas cognitivas e funcionamento executivo, incluindo atenção (Thompson et al. 2009). Esses estudos também foram capazes de relacionar diretamente o tempo de exposição à cocaína no útero aos seus efeitos deletérios na prole, e sugerem que o segundo trimestre pode ser um período particularmente vulnerável (Stanwood et al. 2001).

As alterações comportamentais foram relatadas em vários modelos animais, incluindo déficits em tarefas de atenção, reatividade emocional, e reforço do abuso de drogas (Harvey et al. 2001; Gabriel & Taylor 2003; Stanwood & Levitt, 2003). Estes resultados correspondem com a literatura clínica humana que relata distúrbios tanto na atenção quanto na regulação emocional em crianças com exposição pré-natal à cocaína (Thompson et al. 2009).

Novikova et al. (2008) observaram que exposição pré-natal à cocaína durante o segundo e terceiro trimestres de gestação pode produzir modificações estruturais e funcionais profundas no epigenoma dos neurônios do hipocampo de camundongos no período neonatal e em pré-púberes. A metilação foi medida 3 dias (P3) e 30 dias (P30) após do nascimento. A metilação global do DNA foi significativamente diminuída em P3 e aumentou em P30. Entre as 492 ilhas CpG cuja metilação foi significativamente alterada pela cocaína no P3, 34% foram hipermetiladas enquanto 66% foram hipometiladas. Várias destas ilhas CpG contêm regiões promotoras para genes implicados em funções celulares cruciais, e o estudo de alguns genes ligados a estas ilhas mostrou expressão endógena diminuída ou aumentada de 4 até 19 vezes.

Esta análise mostrou que a hipermetilação induzida pela cocaína correspondeu à diminuição significativa (5-13 vezes) na expressão dos genes *GPR73* (receptor que ajuda a sobrevivência neuronal no sistema nervoso central), *PLK2* (promove a proliferação celular e participa na degradação da espinha dendrítica) e *PTPN5* (impede a potenciação de longa duração), enquanto a hipometilação do promotor induzida por cocaína correspondeu a um aumento

significativo (4-19 vezes) na expressão de *DYRK3* (envolvido na regulação do crescimento celular), *GATA4* (envolvido na diferenciação celular), *GTF3c1* (uma subunidade do complexo de fator de transcrição da polimerase III) e *MTAP6* (responsável pela estabilidade microtubular axonal).

#### **1.6.1.2 Coração**

Observou-se que a exposição pré-natal a cocaína provoca um aumento significativo no estado de metilação de dinucleótidos CpG na região promotora proximal do gene da proteína quinase C épsilon (*PRKCE*) resultando numa diminuição da ligação de fatores de transcrição ao promotor e a repressão do gene *PRKCE* no coração da prole adulta de ratos (Ver figura 5. Zhang et al. 2007; Zhang et al. 2008 citado por Meyer e Zhang 2009). Resultados similares foram achadas no coração de ratos expostos à nicotina (Lawrence et al. 2011). Em humanos, uma possível associação entre exposição pré-natal à cocaína e anormalidades cardiovasculares foi encontrada (Lipshultz et al. 1991, Shaw et al. 1991). De forma similar, crianças nascidas de mães com histórico de abuso de cocaína mostram uma alta incidência de malformações cardiovasculares congênitas, incluindo anormalidades da estrutura e da função ventricular, arritmias e distúrbios da condução intracárdica, que persistem além do período de exposição à cocaína (Meyer et al. 2009).

Abaixo, são descritos dois eventos moleculares dentro do promotor de *PRKCE* de ratos expostos à cocaína. O primeiro deles (AP-1) foi encontrados na descendência de fêmeas grávidas expostas à cocaína intraperitonealmente, o segundo deles (SP1), foi encontrado após a exposição direta à cocaína dos corações fetais de ratos.

##### **1.6.1.2.1 Sítio de ligação do fator de transcrição AP-1**

Foi administrada solução salina ou cocaína por via intraperitoneal (15 mg / kg) à ratas grávidas, duas vezes por dia a partir de dia 15 a 20 de idade

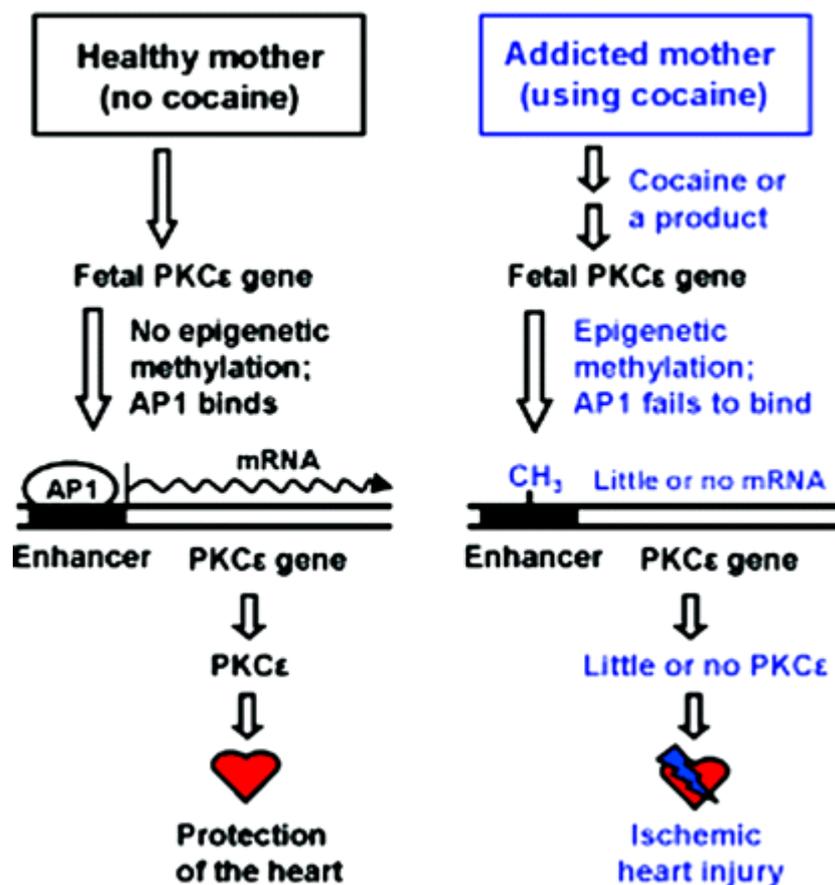
gestacional, e os corações fetais foram estudados a término. O tratamento com cocaína reduziu significativamente o mRNA de *PRKCE* e os níveis de proteína no coração. Dinucleótidos CpG encontrados nos sítios de união da proteína de ligação dos elementos responsivos ao AMPc 1 (CREB), CREB / c-JUN1, e CREB / c-JUN2 na região proximal do promotor do gene *PRKCE* foram densamente metilados e não foram afetados pela cocaína. Em contraste, a metilação de CpG nos sítios de ligação da proteína ativadora 1 (AP-1) foi baixo, mas foi aumentado significativamente pela cocaína.

O evento molecular chave é a metilação específica em uma região fora de uma ilha CpG que normalmente funciona como ligação do fator de transcrição AP-1 (*activator protein 1*). A inibição da ligação foi demonstrada num ensaio direto *in vitro*, bem como por imunoprecipitação da cromatina *in vivo*. Um certo número de experimentos controle foram feitos. Por exemplo, a cocaína não mostrou efeito sobre a ligação de AP-1 na sequência de ligação não metilada de *PRKCE*, mostrando que o fator AP-1 não foi afetado. Ensaio de gene repórter confirmaram *in vivo* a perda de transcrição dependente de AP-1 quando foi utilizada a sequência metilada. Os acentuadores de outros fatores de transcrição não tinham metilação, sendo então descartados. Finalmente, a metilação da região do promotor de um outro gene da mesma família de proteínas PKC (isto é, PKC $\delta$ ) não foi afetado. Existe um grande volume de literatura sobre o papel cardioprotetor do *PRKCE* que provavelmente opera através da fosforilação de múltiplas moléculas a jusante (*downstream*) (Liu et al., 1999; Inagaki et al., 2006; Morrow et al., 2006; Yue et al., 2006 citado por Barik 2007).

Uma questão importante é saber se o efeito observado é devido à cocaína no sangue fetal ou por uma molécula secundária produzida pelo sistema da mãe na resposta à cocaína. A cocaína em si é conhecida por percorrer livremente do sangue da mãe para a circulação fetal (Benveniste et al., 2005 citado por Barik 2007). Outra questão é a estabilidade da metilação na idade adulta e velhice.

Zhang et al. (2007) especulam que, como os cardiomiócitos não se dividem após o nascimento, a metilação adquirida deve persistir. No entanto, isto deve ser testado em várias idades devido a metilação pode ser um processo reversível.

Estudos revelaram que grupos de genes adjacentes são frequentemente regulados em conjunto (Spellman e Rubin, 2002, citado por Barik 2007). Cada conjunto pode cobrir de 20 a 200 kilobases, compreendendo de 10 a 30 genes. Uma análise dos genes em ambos os lados do *PRKCE* no cromossomo 2p21 revela que eles codificam proteínas críticas de sinalização, tais como fatores de transcrição, fosfatases e transportadores. Estes genes são altamente expressos em tecido cardiovascular, bem como em hematopoiético, digestivo, retinal, neurais e reprodutivos. Provavelmente não é uma coincidência que danos significativos a todos estes tecidos são observados em usuários de cocaína (Summavielle et al., 2000; Darland e Dowling, 2001; Li et al., 2003; Wilson e Saukkonen, 2004; Ellis e McAlexander, 2005; He et al., 2006, citado por Barik 2007).



**Figura 5.** Mecanismo de regulação do gene *PRKCε* fetal pelo uso materno de cocaína. O modelo baseia-se nos achados de Zhang et al. (2007). Mãe esquerda, sem exposição à cocaína. Direita, mãe usuária de cocaína, com as mudanças relacionadas à cocaína na cor azul. Na ausência de cocaína, o sítio promotor de AP-1 não modificado adjacente ao promotor do gene *PRKCε* no coração fetal, liga o fator AP-1 e o gene *PRKCε* fetal é expresso, oferecendo cardio-protecção. Como resultado do uso da cocaína pela mãe, o mesmo local é metilado, impedindo a ligação de AP-1 e a expressão de *PRKCε*, deixando o coração da criança vulnerável a futuras lesões isquêmicas. (Barik 2007).

#### 1.6.1.2.2 Sítio de ligação do fator de transcrição fator de transcrição Sp1

O fator de transcrição Sp1 (*specificity protein 1*) se liga às seqüências ricas em GC que são necessários para a expressão e regulação de uma variedade de genes.

Este fator esteve envolvido no efeito direto da cocaína na modificação epigenética da repressão do gene *PRKCE* no coração fetal de ratos. Os corações foram isolados a partir de ratos fetais, dia 17 da gestação, e tratou-se com cocaína em um sistema de cultura ex vivo de órgãos. O tratamento de cocaína por 48 h resultou em reduções significativas na abundância da proteína PKCε e do mRNA e aumentou a metilação de dois sítios de ligação CpG (-346 e -268) do fator de transcrição SP1 na região promotora de *PRKCE*. Ensaio de modificação da mobilidade electroforética (*Electrophoretic mobility shift assay - EMSA*) demonstraram que a metilação CpG de ambos sítios de ligação de SP1 inibiu a ligação de SP1. Consistentemente, um ensaio de imunoprecipitação de cromatina mostrou que o tratamento de cocaína diminuiu significativamente a ligação do SP1 para os sítios SP1 no coração fetal intacto. Ensaio de gene repórter revelaram que mutações dirigidas aos sítios de metilação CpG em ambos os sítios SP1, reduziu significativamente a atividade do promotor *PRKCE* enquanto a metilação de um único local (-346 ou -268) não teve um efeito significativo. O efeito causal do aumento da metilação na sub-regulação de *PRKCE* induzida por cocaína, foi demonstrado com o uso de inibidores de metilação do DNA. A presença de 5-aza-2'-deoxicitidina ou procainamida bloqueou o aumento da metilação induzida por cocaína nos sítios SP1 e bloqueou a diminuição do RNAm de *PRKCE*. Os resultados demonstram um efeito direto da cocaína na modificação epigenética da metilação do DNA e da repressão do gene *PRKCE* cardíaco, ligando a exposição pré-natal à cocaína com as consequências fisiopatológicas no coração de descendência adulta. (Meyer et al. 2009a).

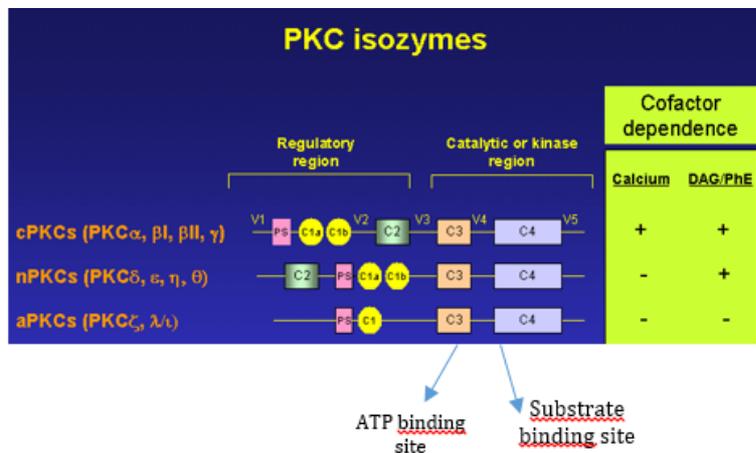
### 1.6.1.2.3 Gene candidato *PRKCE*

#### *Família PRKC*

O gene *PRKCE* codifica uma proteína que faz parte da família de proteínas quinase C (PKC), descoberta no final da década de 1970, é composta de pelo menos 10 serina / treonina quinases, divididas em três grupos com base na sua arquitetura molecular e seus cofatores (ver figura 6). As enzimas PKC foram conservadas ao longo da evolução e são expressas em praticamente todos os tipos de células; eles representam transdutores de sinal críticos que regulam a ativação celular, diferenciação, proliferação e morte celular. Os membros da família PKC desempenham papéis importantes num conjunto diverso de respostas hematopoiéticas e imunitárias.

A descoberta da família se relaciona com o estudo dos forbóis que são compostos promotores de tumores, isto é, substâncias que por si só não são carcinogénicos ou mutagénicos, mas que podem acelerar o aparecimento de tumores quando administrados junto com carcinógenos como o benzopireno. O primeiro forbol identificado foi extraído do óleo de croton, que é um extrato da planta *Croton tiglium*. A pesquisa dos forbóis levou à descoberta de uma enzima PKC como o receptor destas substâncias (Altman & Kong 2016).

Os forbóis imitam o diacilglicerol que é uma molécula que media a comunicação celular.



**Figura 6.** Estrutura e organização das famílias proteína-quinase C (PKC). cPKCs: *classical PKC*, nPKCs *novel PKC*, aPKC *atypical PKC*, Adaptado de Kazanietz (2016)

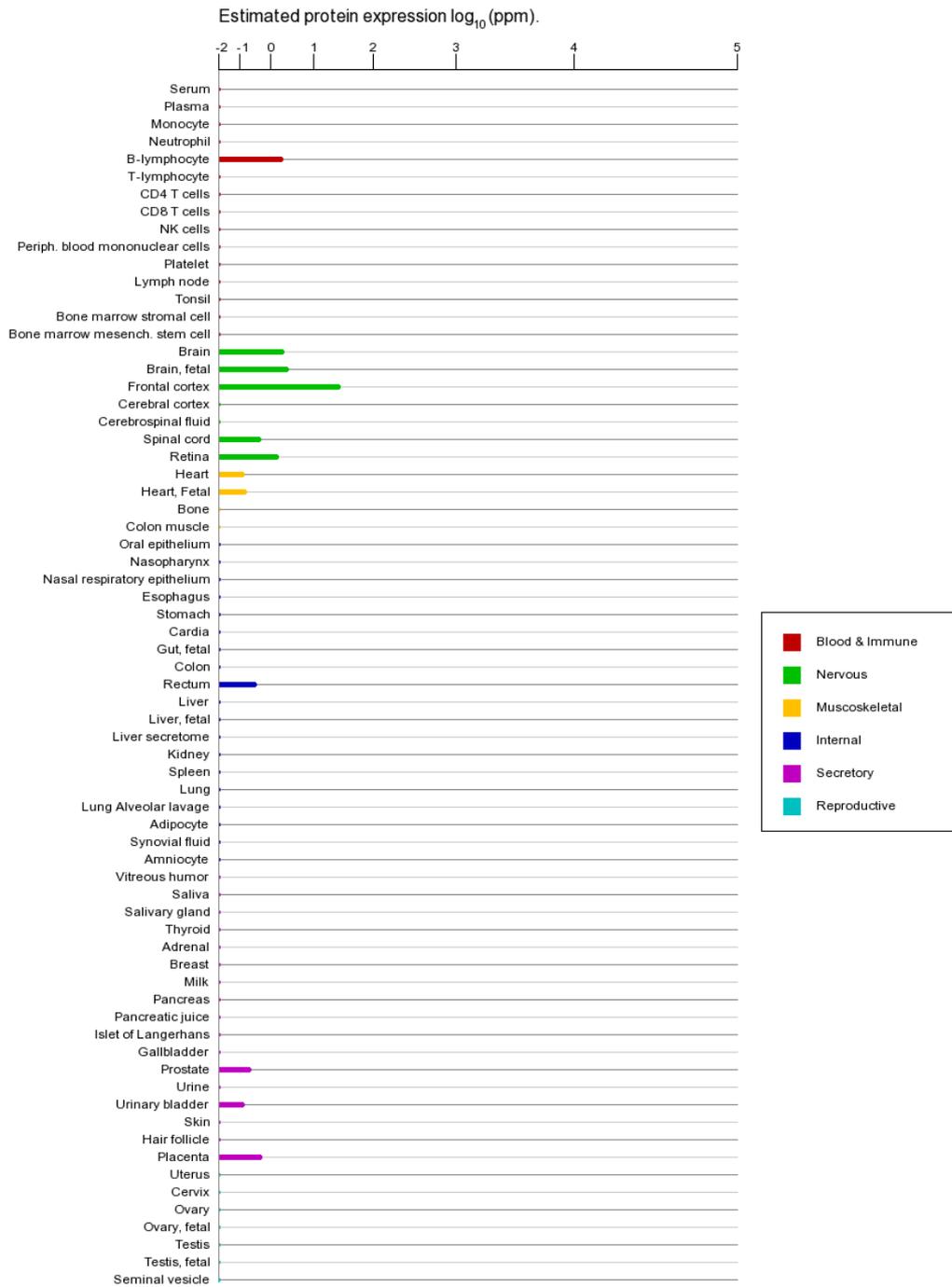
#### Gene PRKCE

Este gene tem 32 éxons e 15 variantes de splicing. Está na fita senso no braço curto do cromossomo 2. Faz parte da família de proteínas quinases que contém um domínio C2.

Basta et al. (1992) isolaram DNAC correspondente à forma épsilon da proteína quinase C. Ao nível dos aminoácidos, a sequência de épsilon humana revelou 98 a 99% de identidade com as sequências de camundongo, rato e coelho.

#### Função

A quinase PRKCE está envolvida em muitas funções celulares diferentes, tais como ativação de canal do neurónio, apoptose, proteção de isquemia cardíaca, resposta de choque ao calor, bem como a exocitose da insulina. Na figura 7 se mostra a expressão deste gene dependendo do tecido. Estudos em camundongo nocaute sugerem que esta quinase é importante para a sinalização mediada por lipopolissacárido (LPS) em macrófagos ativados (RefSeq, Jul 2008).



**Figura 7.** Expressão de *PRKCE* em diferentes tecidos. Retirado de [www.genecards.org](http://www.genecards.org). Acesso em 15 de novembro de 2016.

### *Modelo Animal*

Castrillo et al. (2001), produziram camundongos deficientes em *PRKCE* através de alterações no éxon 1 do gene *PRKCE*. Estes ratos tiveram expectativa de vida e marcadores do sistema imunológico normais, mas apresentaram menor peso e redução da fertilidade devido a infecções frequentes por bactérias gram-negativas no útero. Macrófagos de camundongos *PRKCE* <sup>-/-</sup> em resposta ao lipopolissacárido (LPS) reduziram drasticamente os níveis de óxido nítrico, fator de necrose tumoral-alfa (TNFA) e interleucina-1-beta (IL1B).

Hodge et al. (2002) descobriram que os camundongos *PRKCE* nocaute apresentavam diminuição de comportamentos de ansiedade, acompanhados por redução dos níveis de hormônios do estresse, incluindo o hormônio adrenocorticotrófico. Littler et al. (2003) descobriram também que os camundongos *PRKCE* nocaute apresentaram diminuição na vasoconstrição pulmonar hipóxica.

### **1.7 Variações genéticas e desfechos em recém-nascidos expostos à cocaína**

Em humanos um dos genes mais estudados é o fator neurotrófico derivado do cérebro (*BDNF*) que parece estar relacionado com as alterações neurocomportamentais visualizadas em bebês com exposição pré-natal à cocaína. Níveis de BDNF no sangue de cordão umbilical com os mesmos indivíduos desta dissertação, foram significativamente maiores entre os bebês expostos ao crack durante a gravidez em comparação com os bebês não expostos. Provavelmente, haveria um processo de aumento adaptativo do BDNF, a fim de procurar uma sobrevivência neuronal. (Mardini *et al.* 2014). Por outro lado, os transportadores de efluxo foram pouco estudados associados à EPC, mas tem um papel importante na proteção do feto, razão pela qual foi escolhido um polimorfismo no gene *ABCB1*.

### **Gene ABCB1**

Este gene codifica a glicoproteína de permeabilidade (gp-P), também conhecida como glicoproteína P, que é uma bomba de efluxo dependente de ATP para xenobióticos (Mao, Q 2008).

A glicoproteína-P foi o primeiro transportador do grupo ABC reconhecido a desempenhar um papel significativo na proteção do feto à xenobióticos presentes na placenta (Mao, Q 2008) e sabe-se que a expressão de gp-P no cérebro fetal é limitada ao nascimento (Lam et al. 2015).

Um polimorfismo (C3435T, rs1045642) neste gene já foi associado com comportamento viciante em consumidores de crack / cocaína (Isaza C, et al., 2013). Este polimorfismo, mesmo sendo sinônimo, afeta a expressão da glicoproteína-P, provavelmente alterando o tempo de dobramento e inserção cotranslacional da gp-P na membrana (Kimchi et al. 2007).

Ceckova-Novotna et al. (2006) relatam que a expressão de gp-P é significativamente menor se tanto a mãe como o bebê são homozigotos para o alelo alterado (TT) em comparação com os homozigotos maternos e fetais para o alelo C. Além disso, as placentas de mães portadoras de polimorfismos para ambos os alelos 3435T e 2677T também possuem expressão de gp-P significativamente mais baixa em comparação às placentas de indivíduos de tipo selvagem (CC/GG). Estes autores sugeriram que os polimorfismos C3435T e G2677T podem ter consequências clínicas no feto devido à exposição variável de fármacos.

De forma similar Daud et al. (2016), propuseram que a expressão reduzida de mRNA ou de gp-P devido aos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) 3435C> T, 1236C> T e 2677G> T em amostras placentárias humanas, pode ser evidência de uma proteção fetal mais fraca contra potenciais teratógenos. Este achado foi apoiado por dois estudos clínicos que encontraram um risco aumentado

de fissura labial (Bliet *et al.* 2009) e anomalias cardíacas congênitas (Obermann *et al.* 2011) associado com o alelo materno 3435T nas mães que tomaram qualquer medicação durante o primeiro trimestre da gravidez. Em ambos os estudos, o risco foi ainda maior nas mães que não tomaram suplementos de ácido fólico. No entanto, um estudo em japoneses (Tanabe *et al.*, 2001) não encontrou diferença entre os diferentes genótipos e a expressão de gp-P na placenta.

## **CAPÍTULO II**

### **2 JUSTIFICATIVA**

A expansão e disseminação do consumo de crack/cocaína no Brasil é um problema de saúde pública durante os últimos anos, mas não existem estudos sobre metilação do DNA em bebês com exposição pré-natal ao crack/cocaína e também não foram estudados polimorfismos genéticos que poderiam influenciar o efeito pré-natal desta substância.

As primeiras pesquisas nos anos 80 sugeriram um fenótipo muito grave em crianças expostas ao crack no útero, mas esses estudos tinham vários fatores de confusão. Estudos posteriores bem controlados demonstraram que a exposição pré-natal à cocaína de fato afeta o crescimento físico fetal e resulta em aumento do nascimento prematuro, retardo do crescimento generalizado e efeitos comportamentais.

Por fim, a investigação é de significativa importância para compreensão das possíveis rotas biológicas envolvidas no efeito pré-natal do crack/cocaína.

## **2.1 OBJETIVOS PRINCIPAIS**

- Avaliar se a exposição pré-natal ao crack altera padrão de metilação em genes específicos de bebês expostos ao crack pré-natalmente comparado a bebês que não foram expostos.
- Estudar desfechos perinatais adversos de exposição pré-natal ao crack/cocaína em associação com um polimorfismo na díade mãe-bebê.

## **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Investigar o padrão de metilação da região promotora e região UTR do gene *PRKCE* nos bebês de mulheres usuárias de crack durante a gravidez, comparando com os padrões de metilação de indivíduos não expostos ao crack.
- Estudar um polimorfismo no gene *ABCB1* em mulheres usuárias de crack e seus bebês em associação com desfechos perinatais adversos de exposição pré-natal ao crack/cocaína.

## **2.3 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.3.1 Delineamento do Estudo**

Estudo transversal, observacional

### **2.3.2 Sujeitos do estudo**

A amostra faz parte de um estudo maior que consiste de 57 díades mãe-bebê usuárias de crack e 99 díades não expostas descritas no trabalho de Mardini et al (2014, 2016).

As amostras biológicas deste estudo consistiram de 41 díades de mulheres usuárias de crack e seus bebês, além de 4 mães isoladas e 2 bebês isolados. No grupo dos não expostos, foram incluídas 38 díades de mulheres não usuárias e seus bebês, além de 51 mães isoladas e 4 filhos isolados.

Os indivíduos foram recrutados entre 2012 e 2013 no Hospital Materno Infantil Presidente Vargas (HMIPV) e no Hospital das Clínicas Porto Alegre (HCPA). Ambos são hospitais de referência em assistência pré-natal de alto risco e atendimento de usuárias de crack na cidade de Porto Alegre, Brasil.

As mulheres grávidas foram recrutadas ao chegar ao hospital para dar à luz. Durante o período do estudo houve 2.228 partos.

As mães grávidas saudáveis foram recrutadas de um grupo de doadoras de sangue de cordão umbilical para o banco de sangue do HCPA.

Os dados sociodemográficos coletados das mães foram idade, cor da pele, estado civil e nível socioeconômico (Associação Brasileira de Institutos de Pesquisa de Mercado). O quociente intelectual (QI) foi medido por meio da *Escala Wechsler de Inteligência* (WAIS) e psicopatologia por meio do *Mini International Neuropsychiatric Interview* (MINI) Versão Brasileira 5.0.0 / DSM IV / Current 7. O uso de crack e outras drogas foi avaliado com ASSIST (*Alcohol,*

*Smoking and Substance Involvement Screening Test*).

Uma revisão da história médica dos bebês foi realizada para avaliar o peso ao nascer, bem como a presença de doenças pré-natais e infecciosas transmitidas pelas mães.

### **2.3.3 Aspectos Éticos**

O estudo já se encontra aprovado pelo Comitê de Ética do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GPPG-HCPA) sob números 11-0095.

Todos os indivíduos recrutados para esse trabalho assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

### **2.3.4 Análises Laboratoriais**

#### ***2.3.4.1 Coleta e Extração de DNA***

Foram coletadas amostras de sangue periférico materno e cordão umbilical dos bebês ao nascimento. O DNA foi extraído pelo kit Gentra Puregene Blood Kit (Qiagen®), conforme instruções do fabricante.

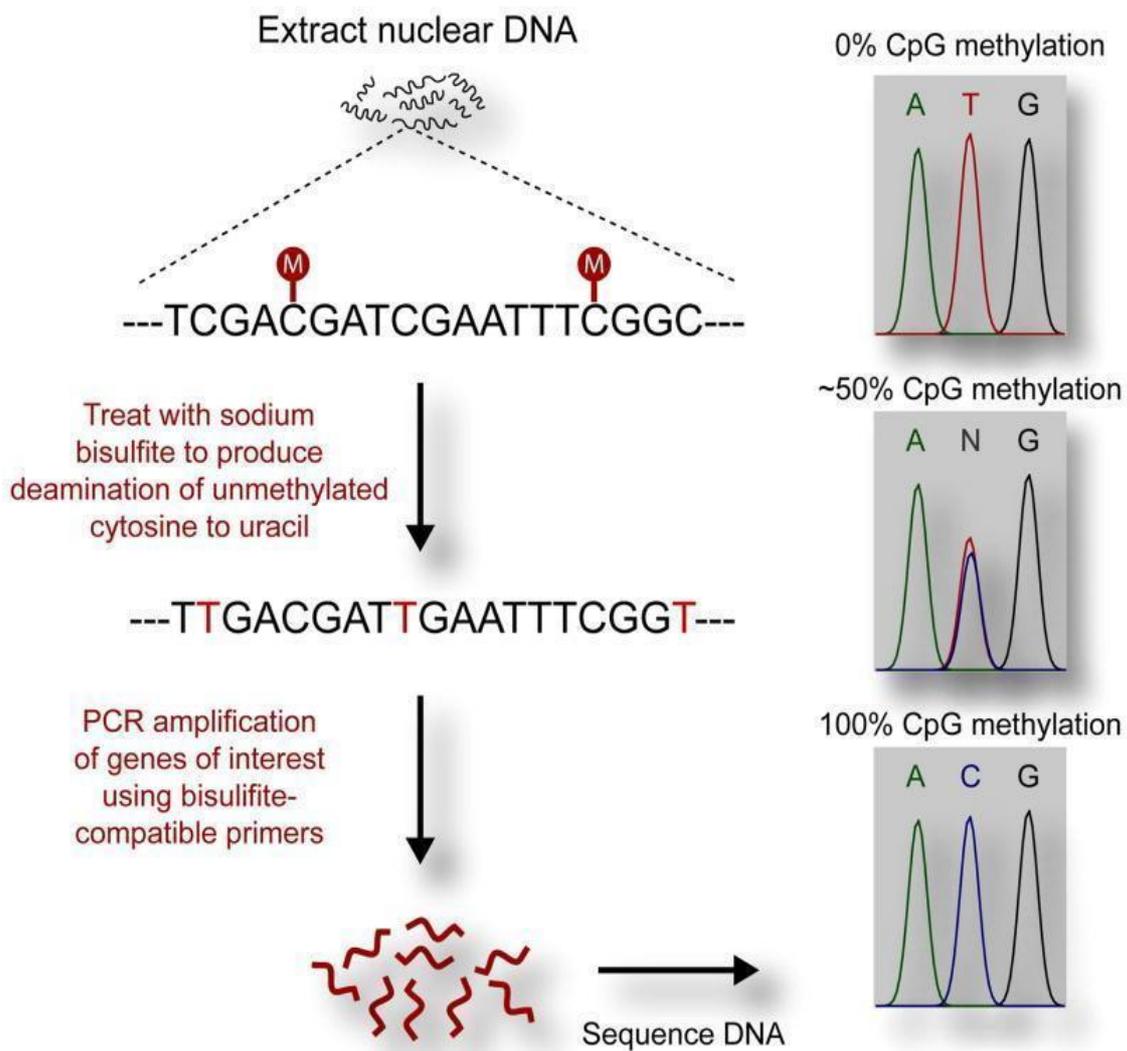
#### ***2.3.4.2 Análises de Metilação de DNA***

O padrão de metilação foi avaliado pela técnica de sequenciamento por bissulfito direto (Frommer et al., 1992). Para tanto, as amostras de DNA foram submetidas ao tratamento por bissulfito pelo kit Cells-to-CpG™ Bisulfite Conversion Kit (Applied Biosystems®), conforme instruções do fabricante.

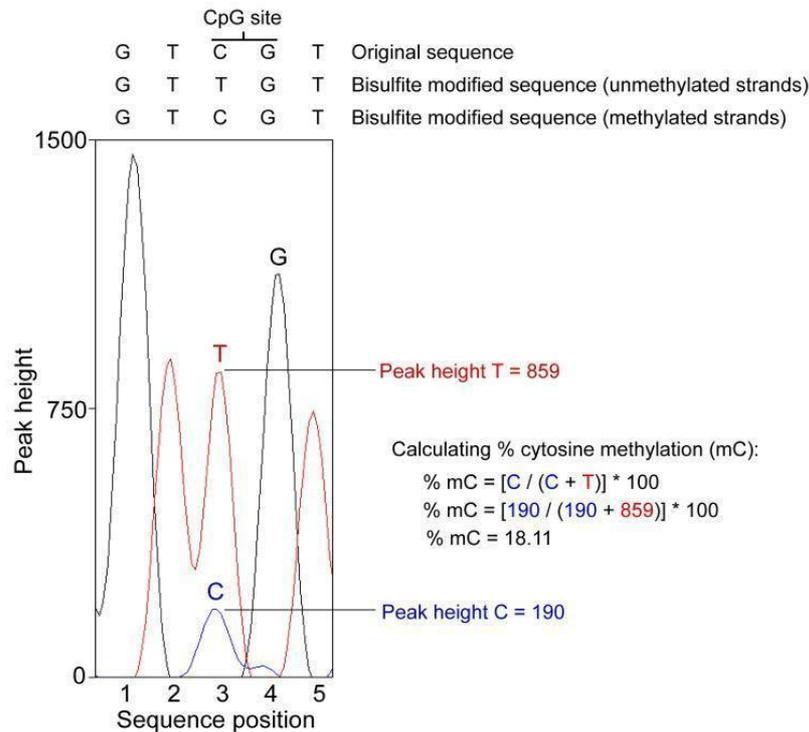
Dois pares de *primers* foram desenhados para cada região de interesse, um

par para amplificação por PCR da sequência original, a partir da ferramenta *Primer Blast* (National Institute of Health, USA) e outro para realizar a mesma reação com a sequência convertida por bissulfito, com o uso da ferramenta *MethPrimer* (Li & Dahiya, 2002).

As amostras previamente tratadas com bissulfito e os DNAs originais foram submetidos a PCR convencional e os fragmentos amplificados foram visualizados em gel de agarose ao 2%, a fim de confirmar a efetividade da reação. As amostras foram então purificadas e sequenciadas utilizando-se os mesmos *primers* pelo método de Sanger no equipamento ABI 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems). A sequência original obtida foi alinhada com a sequência de referência do GenBank® (National Institute of Health, USA) no software CodonCode® Aligner v.3.0.1 (CodonCode Corporation). A sequência convertida por bissulfito foi alinhada no mesmo software. Na figura 8 e 9 se mostra o procedimento do sequenciamento direto por bissulfito e como é feita a análise dos resultados.



**Figura 8. Sequenciamento direto por bissulfito.** O DNA é primeiro tratado com bissulfito para conservar a citosina metilada enquanto a citosina não metilada é convertida em uracila. Durante a PCR, a uracila é convertida em timina e o produto é amplificado. O produto de PCR é então sequenciado. O nível de metilação de cada CpG irá resultar em diferentes tamanhos de pico para citosina e timina como lidos no cromatograma (Parrish et al. 2012).



**Figura 9.** Um exemplo de como realizar a análise semi-quantitativa de dados de um único sítio CpG com o uso do *primer forward* no sequenciamento. Os picos do cromatograma para a timina (que representa citosinas não metiladas que foram convertidas em uracila durante o tratamento com bissulfito) e citosina (representando citosinas metiladas que foram mantidas durante o tratamento com bissulfito) são comparados para determinar o nível médio de metilação para cada local numa amostra dada. A mesma análise deve ser aplicada quando se utiliza os *primers reverse*, ressaltando que os níveis de metilação serão derivados utilizando a proporção de adenina (não metilada) para guanina (metilada) em vez de timina e citosina. (Adaptado de Parrish et al. 2012).<sup>1</sup>

<sup>1</sup> A informação quantitativa é uma característica amplamente desconhecida e inexplorada dos traços fluorescentes de sequenciamento de Sanger. Com a crescente necessidade de quantificar mutações somáticas no tecido tumoral ou a quantidade de metilação num locus CpG particular, é útil explorar essa informação a partir dos dados da altura dos picos. (Applied Biosystems, 2013).

### **Desenho de *primers***

Após o tratamento com bissulfito o DNA está significativamente fragmentado e por essa razão é mais fácil amplificar fragmentos com menos de 300 pb. Ao contrário da PCR convencional, os *primers* para o DNA convertido precisam ser mais longos (geralmente entre 26-30 bases) e, idealmente, os *primers* não devem conter sítios CpG (Zymo Research).

#### *Primers*

<b>Primer</b>	<b>Sequência</b>
DNA sem converter Forward	AACCCGGCGAGGAAATACAT
DNA sem converter Reverse	CTCACCCAGTCCTCGAAGTG
DNA convertido Forward	GGAAATATATGTATTGGTTGAGAAT
DNA convertido Reverse	CCAAACTATAAACTTCAAACCTCAC

#### **2.3.4.3 Análise de polimorfismo *ABCB1***

A genotipagem dos polimorfismos foi realizada pelo método TaqMan® Genotyping Assay (Applied Biosystems) no Departamento de Genética da UFRGS. A reação foi conduzida conforme especificações do fabricante no equipamento StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems). As genotipagens foram realizadas no software StepOne Software v.2.2.2 (Applied Biosystems).

#### **2.3.4.4 Análise estatística**

Foi utilizada estatística descritiva para caracterização dos sujeitos de pesquisa. A normalidade das amostras foi testada utilizando o teste de Shapiro-Wilks. Quando a distribuição não era normal, o teste U de Mann-Whitney utilizou-se e os valores foram expressos como medianas e intervalos. As variáveis com distribuição normal foram avaliadas com o teste t de Student para amostras independentes. As variáveis categóricas foram analisadas com o teste do qui-quadrado ou teste exato de Fisher.

## **CAPÍTULO III**

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1.1 Caracterização dos participantes de pesquisa**

As amostras biológicas deste estudo consistiram de 41 díades de mulheres usuárias de crack e seus bebês, além de 4 mães isoladas e 2 bebês isolados. No grupo dos não expostos, foram incluídas 38 díades de mulheres não usuárias e seus bebês, além de 51 mães isoladas e 4 filhos isolados. No total são 45 mulheres usuárias, 43 bebês expostos; 89 mulheres não usuárias e 42 bebês não expostos.

Das mulheres isoladas com amostra biológica (4 usuárias e 51 não usuárias), tem-se informação sobre os dados perinatais dos seus bebês (peso, apgar, hospitalização, idade gestacional).

As características sociodemográficos destes indivíduos estão apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Dados sociodemográficos e características clínicas das usuárias de crack/cocaína e seus recém-nascidos e no grupo das não usuárias.

<b>Bebês</b>	<b>N</b>	<b>Expostos</b>	<b>N</b>	<b>Não Expostos</b>	<b>P</b>
Peso (g), média (DP)	43	2878,37 (494,56)	42	3129,52 (436,91)	<b>0.015</b>
Apgar					
1', mediana (IQR)	40	9 (1)	42	9 (1)	0.274
5, mediana (IQR)	41	9 (1)	42	10 (1)	0.051
Sexo masculino, n (%)	43	18 (41,9)	42	22 (52,4)	0.38
Hospitalizados, n (%)	42	27 (64,3)	41	7 (17,1)	<b>&lt;0,001</b>
Classificação segundo a idade gestacional, n (%)	38		41		
Adequado		35 (92,1)		31 (75,6)	0.133
Pequeno		2 (5,3)		8 (19,5)	
Grande		1 (2,6)		2 (4,9)	
<b>Mães</b>	<b>N</b>	<b>Usuárias de crack</b>	<b>N</b>	<b>Não usuárias de crack</b>	<b>P</b>
Cor da pele n (%)	45		89		
Branca		16 (35,6)		68 (76,4)	<b>&lt;0,001*</b>
Preta		16 (35,6)		8 (9)	
Parda		10 (22,2)		11 (12,4)	
Indígena		3 (6,7)		1 (1,1)	
Amarela		0		1 (1,1)	
Idade, mediana (IQR)	45	26 (7)	89	25 (9)	0.216
QI, média (DP)	29	76,34 (8,7)	86	84,13 (9,9)	<b>&lt;0,001</b>
Classificação socioeconômica**, n (%)					
Alto (A,B)	44	6 (13,6)	87	15(17,2)	0.801
Baixo (C,D,E)		38 (88,4)		72 (82,8)	

Mães	N	Usuárias de crack	N	Não usuárias de crack	P
Realização de pré-natal	41	30 (73,2)	89	89 (100)	<0,001
Presença de doença infecciosa, n (%) (sífilis, HIV, e/ou hepatite C)	44	23 (52,3)	89	0	<0,001
Tipo de parto (Cesárea), n (%)	45	14 (31,1)	89	33 (37,1)	0,568
Estado civil (casado/coabitando), n (%)	45	23 (51,1)	89	85 (95,5)	<0,001

IQR: intervalo interquartil  
 DP: Desvio padrão  
 QI: Quociente de inteligência

\* O teste foi realizado comparando entre cor da pele autodeclarada branca e todas as outras categorias juntas.

\*\*O nível socioeconômico foi avaliado utilizando critérios estabelecidos pela Associação Brasileira de Anunciantes (ABA) e a Associação Brasileira de Institutos de Pesquisa de Mercado (ABIPEME) e dicotomizados em alto (classes A e B) ou baixo (classes C, D, E).

No último censo (2010), o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) computou na região metropolitana de Porto Alegre uma população de 3.958.985 habitantes, sendo 82,57% brancos, 9,34% pardos, 7,64% pretos, 0,28% amarelos, 0,18% indígena e 0,0006% sem declaração. A predominância de brancos na cidade está associada com o assentamento inicial no sul do Brasil que teve uma contribuição importante europeia. Ao contrário das estatísticas do IBGE, na distribuição da cor da pele entre mulheres usuárias de crack e não usuárias foi encontrada uma diferença significativa entre os dois grupos sendo a maioria de usuárias pretas ou pardas. A sobrerrepresentação de pretos e pardos em contextos de vulnerabilidade social, como observado nas cenas de crack, já foi identificado não somente nesta amostra, mas em todas as capitais do Brasil onde só o 20,85% de usuários são brancos (Inácio, 2013).

Das características sociodemográficas comparadas entre os dois grupos de mulheres foram encontradas diferenças significativas na cor da pele autodeclarada, no quociente de inteligência (QI), na realização de pré-natal, presença de doença infecciosa e estado civil. Os achados demográficos deste estudo são consistentes com outros relatos epidemiológicos do consumo de drogas, como por exemplo, a falta de um relacionamento estável, que já foi associado com uso de drogas em outras populações (Isaza et al., 2013).

Por outro lado, nos bebês foram observadas diferenças significativas no peso do recém-nascido e na porcentagem de bebês hospitalizados.

### **3.1.1.1 Consumo de crack e outras substâncias.**

Na Tabela 2 está apresentada a frequência de consumo de cocaína ou crack nos últimos 3 meses avaliado segundo o instrumento *Alcohol, Smoking and Substance Involvement Screening Test* (ASSIST). Observa-se que a maioria das gestantes usuárias de crack consome também álcool, tabaco e maconha

**Tabela 2. Consumo de substâncias nos últimos três meses antes do parto**

	<b>Usuárias *</b>
Crack	
Nunca	6 (21,4)
Uma ou duas vezes	1 (3,6)
Mensalmente	3 (10,7)
Semanalmente	11 (39,3)
Diariamente ou quase todos os dias	7 (25)
Total	28

\* Não se tem informação do consumo de crack nos últimos três meses para todas as usuárias.

### Álcool

	<b>Usuárias de crack</b>	<b>Não Usuárias</b>	<b>P</b>
Nunca	10 (37)	45 (78,9)	<0,001
Uma ou duas vezes	3 (11,1)	9 (15,8)	
Mensalmente	3 (11,1)	2 (3,5)	
Semanalmente	9 (33,3)	1 (1,8)	
Diariamente ou quase todos os dias	2 (7,4)	0	
Total	27	57	

### Maconha

	<b>Usuárias de crack</b>	<b>Não Usuárias</b>	<b>P</b>
Nunca	15 (62,5)	-	-
Uma ou duas vezes	1 (4,2)	-	
Mensalmente	1 (4,2)	-	
Semanalmente	5 (20,8)	-	
Diariamente ou quase todos os dias	2 (8,3)	-	
Total	24	9	

### Tabaco

	<b>Usuárias de crack</b>	<b>Não usuárias</b>	<b>P</b>
Nunca	3 (9,7)	26 (66,7)	<0,001
Uma ou duas vezes	3 (9,7)	0	
Mensalmente	1 (3,2)	1 (2,6)	
Semanalmente	4 (12,9)	1 (2,6)	
Diariamente ou quase todos os dias	20 (64,5)	11 (28,2)	
Total	31	39	

#### 3.1.2 Análise de metilação

A análise da região promotora de *PRKCE* antes da conversão com bissulfito, que é o primeiro passo na análise de metilação, foi realizado para todos os bebês (43 expostos e 42 não expostos)

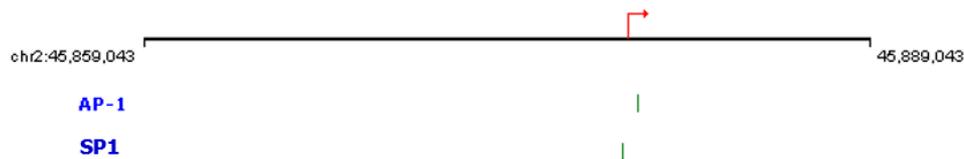
A análise de metilação (DNA convertido com bissulfito) foi realizada até o

momento em 19 bebês expostos e 12 bebês não expostos devido a problemas inerentes à técnica da PCR.

### **3.1.2.1 Identificação dos locais de ligação de fatores de transcrição.**

Usando a ferramenta PROMO, que é um laboratório virtual para a identificação de sítios prováveis de ligação de fatores de transcrição (TFBS) no DNA, foi avaliada a região promotora e a 5'UTR do gene *PRKCE* para os fatores SP-1 e AP-1 considerando que estes sítios tinham mudanças na metilação nas células cardíacas de ratos expostos à cocaína pré-natal.

O banco de dados ENCODE também foi utilizado para inferir os locais de ligação dos mesmos fatores de transcrição (Figura 10). ENCODE é baseado em aplicações de mineração de texto por SABiosciences e anotações de genes de sítios de ligação regulatórios, disponíveis no UCSC *Genome Browser*.

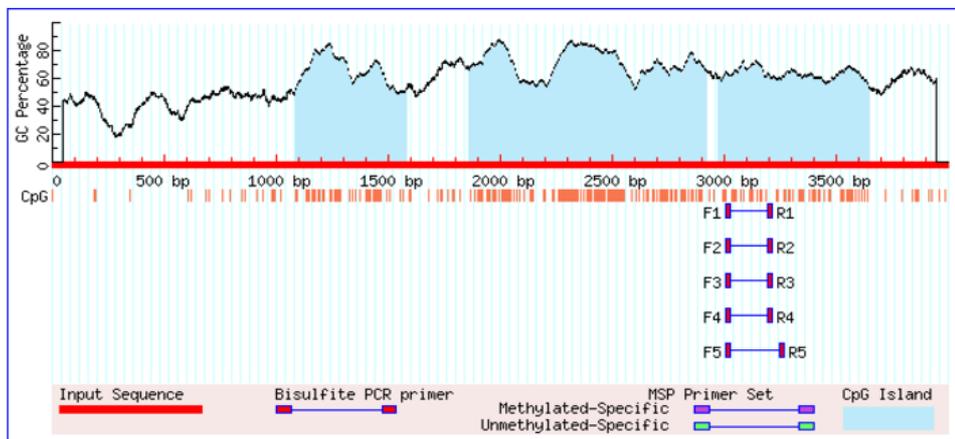


**Figura 10.** Sítios prováveis de ligação de AP-1 e SP1 em *PRKCE*. Seta vermelha: início da transcrição

### **3.1.2.2 Identificação de ilhas CpG**

Foi estudada a sequência a montante do promotor (3000 pb), a região 5'UTR e o primeiro exon com o programa *Methprimer* (Figura 11). Foram identificadas as três ilhas, sendo elas:

- Ilha 1: 493 bp (1092 - 1584)
- Ilha 2: 1063 bp (1864 - 2926)
- Ilha 3 673 bp (2978 - 3650).



**Figura 11.** Ilhas CpG em azul no promotor, a UTR e início do exon 1 de *PRKCE*

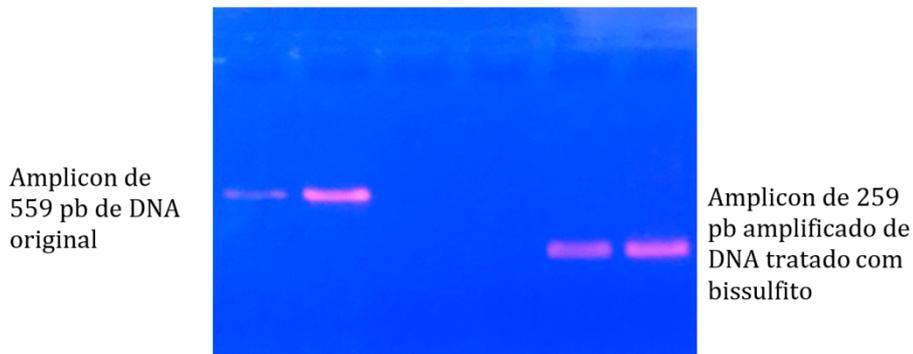
Inicialmente foi estudada a ilha número 1. Os *primers* para amplificação do DNA antes da conversão foram padronizados, mas não foi possível padronizar os *primers* do DNA convertido com bissulfito. Também não foi possível gerar *primers* para a região convertida com bissulfito na segunda ilha. Por esta razão, foram desenhados outros *primers* para a terceira ilha (desde o nucleotídeo 3001 até 3551), que começa com a região 5'UTR como se mostra na figura 13.

Como é mostrado na figura 13, os *primers* para o DNA convertido cobrem somente um dos dois sítios de ligação de interesse para este trabalho. Isto porque a única forma de amplificar o sítio de ligação de AP-1 é gerando *amplicons* maiores a 300 pb, os quais podem não ser amplificados devido a uma potencial fragmentação do DNA genômico durante a conversão com bissulfito.

A localização da ilha CpG estudada perto do início da transcrição é uma localização relevante, especialmente quando assumimos que a metilação do DNA pode estar associada à regulação da transcrição do gene (Michels et al. 2013).

### 3.1.2.3 Confirmação da PCR

Como se mostra na figura 12, a confirmação das PCR para *PRKCE* foi realizada em gel de agarose.



**Figura 12.** Gel de agarose a 2% de duas amostras utilizadas com o DNA antes da conversão e com o DNA convertido com bissulfito. No centro, os brancos (controles negativos) das duas PCR.

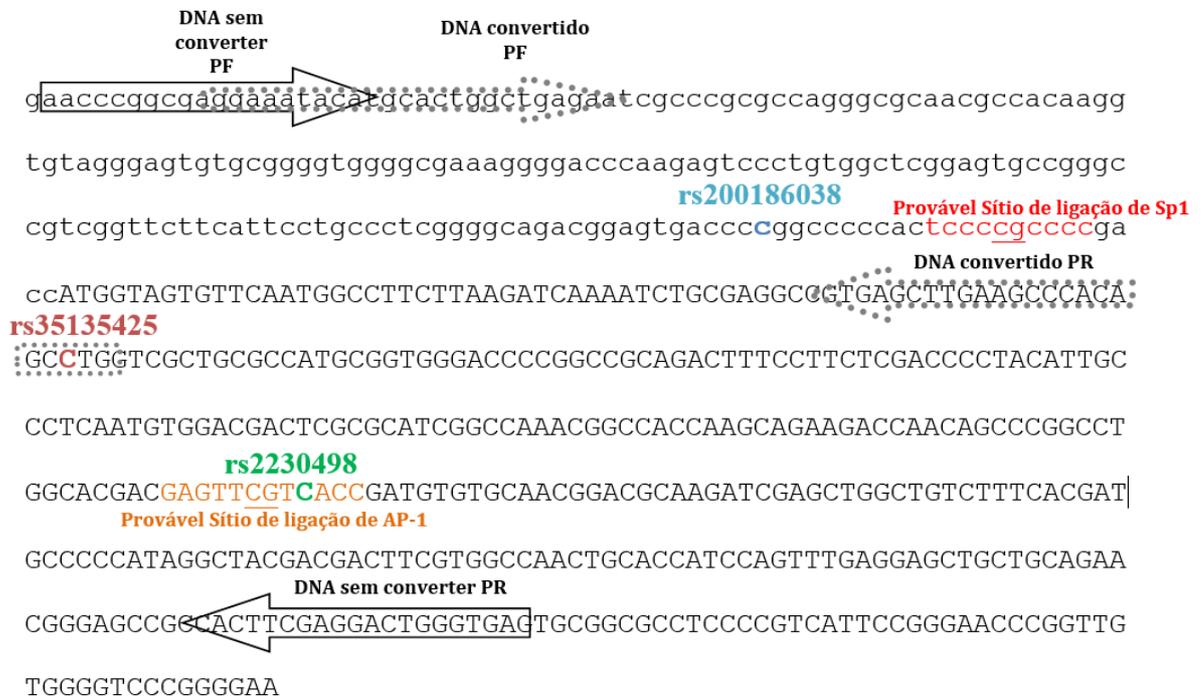
### 3.1.2.4 Eficiência da conversão

O sequenciamento revela a qualidade da conversão com bissulfito. Se estiver incompleta, isso levará ao aparecimento do nucleotídeo Cs que não estão adjacentes ao lado 5' de Gs. Por esta razão, o sequenciamento fornece seu próprio padrão de referência interno para avaliar a completude da conversão com bissulfito. Além disso, os *primers* são concebidos para se anelar com a sequência convertida com bissulfito e assim selecionar moldes de DNA totalmente convertidos (Biosystems, 2007). Como pode-se observar na figura 14, todas as citosinas fora dos dinucleotídeos CpG foram convertidas para timinas mostrando conversão completa do DNA.

### **3.1.2.5 Polimorfismos na região não traduzida (UTR) e exon 1 de PRKCE**

Além dos controles utilizados em ensaios de PCR convencionais, outras medidas devem ser tomadas para verificar a exatidão dos dados de metilação gerados em ensaios baseados em PCR. O DNA genômico não convertido com bissulfito é um controle essencial que deve ser incluído em todos os processos de otimização. No entanto, vários relatos de padronização não incluem ou relatam esse tipo de controle (Hernandez et al., 2013). É importante sequenciar o fragmento de interesse sem converter, para identificar, por exemplo, possíveis variantes de citosina para timina, que descaracterizam um dinucleotídeo CpG e poderiam ser interpretadas por erro como uma metilação de 100% para essa posição. O fragmento de interesse antes da conversão foi estudado em todos os bebês (43 expostos e 42 não expostos). No presente estudo, nenhuma variante em dinucleotídeos CpG foi encontrada, porém alterações em outras regiões foram registradas

Na figura 13, mostram-se as 3 variantes encontradas em heterozigose em 4 dos bebês. Na tabela 3, é mostrada a frequência relatada na literatura e as possíveis consequências sobre a ilha CpG correspondente, ligação de miRNA, ligação de fatores de transcrição, alteração de sítios de splicing e finalmente, o potencial patogênico. Das três variações, somente a primeira (rs200186038) se encontra na região convertida com bissulfito que foi analisada.



**Figura 13.** Variações encontradas em 4 bebês do total da amostra. Minúsculas: região UTR. Maiúsculas: exon. PF: *primer forward*. PR: *primer reverse*. Vermelho: Possível sítio de ligação para fator SP1, que tem posição similar e mesma sequência em rato e humano. Laranja: possível sítio de ligação para fator AP-1 segundo DECODE.

**Tabela 3.** Variantes encontradas na região UTR e início do exon 1 de *PRKCE*.

<b>Identificação da variante</b>	<b>rs200186038</b>	<b>rs35135425</b>	<b>rs2230498</b>
<b>Variante</b>	Variante 5 UTR (C/G). C ancestral	Variante sinônima (C/T). C ancestral	Variante sinônima (C/T). C ancestral
<b>Frequência alélica 1000genomes</b>	Africana: C: 99,4% G:0,6% Europeia: C:100% Global:100% G:0%	Africana: C: 100% T:0 Europeia: C98% T:2% Global: 98% T:2%	Africana: C: 98% T: 2% Europeia: C 100% Global: C: 100% T: 0%
<b>Frequência alélica nos bebês (expostos e não expostos)</b>	C: 99,43% G: 0,57%	C: 98,86% T: 1,14%	C: 99,35% T: 0,65%
<b>Altera características da ilha CpG?<sup>1</sup></b>	Não	Não	Não
<b>Altera ligação de miRNA?<sup>2</sup></b>	Altera a ligação de miR-6090 e cria um sítio potencial de ligação para mir-6743	Altera a ligação de miR-708 e de mir-6806	Altera a ligação de miR-4420
<b>Consequências potenciais da variante</b> <b>Altera ligação de fatores de transcrição?<sup>3</sup></b>	Perde a ligação de 10 fatores de transcrição e gera 3 sítios de ligação novos.	C>T altera ligação de 11 fatores de transcrição.	Altera ligação de 14 fatores de transcrição
<b>Altera sítio de splicing?<sup>4</sup></b>	C>G altera splicing por alteração de um ativador exônico de splicing.	C>T altera splicing por alteração de um ativador exônico de splicing.	Cria um silenciador exônico de splicing e altera um ativador exônico de splicing.
<b>Patogênico?<sup>5</sup></b>	Sim	Sim	Sim

Ferramentas usadas para avaliar efeitos das variantes:

- 1 *Methprimer*
- 2 *MiRBase*
- 3 *TFBIND*
- 4 *Human splicing finder*
- 5 *MutationTaster2*

As variantes sinônimas ou na região UTR encontradas na amostra, são difíceis de interpretar porque os seus efeitos sobre a expressão e função da proteína tendem a ser menos óbvios do que as variantes *missense* ou *nonsense* (Schwarz, Cooper, Schuelke & Seelow 2014). No entanto, como mostrado na tabela prévia, existem várias ferramentas que podem ajudar na avaliação delas.

Uma das características avaliadas, corresponde a um tipo particularmente importante de controle da tradução em eucariotos que depende de um mecanismo epigenético: os microRNAs que se ligam a mRNAs e reduzem a produção da proteína. A desregulação dos miRNAs no cérebro tem sido observada após a exposição a drogas viciantes como a cocaína (Eipper-Mains et al., 2011, citado por Mu & Zhang 2012), enquanto a regulação positiva de alguns miRNAs foi identificada em pessoas com adição com álcool. Especificamente, sobre *PRKCE* sabe-se que micro-RNAs modulam os efeitos cardioprotetores deste gene. miR-1 e miR-31 aumentam após lesão de isquemia/reperfusão tendo como alvo o gene *PRKCE*, e a inibição destes micro RNA é cardioprotetora (Pan et al., 2012; Wang et al., 2015 citado por Scruggs, Wang & Ping 2016) mas as variações identificadas neste estudo não parecem alterar esses microRNA.

Nos bebês somente foi avaliada a metilação do DNA, no entanto, o estudo da sequência antes da conversão e as variações nelas contidas permitiu avaliar se as três alterações encontradas podem potencialmente alterar a ligação de miRNAs. A base de dados na qual foi feita esta análise (miRBase), tem informação principalmente de miRNAs maduros verificados experimentalmente; e de sequências de miRNAs que são homólogos de miRNAs verificados num organismo relacionado (Mu & Zhang 2012). Não entanto, com esta informação, não é possível ter certeza que a região estudada seja um alvo para os miRNA mencionados na tabela, porque muitos genes, mesmo tendo as sequências alvo, não são realmente regulados. De forma similar acontece para os possíveis fatores

de transcrição cuja sequência de ligação é afetada pelas mutações, ou por sítios de *splicing* alterados. No entanto, a ferramenta *MutationTaster2* confirmou as três variações como potencialmente causadoras de doenças. Esta análise, que se baseia em vários dos parâmetros das outras ferramentas, leva em consideração a conservação evolutiva, alterações no sítio de *splicing*, perda de características de proteínas e alterações que podem afetar a quantidade de mRNA (Mu & Zhang 2012).

Por outro lado, Gorlov et al. (2008) sugerem que as 5' UTR estão sob pressão de seleção purificadora tão forte como a que afeta mutações *missense* radicais, em outras palavras, nas UTRs é favorecida a remoção seletiva de alelos que são deletérios, o que explicaria que a distribuição das variações nas partes do genoma que são transcritas acontece de forma não aleatória: em algumas regiões, sua densidade é alta, e em outros, é baixa. Estes pesquisadores também afirmam que as 5' UTRs são locais importantes para identificar polimorfismos funcionais associados a doenças. Na amostra deste estudo, a 5'UTR é uma região conservada e a única variante apresentou uma frequência similar que aquela relatada globalmente em um bebê cujos pais são de cor de pele preta autodeclarada, como era o esperado. De forma similar, as variantes sinônimas foram encontradas em bebês com pais da mesma ascendência mostrada no *1000 Genomes*.

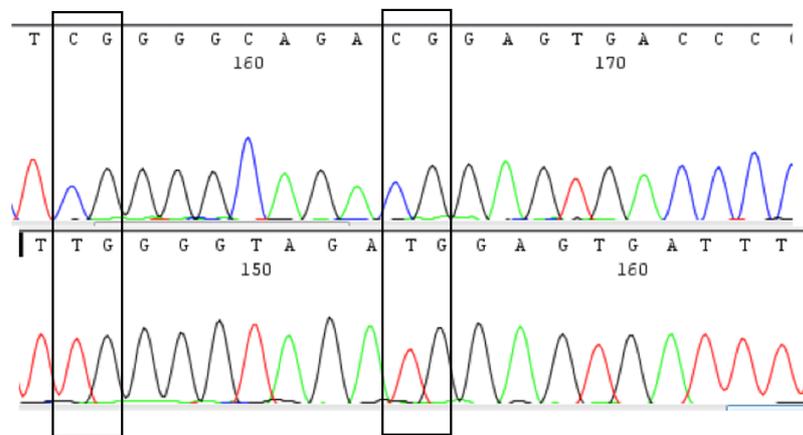
Finalmente, um estudo demonstrou que as variantes de um único nucleotídeo na 5'UTR com patogenicidade desconhecida, podem levar a metilação preferencial de alelos específicos, mostrando uma estreita interação entre genótipo e epigenética (Hitchins et al. 2011), o que frisa a importância de estudar ambas características.

### **3.1.2.6 Porcentagem de metilação em bebês expostos e não expostos ao crack/cocaína pré-natalmente.**

Da amostra total de bebês foi possível realizar análise molecular em 19 expostos (7 meninos e 12 meninas) e 12 não expostos (6 meninos e 6 meninas).

Dos 19 bebês expostos somente se tem dados de consumo dos últimos 3 meses antes do parto de 9 das mães: 3 consumiram crack quase todos os dias, 4 mensalmente, 1 duas vezes e 1 nunca.

A porcentagem de metilação em todos os bebês tanto expostos como não expostos foi de 0% para cada um dos 18 nucleotídeos CpG do amplicon de 255 pares de bases correspondentes à UTR e o começo do exon 1. Abaixo se mostram dois dos dinucleotídeos CpG antes e depois da conversão com bissulfito para um dos bebês com exposição pré-natal à cocaína/crack (EPC).



**Figura 14.** Sequenciamento de um dos bebês com EPC. Primeiro a sequência sem converter e depois convertida com bissulfito mostrando 0% de metilação.

O sequenciamento direto por bissulfito é uma forma eficaz de determinar a metilação percentual de locais CpG individuais em múltiplos locais CpG. Este método permite uma aproximação da metilação do DNA que pode afetar a expressão de um gene de interesse (Parrish et al. 2012).

No entanto, o sequenciamento direto por bissulfito tem limitações. Por exemplo, não é capaz de elucidar a diferença entre a 5-metilcitosina e a 5-hidroximetilcitosina, que é uma modificação que parece estar associada ao processo de demetilação. Outra limitação da aplicação desta técnica ao sangue de cordão umbilical, como foi realizado neste estudo, é que vários tipos celulares

estão presentes nele (hemácias nucleadas, granulócitos, monócitos, células *natural killers*, células B, células CD4CT e células CD8CT). Um estudo de metilação global realizado por Bakulski et al. (2016) no sangue do cordão umbilical, encontrou que as diferenças de metilação entre hemácias nucleadas e o restante de tipos celulares foram as mais pronunciadas, e 99,5% destes locais foram hipometilados em relação aos outros tipos de células. Além disso, compararam também os perfis de metilação de cordão com o painel de referência de sangue periférico adulto e observou-se alta correlação entre granulócitos e monócitos e pouca correlação para células CD8CT e células *natural killer* (NK). Usando sequenciamento direto por bissulfito, não é possível diferenciar as alterações específicas de cada tipo celular, a menos que as células sejam dissociadas e classificadas antes da extração do DNA (Adalsteinsson et al. 2012). Pensando, a nível de genes específicos, o *PRKCE* é um gene que tem uma função importante na produção de megacariócitos, neutrófilos e nas funções efectoras de basófilos, mastócitos e células *natural killers*, mas nos tipos celulares restantes (neutrófilos, eosinófilos etc.) não tem funções descritas (Altman & Kong 2016), o que pode estar sugerindo diferenças na sua metilação nos diferentes tipos celulares presentes nas células estudadas. Infelizmente, essa informação não é possível de ser avaliada com as condições experimentais deste estudo que usou o DNA do total das células presentes no sangue de cordão umbilical.

O sequenciamento Sanger direto, com conversão por bissulfito é uma técnica pouco sensível (Hernández et al. 2013), o que significa que é possível que exista uma baixa porcentagem de metilação na sequência estudada que não foi detectada. Por exemplo, o estudo realizado por Kacevska et al. (2012) encontrou que uma metilação maior a 50% ou menor a 10% podia apresentar um desvio menor a  $\pm 15\%$  do verdadeiro estado de metilação. Estes resultados sugerem que mesmo que os procedimentos de sequenciamento de bissulfito podem representar o estado de metilação de CpGs, deve ser considerado algum nível de desvio do estado de metilação absoluto. Para verificar uma possível baixa metilação em

*PRKCE* seria necessário utilizar uma técnica mais sensível como por exemplo pirosequenciamento ou o metiloma.

O estudo da metilação entre dois grupos de indivíduos com e sem uma determinada característica é conhecido como epidemiologia epigenética. Na literatura, a maioria destes estudos encontram diferenças de metilação pequena e equivale a menos de 5% (Michels, 2012). Este tipo de diferenças não pode ser determinada usando sequenciamento direto por bissulfito que, como já foi mencionado, é útil para ter uma aproximação da metilação. Adicionalmente, isto levanta a questão da implicação funcional das diferenças na metilação de por exemplo 42% contra 46%. Além disso, as diferenças na metilação são frequentemente relatadas para CpGs individuais, como no caso do efeito da cocaína no promotor de *Prkce* em ratos, e a relevância funcional de tais diferenças pode ser difícil de avaliar. No caso de *Prkce*, foi determinado que o nucleotídeo diferencialmente metilado era o sítio de ligação dos fatores de transcrição AP-1 e SP1 que tem um papel importante na expressão do gene em ratos, mas por limitações do desenho do *primer*, não foi possível avaliar o sítio de ligação provável do AP-1 em humanos. O sítio de ligação provável do fator de transcrição SP1 que sim foi avaliado, não mostrou diferença entre bebês expostos e não exposto.

Por outro lado, cada momento da gravidez apresenta uma janela de vulnerabilidade para alguma forma de desenvolvimento (Glover 2015) mas infelizmente na amostra somente se tem informação de consumo de substâncias psicoativas para os últimos 3 meses de gestação e mesmo que o consumo de crack materno dos bebês estudados não é similar, não houve diferença de metilação.

Finalmente, é importante lembrar que em ratos, a hipóxia e a cocaína pré-natal causaram mudanças na metilação do gene *Prkce* que foram diferentes entre os sexos e também houve aumento da vulnerabilidade cardíaca à isquemia em descendentes machos adultos, enquanto que a exposição fetal à nicotina resultou

em mudanças na metilação e vulnerabilidade cardíaca tanto em machos quanto em fêmeas (Lawrence et al. 2011). Mesmo que nenhuma diferença na metilação foi encontrada nos bebês estudados para este gene em particular, em humanos já foi documentada diferenças devido a EPC entre meninos e meninas mas o mecanismo biológico ainda não é compreendido.

### **3.1.3 Polimorfismo *ABCB1***

Considerando que as frequências das variantes alélicas de *ABCB1* diferem entre os grupos étnicos (Aken et al. 2017), a análise foi realizada separando os grupos segundo a cor da pele autodeclarada. Os grupos encontraram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $P > 0.05$ ).

#### **3.1.3.1 Polimorfismo nas mães**

Comparando as frequências genotípicas e alélicas do total da amostra de mulheres (ver tabela 4) com a frequência relatada para a população brasileira (Scheiner et al. 2010), foram identificadas diferenças significativas para a frequência genotípica ( $p=0,006$ ) e alélica ( $p=0,047$ ). No estudo de Scheiner, as frequências alélicas brasileiras foram diferentes em relação às seguintes populações: uma europeia (grega), duas chinesas, todas as indianas, iranianas, asiáticas (sudeste) e africanas e uma da América Central.

As mulheres de ascendência africana apresentaram o alelo 3435C com maior frequência (0,70) do que os indivíduos de ascendência europeia (0,59, tabela 4). A diferença não foi significativa ( $p=0,079$ ) mas uma frequência maior do alelo 3435C é uma característica comum em populações de ascendência africana (Estrela et al. 2008) como foi encontrado em um grupo de afrodescendentes com lúpus eritematoso sistêmico recrutado no hospital de clínicas de Porto Alegre (Gonzalez, 2006). Também foram comparadas as frequências alélicas da população autodeclarada branca com dados para Portugal (Ameyaw et al. 2001) e houve uma diferença significativa ( $p=0.002$ ).

**Tabela 4.** Frequências genótípicas e alélicas das mães separadas por cor da pele autodeclarada.

Cor da pele	Genótipo/Alelo	Usuárias N (%)	Não usuárias N (%)	Total	P	
Branca	TT	5 (31,3)	10 (14,7)	15 (17,9)	0,06	
	TC	9 (56,3)	30 (44,1)	39 (46,4)		
	CC	2 (12,5)	28 (41,2)	30 (35,7)		
	Total	16	68	84		
Preta e Parda	T	19 (59,4)	50 (36,8)	69 (41,1)	<b>0,027</b>	
	C	13 (40,6)	86 (63,2)	99 (58,9)		
	TT	2 (7,7)	1 (5,3)	3 (6,7)		1,0
	TC	12 (46,2)	9 (47,4)	21 (46,7)		
CC	12 (46,2)	9 (47,4)	21 (46,7)			
Total	26	19	45			
Indígena	T	16 (30,8)	11 (28,95)	27 (30,0)	1,00	
	C	36 (69,2)	27 (71,05)	63 (70,0)		
	TT	1 (33,3)	0	1 (25,0)		1,00
	TC	2 (66,7)	1 (100,0)	3 (75,0)		
Total	3	1	4			
T	4 (66,7)	1 (50)	5 (62,5)	1,00		
C	2 (33,3)	1 (50)	3 (37,5)			
Amarela	CC	0	1	1	-	
Total	TT	8 (17,8)	11 (12,4)	19 (14,2)	0,37	
	TC	23 (51,1)	40 (44,9)	63 (47,0)		
	CC	14 (31,1)	38 (42,7)	52 (38,8)		
	Total	45	89	134		
	T	39 (43,0)	62 (35,0)	101 (38,0)	0,18	
	C	51 (57,0)	116 (65,0)	167 (62,0)		

Não foi identificada diferença entre os genótipos das mães comparando

usuárias e não usuárias e separando por cor da pele, mas houve diferença na frequência alélica das mulheres autodeclaradas brancas (tabela 4). Como o alelo T foi mais frequente nelas, foram comparadas as amostras num modelo de alelo de risco e foi encontrada uma diferença significativa ( $p= 0,042$  Tabela 5). A comparação dos outros grupos não foi estatisticamente significativa (dados não mostrados).

**Tabela 5.** Comparação entre os genótipos de mulheres usuárias e não usuárias de pele branca num modelo de alelo de risco.

Cor da pele	Genótipo	Usuárias N (%)	Não usuárias N (%)	P
Branca	CC	2 (12.5)	28 (41.2)	<b>0,042</b>
	TT +TC	14 (87.5)	40 (58,8)	

Em estudos prévios, o genótipo 3435CC foi prevalente entre homens usuários de crack e/ou heroína, assim como foi mais frequente o alelo C (Isaza et al. 2013). Os pesquisadores propuseram que isso poderia se dever à eficiência aumentada do transportador entre usuários com genótipos selvagens (CC) causando efeitos eufórico de duração mais curta, o que produz uma síndrome de abstinência rápida e maior compulsão para continuar o uso. A outra hipótese, que não exclui a anterior, é que fármacos psicoativos no sistema nervoso central de indivíduos com o alelo T (fenótipo P-gp deficiente) produzem níveis excessivos de dopamina, funcionando como fator protetor contra o abuso de substâncias psicoativas.

Em concordância com o estudo de Isaza (2013), o genótipo CC e a frequência do alelo C foi maior nos usuários de maconha (Benyamina et al, 2009). Os pesquisadores propõem hipóteses similares ao estudo de Isaza. A maior frequência do alelo C não foi reproduzida na amostra de mulheres deste estudo onde o genótipo mais frequente entre mulheres brancas usuárias e não usuárias foi o

heterozigoto (não houve diferenças significativas entre os genótipos) e pelo contrário, o alelo T esteve associado ao consumo de droga ( $p=0,042$  tabela 5).

As discrepâncias nos resultados dos estudos genéticos relacionados à toxicod dependência são comuns. Isso se deve, em grande parte, a interações complexas de fatores genéticos e ambientais, o que provavelmente envolve múltiplos genes e cada um deles faz apenas uma modesta contribuição ao risco total. Conseqüentemente, o tamanho da amostra limita o poder estatístico para detectar pequenas contribuições do polimorfismo estudado. O estudo realizado por Isaza et al. tem 120 usuários de crack e/ou heroína e 120 não usuários e foi realizado somente com homens; no estudo de Benyamina et al. foram incluídos 40 usuários de maconha e 40 não usuários (homens (62,5%) e mulheres (32,5%)), enquanto este somente inclui mulheres (45 usuárias e 89 não usuárias, das quais são brancas 16 e 68 respectivamente). Sabe-se que o gênero é um fator importante nos estudos de abuso de substâncias o que pode estar contribuindo na diferença das frequências do polimorfismo nos dependentes dos estudos citados. Especificamente, em modelos animais as flutuações hormonais que ocorrem durante a gravidez e o ciclo menstrual feminino têm o potencial de afetar a expressão e a função da gp-P e conseqüentemente a disposição e a resposta de fármacos em geral. Além disso a testosterona, embora não seja um substrato da gp-P, é um potente inibidor dela (Bebawy & Chetty, 2009).

É importante salientar, que mesmo que este polimorfismo já tenha sido associado em dependentes à cocaína, não está claro se a cocaína/crack ou algum metabólito relacionado, são substratos da gp-P. No entanto, um estudo de associação em escala genômica (*Genome-Wide Association Studies GWAS*) de 1.379 indivíduos, sugere que um outro polimorfismo no gene *ABCB1* (rs4728702) pode estar envolvido no comportamento anti-social adulto. Considerando outras pesquisas, este gene parece ter efeitos pleiotrópicos em vários comportamentos do espectro de externalização como por exemplo dependência de drogas. As análises complementares nessa amostra encontraram que esse polimorfismo de *ABCB1*

estava associada com dependência de álcool e cocaína, mas não encontraram associações entre *ABCBI* e dependência de maconha ou de opiáceos (Salvatore et al. 2015).

Por fim, este polimorfismo exibe grandes diferenças de frequência alélica entre etnias e as frequências de haplótipos também diferem por grupo étnico (Hodges et al. 2011, Estrela et al., 2008) o que poderia estar relacionado com o fato de encontrar a diferença alélica somente em mulheres brancas. Para ter uma melhor compreensão do haplótipo também é importante considerar que a auto-identificação de acordo com as categorias propostas pelo IBGE é insuficiente para o controle adequado da estratificação populacional em estudos com os polimorfismos de *ABCBI* no Brasil (Estrela et al., 2008).

A possibilidade de que a variante associada à propensão ao consumo de droga seja outro polimorfismo diferente de 3435T, não pode ser excluída, e é necessário seguir investigando outros polimorfismos que possam influenciar a vulnerabilidade para a aquisição de dependência, para a sua persistência ou para a propensão para a recaída, o que resultará em uma melhor base científica de prevenção e tratamento de dependentes de drogas.

### **3.1.3.2 Polimorfismo nos bebês**

Na tabela 6 é mostrada a frequência alélica e genotípica nos bebês, separando por cor da pele materna. Houve diferenças nos genótipos entre expostos e não expostos, somente nos filhos das mães autodeclaradas brancas sendo mais frequente o genótipo TC nos expostos e o CC nos não expostos ( $p=0,045$ ). Não houve diferença nas frequências alélicas. Considerando que o alelo T poderia diminuir a proteção contra potenciais teratógenos, a amostra foi avaliada em um modelo de alelo de risco e foi encontrada diferença nos filhos de mães brancas ( $p=0,026$ , tabela 7). Para os filhos de mães pardas e pretas não houve diferença ( $p=0,67$  dados não mostrados).

**Tabela 6.** Frequências alélicas e genótípicas dos bebês separados por cor da pele materna.

Cor da pele materna	Genótipo /Alelo	Expostos	Não expostos	Total	P
Branca	TT	2 (13,3)	4 (11,4)	6 (12,0)	<b>0,045</b>
	TC	11 (73,3)	14 (40,0)	25 (50,0)	
	CC	2 (13,3)	17 (48,6)	19 (38,0)	
	Total	15	35	50	
	T	15 (50%)	22 (31,4)	37 (37)	0,113
	C	15 (50%)	48 (68,6)	63 (63)	
Parda e preta	TT	3 (11,5)	0	3 (9,1)	1
	TC	12 (46,2)	3 (42,9)	15 (45,5)	
	CC	11 (42,3)	4 (57,1)	15 (45,5)	
	Total	26	7	33	
	T	18 (34,6)	3 (21,4)	21 (31,8)	0,52
	C	34 (65,4)	11 (78,6)	45 (68,2)	
Indígena	TT	1 (50,0)		1 (50,0)	-
	TC	1 (50,0)		1 (50,0)	
	Total	2		2	
	T	3 (75)		3 (75)	
	C	1 (25)		1 (25)	-
Total	TT	6 (14,0)	4 (9,5)	10 (11,8)	0,192
	TC	24 (55,8)	17 (40,5)	41 (48,2)	
	CC	13 (30,2)	21 (50,0)	34 (40,0)	
	Total	43	42	85	
	T	36 (41,9)	25 (29,8)	61 (35,9)	0,112
	C	50 (58,1)	59 (70,2)	109 (64,1)	

**Tabela 7.** Comparação entre os genótipos de bebês expostos e não expostos filhos de mães de pele branca autodeclarada num modelo de alelo de risco.

<b>Cor da pele materna</b>	<b>Genótipo bebê</b>	<b>Usuárias (%)</b>	<b>Não usuárias (%)</b>	<b>P</b>
Branca	CC	2 (13,3)	17 (48,6)	<b>0,026</b>
	TT +TC	13 (86,7)	18 (51,4)	

#### **3.1.3.2.1 Desfechos neonatais adversos e o polimorfismo**

Foi encontrada diferença significativa na média do peso (tabela 1,  $p=0,013$ ) sendo menor nas crianças expostas ao crack/cocaína, mas não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos quando comparadas categorias de crescimento fetal intrauterino (pequeno, grande e adequado para idade gestacional), que constituem-se em importante fator de risco para a mortalidade neonatal (tabela 1). Na tabela 8 se compararam os bebês expostos e não expostos, dos quais se tem amostra biológica materna (45 usuárias de crack e 89 não usuárias), com a presença de desfechos neonatais adversos que já foram relatados na literatura associados à cocaína. A porcentagem de crianças pequenas para a idade gestacional (PIG) foi menor nas crianças expostas quando comparadas com as não expostas (Tabela 8, 4,4% e 14,6% respectivamente), contrário a numerosos estudos prévios (ver metanálise de Gouin et al. 2011), mas é preciso considerar que outros fatores podem contribuir para este desfecho (Pereira et al. 2014). Por outro lado, a prematuridade foi mais frequente nas crianças expostas de forma similar a estudos anteriores.

**Tabela 8.** Desfechos neonatais.

<b>Desfecho adverso</b>	<b>Expostos N (%)</b>	<b>Não exposto N (%)</b>
Baixo peso (<2500 g)	7 (15,6)	3 (3,4)
Prematuridade	7 (15,6)	1 (1,1)
Crianças pequenas para idade gestacional	2 (4,4)	13 (14,6)
Abstinência neonatal	1 (2,2)	0
Total *	12/45 (27,0)	15/89 (18,9)

\*Cada bebê podia apresentar mais de um desfecho.

Nos bebês expostos foi encontrado um caso de abstinência neonatal. Contrário aos outros desfechos adversos da tabela 8 que foram associados à EPC em numerosos estudos, na literatura há pouca comprovação dos relatos iniciais de abstinência neonatal da década de 1980 e 1990. Alguns estudos bem controlados relataram sinais leves, incluindo nervosismo e irritabilidade que não precisaram de tratamento e não estavam relacionados a problemas neurológicos (Eyler et al. 2001, M. Behnke & Smith, 2013). Os sintomas de uso indevido de substâncias não opióides como a cocaína, associados a abstinência neonatal ainda está sujeita a debate. Hudak e Tan (2012, citado por Jones & Fielder 2015) apresentam um resumo dos sinais associados ao abuso materno de substâncias não-opióides. Esses pesquisadores propõem que os recém-nascidos expostos a essas substâncias possam estar experimentando uma toxicidade específica à substância em vez de uma síndrome de abstinência. O quadro torna-se ainda mais complexo quando as

mulheres grávidas usam múltiplas substâncias, com potenciais efeitos sinérgicos de múltiplas substâncias, que podem complicar a capacidade de avaliar a abstinência e distinguir isso da toxicidade. Deve-se lembrar que das usuárias de crack das quais se tem informação de consumo de outras substâncias, nenhuma consumiu opióides (auto-relato), que há uma síndrome de abstinência nos bebês melhor documentada.

As comparações a seguir entre os desfechos adversos e os polimorfismos, são mostradas para filhos de mães autodeclaradas brancas, pretas e pardas. As categorias restantes têm poucos indivíduos e não são mostradas.

Ao comparar bebês com a presença de desfechos adversos mostrados na tabela 8 junto com o genótipo materno em um modelo de alelo de risco, não foi encontrada diferença entre os grupos (tabela 9). A mesma comparação foi feita com o polimorfismo dos bebês e os desfechos adversos, e por último, nas díades disponíveis, foram considerados ambos os polimorfismos (mãe-bebê) comparando com os desfechos adversos e não foi encontrada diferença (dados não mostrados).

**Tabela 9.** Presença de desfechos adversos entre bebês com e sem exposição pré-natal ao crack/cocaína comparado com o polimorfismo de *ABCB1* materno.

Cor pele mãe	Genótipo mãe	Desfecho adverso* bebê	Expostos N (%)	Não expostos N (%)	Total	p	
branca	CC	não	2 (100,0)	24 (85,7)	26 (86,7)	1	
		sim	0	4 (14,3)	4 (13,3)		
		Total	2 (100,0)	28 (100,0)	30 (100,0)		
	CT+TT	não	11 (78,6)	33 (82,5)	44 (81,5)	0,7	
		sim	3 (21,4)	7 (17,5)	10 (18,5)		
		Total	14 (100,0)	40 (100,0)	54 (100,0)		
	Total	não	13 (81,3)	57 (83,8)	70 (83,3)	0,7	
		sim	3 (18,8)	11 (16,2)	14 (16,7)		
		Total	16 (100,0)	68 (100,0)	84 (100,0)		
	preta e parda	CC	não	9 (75,0)	8 (88,9)	17 (81,0)	0,603
			sim	3 (25,0)	1 (11,1)	4 (19,0)	
			total	12 (100,0)	9 (100,0)	21 (100,0)	
CT+TT		não	9 (64,3)	7 (70,0)	16 (66,7)	1	
		sim	5 (35,7)	3 (30,0)	8 (33,3)		
		total	14 (100,0)	10 (100,0)	24 (100,0)		
Total		não	18 (69,2)	15 (78,9)	33 (73,3)	0,517	
		sim	8 (30,8)	4 (21,1)	12 (26,7)		
		total	26 (100,0)	19 (100,0)	45 (100,0)		

\* Baixo peso, restrição de crescimento, abstinência neonatal, prematuridade

Segundo a literatura, o alelo T diminuiria a proteção contra potenciais teratogênicos porque sabe-se que este transportador na placenta desempenha um papel significativo na proteção do feto de xenobióticos (Ceckova-Novotna et al. 2006, Mao, Q 2008). A hipótese era que aqueles indivíduos que tivessem o alelo T, seriam menos eficientes em transportar a cocaína/crack ou algum dos metabólitos associados para fora da placenta e poderiam ter maiores desfechos adversos

associados ao uso. Entretanto não se encontrou associação entre esse alelo e desfechos perinatais que já foram associados com exposição pré-natal à cocaína na literatura (tabela 9). Por outro lado, a comparação entre as crianças que precisaram ser hospitalizadas ou não, mostrou diferença significativa nos bebês de mães autodeclaradas brancas, sendo internados mais frequentemente os filhos de mães que tinham o alelo T (tabela 10). A mesma análise se mostrou significativa considerando o genótipo apenas do bebê (tabela 11) e os genótipos mãe-bebê (tabela 12).

**Tabela 10.** Bebês hospitalizados com e sem EPC comparado com o polimorfismo materno.

Cor da pele materna	Genótipo materno	Hospitalização	Expostos N(%)	Não Expostos N(%)	Total (%)	P	
Branca	CC	Não	1 (50,0)	22 (78,6)	23 (76,7)	0,418	
		Sim	1 (50,0)	6 (21,4)	7 (23,3)		
		Total	2 (100,0)	28 (100,0)	30 (100,0)		
	CT+TT	Não	1 (7,1)	37 (92,5)	38 (70,4)	<0,001	
		Sim	13 (92,9)	3 (7,5)	16 (29,6)		
		Total	14 (100,0)	40 (100,0)	54 (100,0)		
	Total	Não	2 (12,5)	59 (86,8)	61 (72,6)	<0,001	
		Sim	14 (87,5)	9 (13,2)	23 (27,4)		
		Total	16 (100,0)	68 (100,0)	84 (100,0)		
	Parda e Preta	CC	Não	6 (54,5)	6 (66,7)	12 (60,0)	0,67
			Sim	5 (45,5)	3 (33,3)	8 (40,0)	
			Total	11 (100,0)	9 (100,0)	20 (100,0)	
CT+TT		Não	5 (35,7)	7 (77,8)	12 (52,2)	0,089	
		Sim	9 (64,3)	2 (22,2)	11 (47,8)		
		Total	14 (100,0)	9 (100,0)	23 (100,0)		
Total		Não	11 (44)	13 (72,2)	24 (55,8)	0,119	
		Sim	14 (56,0)	5 (27,8)	19 (44,2)		
		Total	25 (100,0)	18 (100,0)	43 (100,0)		

**Tabela 11.** Bebês hospitalizados com e sem EPC comparado com o polimorfismo do bebê.

Cor da pele materna	Genótipo Bebê	Hospitalização	Expostos N(%)	Não Expostos N(%)	Total	P
Branca	CC	Não	1 (50.0)	13 (76.5)	14 (73.7)	0.468
		Sim	1 (50.0)	4 (23.5)	5 (26.3)	
		Total	2 (100)	17 (100.0)	19(100.0)	
	CT+TT	Não	1 (7.7)	16 (88.9)	17 (54.8)	<0,001
		Sim	12 (92.3)	2 (11.1)	14 (45.2)	
		Total	13 (100.0)	18 (100.0)	31 (100.0)	
	Total	Não	2 (13.3)	29(82.9)	31 (82.9)	<0,001
		Sim	13 (86.7)	6 (17.1)	19 (38.0)	
		Total	15 (100.0)	35 (100.0)	50 (100.0)	
Parda e Preta	CC	Não	5 (50.0)	3 (75.0)	8 (57.1)	0.580
		Sim	5 (50.0)	1 (25.0)	6 (42.9)	
		Total	10 (100.0)	4 (100.0)	14 (100.0)	
	CT+TT	Não	7 (46.7)	2 (100.0)	9 (52.9)	0.471
		Sim	8 (53.3)	0	8 (47.1)	
		Total	15 (100.0)	2 (100.0)	17 (100.0)	
	Total	Não	12 (48.0)	5 83.3%	17 54.8%	0.185
		Sim	13 (52.0)	1 (16.7)	14 (45.2)	
		Total	25 (100.0)	6 (100.0)	31 (100.0)	

**Tabela 12.** Bebês hospitalizados com e sem EPC comparando com o polimorfismo mãe-bebê.

Cor da pele materna	Genótipo mãe-bebê	Hospitalização	Expostos	Não Expostos	Total	P	
Branca	CC	Não	1 (50.0)	11 (73.3)	12 (70.6)	0,515	
		Sim	1 (50.0)	4 (26.7)	5 (29.4)		
		Total	2 (100.0)	15 (100.0)	17 (100.0)		
	CT+TT	Não	1 (7.7)	15 (88.2)	16 (53.3)	<0,001	
		Sim	12 (92.3)	2 (11.8)	14 (46.7)		
		Total	13 (100.0)	17 (100.0)	30 (100.0)		
	Total	Não	2 (13.3)	26 (81.3)	28 (59.6)	<0,001	
		Sim	13 (86.7)	6 (8.8)	19 (40.4)		
		Total	15 (100.0)	32 (100.0)	47 (100.0)		
	Parda e Preta	CC	Não	3 (50.0)	2 (66.7)	5 (55.6)	1.0
			Sim	3 (50.0)	1 (33.3)	4 (44.4)	
			Total	6 (100.0)	3 (100.0)	9 (100.0)	
CT+TT		Não	4 (40.0)	2 (100.0)	6 (50.0)	0.455	
		Sim	6 (60.0)	0	6 (50.0)		
		Total	10 (100.0)	2 (100.0)	12 (100.0)		
Total		Não	7 (43.8)	4 (80.0)	11 (52.4)	0.311	
		Sim	9 (56.3)	1 (20.0)	10 (47.6)		
		Total	16 (100.0)	5 (100.0)	21 (100.0)		

Estes resultados podem ser um indicativo de que a presença do alelo T estaria envolvida numa maior vulnerabilidade do bebê à exposição a substâncias durante a gravidez.

É necessário enfatizar algumas limitações deste estudo. Primeiro, o tamanho

da amostra limita o poder estatístico para detectar pequenas contribuições do polimorfismo estudado. Segundo, não está claro se a cocaína ou algum dos metabólitos associados são substratos da gp-P mas sabe-se que a expressão dessa proteína em placentas aumenta significativamente quando expostas a metadona em combinação com cocaína, comparada com a exposição com metadona isoladamente (Malek et al., 2009). A metadona é a terapia de escolha para o tratamento da dependência de opiáceos durante a gravidez.

Por outro lado, a variável hospitalização, pode incluir múltiplas causas que deveriam ser analisadas com mais detalhe para caracterizar melhor os desfechos adversos da amostra. Todavia, é importante salientar que além do consumo de substâncias, a maioria de mulheres usuárias de crack não fez pré-natal e estava exposta a outros estressores como psicopatologias maternas (Mardini et al, 2016) que poderiam estar contribuindo numa maior porcentagem de bebês hospitalizados.

Outro fator a ser considerado nestes resultados é a falta do estudo dos haplótipos na amostra. Por exemplo, o RNAm de *ABCBI* e a glicoproteína P foram analisados em 73 placentas humanas de caucasianos, bem com os respectivos genótipos/haplótipos para os polimorfismos C3435T e G2677T/A de mães e bebês. Os níveis de mRNA não foram diferentes entre estes genótipos. No entanto, as placentas de mães portadoras de ambos os polimorfismos (3435T e 2677T, TT/TT) tiveram uma expressão significativamente menor de glicoproteína P em comparação com placentas de indivíduos de tipo selvagem (Hitz et al 2004, citado por Ceckova-Novotna et al., 2006). Na amostra de usuárias de crack somente foi avaliado um polimorfismo e seria necessário avaliar outros que poderiam estar influenciando na expressão da gp-P. Diferentes haplótipos entre etnias explicariam a associação entre o alelo T e o maior número de crianças hospitalizadas somente em mães autodeclaradas brancas.

Embora haja um número cada vez maior de pesquisas com o objetivo de entender o papel dos transportadores de efluxo ABC, atualmente não é possível

usar o conhecimento de genótipo ou haplótipo para prever quais os bebês estariam melhor protegidos pela sua ação. Estes resultados seriam transferíveis para outros grupos de mulheres para quem a toma de fármacos durante a gravidez é inevitável (mulheres com HIV etc.) e assim reduzir o temor de mulheres que devem tomar medicação durante este período (Thajam, 2013).

Finalmente consideramos que estudos como este, levando em conta variáveis genéticas frente a exposições ambientais são uma importante via de compreensão dos mecanismos e suscetibilidade à ação teratogênica destes.

## CAPÍTULO IV

### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Não foi detectada metilação na região UTR e o início do exon 1 de *PRKCE* em bebês expostos e não expostos ao crack.
- O alelo 3435T de *ABCBI* foi mais frequente em usuárias brancas que em não usuárias sugerindo associação deste alelo com o consumo de substâncias, contrário ao encontrado em homens usuários de crack e maconha.
- Não foi encontrada associação entre o polimorfismo C3435T de *ABCBI* e os desfechos neonatais adversos: baixo peso, prematuridade, bebês pequenos para idade gestacional e abstinência neonatal entre bebês com EPC e sem exposição, mas o alelo foi mais frequente em crianças hospitalizadas filhas de mães usuárias de crack autodeclaradas brancas. A presença do alelo T estaria envolvida numa maior vulnerabilidade do bebê ao uso de substâncias durante a gravidez.

#### 4.1 REFERÊNCIAS

Abdalla R.R., Madruga C.S., Ribeiro M., Pinsky I., Caetano R., Laranjeira R (2014). Prevalence of cocaine use in Brazil: Data from the II Brazilian National Alcohol and Drugs Survey (BNADS) *Addict. Behav.* ; 39:297–301.

Accornero, V. H., Anthony, J. C., Morrow, C. E., Xue, L., Mansoor, E., Johnson, A. L., McCoy, C.B., Bandstra, E. S. (2011). Estimated Effect of Prenatal Cocaine Exposure on Examiner-Rated Behavior at Age 7 Years. *Neurotoxicology and Teratology*,33(3), 370–378.

Adalsteinsson, B. T., Gudnason, H., Aspelund, T., Harris, T. B., Launer, L. J., Eiriksdottir, G., ... Gudnason, V. (2012). Heterogeneity in White Blood Cells Has Potential to Confound DNA Methylation Measurements. *PLoS ONE*, 7(10), e46705. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0046705>

Addis A, Moretti ME, Ahmed Syed F, Einarson TR, Koren G. (2001). Fetal effects of cocaine: an updated meta-analysis. *Reprod Toxicol* 15:341-69

Aken, B. L., Achuthan, P., Akanni, W., Amode, M. R., Bernsdorff, F., Bhai, J., ... Flicek, P. (2017). Ensembl 2017. *Nucleic Acids Research*, 45(Database issue), D635–D642.

Altman A. Kong K.F. (2016). Protein Kinase C Enzymes in the Hematopoietic and Immune Systems. *Annual Review of Immunology* Vol. 34: 511-538.

Ameyaw MM, Regateiro F, Li T, Liu X, Tariq M, Mobarek A, et al. (2001) MDR1 pharmacogenetics: frequency of the C3435T mutation in exon 26 is significantly influenced by ethnicity. *Pharmacogenetics*; 11: 217-221.

Applied Biosystems (2013) Detection and Quantification of Sequence Variants from Sanger Sequencing Traces.

<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/seq-quantification-app-note.pdf> Acesso em 12 de fevereiro de 2013.

Bakulski K.M., Jason I. Feinberg, Shan V. Andrews, Jack Yang, Shannon. DNA methylation of cord blood cell types: Applications for mixed cell birth studies. *Epigenetics* 2016 May; 11(5): 354–362.

Bandstra, E. S., Vogel, A. L., Morrow, C. E., Xue, L., & Anthony, J. C. (2004). Severity of Prenatal Cocaine Exposure and Child Language Functioning Through Age Seven Years: A Longitudinal Latent Growth Curve Analysis. *Substance Use & Misuse*, 39(1), 25–59.

Barik S (2007) The thrill can kill: murder by methylation. *Mol Pharmacol.* 71:1203-5

Basta, P., Strickland, M. B., Holmes, W., Loomis, C. R., Ballas, L. M., Burns, D. J. (1992) Sequence and expression of human protein kinase C-epsilon. *Biochim. Biophys. Acta* 1132: 154-160.

Bateman D. A., Chiriboga C. A. 2000. Dose-response effect of cocaine on newborn head circumference. *Pediatrics*;106.

Bebawy M, Chetty M. (2009) Gender differences in p-glycoprotein expression and function: effects on drug disposition and outcome. *Curr Drug Metab*;10:322–328

Behnke M, Smith VC. Committee on Substance abuse; Committee on fetus and new-born. Prenatal substance abuse: Short- and long-term effects on the exposed fetus. *Pediatrics.* (2013);131:e1009–e1024.

Benyamina A, Bonhomme-Faivre L, Picard V, Sabbagh A, Richard D, Blecha L et al. (2009). Association between ABCB1 C3435T polymorphism and increased risk of cannabis dependence. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*; 33: 1270–1274.

Bhuvanewar, C. G., Chang, G., Epstein, L. A., & Stern, T. A. (2008). Cocaine and Opioid Use During Pregnancy: Prevalence and Management. *Primary Care Companion to The Journal of Clinical Psychiatry*, 10(1), 59–65.

Biosystems A. (2007) *Methylation Analysis by Bisulfite Sequencing: Chemistry, Products and Protocols from Applied Biosystems*.

Blik B.J.B., van Schaik R.H.N., van der Heiden I.P., Sayed-Tabatabaei F.A., van Duijn C.M., Steegers E.R.P., Eurocran Gene-Environment Interaction Group (2009). Maternal medication use, carriership of the ABCB1 3435C>T polymorphism and the risk of a child with cleft lip with or without cleft palate. *Am. J. Med. Genet. A*;149:2088–2092.

Castrillo, A., Pennington, D. J., Otto, F., Parker, P. J., Owen, M. J., Bosca, L. (2001). Protein kinase C-epsilon is required for macrophage activation and defense against bacterial infection. *J. Exp. Med.* 194: 1231-1242,.

Camargo, Paola De Oliveira; Martin, Maria De Fátima Duarte (2014). Os efeitos do crack na gestação e nos bebês nascidos de mães usuárias: Uma revisão bibliográfica. *Cadernos de Terapia Ocupacional da UFSCar*, v. 22, p. 161-169.

Camilo, C.P. (2015) *Estudos epigenéticos em dependentes de crack e cocaína: investigação da metilação global do genoma*. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

Ceckova-Novotna M., Pavek P., Staud F. (2006) P-glycoprotein in the placenta: Expression, localization, regulation and function. *Reprod. Toxicol.*;22:400–410.

Chasnoff IJ, Burns WJ, Schnoll SH, Burns KA. (1985) Cocaine use in pregnancy. *New England Journal of Medicine*; 313:666–9.

Chasnoff IJ, Burns KA, Burns WJ. (1987) Cocaine use in pregnancy: perinatal morbidity and mortality. *Neurotoxicology & Teratology.* ;9:291–3.

Conselho Nacional de Justiça. *Cartilha sobre o crack*. Brasília: CNJ, (2011). Disponível em: <[http://www.twiki.ufba.br/twiki/pub/CetadObserva/Outros/Craqueiros\\_e\\_cracados\\_paginadoteseufba.pdf](http://www.twiki.ufba.br/twiki/pub/CetadObserva/Outros/Craqueiros_e_cracados_paginadoteseufba.pdf)>. Acesso em: 23 ago. 2015.

Daud, A. N. A., Bergman, J. E. H., Kerstjens-Frederikse, W. S., Groen, H., & Wilffert, B. (2016). The Risk of Congenital Heart Anomalies Following Prenatal Exposure to Serotonin Reuptake Inhibitors—Is Pharmacogenetics the Key? *International Journal of Molecular Sciences*, 17(8), 1333.

De Freitas, T. A. B., Palazzo, R. P., de Andrade, F. M., Reichert, C. L., Pechansky, F., Kessler, F., De Farias C.B., de Andrade G.G., Leistner-Segal S.,

Dyson MT, Roqueiro D, Monsivais D, Ercan CM, Pavone ME, Brooks DC, et al. (2014) Genome-Wide DNA Methylation Analysis Predicts an Epigenetic Switch for GATA Factor Expression in Endometriosis. *PLoS Genet* 10(3): e1004158. doi:10.1371/journal.pgen.1004158

Domanico, A. (2006) *Craqueiros e cracados: bem vindo ao mundo dos nórias!* Estudo para a implementação de estratégias de redução de danos para usuários de crack nos cinco projetos-piloto do Brasil. 220 f. Tese (Doutorado em Ciências

Sociais)-Universidade Federal da Bahia, Salvador, (2006). PMID:16955285.

Estrela RC, Ribeiro FS, Carvalho RS, et al. (2008) Distribution of *ABCB1* polymorphisms among Brazilians: impact of population admixture. *Pharmacogenomics*;9(3):267–276.

Eyler et al., 2001 F.D. Eyler, M. Behnke, C.W. Garvan, N.S. Woods, K. Wobie, M. Conlon. (2001) Newborn evaluations of toxicity and withdrawal related to prenatal cocaine exposure *Neurotoxicol. Teratol.*, 23, pp. 399–411

Forray, A., & Foster, D. (2015). Substance use in the perinatal period. *Current Psychiatry Reports*, 17(11), 91. <http://doi.org/10.1007/s11920-015-0626-5>

Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL, Paul CL. (1992) A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A*;89:1827–1831.

Gabriel M, Taylor C, Burhans L. (2003) In utero cocaine, discriminative avoidance learning with low-salient stimuli and learning-related neuronal activity in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) *Behav Neurosci*. 117:912–26.

Glover V. Prenatal stress and its effects on the fetus and the child: possible underlying biological mechanisms. *Adv Neurobiol* 2015; 10: 269–283.

Gonçalves, J. R., & Nappo, S. A. (2015). Factors that lead to the use of crack cocaine in combination with marijuana in Brazil: a qualitative study. *BMC Public Health*, 15, 706.

Gonzalez T.P. (2006). Polimorfismos moleculares do gene MDR1/ABCB1 em pacientes com Lupus Erimatoso Sistêmico. Dissertação Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

Gorlov IP, Gorlova OY, Amos CI. (2008) Relative effects of mutability and selection on single nucleotide polymorphisms in transcribed regions of the human genome. *BMC genomics*.9: 292-10.1186/1471-2164-9-292.

Gouin K, Murphy K, Shah PS. (2011) Effects of cocaine use during pregnancy on low birthweight and preterm birth: systematic review and metaanalyses. *Am J Obstet Gynecol.*;204:340.e1–.e12.

Hernandez HG, Tse MY, Pang SC, Arboleda H, Forero DA. Optimizing methodologies for PCR-based DNA methylation analysis. *Biotechniques*. 2013;55:181–97.

Hitchins MP, Rapkins RW, Kwok CT, Srivastava S, Wong JJ, Khachigian LM, et al. (2011) Dominantly inherited constitutional epigenetic silencing of MLH1 in a cancer-affected family is linked to a single nucleotide variant within the 5'utr. *Cancer Cell*;20:200–213.

Hodge, C. W., Raber, J., McMahon, T., Walter, H., Sanchez-Perez, A. M., Olive, M. F., Mehmert, K., Morrow, A. L., Messing, R. O. (2002). Decreased anxiety-like behavior, reduced stress hormones, and neurosteroid supersensitivity in mice lacking protein kinase C-epsilon. *J. Clin. Invest.* 110: 1003-1010,.

Hodges, L. M., Markova, S. M., Chinn, L. W., Gow, J. M., Kroetz, D. L., Klein, T. E., & Altman, R. B. (2011). Very important pharmacogene summary: ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein). *Pharmacogenetics and Genomics*, 21(3), 152–161.

Illingworth R, Kerr A, DeSousa D, Jørgensen H, Ellis P, Stalker J, et al. (2008). A Novel CpG Island Set Identifies Tissue-Specific Methylation at Developmental Gene Loci. *PLoS Biol* 6(1): e22.

Illingworth R.S., Bird A.P. (2009) CpG islands—‘a rough guide’ *FEBS Lett.*;583:1713–1720.

Inacio, F. Estimativa do número de usuários de crack e/ou similares nas capitais do país. Ministério da Saúde/Fiocruz, 2013.

Isaza, C., Henao, J., Beltrán, L., Porras, L., Gonzalez, M., Cruz, R., & Carracedo, A. (2013). Genetic variants associated with addictive behavior in Colombian addicted and non-addicted to heroin or cocaine. *Colombia Médica : CM*, 44(1), 19–25.

Jones HE, Fielder A. (2015). Neonatal abstinence syndrome: Historical perspective, current focus, future directions. *Prev Med*;80:12–7.

Kacevska M., M. Ivanov, A. Wyss, S. Kasela, L. Milani, A. Rane, et al. (2012). DNA methylation dynamics in the hepatic CYP3A4 gene promoter. *Biochimie*, 94, pp. 2338–2344

Kazanietz M. (2016). Disponível em <http://www.med.upenn.edu/marcelo/images.shtml>. Acesso em dezembro 2016.

Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar SV, Gottesman MM (2007). A “silent” polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science*;315:525–8. doi: 10.1126/science.1135308.

LaGasse, L. L., Gaskins, R. B., Bada, H. S., Shankaran, S., Liu, J., Lester, B. M., Roberts, M. (2011). Prenatal Cocaine Exposure and Childhood Obesity at Nine Years. *Neurotoxicology and Teratology*, 33(2): 188–197.

Li LC and Dahiya R. (2002). MethPrimer: designing primers for methylation PCR. *Bioinformatics*. Nov;18 (11):1427-31. PMID: 12424112

Lam J, Baello S, Igbal M, Kelly LE, Shannon PT, Chitayat D, Mattheyws SG, Koren G. (2015) The ontogeny of P-glycoprotein in the developing human blood-brain barrier: implication for opioid toxicity in neonates. *Pediatr Res*.

Levandowski ML, Tractenberg SG, de Azeredo LA, De Nardi T, Rovaris DL, Bau CH, Rizzo LB, Maurya PK, Brietzke E, Tyrka AR, Grassi-Oliveira R. (2016) Crack cocaine addiction, early life stress and accelerated cellular aging among women. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. Nov 3;71:83-9.

Lipshultz SE, Frassica JJ, Orav EJ. (1991). Cardiovascular abnormalities in infants prenatally exposed to cocaine. *J Pediatr* 118:44-51.

Lawrence, J., Chen, M., Xiong, F., Xiao, D., Zhang, H., Buchholz, J. N., & Zhang, L. (2011). Foetal nicotine exposure causes PRKCε gene repression by promoter methylation in rat hearts. *Cardiovascular Research*, 89(1), 89–97.

Lester, B. M., & Lagasse, L. L. (2010). Children of Addicted Women. *Journal of Addictive Diseases*, 29(2), 259–276.

Levine, T. P., Liu, J., Das, A., Lester, B., Lagasse, L., Shankaran, S., Bada H.S., Bauer, C.R., Higgins, R. (2008). Effects of Prenatal Cocaine Exposure on Special Education in School-Aged Children. *Pediatrics*, 122(1), e83–e91.

Little BB, Gilstrap LC, and Cunningham FG. 2001. Teratology, drugs and medications. In: Cunningham G, Gant N, Leveno K, et al, eds. Williams Obstetrics. 21st ed. New York, NY: The McGraw Hill Companies. 1005–1031.

Littler, C. M., Morris, K. G., Jr., Fagan, K. A., McMurtry, I. F., Messing, R. O., Dempsey, E. C. (2003). Protein kinase C-epsilon-null mice have decreased hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 284: H1321-H1331,.

Lockridge O (2015) Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses. *Pharmacol Ther* 148:34–46.

Lumeng, J. C., Cabral, H. J., Gannon, K., Heeren, T., & Frank, D. A. (2007). Prenatal exposures to cocaine and alcohol and physical growth patterns to age 8 years. *Neurotoxicology and Teratology*, 29(4), 446–457.

Malek, A., Obrist, C., Wenzinger, S., & von Mandach, U. 2009. The impact of cocaine and heroin on the placental transfer of methadone. *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E*, 7, 61.

Mansoor, E., Morrow, C. E., Accornero, V. H., Xue, L., Johnson, A. L., Anthony, J. C., & Bandstra, E. S. (2012). Longitudinal Effects of Prenatal Cocaine Use on Mother-Child Interactions at Ages 3 and 5. *Journal of Developmental and Behavioral Pediatrics : JDBP*, 33(1), 32–41.

Martin, M. M., Graham, D. L., McCarthy, D. M., Bhide, P. G. and Stanwood, G. D. (2016), Cocaine- induced neurodevelopmental deficits and underlying mechanisms. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 108: 147–

173.

Mao, Q. (2008). BCRP/*ABCG2* in the Placenta: Expression, Function and Regulation. *Pharmaceutical Research*, 25(6), 1244–1255.

Marchetto NM, Glynn RA, Ferry ML, Ostojic M, Wolff SM, Yao R, Hausmann MF. (2016). Prenatal stress and newborn telomere length. *Am J Obstet Gynecol.*;215(1):94 e1–8

Mardini, V, Rohde, L.A., Ceresér, K.M. M., Gubert, C.M., Silva, E.M.D, Xavier, F, Parcianello, R, Röhsig, L.M, Pechansky, F, Pianca, T.G., & Szobot, C.M. (2016). IL-6 and IL-10 levels in the umbilical cord blood of newborns with a history of crack/cocaine exposure in utero: a comparative study. *Trends in Psychiatry and Psychotherapy*, 38(1), 40-49.

Messiah, S. E., Ludwig, D. A., Vidot, D. C., Accornero, V. H., Lipshultz, S. E., Miller, T. L., ... Bandstra, E. S. (2015). Prenatal Cocaine Exposure and Cardiometabolic Disease Risk Factors in 18- to 20-Year-Old African Americans. *Ethnicity & Disease*, 25(4), 419–426.

Meyer, K., Zhang, H., & Zhang, L. (2009a). Direct effect of cocaine on epigenetic regulation of PKC $\epsilon$  gene repression in the fetal rat heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 47(4), 504–511.

Meyer, K. D., & Zhang, L. (2009b). Short- and long-term adverse effects of cocaine abuse during pregnancy on the heart development. *Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease*, 3(1), 7–16.

Michels, K.B. (2012) *Epigenetic Epidemiology*. Springer.

Michels KB, Binder AM, Dedeurwaerder S, Epstein CB, Grealley JM, Gut I, et al. (2013). Recommendations for the design and analysis of epigenome-wide association studies. *Nat Methods*.10 (10):949–955.

Morrow, C. E., Culbertson, J. L., Accornero, V. H., Xue, L., Anthony, J. C., & Bandstra, E. S. (2006). Learning Disabilities and Intellectual Functioning in School-Aged Children With Prenatal Cocaine Exposure. *Developmental Neuropsychology*, 30(3), 905–931.

Mu W and Zhang W (2012) Bioinformatic resources of microRNA sequences, gene targets, and genetic variation. *Front. Gene*. 3:31.

Novikova, S. I., He, F., Bai, J., Cutrufello, N. J., Lidow, M. S., & Undieh, A. S. (2008). Maternal Cocaine Administration in Mice Alters DNA Methylation and Gene Expression in Hippocampal Neurons of Neonatal and Prepubertal Offspring. *PLoS ONE*, 3(4), e1919.

Obermann-Borst S.A., Isaacs A., Younes Z., van Schaik R.H.N., van der Heiden I.P., van Duyn C.M., Steeqers E.A., Steeqer-Theunissen R.P. (2011) General maternal medication use, folic acid, the MDR1 C3435T polymorphism, and the risk of a child with a congenital heart defect. *Am. J. Obstet. Gynecol*;236:e1–e8.

Parlaman JP, Thompson BL, Levitt P, Stanwood GD. (2007) Pharmacokinetic profile of cocaine following intravenous administration in the female rabbit. *Eur J Pharmacol*.563:124–9.

Parrish, R., Day, J. J., & Lubin, F. D. (2012). Direct bisulfite sequencing for examination of DNA methylation patterns with gene and nucleotide resolution from brain tissues. *Current Protocols in Neuroscience*, CHAPTER, Unit7.24.

Pereira DDS, Magalhães ALC, Jesús NR, Trajano AJB. (2014) Restrição de

crescimento intrauterino. Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto;13(3):33-40

Pesquisa Nacional Por amostra de domicílios e contagem da população Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Brasil (2010). Disponível em [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010/indicadores\\_sociais\\_municipais/indicadores\\_sociais\\_municipais\\_tab\\_pdf.shtm](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010/indicadores_sociais_municipais/indicadores_sociais_municipais_tab_pdf.shtm)

Stanwood GD, Washington RA, Levitt P. (2001) Identification of a sensitive period of prenatal cocaine exposure that alters the development of the anterior cingulate cortex. *Cerebral Cortex*. 11:430–40

Stanwood GD, Levitt P. (2003). Repeated i.v. cocaine exposure produces long-lasting behavioral sensitization in pregnant adults, but behavioral tolerance in their offspring. *Neuroscience*122:579–83.

Ribeiro, L. A., Sanchez, Z. M., & Nappo, S. A. (2010). Surviving crack: a qualitative study of the strategies and tactics developed by Brazilian users to deal with the risks associated with the drug. *BMC Public Health*, 10, 671.

Richardson GA, Goldschmidt L, Larkby C. (2007) Effects of Prenatal Cocaine Exposure on Growth: A Longitudinal Analysis. *Pediatrics*. 120:e1017–1027.

Rinaudo, P., & Wang, E. (2012). Fetal Programming and Metabolic Syndrome. *Annual Review of Physiology*, 74, 107–130.

Ross, E. J., Graham, D. L., Money, K. M., & Stanwood, G. D. (2015). Developmental Consequences of Fetal Exposure to Drugs: What We Know and What We Still Must Learn. *Neuropsychopharmacology*, 40(1), 61–87

Sadri-Vakili, G. (2014), Cocaine triggers epigenetic alterations in the corticostriatal circuit. *Brain Research*.

Salvatore, J. E., Edwards, A. C., McClintick, J. N., Bigdeli, T. B., Adkins, A., Aliev, F., ... Dick, D. M. (2015). Genome-wide association data suggest *ABCB1* and immune-related gene sets may be involved in adult antisocial behavior. *Translational Psychiatry*, 5(4), e558

Scruggs, S.B., D. Wang, P. Ping. (2016) PRKCE gene encoding protein kinase C-epsilon-dual roles at sarcomeres and mitochondria in cardiomyocytes, *Gene* 590 (1) 90–96.

Scheiner, M.A.M., Damasceno, A.M. & Maia, R.C. (2010) *ABCB1* single nucleotide polymorphisms in the Brazilian population. *Mol Biol Rep* 37: 111

Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods*. (2014);11:361–362.

Shaw GM, Malcoe LH, Lammer EJ. (1991). Maternal use of cocaine during pregnancy and congenital cardiac anomalies. *J Pediatr* 118:167-8

Tanabe M, Ieiri I, Nagata N, et al. (2001) Expression of P-glycoprotein in human placenta: relation to genetic polymorphism of the multidrug resistance (MDR)-1 gene. *J Pharmacol Exp Ther*; 297(3):1137–1143

Thajam D. (2013) The Role of Multidrug Resistance Proteins in Determining Fetal Susceptibility to Drugs of Misuse. PhD Thesis. School of Medicine Maternal and Fetal Health Research Centre Institute of Human Development. The University of Manchester. Manchester. United Kingdom.

Thompson, B. L., Levitt, P., & Stanwood, G. D. (2009). Prenatal exposure to drugs: effects on brain development and implications for policy and education. *Nature Reviews. Neuroscience*, *10*(4), 303–312.

Vassoler, F. M., Byrnes, E. M., & Pierce, R. C. (2014). The Impact of Exposure to Addictive Drugs on Future Generations: Physiological and Behavioral Effects. *Neuropharmacology*, *76*(0 0), 10.1016/j.neuropharm.2013.06.016. <http://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.06.016>

Zymo Research Beginners Guide. <http://www.zymoresearch.com/bisulfite-beginner-guide>. Acesso em 12 de fevereiro de 2013.