

Faculdade de Medicina  
Doutorado em Psiquiatria  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Helena Ferreira Moura

**Envelhecimento Celular Precoce em Indivíduos com Transtorno por uso de  
Álcool ou Cocaína/Crack**

Porto Alegre

2021

Helena Ferreira Moura

**Envelhecimento Celular Precoce em Indivíduos com Transtorno por uso de  
Álcool ou Cocaína/Crack**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do título de doutora em Psiquiatria pelo Programa de Pós-graduação em Psiquiatria e Ciências do Comportamento da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Profa.Dra. Lísia von Diemen

Porto Alegre

2021

MOURA, HELENA FERREIRA  
ENVELHECIMENTO CELULAR PRECOCE EM INDIVÍDUOS COM  
TRANSTORNO POR USO DE ÁLCOOL OU COCAÍNA/CRACK / HELENA  
FERREIRA MOURA. -- 2021.  
134 f.  
Orientador: LISIA VON DIEMEN.

Coorientador: RAFFAEL MASSUDA.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de  
Pós-Graduação em Psiquiatria e Ciências do  
Comportamento, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. ÁLCOOL. 2. COCAÍNA. 3. TELÔMEROS. 4. INFLAMAÇÃO.  
5. COVID-19. I. VON DIEMEN, LISIA, orient. II.  
MASSUDA, RAFFAEL, coorient. III. Título.

Helena Ferreira Moura

**Envelhecimento Celular Precoce em Indivíduos com Transtorno por uso de  
Álcool ou Cocaína/Crack**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do título de doutora em Psiquiatria pelo Programa de Pós-graduação em Psiquiatria e Ciências do Comportamento da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Profa. Dra. Lísia von Diemen

**Aprovada em:**Porto Alegre, 30 de abril de 2021.

BANCA EXAMINADORA:

---

Prof. Dr. Ives Cavalcante Passos  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

---

Profª Dra. Joana Corrêa de Magalhães Narvaez  
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

---

Dr. João Maurício Castaldelli-Maia  
University of Columbia

Aos meus pais, pelo carinho, exemplos e incentivo para seguir sempre em busca de  
novas descobertas;

À minha irmã, por me mostrar os caminhos;

Ao Dudu, Bibi e Biel, que me renovam o espírito;

À Lola, sempre ao meu lado.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha orientadora, pelos ensinamentos, encorajamento e afetividade;  
Ao Raffael Massuda, por me transmitir tranquilidade nos momentos em que ela foi  
mais necessária;

À banca examinadora, que corajosamente aceitou desafiar o tempo junto comigo:  
Joana Narvaez, João Maurício Castaldelli-Maia e o relator Ives Cavalcante;

Ao Felix Kessler, pela motivação e positividade infinitas;  
À Fernanda Ramos, amiga e parceira de aventuras, pelo apoio estrutural e afetivo;  
Ao primoroso Felipe Ornell, sempre me ajudando a soletrar GABBANA, pelo  
acolhimento e compartilhamento de sonhos;

À Jaqueline Schuch, cuja presteza e habilidades possibilitaram a realização deste  
trabalho;

Ao Felipe Schuch, pela inspiração como pesquisador e por todo o apoio e  
ensinamentos com a meta-análise;

À toda a equipe do CPAD, em especial à Juliana Scherer, Fernando Rebelato,  
Vinícius Roglio, Sílvia Halpern e Carla Dalbosco, pelo apoio e por tornar em festa os  
momentos de trabalho;

Ao Anderson Stolf, pela generosidade em compartilhar comigo os caminhos por ele  
abertos no estudo da genética;

A toda a equipe do Departamento de Genética da UFRGS e do laboratório da  
PUCRS, pela colaboração;

A todos os meus pacientes, pelos desafios e por me ensinarem que é possível  
enxergar o melhor das pessoas, mesmo em seus piores momentos.

Alice: - Quanto tempo dura o eterno?

Coelho Branco: - Às vezes, apenas um segundo

Lewis Carroll

## RESUMO

Indivíduos com transtorno por uso de substâncias (TUS) apresentam indícios clínicos de envelhecimento precoce. Dentre os biomarcadores, o tamanho de telômero (TL) tem sido um dos mais utilizados para estudar envelhecimento. Além deste, o envolvimento do sistema imune e o aumento de citocinas inflamatórias são outros marcadores associados ao envelhecimento biológico. Diversos estudos mostram o envolvimento desses processos na neurodegeneração. O estudo de citocinas e de TL pode auxiliar na compreensão dos fatores relacionados ao desenvolvimento, gravidade e resposta ao tratamento do TUS. Esse tema será abordado nos artigos 1 e 2 que consistem em (1) revisão sistemática e meta-análise dos níveis de citocinas em pessoas com transtorno por uso de álcool (TUA) comparados com controles saudáveis (CS) e (2) num estudo clínico em que foi medido o tamanho de telômeros em pacientes com transtorno de uso de cocaína/crack (TUC). (3) Um terceiro estudo compõe essa tese- a avaliação do consumo de álcool durante a Pandemia COVID-19 na população em geral. O artigo 1 consistiu em uma revisão sistemática e metanálise de estudos transversais que comparavam níveis de marcadores inflamatórios em pessoas com o diagnóstico de transtorno de uso de álcool comparado com controles. Foram inclusos 18 artigos englobando 14 citocinas. Entre elas, apenas o TNF-alfa foi significativamente mais elevado no TUA (SMD=0.588; 95% CI 0.392-0.847;  $p < 0.001$ ). Para o artigo 2, foi realizado um estudo transversal em que o TL foi extraído do sangue periférico de 219 indivíduos com transtorno por uso de cocaína/crack (TUC) e comparado ao de 217 CS. Em ambos os grupos, a presença de trauma na infância e sua associação com o TL foi investigada. Correlações entre esse marcador e parâmetros de maior gravidade do TUC também foram avaliados. Encontramos telômeros significativamente mais curtos no TUC, mas apenas quando associado ao trauma na infância ( $p=0.018$ ). Porém, a presença de trauma foi significativamente maior em TUC do que em CS (57.1% vs 30%,  $p < 0.001$ ). Similarmente, não houve associação entre esse biomarcador e gravidade do TUC. Por fim, para o artigo 3 foi realizado um levantamento online entre pessoas que estavam em isolamento devido à pandemia de COVID-19. A associação entre o uso de álcool e a percepção de mudanças no seu consumo, com o perfil demográfico ou a presença de sintomas ansiosos e depressivos foi avaliada. Neste trabalho, encontramos que 68,5% da amostra consumia álcool, dentre os quais 22,7% haviam aumentado o consumo. Uso



de álcool foi associado à ansiedade (OR=1.40, 95% CI 1.06 – 1.85,  $p<0.01$ ) e à associação de sintomas ansiosos e depressivos (OR=1.38, 95% CI 1.02 – 1.87,  $p=0.033$ ). Concluindo, a presença de trauma, e não o TUC, esteve associado a telômeros mais curtos. Porém, a elevada prevalência de trauma nessa população é preocupante em razão de sua associação com envelhecimento precoce. Há poucos estudos avaliando a associação de citocinas com a gravidade do TUA e ainda não é possível identificar um perfil imunológico nessa população. Finalmente, a associação do consumo de álcool com sintomas psiquiátricos pode ter efeitos a longo prazo e deve ser monitorada cuidadosamente.

**Palavras-chave:** Álcool. Cocaína. Telômeros. Inflamação. Pandemia

## ABSTRACT

Individuals with substance use disorder (SUD) have clinical signs of premature aging. Telomere length (TL) has been one of most widely used biomarker to study aging. In addition, involvement of the immune system and increase in inflammatory cytokines are other markers associated with biological aging. Several studies show the involvement of these processes in neurodegeneration. Study of cytokines and TL can help to understand factors related to the development, severity and response to TUS treatment. This theme will be addressed in articles 1 and 2 which consist of (1) systematic review and meta-analysis of cytokine levels in people with alcohol use disorder (AUD) compared with healthy controls (HC) and (2) a clinical study in which TL of patients with cocaine / crack use disorder (CUD) was measured. (3) A third study composes this thesis, the assessment of alcohol consumption during the COVID-19 Pandemic in the general population. Article 1 consisted of a systematic review and meta-analysis of cross-sectional studies that compared levels of inflammatory markers in people with a diagnosis of AUD compared with controls. Eighteen articles were included, among them (including) 14 cytokines. From those, (Among them), only TNF-alpha was significantly higher in AUD (SMD = 0.588; 95% CI 0.392-0.847;  $p < 0.001$ ). For article 2, a cross-sectional study was carried out in which the TL was extracted from the peripheral blood of 219 individuals with CUD and compared to that of 217 CS. In both groups, the presence of trauma in childhood and its association with TL was investigated. Correlations between this marker and parameters of greater CUD severity were also evaluated. We found significantly shorter telomeres in CUD, but only when associated with childhood trauma ( $p = 0.018$ ). However, the presence of trauma was significantly higher in CUD than in CS (57.1% vs 30%,  $p < 0.001$ ). Similarly, there was no association between this biomarker and CUD severity. Finally, for article 3, an online survey was conducted among people who were in isolation due to the COVID-19 pandemic. The association between alcohol use, and the perception of changes in its consumption, with the demographic profile or the presence of anxious and depressive symptoms was evaluated. In this study, we found that 68.5% of the sample consumed alcohol, among which 22.7% had increased its consumption. Alcohol use was associated with anxiety (OR = 1.40, 95% CI 1.06 - 1.85,  $p < 0.01$ ) and the association of anxious and depressive symptoms (OR = 1.38, 95% CI 1.02 - 1.87,  $p = 0.033$ ). In conclusion, the presence of trauma, and not CUD, was associated with

shorter telomeres. However, the high prevalence of trauma in this population is worrisome because of its association with premature aging. There are few studies evaluating the association of cytokines with the severity of AUD and it has not yet been possible to identify an immunological profile in this population. Finally, the association of alcohol consumption with psychiatric symptoms can have long-term effects and must be carefully monitored.

**Keywords:** Alcohol. Cocaine. Telomere. Inflammation. Pandemic

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Neurobiologia do transtorno por uso de substância (TUS).....	20
Figura 2 - Biomarcadores conforme a progressão para TUS .....	21
Figura 3 - Senescência celular .....	23
Figura 4 - Marcos de envelhecimento .....	24
Figura 5 - Fatores de encurtamento e repatção de telômeros.....	28
Figura 6 - Marcos de envelhecimento cerebral .....	31
Figura 7 - Envelhecimento precoce no transtorno por uso de substâncias .....	33
Figura 8 - Associação entre estressores e envelhecimento saudável ou acelerado .	40

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Medidas de envelhecimento biológico .....	25
Tabela 2 - Algumas manifestações das síndromes teloméricas que coincidem com o fenótipo de doenças relacionadas à idade .....	29
Tabela 3 - Estudos sobre tamanho de telômeros em usuários de álcool .....	34
Tabela 4 - Estudos sobre tamanho de telômeros em usuários de cocaína/crack.....	36

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AVC – acidente vascular cerebral
- BDNF – do inglês - brain-derived neurotrophic fator
- CAT – catalase
- CDT – carboidrato deficiente de transferrina
- COF – córtex órbito-frontal medial
- CPF – córtex pré-frontal
- CPFdl – córtex pré-frontal dorsolateral
- CS – controles saudáveis
- DA – dopamina
- DALYS – disability-adjusted life years
- DNA – ácido desoxirribonucleico
- EO – estresse oxidativo
- GABA – ácido gama-aminobutírico
- GCA – girus cingulado anterior
- GGT – gama glutamil transferase
- IFN-gama – interferon gama
- IL – interleucina
- LTL – tamanhos de telômeros entre as células
- mLTL - média dos telômeros de leucócitos
- NAc – núcleo accumbens
- NGF – *nerve growth factor*
- OMS – Organização Mundial da Saúde
- PBMCs - células mononucleares do sangue periférico
- PCR – polimerase em cadeia
- RNA – ácido ribonucleico
- S – beta-hemoglobina
- SPA – substância psicoativa
- SASP – *senescence-associated secretory phenotype*
- T – leucócito
- TBARS – ácido tiobarbitúrico, do inglês *Thyobarbituric Acid Reactive Species*
- TERC – *telomerase RNA component*
- TEPT – transtorno de estresse pós-traumático

TERT – *telomerase reverse transcriptase*

TL – tamanho de telômero

TNF-alfa – fator alfa de necrose tumoral

TR – RNA telomerase

TUA – transtorno por uso de álcool

TUC – transtorno por uso de cocaína/crack

TUS – transtorno por uso de substância

VCM – volume corpuscular médio

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2 DESENVOLVIMENTO</b> .....	<b>17</b>
2.1 EPIDEMIOLOGIA .....	17
<b>2.1.1 Álcool</b> .....	<b>17</b>
<b>2.1.2 Cocaína/crack</b> .....	<b>17</b>
2.2 DESENVOLVIMENTO E PROGRESSÃO DO TUS .....	17
2.3 ENVELHECIMENTO PRECOCE .....	21
<b>2.3.1 Envelhecimento cronológico versus biológico</b> .....	<b>22</b>
<b>2.3.2 Marcadores de envelhecimento biológico</b> .....	<b>24</b>
2.4 FATORES DE RISCO E PROTEÇÃO PARA ENVELHECIMENTO PRECOCE .....	26
<b>2.4.1 Fatores Biológicos:</b> .....	<b>26</b>
<b>2.4.2 Fatores Ambientais:</b> .....	<b>39</b>
<b>2.4.3 Trauma na infância, transtornos psiquiátricos e telômeros</b> .....	<b>41</b>
2.5 A PANDEMIA DE COVID-19 .....	43
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>46</b>
<b>4 ASPECTOS ÉTICOS</b> .....	<b>47</b>
4.1 ARTIGO 1 .....	47
4.2 ARTIGO 2 .....	47
4.3 ARTIGO 3 .....	47
<b>5 ARTIGO 1</b> .....	<b>48</b>
<b>6 ARTIGO 2</b> .....	<b>79</b>
<b>7 ARTIGO 3</b> .....	<b>96</b>
<b>8 RESULTADOS COMPLEMENTARES</b> .....	<b>110</b>
<b>9 CONCLUSÃO</b> .....	<b>116</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>120</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>129</b>
COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DE ARTIGO CIENTÍFICO .....	131



## 1 INTRODUÇÃO

O consumo de álcool ou drogas contribui de forma expressiva para a carga global de doenças <sup>1</sup>. Dentre os transtornos por uso de substâncias (TUS), os relacionados ao álcool são os mais prevalentes no mundo todo, correspondendo a 100,4 milhões de casos em 2016 <sup>1</sup>. Em relação às drogas ilícitas, são consumidas por 5,5% da população mundial adulta, o que representa 271 milhões de pessoas. Destes, 13%, ou 35 milhões, desenvolvem dependência <sup>2</sup>. Além de gerar graves problemas psicológicos e sociais, os TUS também estão associados a complicações clínicas. De acordo com um estudo epidemiológico realizado pelo Global Burden of Disease, 4,2% e 1,3% dos anos de vida perdidos ajustados por incapacidade, (ou DALYS, do inglês disability-adjusted life years) foram atribuídos ao álcool ou drogas ilícitas, respectivamente, como fator de risco <sup>1</sup>.

Esses dados sofrem grandes variações geográficas <sup>1</sup>. No Brasil, o álcool, dentre as substâncias lícitas e a cocaína/crack, dentre as ilícitas, são atualmente as mais associadas a complicações e necessidade de tratamento. Tais demandas geram sobrecarga e aumento dos custos para o sistema de saúde <sup>3</sup>.

Apesar do uso de substâncias psicoativas (SPA) ser relatado há milhares de anos <sup>4</sup>, a busca pela compreensão das bases biológicas dos TUS, as quais podem ampliar as possibilidades preventivas e terapêuticas <sup>5</sup>, ainda é relativamente recente <sup>6</sup>. Enquanto isso, hipóteses morais, religiosas ou estritamente sociais ainda persistem, perpetuando o estigma e prejudicando tanto a avaliação como a assistência aos indivíduos que sofrem com o transtorno <sup>2</sup>.

Nesse sentido, é importante destacar que indivíduos com TUS apresentam risco maior para o desenvolvimento precoce de doenças relacionadas à idade. Câncer e declínio cognitivo, por exemplo, estão comumente associadas ao consumo de SPA, sugerindo que seus usuários possam ter um envelhecimento biológico mais acelerado <sup>7</sup>.

O envelhecimento se caracteriza pelo surgimento de alterações patofisiológicas que comprometem o funcionamento do organismo <sup>8</sup>. É considerado precoce quando a idade biológica ultrapassa a idade cronológica, resultando em um fenótipo que seria esperado para pessoas mais velhas <sup>8</sup>. O encurtamento de telômeros, porção final dos cromossomos responsável pela estabilidade do DNA, é um dos principais marcadores

desse processo <sup>8,9</sup>. Indivíduos com telômeros mais curtos apresentam maior morbimortalidade quando comparados a indivíduos com telômeros mais longos de mesma idade <sup>9</sup>.

As alterações envolvidas no envelhecimento biológico acelerado também podem estar associadas ao desenvolvimento, gravidade e resposta ao tratamento do TUS. Até o momento, alterações da resposta ao estresse, fatores neurotróficos, inflamatórios e de estresse oxidativo, todos componentes do envelhecimento, foram associados à maior gravidade de sintomas e ao curso do uso de SPA <sup>10-13</sup>. Entretanto, os fatores associados à morbimortalidade precoce entre usuários de SPA ainda não estão bem esclarecidos.

Indivíduos com TUS apresentam considerável heterogeneidade de apresentações clínicas, curso e resposta ao tratamento. Tais variações podem ocorrer em razão das diferentes características farmacológicas de cada SPA, mas também por diferenças ambientais (exposição a trauma na infância, por exemplo) e biológicas <sup>14</sup>. Dessa forma, assim como em outros transtornos psiquiátricos <sup>15,16</sup>, é possível que diferentes biomarcadores estejam associados a diferentes características do TUS.

Por fim, os problemas relacionados ao uso de substâncias são influenciados por características individuais, mas também sociais. A epidemia de COVID-19 gerou uma crise global que interferiu no estilo de vida da população, sua saúde mental e financeira <sup>17,18</sup>. Com isso, veio também a oportunidade de estudar o impacto e as relações entre essas características e o consumo de álcool.

## **2 DESENVOLVIMENTO**

### **2.1 EPIDEMIOLOGIA**

#### **2.1.1 Álcool**

O consumo de álcool é responsável por 5,1% da carga global de doenças e lesões (DALYS) <sup>19</sup>. No Brasil, cerca de 50% da população ingere bebidas alcoólicas e destes, 17% apresenta algum transtorno por uso de álcool <sup>20</sup>. A idade média de primeiro consumo é de 12,5 anos no Brasil, sendo que 11,7% dos adolescentes faz uso frequente de bebidas alcoólicas e 6,7%, uso pesado <sup>21</sup>. A iniciação precoce tem sido associada a maior risco de desenvolver transtorno por uso de álcool ou outras substâncias <sup>22</sup>.

#### **2.1.2 Cocaína/crack**

Dentre as SPA ilícitas, a cocaína inalada é a segunda droga mais utilizada no Brasil. Dentre a população adulta, 3,8% referiu uso ao longo da vida e 1,7%, no último ano <sup>23</sup>. O crack, cocaína na forma fumada, teve seu uso na vida relatado por 1,3% dos adultos, sendo 0,7% no último ano <sup>23</sup>. Entre os adolescentes, 2% referiram o uso na vida de cocaína e 0,7%, de crack <sup>24</sup>. O desenvolvimento de dependência ocorre em 41,4% dos usuários <sup>3</sup>.

### **2.2 DESENVOLVIMENTO E PROGRESSÃO DO TUS**

O processo entre a experimentação e o desenvolvimento do TUS engloba aspectos psicossociais, ambientais e biológicos que se inter-relacionam para a predisposição, facilitação e manutenção do consumo <sup>14</sup>. Dentre os biológicos, destacamos a genética e epigenética, assim como a presença de comorbidade psiquiátrica ou traços de personalidade que envolvam maior impulsividade e baixa percepção de risco. Dentre os fatores ambientais e comportamentais, temos os aspectos culturais, história de trauma na infância e estilo parental <sup>14</sup>. Entretanto, enquanto os aspectos ambientais podem ser acessados através de escalas validadas

ou história clínica, os aspectos biológicos não são tão facilmente observados. Em razão da interação entre esses fatores de risco, influenciar quem vai ou não evoluir da experimentação para o TUS, a identificação de biomarcadores que possam auxiliar no diagnóstico ou intervenção precoce torna-se essencial.

Nesse sentido, alguns modelos têm sido propostos. De acordo com Koob e Volkow (2010), as alterações neurobiológicas do TUS se desenvolvem em três estágios: intoxicação / *binge* (incentivo ao uso de substâncias impulsionado por reforço positivo, isto é, prazer); afeto negativo / síndrome de abstinência (déficits no sistema de recompensa e aumento do estresse, que leva a uso de drogas para aliviar afetos negativos e outros sintomas de desconforto); e, preocupação / antecipação (déficit na função executiva geralmente levando a comportamento impulsivo)<sup>6</sup>. Cada estágio envolve diferentes regiões do cérebro e diferentes respostas neuroimunoendócrinas (Figura 1), para as quais um ou mais biomarcadores podem se alterar e formar uma assinatura característica que pode ajudar tanto no diagnóstico, como no desenvolvimento de terapias mais efetivas<sup>6,13</sup>.

O modelo de Koob também sugere que possa haver diferenças importantes entre indivíduos e em um mesmo indivíduo com TUS. Em outras palavras, uma pessoa pode ter elevados níveis de um determinado biomarcador durante a síndrome de abstinência aguda, mas não após alguns meses de abstinência da SPA. Como em uma população com TUS podemos encontrar pessoas em ambas essas fases, é importante identificar o momento do último consumo. Da mesma forma, avaliar a gravidade do transtorno e os padrões de consumo da SPA (como consumo excessivo ou não, idade no primeiro uso, anos desde o uso problemático) também são essenciais para a melhor compreensão dos processos biológicos envolvidos na progressão do TUS.

Ao longo do curso de um transtorno podem surgir alterações cerebrais que se traduzem clinicamente através de déficit cognitivo, gravidade dos sintomas e resposta ao tratamento. Esse processo foi denominado neuroprogressão<sup>25</sup> ou apenas progressão, já que mais recentemente se observou que o comprometimento também pode ser sistêmico. A neuroprogressão tem sido descrita para outros transtornos psiquiátricos graves, como esquizofrenia e transtorno bipolar<sup>15,16</sup>, e também tem sido proposta para os TUS<sup>26</sup>. O modelo neurobiológico proposto por Koob e Volkow (2010), apresentado acima, já descreve algumas alterações sugestivas de neurodegeneração<sup>6</sup>.

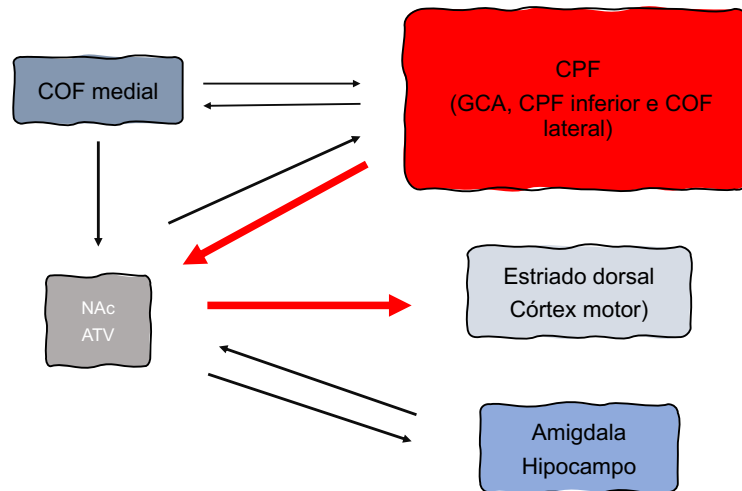
A base neurobiológica da neuroprogressão envolve alterações nos sistemas dopaminérgico e glutamatérgico, redução na expressão de fatores neurotróficos, aumento no estresse oxidativo e resposta imunológica, além da falha em mecanismos compensatórios <sup>25,26</sup>. Para cada uma dessas alterações, diferentes biomarcadores podem ser mensurados periféricamente e apresentam associação com alterações cerebrais, ou seja, déficit cognitivo e atrofia de algumas regiões do cérebro <sup>15,27</sup>.

As alterações clínicas e biológicas vão se tornando mais exacerbadas à medida que o transtorno progride, aumentando a vulnerabilidade ao estresse e o uso ou recaída no uso de substâncias. Este círculo vicioso intensifica ainda mais os mecanismos de neuroprogressão <sup>26</sup>.

Os mecanismos de neuroplasticidade também diminuem com a idade <sup>28</sup>. Níveis reduzidos de neurotrofinas em indivíduos mais velhos podem refletir perda sináptica e se traduzir por menor capacidade de recuperação após eventos estressores, incluindo o consumo de substâncias <sup>28</sup>.

Diante da heterogeneidade entre os usuários de substâncias, é possível que um conjunto de biomarcadores, e não um marcador isoladamente, possa caracterizar o TUS e auxiliar no prognóstico e tratamento. Até o momento, foi possível identificar variações de BDNF (marcador de neuroplasticidade) e TBARS (estresse oxidativo) de acordo com a gravidade do uso de álcool ou crack e conforme os dias de abstinência <sup>10,11,29</sup> (figura 2).

### A – Cérebro sem dependência de drogas



### B – Cérebro com dependência de drogas

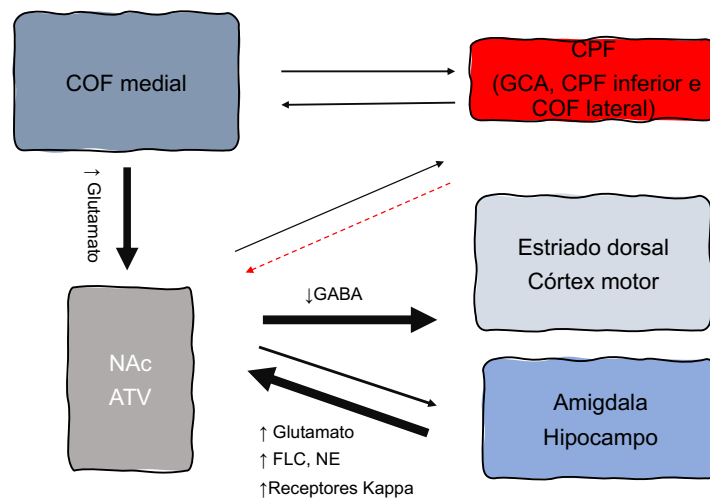


Figura 1 - Neurobiologia do transtorno por uso de substância (TUS)

(A) Controle inibitório mais intenso da função executiva (CPF) sobre o circuito de recompensa (NAc e ATV) e deste sobre o circuito de motivação (estriado dorsal e córtex motor). O sistema de memória e condicionamento (amígdala, COF, hipocampo e estriado dorsal) age tenuamente sobre o sistema de recompensa.

(B) Perda do controle inibitório pelo CPF, aumento da influência do COF medial (saliência da droga) sobre o sistema de recompensa, aumento da memória e condicionamento sobre o sistema de recompensa e deste sobre o circuito de motivação.

CPF, córtex pré-frontal; COF, córtex orbito-frontal; GCA, giro cingulado anterior; NAc, núcleo acumbens; ATV, área tegmentar ventral; FLC, fator liberador de corticotrofina, NE, norepinefrina. Adaptado de Volkow (2010).

Além disso, é importante destacar que as variações e o potencial dependógeno podem ocorrer não apenas com os anos de uso da SPA, mas também conforme o padrão de uso. Mais especificamente, uso agudo ou crônico; em *binge* (consumo de grandes quantidades em curto período de tempo) ou não; se a pessoa está em intoxicação ou síndrome de abstinência; quantidade de eventos de desintoxicação; assim como, se o último uso ocorreu recentemente ou após um tempo prolongado<sup>30-32</sup>. Entretanto, todos esses parâmetros podem variar conforme a SPA e suas definições variam conforme o estudo, dificultando comparações.

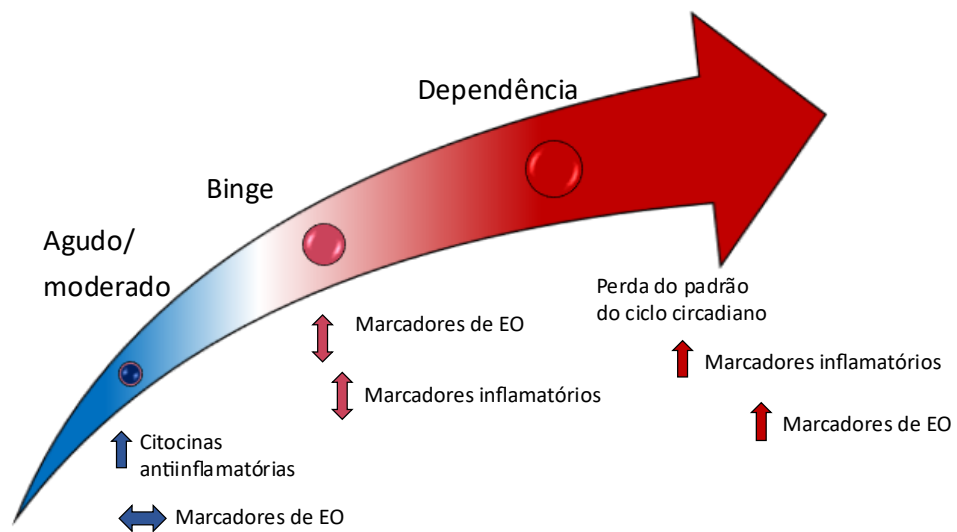


Figura 2 - Biomarcadores conforme a progressão para TUS

EO – estresse oxidativo; BDNF - do inglês - brain-derived neurotrophic factor. ↓ = redução; ↑ = aumento; ↓↑ = aumento transitório; ↔ = inalterado

Fonte: Crews (2017); Milivojevic (2018); Sordi (2020)

### 2.3 ENVELHECIMENTO PRECOCE

Usuários de SPA apresentam indícios de envelhecimento precoce<sup>7,33,34</sup>. As taxas de mortalidade entre estes indivíduos são maiores quando comparados à

população geral e eles apresentam problemas de saúde semelhantes aos encontrados em populações mais idosas, como declínio cognitivo e deficiência imunológica <sup>7,35-38</sup>. No entanto, ainda existem poucos estudos sobre a relação entre TUS e processos ligados ao envelhecimento biológico precoce e se essa associação estaria relacionada à maior gravidade do transtorno.

### **2.3.1 Envelhecimento cronológico versus biológico**

O envelhecimento se caracteriza pela perda progressiva da integridade fisiológica, levando à perda de função de tecidos e órgãos, desenvolvimento de doenças e maior vulnerabilidade para a morte. Essas doenças, conhecidas como doenças relacionadas à idade, incluem o câncer, aterosclerose, demências e diabetes tipo 2, dentre outras <sup>8</sup>.

O envelhecimento cronológico pode ser medido pela passagem dos anos. Já o envelhecimento biológico corresponde a processos fisiológicos no organismo e é considerado um parâmetro mais fidedigno para o risco de doenças e maior mortalidade. O “envelhecimento biológico precoce” ocorre quando o envelhecimento biológico ultrapassa o cronológico <sup>8</sup>.

Além do surgimento de doenças relacionadas à idade, o envelhecimento também possui outros fenótipos mensuráveis (Tabela 1). Alguns autores propõem que o conjunto de marcadores para idade biológica seja melhor preditor de morbimortalidade que avaliações individuais <sup>39,40</sup>.



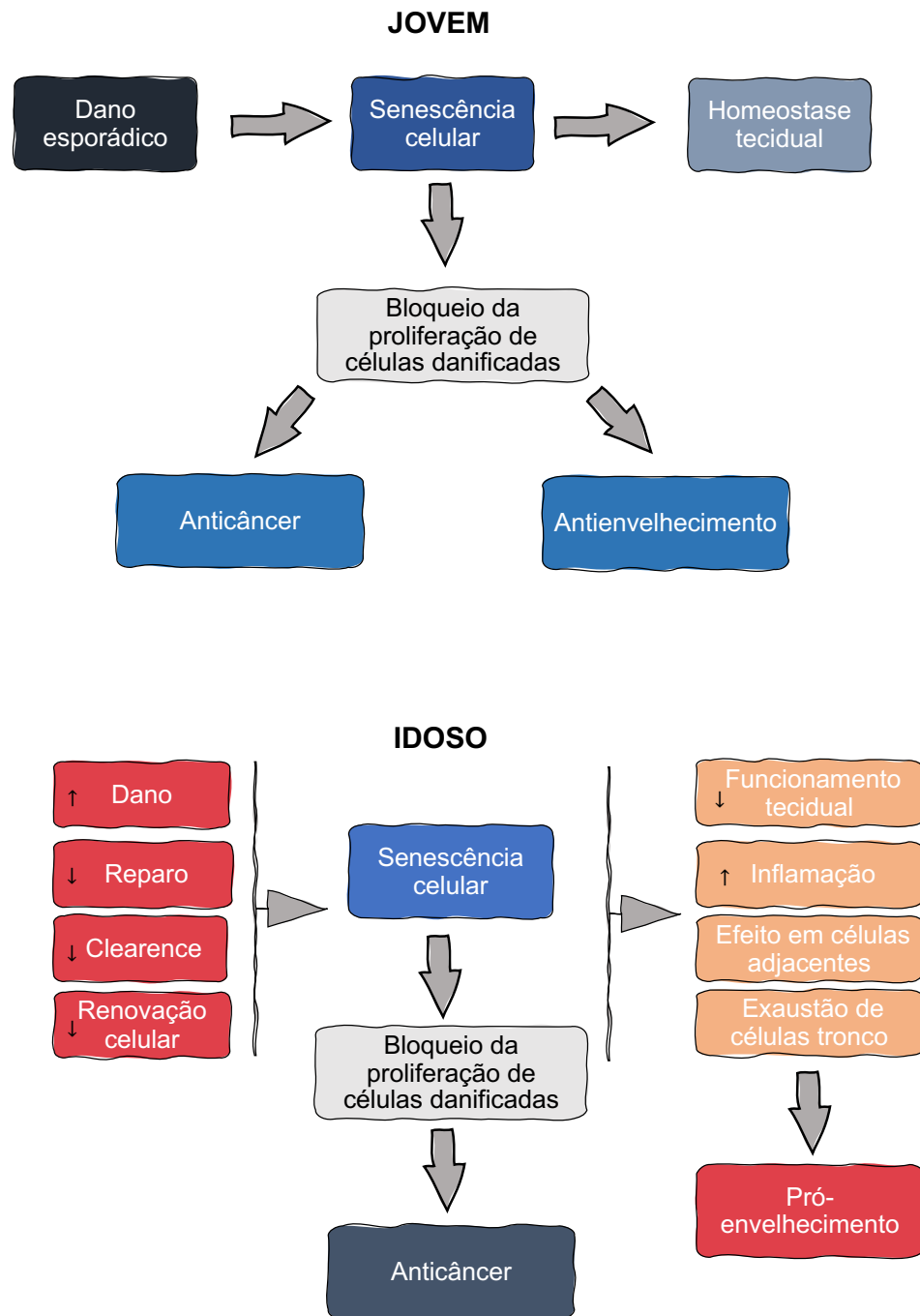


Figura 3 - Senescência celular

Em pessoas mais jovens, a senescência celular previne a proliferação de células danificadas. Nos mais velhos, esse mecanismo fica prejudicado pelo aumento dos danos e deficiência no clearance das células danificadas, resultando em alterações que favorecem o envelhecimento.

Adaptado de López-Otín (2013)

### 2.3.2 Marcadores de envelhecimento biológico

#### a) Envelhecimento celular:

Há múltiplos processos celulares envolvidos no envelhecimento biológico (Figura 4), os quais interagem entre si e se retroalimentam<sup>8</sup>. Dentre estes, destaca-se a medida dos telômeros e o aumento de sinais inflamatórios, objetos de estudo do presente trabalho. O encurtamento telomérico é, por exemplo, responsável pela senescência celular. Este processo se caracteriza por um quadro estável e prolongado de acúmulo de células danificadas e sem capacidade proliferativa, mas que preservam o metabolismo celular, gerando um fenótipo secretor alterado (SASP, do inglês senescence-associated secretory phenotype). O SASP, por sua vez, contribui para o aumento da resposta inflamatória<sup>41</sup>.

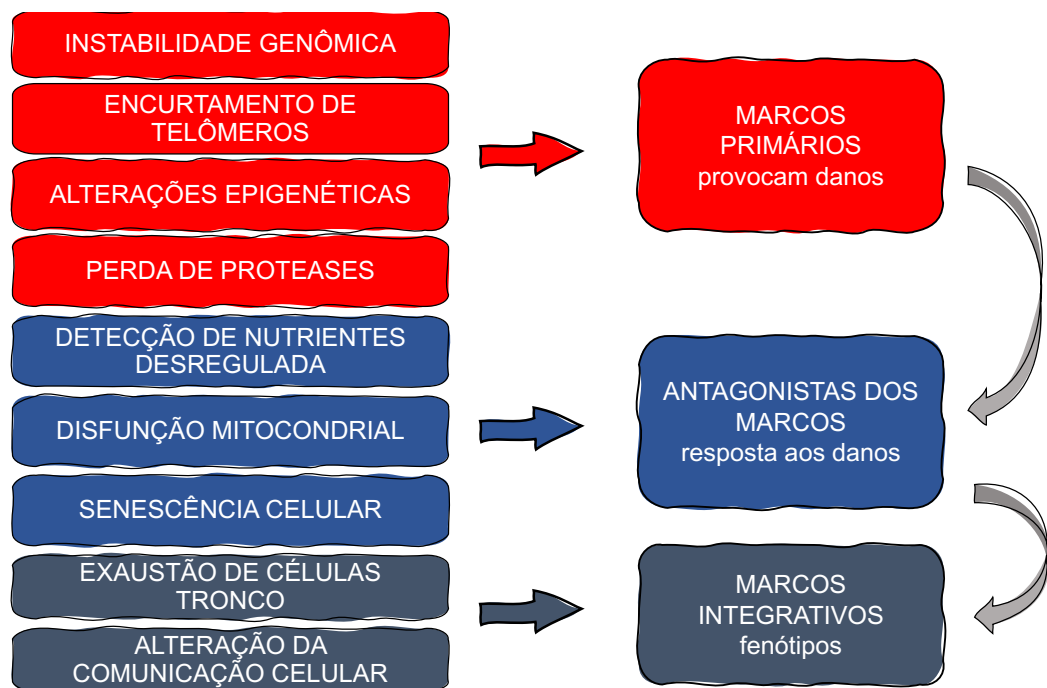


Figura 4 - Marcos de envelhecimento

Marcos de envelhecimento divididos em três grupos. Em vermelho, os as causas primárias do processo de envelhecimento celular. Em azul, as respostas compensatórias desencadeadas pelos hallmarks primários. Inicialmente, têm função reparadora. Porém, se crônicas ou intensas, também se tornam deletérias. Em cinza, os processos gerados pelos dois grupos acima e que originam o fenótipo do envelhecimento ou declínio funcional associado à idade.

Adaptado de López-Otín (2013)

**b) Envelhecimento multissistêmico:**

O processo de envelhecimento envolve um conjunto de alterações (Tabela 1), para as quais biomarcadores ou fenótipos específicos podem surgir. A associação desses marcadores pode gerar uma medida composta e refletir o dano acumulado entre os sistemas de regulação (carga alostática), assim como o ritmo de envelhecimento <sup>8,40,42</sup>.

**c) Velocidade de recuperação:**

Passou a ser estudado mais recentemente, refletindo a resiliência ao estresse e capacidade latente de homeostase de um organismo. Tende a diminuir com a idade, sendo, portanto, um importante marcador de envelhecimento <sup>42</sup>.

Tabela 1 - Medidas de envelhecimento biológico

<b>ENVELHECIMENTO BIOLÓGICO</b>	<b>COMPONENTES</b>
<b>Envelhecimento Celular</b>	
Tamanho de telômeros	Medida de telômeros dos leucócitos
Idade do DNA	Níveis de metilação do DNA de leucócitos
<b>Idade Fisiológica</b>	Resistência à insulina Diminuição de massa magra Aumento da massa gorda
<b>Função cognitiva</b>	Fluência verbal, habilidade visuoespacial, memória
<b>Índice de Idade Funcional</b>	Sensorial (visão e audição), força de preensão manual, equilíbrio corporal, velocidade da caminhada
<b>Índice de Fragilidade</b>	Vulnerabilidade para desfechos desfavoráveis relacionados à idade, como prejuízo funcional, doenças associadas ao envelhecimento, dentre outros

Adaptado de: Li et al. (2020)

## 2.4 FATORES DE RISCO E PROTEÇÃO PARA ENVELHECIMENTO PRECOCE

### 2.4.1 Fatores Biológicos:

#### a) Telômeros:

O encurtamento de telômeros tem grande relevância no estudo do envelhecimento e é considerado um dos biomarcadores mais importantes desse processo. Os telômeros são estruturas posicionadas nos extremos do DNA e têm a função de proteger sua integridade. A cada mitose, parte do DNA não pode ser completamente replicada, gerando um encurtamento progressivo dessa região. Esse processo, que ficou conhecido como senescência de replicação ou limite de Hayflick, limita a capacidade proliferativa das células, levando à senescência e apoptose <sup>8,9</sup>.

#### a.1) Medida dos telômeros

Os telômeros medem, em média, 10-15kb no momento do nascimento. Nos primeiros anos de vida, a taxa de redução é mais acelerada (>1kb/ano), reduzindo para 20-60bp/ano durante a vida adulta <sup>41</sup>. O tamanho mínimo para a preservação do DNA é de 3,85kb <sup>9</sup>.

A heritabilidade do tamanho do telômero é de 30 a 80% <sup>9</sup>. Além da genética, os telômeros podem ser transmitidos diretamente através dos gametas e há grande variabilidade entre indivíduos <sup>9,43</sup>.

O ponto de corte para se considerar um encurtamento como patológico pode ser definido pela comparação da população geral com casos de síndrome telomérica herdada, mas não para casos adquiridos <sup>44</sup>. As síndromes teloméricas herdadas são, em geral, autossômicas dominantes e comprometem os sistemas de reparação dos telômeros, gerando um encurtamento precoce e mais acentuado <sup>9,44</sup>. Porém, o encurtamento em casos de alterações adquiridas, ainda que a diferença seja estatisticamente significativa em comparação aos controles saudáveis, não é amplo o suficiente para determinar parâmetros de referência <sup>44</sup>.

Cada cromossomo apresenta 2 pares de telômeros, totalizando 92 unidades por célula e uma mesma célula pode ter tamanhos diferentes de telômeros. Entre tecidos, também há variações conforme a necessidade proliferativa do órgão (Tabela 2). Dessa forma, um mesmo indivíduo pode ter telômeros de tamanhos diferentes num

mesmo período de tempo <sup>9</sup>. Entretanto, a correlação entre encurtamento e idade se mantém estável ao longo da vida <sup>45</sup>. Além disso, as variações são maiores entre indivíduos do que entre células de uma mesma pessoa <sup>45</sup>.

É importante destacar que um único telômero mais curto já pode ser suficiente para a senescência de uma célula <sup>45</sup>. Ademais, os tecidos podem conter graus diferentes de envelhecimento celular e, propõe-se que a percentagem de telômeros mais curtos seja um preditor de expectativa de vida <sup>45</sup>. Assim, novos métodos de medição têm sido estudados, como a avaliação da média dos telômeros de leucócitos (mLTL) e da distribuição dos tamanhos de telômeros entre as células (LTLD) <sup>45</sup>.

No momento, o método mais frequentemente utilizado tem sido o desenvolvido por Cawton (2002). Nele, os telômeros são medidos a partir de leucócitos ou células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), as quais representam as medidas de outras células somáticas. O DNA é extraído dos leucócitos e analisado pela técnica de reação de polimerase em cadeia (PCR). A sequência de uma cadeia do DNA do leucócito (T) é comparada com a cópia de um gene de referência da beta-hemoglobina (S). A partir daí, tem-se o tamanho relativo do telômero que é apresentado através da taxa T/S <sup>46</sup>.

## **a.2) Fatores de reparação**

O encurtamento dos telômeros sofre reparação da enzima telomerase, cujo papel é essencial na estabilidade cromossômica de células altamente proliferativas, como as germinativas ou tumorais <sup>9,41</sup>. Duas unidades essenciais compõem a telomerase: a transcrição reversa da telomerase (TERT) e a RNA telomerase (TR). Através delas, novas repetições de DNA são adicionadas aos telômeros após cada divisão celular. Entretanto, apenas uma parte dos telômeros é alongada o que gera o encurtamento ao longo dos anos <sup>44</sup>. Em células saudáveis, esta enzima tem baixa atividade e o oposto ocorre em resposta aos estressores. Níveis elevados de telomerase já foram encontrados em indivíduos com depressão, o que pode explicar porque estudos prospectivos encontraram uma associação mais fraca entre o transtorno de humor e telômeros mais curtos <sup>47</sup>.

O tamanho também é preservado por proteínas de proteção dos telômeros <sup>9,41</sup>. Alterações nesses sistemas de reparo podem ter origem genética e constituem os mecanismos biológicos de maior vulnerabilidade para o encurtamento telomérico <sup>28,44</sup>.

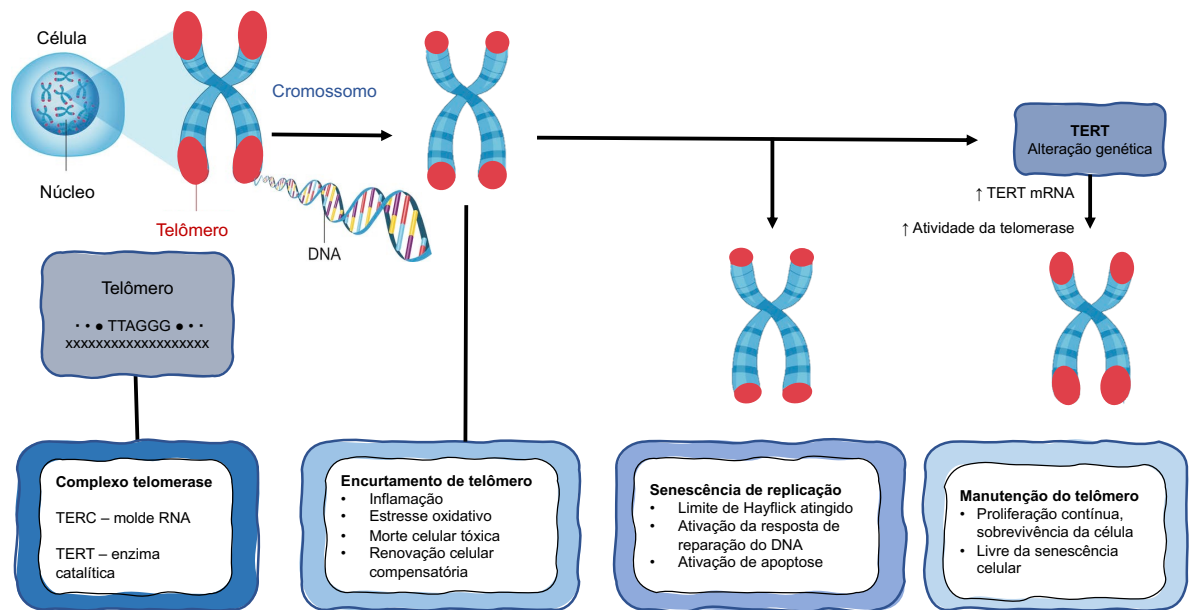


Figura 5 - Fatores de encurtamento e repatração de telômeros

TERT = transcrição reversa da telomerase; TERC = Telomerase RNA component

Adaptado de: Nault et al. (2019)

### a.3) Encurtamento dos telômeros e morbimortalidade

O encurtamento de telômeros tem sido relacionado ao surgimento de várias doenças relacionadas à idade <sup>8,9,44</sup>. Diabetes, hipertensão arterial, câncer, deficiência imunológica e comprometimento cognitivo são alguns exemplos. A comorbidade com uma ou mais dessas doenças, apesar de não relacionadas entre si, ocorre com frequência maior que a esperada para o acaso, sugerindo que os telômeros possam atuar como fator em comum <sup>9</sup>.

Mutações genéticas que provocam encurtamento mais precoce dos telômeros estão associadas às doenças degenerativas e à predisposição ao câncer e sugerem uma relação de causalidade. Cânceres hematológicos, fibrose pulmonar, alterações gastrointestinais, cirrose hepática e transtornos neuropsiquiátricos estão entre os mais relatados <sup>9,44</sup>. Em outros casos, a causalidade depende da interação com outros fatores. Por exemplo, disfunção de telômeros pode gerar o desenvolvimento de enfisema pulmonar, mas apenas se o indivíduo for tabagista <sup>9,44</sup>.

Tabela 2 - Algumas manifestações das síndromes teloméricas que coincidem com o fenótipo de doenças relacionadas à idade

<b>Compartimentos de alta renovação celular</b>	<b>Compartimentos de baixa renovação celular</b>
Cabelos cinzas	Fibrose pulmonar idiopática
Calvície	Enfisema
Sulcos/estrias ungueais	Fibrose ou cirrose hepática
Doenças periodontais	Intolerância à glicose
Trombocitopenia	Deficiência na secreção de insulina
Imunosenescência	Osteoporose
Aumento do risco para câncer	

Adaptado de: Armanios, 2013

Além disso, alguns estudos têm sugerido uma relação entre telômeros mais curtos e diminuição de anos de vida saudável e mortalidade prematura <sup>9,48</sup>. Uma coorte mostrou que o encurtamento ao longo de um período relativamente curto (2,5 anos) esteve associado a maior risco de mortalidade por doenças cardiovasculares nos 12 anos seguintes <sup>48</sup>. Em uma ampla amostra populacional dinamarquesa (n=64.673) indivíduos com telômeros mais curtos tiveram uma chance de mortalidade por todas as causas ou por câncer 1,4 vezes maior do que aqueles com telômeros mais longos <sup>49</sup>.

Telômeros curtos também podem ter efeito protetor contra alguns tipos de malignidade, enquanto o oposto pode ocorrer para telômeros mais longos. Uma meta-análise encontrou telômeros significativamente mais curtos, em comparação a controles saudáveis, para cânceres gastrointestinais e de cabeça e pescoço, mas não em outros tipos de câncer. Aqueles com câncer de pulmão, porém, tiveram telômeros significativamente maiores em relação aos controles saudáveis em estudos prospectivos, mas não em estudos transversais <sup>50</sup>. Portanto, a associação do tamanho dos telômeros ao risco de câncer depende de aspectos histopatológicos do mesmo <sup>9</sup>. Mais especificamente, telômeros mais curtos podem favorecer malignidades decorrentes de instabilidade cromossômica, enquanto telômeros mais longos seriam um fator de proteção. Da mesma forma, telômeros mais alongados favoreceriam malignidades de origem mais proliferativa, contra as quais telômeros encurtados protegeriam <sup>9,50</sup>.

#### **a.4) Fatores de variabilidade**

A idade cronológica é responsável por apenas 10% da variação dos telômeros. A outra parte é determinada por fatores ambientais e de estilo de vida, assim como da interação entre fatores genéticos e ambientais <sup>9</sup>.

Um grande estudo epidemiológico, com mais de 100 mil indivíduos, encontrou variações de tamanho conforme o sexo e idade. Homens e mulheres têm medidas semelhantes até os 50 anos, quando os telômeros delas passam a ser significativamente maiores que os deles <sup>43</sup>. A partir dessa idade, a diminuição do tamanho dos telômeros continua a ocorrer apenas entre os homens. Em ambos os sexos, observou-se que as medidas em indivíduos com 80 a 90 anos são significativamente maiores que daqueles abaixo dessa faixa etária <sup>43</sup>. É provável que essa reversão da curva ocorra porque aqueles que ultrapassaram os 80 anos, faixa etária de elevada mortalidade, já apresentavam telômeros maiores (seleção de sobreviventes). Também é possível que seja uma coorte menos exposta a fatores de risco para encurtamento de telômeros em comparação às gerações mais novas <sup>43,51</sup>.

O encurtamento de telômeros sofre influência de processos inflamatórios, estresse oxidativo e exposição crônica a hormônios de estresse. Esses fatores seriam os responsáveis pelo dano em células que não passam por replicação, como os neurônios. Fatores ambientais também têm sido associados, como trauma na infância, tabagismo, sono inadequado, sedentarismo, alimentação, baixa condição sócio-econômica e baixa escolaridade <sup>9,52</sup>.

Diante da exposição a alguns desses fatores de encurtamento, os telômeros também podem sofrer ações reparadoras. Algumas medicações psiquiátricas, como lítio, antipsicóticos de segunda geração e inibidores seletivos da receptação de serotonina já foram implicadas nessa função. A prática de exercício físico, dieta adequada e meditação também teriam potencial reparador <sup>53-56</sup>.

Portanto, o tamanho dos telômeros sofre modificações constantes e depende do equilíbrio entre fatores de encurtamento e reparação. Tal dinamicidade pode explicar a heterogeneidade de achados, visto que, nem todos os estudos conseguiram replicar a associação de telômeros mais curtos com doenças relacionadas à idade. Nesse sentido, destaca-se que a observação do efeito de determinado fator pode depender do intervalo de tempo entre o evento e a medição do telômero <sup>47</sup>. Outro desafio para a avaliação da idade biológica seria a variação de tamanho entre



diferentes tecidos. Estudos em animais demonstraram que o encurtamento de telômeros em apenas parte das células já foi suficiente para desencadear o processo de envelhecimento, sugerindo que a idade seria determinada pelo telômero mais curto, ao invés da média de tamanhos daquele organismo <sup>41</sup>.

### a.5) Telômeros e o cérebro

Estudos de neuroimagem vem demonstrando a associação entre encurtamento de telômeros, medido periféricamente, e o envelhecimento cerebral <sup>57,58</sup>. Ainda assim, o seu papel como biomarcador de transtornos mentais ainda não está bem esclarecido <sup>28</sup> (figura 5). Devido aos neurônios serem células pós-mitóticas, seus telômeros não diminuem naturalmente, mas podem ser encurtados diante de estresse oxidativo e inflamação crônica <sup>28,41</sup>. O encurtamento dos telômeros também pode ocorrer durante o processo de diferenciação de células-tronco, tornando os neurônios recém formados mais vulneráveis à apoptose <sup>28</sup>.

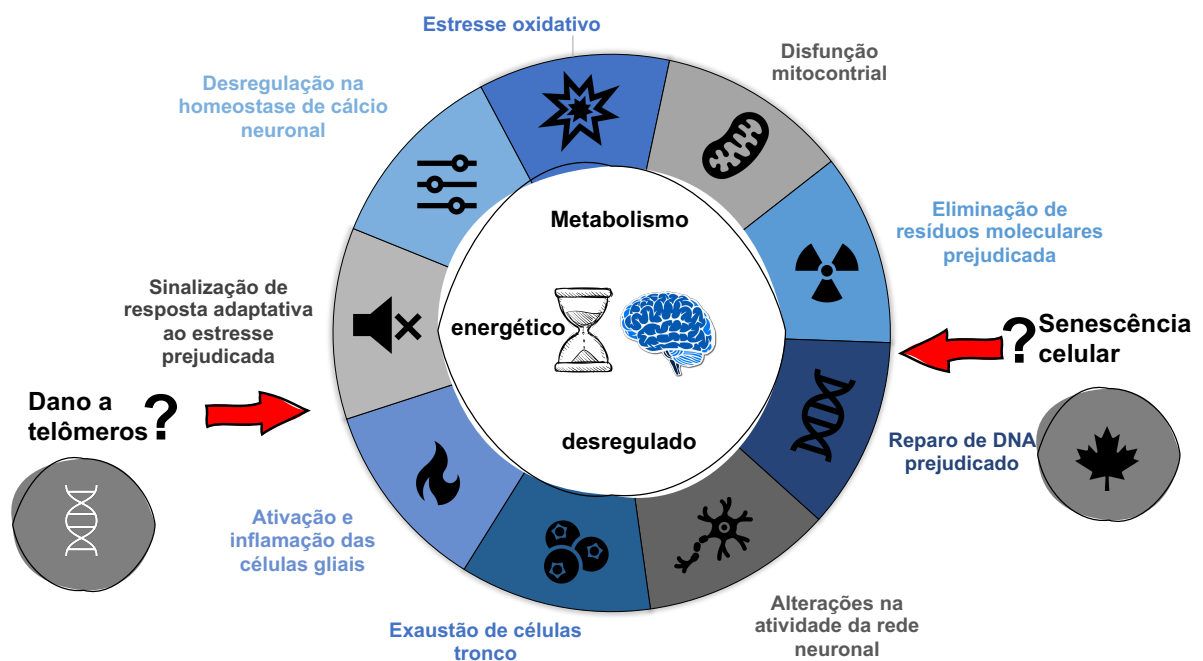


Figura 6 - Marcos de envelhecimento cerebral

Adaptado de Mattson e Arumugam (2018)

### **a.6) Telômeros e transtornos psiquiátricos**

Nos últimos anos, as evidências a respeito da relação entre transtornos psiquiátricos e envelhecimento precoce têm aumentado<sup>56,59-62</sup>. Existe uma associação entre transtornos de humor, ansiedade, esquizofrenia e estresse pós-traumático e algumas doenças relacionadas à idade, como diabetes tipo 2, obesidade, doenças cardíco-vasculares, osteoporose, demência e acidente vascular cerebral. Além disso, apresentam risco aumentado para mortalidade precoce por causas naturais.

Indivíduos com transtornos mentais graves apresentam comportamentos que são fatores de risco para complicações clínicas, como maior prevalência de tabagismo, sedentarismo e má alimentação. Entretanto, a associação com elevada morbimortalidade se mantém mesmo após controlar para estes fatores<sup>56</sup>. Alterações biológicas responsáveis pelo envelhecimento celular também ocorrem com frequência em diferentes transtornos psiquiátricos<sup>56</sup>. Essas incluem o aumento no estresse oxidativo e processos inflamatórios, excesso de mitoses em células do sistema imune, diminuição de fator de crescimento cerebral (BDNF) e desequilíbrio metabólico<sup>56,59</sup>.

Uma meta-análise encontrou telômeros significativamente mais curtos naqueles com transtorno mental em comparação aos controles saudáveis, com tamanho de efeito médio. Porém, após avaliar os transtornos psiquiátricos separadamente, este efeito se manteve apenas para depressão maior, transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) e transtornos ansiosos e não mais para psicoses e transtorno bipolar<sup>61</sup>.

Estudos longitudinais, entretanto, têm encontrado resultados conflitantes. Uma coorte avaliou a medida de telômeros entre pessoas com ou sem depressão maior e, no primeiro momento, não obteve diferença significativa entre os grupos. Porém, 2 anos depois, o grupo com depressão teve redução relativamente maior dos telômeros em comparação aos controles, mesmo após controlar para fatores de confusão<sup>63</sup>. O oposto foi identificado no estudo de Verhoven (2018), que encontrou diferenças significativas entre os grupos na primeira avaliação, porém, sem mudanças naqueles com depressão após 10 anos<sup>64</sup>.

Em relação aos TUS, uma meta-análise recente demonstrou encurtamento de telômeros significativamente mais acentuado em usuários de drogas ou álcool em comparação a controles saudáveis<sup>34</sup>. Até o momento, a maioria dos estudos avaliou álcool ou cocaína<sup>65-69</sup> e, alguns, avaliaram múltiplas substâncias<sup>33,70</sup>.

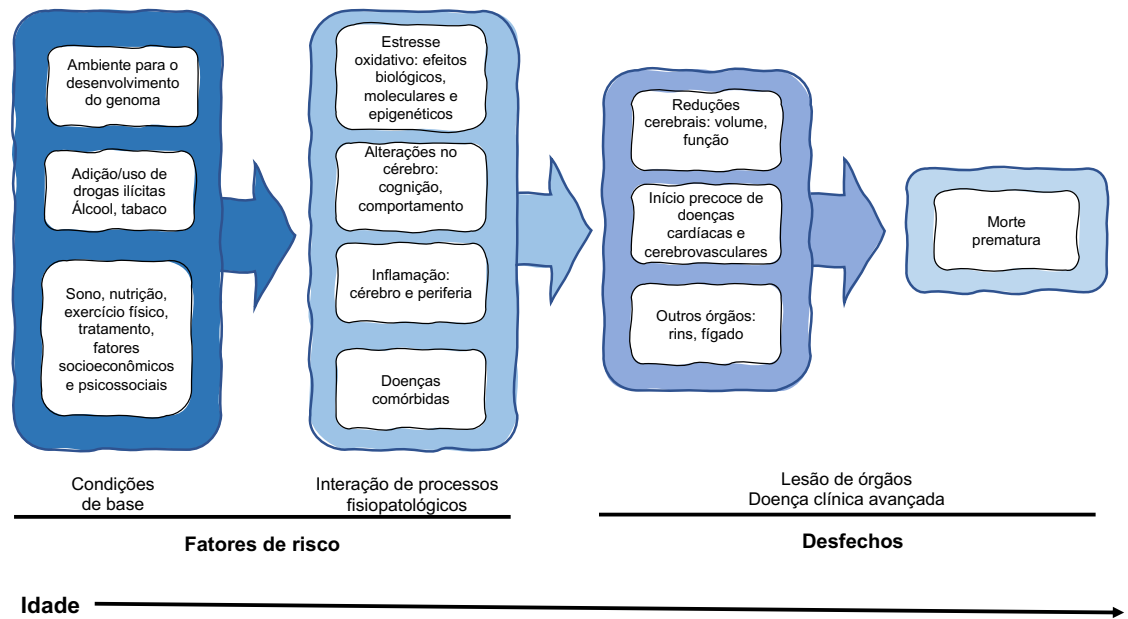


Figura 7 - Envelhecimento precoce no transtorno por uso de substâncias

Adaptado de Bachi et al. (2017)

Yang e colaboradores encontraram telômeros mais curtos em usuários de substâncias em comparação a indivíduos saudáveis. Esse achado ocorreu para drogas depressoras do sistema nervoso central, mas não para as estimulantes. Outros fatores relacionados à gravidade da dependência, como intensidade de consumo, não tiveram resultados significativos. Curiosamente, houve uma relação inversa entre tamanho do telômero e intervalo de tempo para recaída <sup>71</sup>.

Em relação ao álcool, os estudos realizados até o momento identificaram encurtamento dos telômeros <sup>66,67,69,72</sup>. Porém, algumas questões metodológicas dificultam a interpretação e comparação dos dados. Mais especificamente, houve variação nos parâmetros de avaliação do consumo de álcool e controle para fatores de confusão (tabela 3)

Os dados sobre a associação da gravidade do TUA e o tamanho dos telômeros também continuam inconclusivos. Um estudo encontrou uma relação entre a dose da substância e o encurtamento de telômeros. Entretanto, um estudo mais recente com amostra populacional não conseguiu associar o tamanho dos telômeros à gravidade do consumo de álcool <sup>66</sup>.

Tabela 3 - Estudos sobre tamanho de telômeros em usuários de álcool

ESTUDO	DELINEAMENTO E POPULAÇÃO	CRITÉRIO DE USO DE ÁLCOOL	PRINCIPAIS ACHADOS	LIMITAÇÕES
<b>Pavanello et al., 2011</b>	TUA infratores de trânsito (N=200) vs CS (N=257), todos homens Seguimento feito com parâmetros laboratoriais (GGT, VCM, CDT)	TUA Uso pesado: >40g/dia	TL mais curto no TUA que CS (p<0.0001) Sem associação com drinks/dia em alcoolistas	Não usou escala diagnóstica Não pareou para idade Sem diferença significativa de GGT entre os grupos
<b>Aida et al., 2011</b>	TUA (N=26) vs CS (N=24) TL medido em biópsias do esôfago	TUA	TL mais curto em TUA que CS (p<0.002)	Não usou escala diagnóstica
<b>Stradberg et al., 2017</b>	Coorte populacional com 449 homens Usou ponto de corte para classificar TL como curtos	5 grupos: 0g/dia 14 g/dia 14-28g/dia 28-70g/dia >70g/dia	TL mais curtos a partir de 14g/dia (1 dose de álcool) em comparação aos abstêmios. Maior proporção de TL curto no grupo que consumia >70g/dia Diferenças significativas apenas quanto ao consumo no <i>baseline</i> , mas não ao final do estudo (46 vs 75 anos)	Avalia padrões de consumo, não TUA Auto relato Apenas 15 indivíduos no grupo >70g/dia ao final do estudo Consumo de álcool medido longitudinalmente, mas o TL apenas ao final do estudo
<b>Wang et al., 2017</b>	Estudo populacional com 897 usuários e 906 abstêmios de ambos os sexos	Consumo de álcool no último ano: 1-5g/dia 6-15g/dia 16-30g/dia >30g/dia	TL mais curto naqueles com consumo >30g/dia em comparação aos abstêmios, mas apenas nos mais velhos (>65 anos)	Avalia padrões de consumo, não TUA Auto relato

<b>Dixit et al., 2019</b>	Coorte com 627 usuários e 321 abstêmios + estudo transversal com 790 usuários e 883 abstêmios; ambos os sexos; amostra ambulatorial	Quantidade de doses por semana Beber em <i>binge</i> ou não "Beber ideal": 1-2 doses/dia ou 1-7 doses/semana para mulheres e 1-14 para homens	Sem diferença entre os grupos no baseline ( $p=0.091$ ; $p=0.239$ ) ou 5 anos depois ( $p=0.614$ ) Sem diferença na redução dos TL após 5 anos ( $p=0.065$ ) Sem correlação com doses semanais para tamanho do TL no <i>baseline</i> ou redução após 5 anos TL mais curto associado à 14 doses/semana versus nenhuma ( $p=0.046$ ) TL mais curto associado ao beber em <i>binge</i> ( $p<0.01$ ) Sem associação de "beber ideal" com TL mais longo ( $p=0.37$ ; $p=0.14$ ) Sem associação com tipo de bebida	Avalia padrões de consumo, não TUA Consumo de álcool não foi medido longitudinalmente Idade média > 65 anos (pode ter se limitado aos sobreviventes) Parte da amostra com doenças cardiovasculares
<b>Carvalho et al., 2019</b>	260 TUA versus 449 CS; ambos os sexos Parâmetros de gravidade: anos de beber pesado, anos de uso e doses/semana Trauma na infância	TUA	TL mais curto em TUA que em controles ( $p<0.05$ ) Associação de TL mais curto com impulsividade Sem correlação do TL com gravidade do TUA ou scores de trauma na infância Associação com parâmetro cognitivo	Poucos controles com trauma

			e motor de impulsividade Sem associação com QI	
<b>Yamaki, 2019</b>	TUA (N= 134; 48 com câncer) versus CS (N=121); todos homens	TUA	TL mais curto em TUA que CS (p<0.0001) Tendência a TL mais curto naqueles que iniciaram consumo de álcool <20 anos de idade (p=0.060) Deficiência de tiamina associada a TL mais curto entre alcoolistas (p=0.018) Sem diferença de TL entre TUA com ou sem câncer (p=0.598) Sem associação com história de convulsão (p=0.147) ou <i>delirium tremens</i> (p=0.058)	Não usou escala diagnóstica

Legenda: CS = controles saudáveis; CDT= carboidrato deficiente de transferrina; GGT= gama-glutamil transferase; TL = telômero; TUA = transtorno por uso de álcool; VCM= volume corpuscular médio

Entre usuários de crack do sexo feminino também foram encontrados telômeros mais curtos em comparação às mulheres não usuárias. A diferença foi ainda maior para aquelas com história de trauma na infância, porém, não houve correlação com a gravidade do transtorno por uso de crack, assim como com comorbidade com depressão <sup>65</sup> (tabela 4).

Tabela 4 - Estudos sobre tamanho de telômeros em usuários de cocaína/crack

ESTUDO	DELINEAMENTO E POPULAÇÃO	CRITÉRIO DE USO DE COCAÍNA/CRACK	PRINCIPAIS ACHADOS	LIMITAÇÕES
--------	--------------------------	----------------------------------	--------------------	------------

<b>Levandowski et al., 2016</b>	Caso-controle TUC com (N=93) e sem (N=34) trauma vs CS idosas sem trauma (N=49)	TUC	TL sign mais curto em TUC que em CS Diferença ainda maior com TUC associado ao trauma	Não avaliou correlação com gravidade do TUC nem idade
<b>Tannous et al., 2019</b>	Caso-controle TUC/TUA (N=24) vs CS (N=25)	TUC associado ao TUA	Sem diferenças de TL entre grupos Também avaliou: volume de massa branca e viés de atenção e impulsividade	Amostra pequena Não correlacionou com gravidade ou idade

Legenda: CS = controles saudáveis; TUC = transtorno por uso de cocaína; TL = telômero; TUA = transtorno por uso de álcool

Ainda não foi possível determinar se o encurtamento do telômero estaria associado à gravidade dos sintomas dos transtornos por uso de substâncias ou sua cronicidade <sup>65,66,71</sup>. Alguns estudos sobre depressão têm sugerido uma relação dose-resposta <sup>56</sup>. No entanto, ao se analisar o conjunto de estudos sobre depressão e sobre outros transtornos, os resultados ainda são mistos <sup>56,61</sup>.

## **b) Inflamação:**

O cérebro do idoso apresenta aumento da transmissão de sinais inflamatórios que atuam tanto como causa (por exemplo, de atividade aberrante dos sistemas neuronais), como consequência (como do estresse oxidativo) de outras alterações biológicas da idade. Em decorrência do processo de senescência celular (SASP), as células da glia têm maior liberação de citocinas, dentre as quais a interleucina 1 (IL-1) e 6 (IL-6), assim como o fator alfa de necrose tumoral (TNF). Quando transitórias, tais alterações têm potencial reparador e auxiliar na neuroplasticidade. Entretanto, quando são crônicas, levam à degeneração sináptica e comprometimento funcional. Também é importante ressaltar que os níveis de fatores pró-inflamatórios do envelhecimento são menores do que aqueles observados em infecções agudas, caracterizando um estado inflamatório crônico de baixa intensidade <sup>28,41</sup>.

Vários estudos transversais encontraram uma associação entre níveis elevados de proteína C reativa, IL-6 e TNF-alfa e telômeros mais curtos <sup>59</sup>. Porém, estudos longitudinais têm apresentado resultados mais conflitantes. Em um estudo, o aumento de marcadores inflamatórios esteve associado a encurtamento de telômeros 15 meses depois. Outra coorte mais longa, de até 13 anos de seguimento, não encontrou essa associação <sup>59</sup>.

### **b.1) Inflamação e transtornos psiquiátricos**

A associação entre maior atividade inflamatória e transtornos mentais tem sido demonstrada através de meta-análises para depressão, transtorno bipolar, esquizofrenia e TEPT <sup>73-77</sup>. Até o momento, os marcadores mais estudados são a interleucina-1 beta (IL-1beta), interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10) e o fator alfa de necrose tumoral (TNF-alfa), dentre outros. A IL-6 e TNF-alfa estão associados à redução da neurogênese na região do hipocampo, podendo levar a déficits cognitivos, assim como sintomas afetivos <sup>59,78</sup>.

A IL-6 encontra-se elevada em indivíduos com depressão maior, esquizofrenia e TEPT, enquanto o TNF-alfa está elevado na esquizofrenia, no transtorno bipolar e na depressão maior <sup>73-76</sup>. Variações em cada transtorno também têm sido identificadas. No transtorno bipolar, cada fase de humor apresenta um padrão inflamatório diferente <sup>79</sup>. Além disso, há variações conforme os anos de transtorno. Inicialmente, ocorre o aumento de citocinas anti-inflamatórias (IL-10) e pró-inflamatórias (IL-6 e TNF-alfa). Já nos estágios mais avançados, predomina a resposta pró-inflamatória <sup>15</sup>.

Na esquizofrenia, os marcadores inflamatórios se elevam na fase aguda de sintomas psicóticos e retornam ao normal após o tratamento com antipsicóticos <sup>77</sup>. Similarmente, o tratamento antidepressivo reduziu os níveis de IL-6, IL-10 e TNF-alfa em indivíduos com depressão maior <sup>59</sup>.

Em relação ao consumo de álcool, estudos pré-clínicos identificaram diferentes respostas imunológicas. Mais especificamente, o consumo agudo está associado a um padrão anti-inflamatório, enquanto o uso crônico se associa a um padrão pró-inflamatório <sup>32,78</sup>. Talvez em razão dessa complexidade, estudos sobre marcadores inflamatórios no TUA mostraram resultados contraditórios, com alguns mostrando aumento, outros, diminuição ou nenhuma diferença entre casos e controles saudáveis <sup>78,80-82</sup>.



Estudos em usuários de cocaína ou crack também encontraram alterações na resposta inflamatória <sup>29,83</sup>. Indivíduos com transtorno por uso de cocaína (TUC) apresentaram aumento de TNF-alfa quando submetidos a um estímulo estressor, enquanto o mesmo não ocorreu entre os controles. Além disso, os níveis basais da interleucina anti-inflamatória IL-10 encontraram-se mais baixos <sup>83</sup>. Outro estudo encontrou maiores níveis de IL-1beta, IL-10 e TNF-alfa em usuários de crack em comparação a controles saudáveis <sup>29</sup>. Esse efeito não foi mediado por comorbidades clínicas ou psiquiátricas, assim como o uso pesado de crack ou ausência de períodos de abstinência. Não houve diferença para IL-6. Níveis mais altos de IL-8 foram encontrados naqueles com comorbidade por uso de outras substâncias, enquanto o aumento de IL-12p70 foi associado ao uso diário de crack <sup>29</sup>.

Um estudo longitudinal que acompanhou usuárias de crack, entre o primeiro e vigésimo primeiro dia de desintoxicação hospitalar, observou variações no padrão inflamatório ao longo desse período. Em comparação aos controles saudáveis, no início da internação as usuárias apresentaram níveis mais baixos de IL-2, interferon-gama (IFN-gama), TNF-alfa e IL-17A, enquanto IL-10, IL-4 e IL-6 estavam elevados. Ao final da desintoxicação, os níveis se aproximaram dos valores de referência, exceto nos casos associados à história de trauma na infância, que mantiveram níveis mais altos de IL-4, IL-6 e TNF-alfa. Esses dados sugerem que o TUC pode causar um desequilíbrio na resposta inflamatória, a qual se recupera apenas parcialmente após a desintoxicação <sup>65</sup>. Por fim, mais recentemente dois estudos encontraram um padrão diferente de marcadores inflamatórios também entre pessoas com TUC, com ou sem depressão comórbida <sup>84,85</sup>.

## **2.4.2 Fatores Ambientais:**

### **a) Estressores e envelhecimento**

A reação do nosso organismo a estressores externos é um dos fatores envolvidos no processo de envelhecimento. Seu efeito pode ser deletério ou benéfico dependendo do período em que ocorre, intensidade, cronicidade, forma como é percebido e da disponibilidade de recursos para enfrentá-los <sup>42,47</sup>. Os estressores externos podem ser tanto fisiológicos (cirurgia, extremos de temperaturas) como psicológicos (luto, separação).

A reação a um estresse agudo pode permitir a melhora das respostas de enfrentamento do organismo a novos estressores. A essa plasticidade biológica bem adaptativa chamamos de **hormesis**, a qual tem, à medida que se acumula ao longo da vida, a capacidade de desacelerar o processo de envelhecimento <sup>42</sup>. Em outras palavras, a hormesis seria a resiliência ao estresse. Exemplos de estressores positivos são o exercício físico, aprender uma nova língua, ou outros desafios capazes de gerar aprendizagem e sentido na vida.

Entretanto, se o estressor for crônico ou repetitivo, pode haver um esgotamento dessas capacidades de adaptação e um aumento da carga alostática. A esses estressores chamamos de **estresse tóxico** <sup>42</sup>. De fato, muitos biomarcadores de carga alostática são também marcadores de envelhecimento, reforçando a importância do estresse no processo de senilidade.

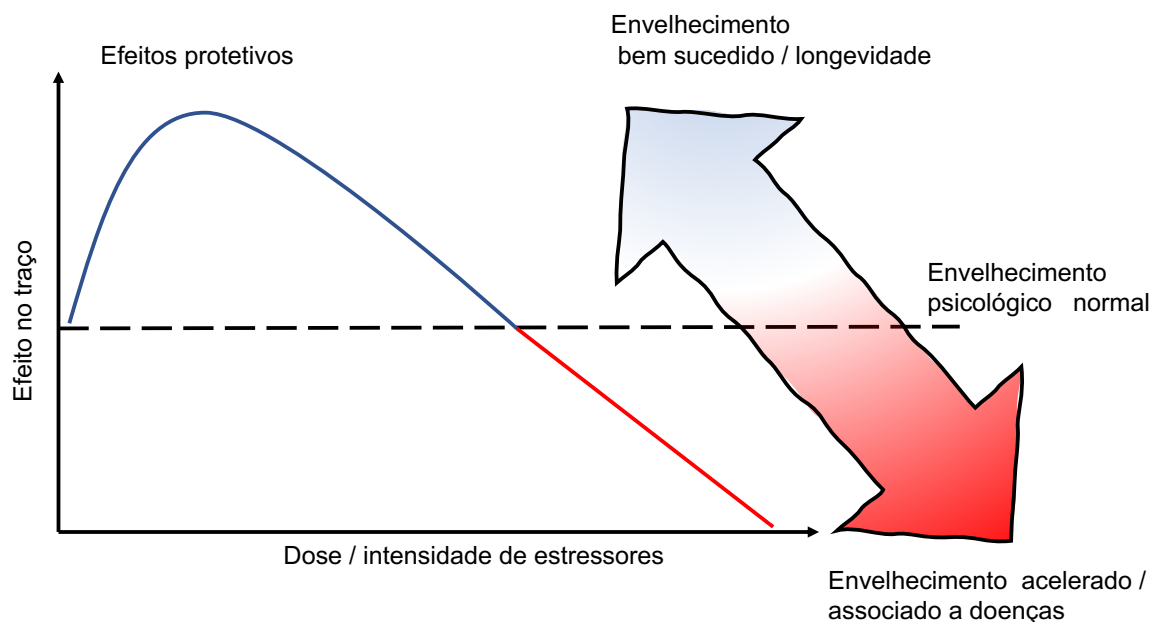


Figura 8 - Associação entre estressores e envelhecimento saudável ou acelerado

Adaptado de Franceschi et al. (2018)

O período de vida em que o estressor surge também pode determinar a resposta do organismo. Perda de um dos pais pode ter um efeito tóxico se ocorrer

durante a infância, mas pode não ter, se ocorrer na vida adulta. Acontecendo durante a gestação, há a possibilidade de efeito transgeracional do estresse sobre os mecanismos de regulação celular do envelhecimento, como o tamanho de telômeros ou epigenética<sup>42</sup>.

Por fim, a forma como o estresse é percebido pelo indivíduo também vai determinar se a resposta será tóxica ou resiliente, independente de ele ser agudo ou crônico. Cultura, personalidade e contexto podem interferir nessa interpretação<sup>42</sup>.

Outro fator importante na proteção contra o envelhecimento precoce é a capacidade de reserva, a qual se caracteriza por recursos sociais, psicológicos e fisiológicos capazes de aumentar a resiliência ao estresse. Dentre eles, podemos citar as altas habilidades cognitivas, bom condicionamento físico, o otimismo e o apoio social<sup>42</sup>.

#### **b) Alterações metabólicas e envelhecimento**

Doenças metabólicas, como diabetes, resistência à insulina e obesidade podem acelerar o envelhecimento através dos mecanismos de envelhecimento biológico. Balanço calórico positivo e sedentarismo, quando crônicos, intensificam processos inflamatórios mediados pela microglia e geram perda de sinapses na região do hipocampo, importante para a memória. A obesidade prejudica a neurogênese e o metabolismo de oxigênio na região pré-frontal, levando à déficit na função executiva, atenção e memória. Clinicamente, tais alterações se refletem em maior risco para comprometimento cognitivo, demências, doença de Parkinson e acidente vascular cerebral (AVC)<sup>28</sup>.

Exercício físico e restrição calórica agem na direção contrária e retardam o envelhecimento através da melhora da neuroplasticidade e resistência ao estresse. Assim como os estressores positivos descritos para situações traumáticas, os desafios impostos pelo exercício e jejum devem ser intermitentes, pois a regeneração ocorre nos momentos de repouso (descanso, alimentação, sono)<sup>28</sup>.

#### **2.4.3 Trauma na infância, transtornos psiquiátricos e telômeros**

A associação entre trauma na infância e tamanho de telômeros na vida adulta já foi demonstrada em vários estudos. Quanto mais grave o trauma ou quanto maior

o número de exposição a situações traumáticas, maior o efeito sobre o encurtamento dos telômeros. Tal efeito parece decorrer da ativação do eixo hipotálamo-hipófese-adrenal, inflamação crônica, hiperatividade glutamatérgica, deficiência de neurotrofinas e maior estresse oxidativo<sup>9,47</sup>.

Uma meta-análise encontrou telômeros mais curtos naqueles com história de trauma que em controles, com pequeno tamanho de efeito<sup>86</sup>. Dentre os diferentes tipos de trauma estudados, a separação dos pais teve a associação mais forte<sup>86</sup>.

Outra meta-análise, desta vez incluindo diferentes faixas etárias, avaliou a contribuição de vários tipos de adversidade sobre o tamanho dos telômeros. Exposição a poluentes, baixas condições socioeconômicas, baixa escolaridade, dieta pobre em nutrientes e pouco cuidado parental tiveram uma correlação negativa com o tamanho de telômero, com pequeno tamanho de efeito. Além disso, não houve diferença entre indivíduos que sofreram trauma na infância em comparação àqueles que o tiveram na vida adulta<sup>52</sup>.

Muitos desses estudos avaliaram fatores individuais (por exemplo, exposição ao abuso ou negligência) e/ou fatores ambientais (por exemplo, adversidade econômica ou vizinhança violenta). Em ambos os casos se observou o efeito sobre o encurtamento de telômeros<sup>47</sup>. Porém, é comum que um indivíduo seja exposto a mais de um tipo de estressor, sendo difícil separá-los nos estudos<sup>47</sup>.

Em sua meta-análise, Ridout e colaboradores (2018) encontraram telômeros significativamente mais curtos naqueles com trauma na infância do que em controles. Dentre os fatores que interferiram no tamanho de efeito estavam o período da avaliação do biomarcador, idade em que o trauma ocorreu, os critérios para o trauma, comorbidades ou uso de medicação e idade dos participantes. Quanto mais próximo do evento traumático ocorrer a avaliação do tamanho dos telômeros, mais forte é a associação<sup>87</sup>. Porém, o efeito também aumenta com a precocidade da exposição, como em crianças pequenas<sup>47,87</sup>. Os critérios utilizados para avaliação do trauma tiveram maior tamanho de efeito quando foram mais amplos (abuso, negligência ou outros) do que quando foram mais restritos<sup>87</sup>. A presença de comorbidades clínicas ou psiquiátricas, assim como o tratamento medicamentoso, diminuiu o tamanho de efeito. Por fim, as amostras mais jovens tiveram um maior tamanho de efeito<sup>87</sup>.

Estudos longitudinais, porém, têm tido resultados conflitantes. A meta-análise de Ridout e col. não encontrou efeito significativo do trauma nos telômeros<sup>87</sup>. Entretanto, ainda há poucos estudos com este delineamento.

Sofrer adversidades no início da vida também está associado a transtornos psiquiátricos. Até o momento, já foram encontradas associações com transtornos ansiosos, estresse pós-traumático e, principalmente, depressão, enquanto os resultados para os transtornos psicóticos ainda são conflitantes<sup>47,52</sup>. Entretanto, assim como pode ser considerado um fator de confusão importante, é possível que o envelhecimento biológico dependa da interação entre trauma na infância e transtornos mentais. Alguns estudos encontraram menor tamanho de efeito, ou os resultados deixaram de ser estatisticamente significativos, após se controlar para transtornos mentais. A hipótese de que o trauma na infância favoreceria o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos que, por sua vez, agravariam o processo de envelhecimento celular, também vem sendo discutida e avaliada<sup>47</sup>.

Concluindo, a importância do estudo do envelhecimento biológico entre pessoas com TUS compreende dois aspectos. Primeiramente, a avaliação de sua associação com doenças relacionadas à idade e risco maior de mortalidade nos TUS. Atualmente, a maioria daqueles que procura tratamento especializado se encontra em faixas etárias mais jovens<sup>2</sup>, o que pode fazer com que os serviços não estejam adaptados para atender às demandas de um organismo biologicamente mais velho. Dessa forma, a identificação dos processos de envelhecimento associados ao uso de SPA poderia auxiliar no diagnóstico precoce de complicações clínicas, assim como, no desenvolvimento de cuidados mais adequados para essa população.

Por fim, os mecanismos de envelhecimento biológico também estão implicados no processo de neurodegeneração. Portanto, podem estar envolvidos no desenvolvimento, manutenção e gravidade do TUS, bem como na resposta ao tratamento. Porém, ainda há poucos estudos sobre medida de telômero e marcadores inflamatórios em indivíduos com TUS e os dados obtidos até o momento são conflitantes. Tal conhecimento contribuiria para expandir o conhecimento das bases neurobiológicas do transtorno e aperfeiçoar as estratégias preventivas e terapêuticas.

## 2.5 A PANDEMIA DE COVID-19

Em março de 2020, a Organização Mundial de Saúde (OMS) decretou a pandemia de COVID-19<sup>88</sup>. Desde aquele momento, preocupações acerca de seus possíveis efeitos sobre a saúde mental da população começaram a ser levantadas<sup>17,89,90</sup>. Além do medo de contaminação, a necessidade de quarentena, a preocupação

com familiares adoecidos e o luto poderiam desencadear sintomas de ansiedade, depressão e até mesmo estresse pós-traumático. Esses efeitos poderiam ser ainda mais graves em populações vulneráveis, como a de pessoas com TUS <sup>90,91</sup>.

Está bem descrito que os transtornos por uso de substâncias estão frequentemente associados às comorbidades clínicas, psiquiátricas e à vulnerabilidade social, o que aumenta o risco para uma série de desfechos negativos em saúde, incluindo a mortalidade <sup>1</sup>. Investigações recentes têm ponderado que os fatores de risco para contrair e disseminar o vírus, além de evoluir com complicações da COVID-19, são elevados entre usuários de álcool e de crack <sup>92</sup>. Além disso, sabe-se que estes pacientes são sensíveis ao estresse e que os sintomas disfóricos são amplamente associados à fissura e à recaída <sup>6</sup>. Durante a pandemia, isso pode ser intensificado pelo efeito “pandemia de medo”, que aumentou a prevalência de sintomas ansiosos e depressivos na população geral; pelo isolamento e aumento do tempo com a família; pela dificuldade de acesso ao tratamento e pela crise econômica <sup>17,93</sup>.

Da mesma forma, esses efeitos da pandemia podem afetar o consumo de SPA entre pessoas sem TUS <sup>91,94,95</sup>. Em outros períodos históricos de crises globais, observou-se uma mudança no padrão de consumo de álcool, em especial entre as populações mais vulneráveis <sup>91</sup>. A crise econômica de 2008, por exemplo, afetou principalmente indivíduos jovens, com boa escolaridade e de ambos os sexos. Nos anos seguintes, foi constatado que o uso nocivo de álcool permaneceu estável na população como um todo. Porém, essa aparente estabilidade ocorreu às custas da diminuição em determinadas populações (grupos de baixa renda e baixa escolaridade) e aumento em outras (adultos jovens, mulheres e com nível superior completo) <sup>91</sup>. Similarmente, a epidemia de SARS de 2003 foi sucedida pelo aumento da prevalência de TUA entre profissionais de saúde <sup>91</sup>. Estudos de outras epidemias também mostraram um aumento de sintomas depressivos, ansiosos e de estresse pós-traumático entre pessoas que fizeram quarentena<sup>90</sup>. Da mesma forma, durante a pandemia de COVID-19, as medidas de distanciamento social e necessidade de autoisolamento geraram mudanças bruscas de estilo de vida e têm sido associadas à piora da saúde mental da população.

Em conjunto, estes elementos tornam relevante a investigação sobre os efeitos da pandemia entre indivíduos com TUS e sobre mudanças no padrão de consumo de SPA entre a população geral. Porém, até o momento pouco se sabe a respeito dessa

associação na população brasileira. Portanto, desde o início da crise sanitária, o nosso grupo tem destinado parte de seus esforços de pesquisa para este tópico. Por conseguinte, o mesmo também passou a integrar os objetivos da presente tese.

### **3 OBJETIVOS**

#### ***Objetivo Geral***

Verificar se pacientes com diagnóstico de transtorno por uso de álcool ou transtorno por uso de cocaína/crack apresentam alterações em biomarcadores de envelhecimento biológico precoce.

Avaliar a associação do isolamento social sobre o consumo de álcool.

#### ***Objetivos Específicos***

Realizar uma revisão sistemática e meta-análise para comparar a concentração de citocinas inflamatórias entre indivíduos com transtorno por uso de álcool e controles saudáveis;

Verificar se há diferença de tamanho de telômero entre pacientes com transtorno por uso de álcool ou transtorno por uso de cocaína/crack e controles pareados;

Verificar se as alterações encontradas se correlacionam com aspectos clínicos dos transtornos por uso de álcool ou cocaína/crack;

Verificar se as alterações encontradas se correlacionam com histórico de trauma na infância;

Avaliar aspectos clínicos e demográficos associados ao consumo de álcool durante o isolamento.



## 4 ASPECTOS ÉTICOS

### 4.1 ARTIGO 1

O projeto para a meta-análise foi submetido e aprovado pelo PROSPERO (CRD42017072238).

### 4.2 ARTIGO 2

Este estudo utilizou o banco de dados de projetos anteriores do Centro de Pesquisas em Álcool e Drogas (CPAD) da UFRGS. O projeto recebeu aprovação do Conselho de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GPPG HCPA: 2018-0488) e do Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CAAE: 82461417.2.0000.5327).

### 4.3 ARTIGO 3

Este estudo foi realizado com dados secundários do projeto sobre saúde mental durante a pandemia de COVID-19 da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) em parceria com outras universidades internacionais. Foi aprovado pelo Comitê de Ética da UFSM e pelo Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (30.244.620.1.0000.5346)

## 5 ARTIGO 1

Artigo em revisão na revista Brazilian Journal of Psychiatry (Fator de impacto = 1.904; Qualis B1)

### **Inflammation and Alcohol Use Disorder – a Systematic Review and Meta-Analysis**

Helena Ferreira Moura<sup>1</sup>, Fernanda Hansen<sup>2</sup>, Fabiana Galland<sup>1</sup>, Daiane Silvelo<sup>1</sup>, Fernando Pezzini Rebelatto<sup>1</sup>, Felipe Ornell<sup>1</sup>, Raffael Massuda<sup>3</sup>, Juliana Nichterwitz Scherer<sup>1</sup>, Felipe Schuch<sup>4</sup>, Felix H. P. Kessler<sup>1</sup>, Lisia von Diemen<sup>1\*</sup>

1. Department of Psychiatry, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), RS, Brazil
2. Department of Nutrition, Health Sciences Center, Federal University of Santa Catarina (UFSC), SC, Brazil
3. Department of Psychiatry, Federal University of Paraná (UFPR), PR, Brazil
4. Department of sports methods and techniques, Federal University of Santa Maria (UFSM), RS, Brazil

\*Corresponding author:

Lisia von Diemen

Ramiro Barcelos 2350

Zip Code: 90035-903

+ 55 51 99968-7698

Porto Alegre – RS, Brazil

ldiemen@hcpa.edu.br

Inflammation and alcohol use disorder

Word count: 3,416

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors. The authors declare no conflicts of interest.

**Abstract**

This study aimed to compare concentrations of cytokines in people with alcohol use disorder (AUD) and healthy controls (HC). Searches were performed on PubMed, PsycINFO, Web of Science and Embase, from inception through February 18th, 2019. Meta-analyses using random-effects models calculating the standardized mean difference (SMD, 95% confidence interval; CI) were performed and potential sources of heterogeneity were explored through meta-regressions and subgroup analysis. Eighteen papers were included in the meta-analysis accounting for 521 individuals with AUD and 499 HC, for 14 cytokines: tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , IL-1, IL-1RA, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-13, IL15, interferon (IFN)- $\gamma$  and sCD14. There were significantly higher concentrations of TNF- $\alpha$  (n=366 AUD and 315 HC; SMD=0.588; 95% CI 0.392-0.847;  $p<0.001$ ) in AUD compared with HC. A moderate, but not statistically significant, increased levels of IL-6 in AUD compared to HC was found (n=328 AUD and 280 HC; SMD=0.469; 95% CI -0,006-0,945;  $p<0.053$ ). Plasma analysis increased the SMD of TNF- $\alpha$  to 0.620 while studies with serum no longer showed significant differences between AUD and HC ( $p=0.076$ ). No statistical significance was found for 12 other cytokines.

Key words: alcohol; biomarker; inflammation; interleukins; TNF alpha

## 1. INTRODUCTION:

Alcohol use disorder (AUD) is responsible for a great social burden as it may affect the individual in several ways <sup>1</sup>. In addition to the characteristics of the disorder itself, such as social and behavioral problems, it is associated with other psychiatric comorbidities, as well as with clinical complications, like alcoholic liver disease (ALD) <sup>2,3</sup>.

In the past years, much attention has been given to the neurobiological basis of AUD <sup>4</sup>. Studies on neuroimmune signaling have shown a role for the immune system in both development and progression of the disorder <sup>5</sup>. Immune alterations associated with alcohol, however, are complex and depend on several factors <sup>5,6</sup>. Alcohol can activate the innate immune system as a direct effect on the brain <sup>5,7</sup>. In the latter, alcohol allows the entrance of gut biome bacteria and endotoxins (LPS) in the portal circulation by changing the gastrointestinal permeability ("leaky stomach") <sup>7</sup>. Then, it potentiates alcohol liver inflammation, leading to the secretion of proinflammatory cytokines systemically <sup>5,6</sup>

Acute and chronic alcohol consumption may affect the immune system in different ways: the former is associated with decreased cytokine levels, whereas the latter has the opposite effect <sup>5,8,9</sup>. During abstinence, the immune system may remain primed for additional activation for months <sup>5</sup>. In chronic users, these changes could induce a cumulative process which may correspond to the progressive aspect of the disorder <sup>5,6</sup>.

Studies comparing cytokines levels between AUD and healthy controls have shown mixed results, some of them finding increased cytokines levels in AUD in comparison to healthy controls (HC) and others finding decreased levels or no differences between the two groups <sup>5,9-11</sup>. Small sample sizes, inclusion of

individuals with inflammatory or other chronic diseases, heterogeneity in length of abstinence and lack of control for other variables related to inflammation, such as age and sex, may contribute to these discrepancies. Previous narrative reviews have suggested that people with AUD present increased levels of inflammatory levels<sup>5,6,12-14</sup> however, to the best of our knowledge, no meta-analysis was performed.

Therefore, the aim of our study was to conduct a systematic review and meta-analysis to compare concentrations of inflammatory markers in patients with AUD and HC. We also intended to investigate the effect of alcohol intoxication, withdrawal, chronic exposure, long-term abstinence and symptom severity on inflammatory profile.

## **2. METHODS:**

The study was conducted according to the PRISMA guidelines<sup>15</sup> and was previously registered in PROSPERO (CRD42017072238).

### **2.1 Eligibility Criteria:**

Original studies that assessed inflammatory markers in individuals over 18 years of age with AUD, in comparison with healthy controls. Papers which used validated diagnostic tools for AUD or described alcohol ingestion greater than 100g/day and/or that AUD subjects were recruited from detoxification programs were considered eligible. Both cross-sectional and longitudinal studies were included. In the latter case, we considered data collected in baseline.

We excluded review articles without original data (reviews, editorials, comments), data published in posters or in conferences, as well as studies conducted in animals. Other exclusion criteria were lack of control group without substance

abuse disorders, inflammatory markers collected from a sample other than blood, use of anti-inflammatory or immunomodulatory drugs, assessment of individuals with severe comorbid axis 1 disorder (bipolar or psychotic disorder), autoimmune or inflammatory diseases, pregnancy and severe medical illness.

## **2.2 Information Sources:**

The search for scientific articles was performed on the following databases: PubMed, PsycINFO, Web of Science and Embase. We included studies published from inception to February 18, 2019. We had also screened for any relevant papers on the reference lists of included articles and previous systematic or narrative reviews on the topic <sup>5,6,12-14</sup>.

## **2.3 Search Strategy:**

For PubMed we used the following terms: ("Alcohol related disorder" OR "Alcohol dependence" OR "Alcohol abuse" OR "Alcohol addiction" OR Alcoholi\*) AND (Inflammation OR "Inflammatory markers" OR Cytokine OR Interleukin OR IL OR Interferon OR IFN OR "C-Reactive Protein" OR CRP OR "Tumor necrosis factor" OR TNF OR Chemokine OR "Transforming growth factor" OR TGF OR Lymphocyte OR Macrophage OR Microglia) NOT (Review[ptyp] OR meta-analysis). Details of search strategy for each database are described in supplement.

**2.4 Study selection:** Initially, three reviewers (HM, FG and DS) had independently screened titles and abstracts using the inclusion and exclusion criteria. Full text examination was performed in case of uncertainty. Also, if there was any disagreement between reviewers, a fourth reviewer (FH) was consulted to elucidate the questions. Articles in a language other than English, Spanish or

Portuguese were translated using Google Translator and screened according to the same process.

Selected articles went through full text examination. Three reviewers (HM, FG and DS) had independently identified eligible studies and a fourth one was consulted in case of disagreement. Reasons for excluding an article were documented for each one of them.

**2.5 Data Collection Process:** Two reviewers (HM and FPR) using a pilot tested data extraction form had independently collected data from the selected studies. In case of uncertainty, study's authors were contacted through e-mail. A third reviewer (FH) was consulted to achieve consensus if there was any disagreement.

#### **2.6 Data Items:**

We attempt to extract data concerning:

- 1- General Data: journal, author's name, title, year of publication, main results.
- 2- Inflammatory markers (cases and controls): type, mean value and standard deviation, time of day blood was collected, unity (ng/ml, mg, etc), type of sample (plasma or serum), type of diagnostic instrument used.
- 3- Sample characteristics (cases and controls): sex, age (mean/median), age of first use of alcohol, years of alcohol consumption, use of alcohol in the last 30 days, use of alcohol in the last 7 days, amount of alcohol consumed in the last 30 days, time of abstinence at the time blood was collected, use of tobacco.
- 4- Medications (cases and controls): use of anti-inflammatory or immunomodulatory drugs, use of any other medication

- 5- Psychiatric comorbidity (cases and controls): substance use disorders other than alcohol, depressive disorder, bipolar disorder, psychotic disorders, anxiety disorders, obsessive compulsive disorder, personality disorders, scales used to assess comorbidity.
- 6- Clinical comorbidity and other information (cases and controls): autoimmune or inflammatory diseases and severe medical illness, body weight (mean and standard deviation), body mass index (BMI) (mean and standard deviation), Gamma-glutamyltransferase (GGT) (mean and standard deviation), Mean corpuscular volume (MCV) (mean and standard deviation).

## **2.6 Risk of Bias:**

Articles selected for full text examination have had their quality assessed according to the Newcastle-Ottawa Scale (NOS). Also, we specifically assessed risk of including former heavy drinkers or AUD in the control group according to criteria used elsewhere<sup>16</sup> because it is considered an important source of bias in studies on alcohol use disorders<sup>16,17</sup>.

## **2.7 Data Synthesis**

We used Comprehensive Meta-Analysis version 3 Software (CMA Biostat, Englewood, NJ, USA) to analyze the data. A comparative Meta-analysis was performed if values of inflammatory markers from people with alcohol use disorders and non-user controls were available in two or more studies. Mean values were used to calculate the effect size if studies had used different assessment methods. The standardized mean deviation (SMD) was calculated using Cohen's D for each individual study, for each marker, comparing AUD versus HC. Data was pooled through a random-effects model, using the



DerSimonian and Laird <sup>18</sup> formulae. Heterogeneity was assessed with Cochran's Q and the I<sup>2</sup> statistic for each analysis. Analysis with I<sup>2</sup> higher than 75% were considered high.

### **2.8 Analysis of subgroups or subsets**

We intended to perform subgroup analyses for: alcohol use characteristics' (intoxication, withdrawal, chronic exposure or long-term abstinence), symptom severity (mild or severe), case selection (AUD or heavy drinkers), appropriate exclusion of former AUD or heavy drinkers from control group (yes/no), sample type (plasma or serum), clinical and psychiatric comorbidity (yes/no), AST and ALT levels (high/normal) and BMI (normal/overweight or obese). Meta-regressions were performed to explore heterogeneity from moderators expressed as continuous variables, such as percentage of men, age and mean volume of alcohol ingestion. Heterogeneity was not explored in analyses containing less than 4 studies.

### **2.9 Meta-bias:**

Publication bias was assessed with the Begg-Mazumdar rank correlation test (yielding Kendall's tau) and Egger's bias test.

## **3. RESULTS:**

Initially, 20,043 studies were identified. Of those, eighteen studies, accounting for 521 individuals with AUD and 499 HC, met our inclusion criteria and were included in the meta-analysis <sup>10,11,27-34,19-26</sup>. Inappropriate selection of cases (such as no exclusion of inflammatory or chronic diseases, use of immunomodulators or uncertainty of AUD diagnosis) was the main reason for

exclusion (see figure 1 for study selection details). Studies' characteristics are described in table 1.

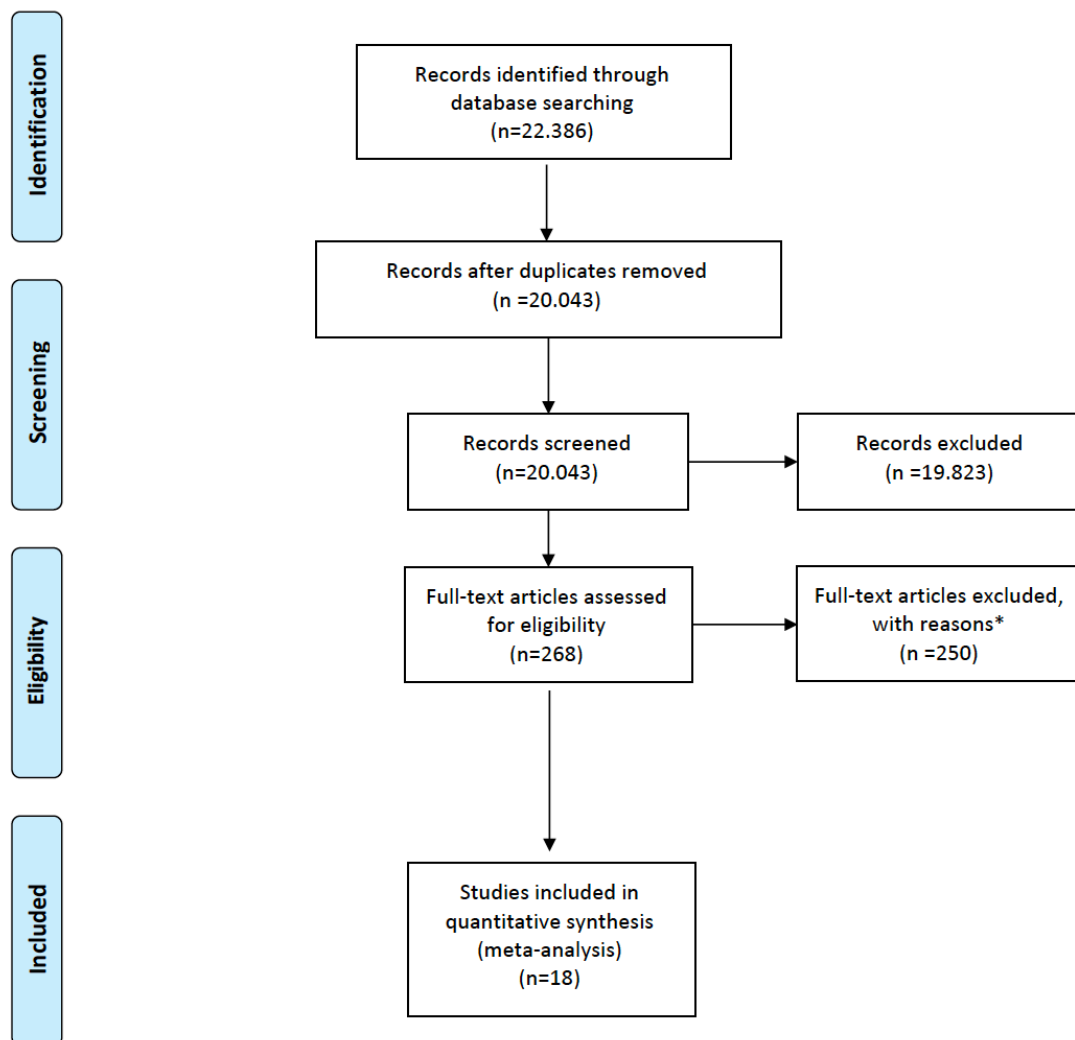


Figure 1: PRISMA Flow Diagram of the Literature Search

\*No controls: 41; inappropriate patient group: 84; not original article (review, poster, editorial): 53; not found: 5; animals: 6; sample other than blood: 8; stimulated cytokine: 20; gene polymorphisms: 3; inflammatory markers not assessed: 12; undetected levels of inflammatory markers: 2; Mean and/or SD not available: 15; Study population overlap: 1

Table 1: Characteristics of studies included in the meta-analysis

Author	Inflammatory markers	N		% Men		Days of abstinence (SD)	AUD scale
		Cases	HC	Cases	HC		
Bird 1990	TNF- $\alpha$ , IL-1	10	10	70%	50%	NA	>80g/day > 1 year
Di Gennaro 2007	CRP, ICAM1, VCAM1	42	39	72%	69%	1113 (960)	ADS
Garcia-Valdecasas-Campelo 2007	TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-10, cortisol	26	12	92.30%	66.66%	NA	> 150g/day for 5 years
Heberlein 2014	TNF- $\alpha$ , IL-6	30	18	100%	100%	NA	SESA (AUD), CIWA, OCDS, BDI, STAI I and STAI II, AUDIT, CAGE
Irwin 2004	IL-6, TNF- $\alpha$	14 (TNF- $\alpha$ )/12 (IL-6)	13 (TNF- $\alpha$ )/11 (IL-6)	100%	100%	18.8 (8.9)	SSAGA (AUD), HRSD
Kiefer 2002	TNF- $\alpha$	30	30	100%	100%	½ - 1	DSM criteria
Laso 1998	IL-4, IL-12, IFN $\gamma$	14	10	93%	93%	NA	90g/day for 5 years
Leclercq 2014	TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-8	15	6	56%	50%	1	TLFB, OCDS,
Liu 2017	IL-22, IL -27, IL-13, IL 10, CCL 20/MIP3- $\alpha$ , TNF- $\alpha$	9	10	NA	NA	NA	AUDIT, NIAAA Q6, TLFB
Maes 1998	IL-6, sIL-6R, IL-1RA, IL-8	12	12	90.90%	83.33%	> 30	SCID
Naveau 1998	TNF- $\alpha$ , TNFsRp55, TNFsRp75	23	22	84%	68%	2	> 100g/day for 5 years
Naveau 2005	TNFsRp, IL-10	25	22	NA	68%	NA	g/day for 5 years
Nikou 2016	IL-7, IL-10, G-CSF	48	84	83%	NA	1	DSM IV criteria; g/day
Soylu 2012	IL-1B, IL-2R, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$	15	17	NA	NA	NA	60g/day for 8 years; patients hospitalized in detoxication unity
Urbaschek 2001	TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, sICAM-1, sCD14	20	20	NA	NA	1	> 80g/day for 5 years

Vidali 2008	IL2-, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$	29	34	100%	100%	2	80g/day, TLFB
Yen 2017	TNF- $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF	78	86	100%	100%	½ - 3	SADS-L, FORM 90 (AUD), YBOCS alcohol craving scale, HRSD, TMT
Zahr 2018	IL-1A, IL-1b, IL-1RA, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12-p40, IL-12-p70, IL-13, IL-15, IL-17, sCD40, GCSF, GMC-SF, TNF- $\alpha$ , TNF $\beta$ , IFN $\gamma$ , IFN- $\alpha$	81	54	66%	51.80%	96.1 (96.3)	SCID, TLFB

---

Key: NA=Not available; AUD= alcohol use disorder; CCL 20=chemokine (C-C motif) ligand 20; CRP=C-reactive protein; GCSF=granulocyte colony-stimulating factor; GMC-SF=granulocyte macrophage colony-stimulating factor; ICAM=intercellular adhesion molecule-1; IFN=interferon; IL=interleukin; IL-2R=interleukin-2 receptor; MIP3- $\alpha$ =macrophage inflammatory protein-3 alpha; sCD14=soluble CD14; sIL-6R=soluble IL6 receptor; sICAM-1=Soluble intercellular adhesion molecule-1; TNF=tumor necrosis factor; TNFRp=TNF soluble receptor; VCAM1=vascular cell

Separate meta-analyses were performed for 14 inflammatory markers (10 pro-inflammatory and 4 anti-inflammatory). Tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  was significantly higher in AUD in comparison to HC with medium effect size (0.588; 95%CI 0.392-0.847). No differences were found for the other 13, although IL-6 almost reached statistical significance ( $p=0.053$ ). See table 2 for description of meta-analyses results.

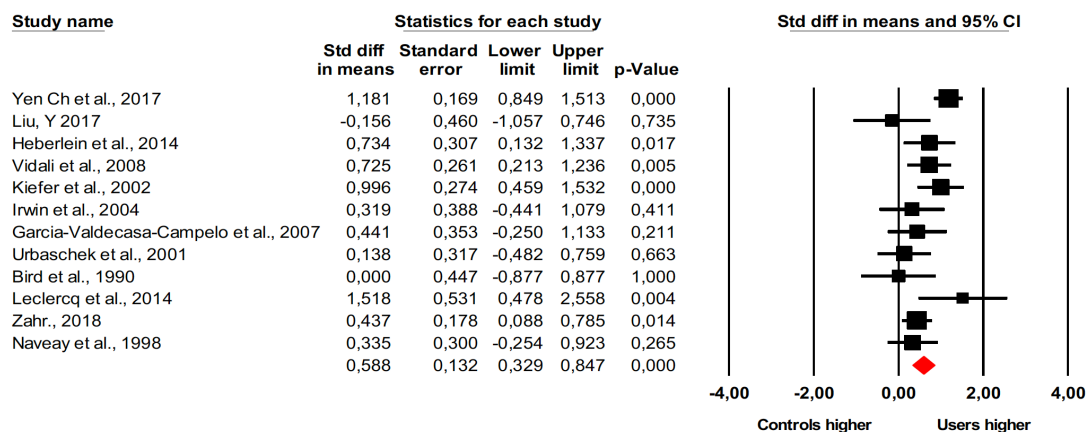


Figure 2: TNF- $\alpha$  levels in AUD and HC

Heterogeneity was high for almost all biomarkers ( $I^2=84.06\%$  to  $97.10\%$ ), moderate for TNF- $\alpha$  ( $I^2=57.09\%$ ) and nonexistent for IL-13 and IL-15 ( $I^2=0\%$ ). In order to identify sources of heterogeneity, subgroup analyses and meta-regressions were performed for TNF- $\alpha$  and IL-6. We were unable to perform these analyses for the other cytokines due to the limited number of studies.

Begg-Mazumdar rank correlation test (yielding Kendall's tau) and Egger's bias were not suggestive of publication bias for TNF- $\alpha$  (Begg-Mazumdar: Tau=-0.288,  $p=0.193$ ; Egger's: Intercept=-1.755,  $p=0.189$ ), IL-6 (Begg-Mazumdar: Tau=-0.291,  $p=0.213$ ; Egger's: Intercept=-1.137,  $p=0.651$ ), IL-8 (Begg-Mazumdar: Tau=0.095,  $p=0.764$ ; Egger's: Intercept=-0.206,  $p=0.944$ ) and IL-10 (Begg-

Mazumdar: Tau=-0.133,  $p=0.707$  and Egger's: Intercept=-0.202,  $p=0.966$ ) analyses.

Table 2: Meta-analysis of inflammatory markers

BIOMARKER	AUD (n)	HEALTHY CONTROLS (n)	SMD (95% CI)	P value	Q statistics (DF; p values)	t <sup>2</sup>	I <sup>2</sup>
TNF- $\alpha$	366	315	0.588 (0.392-0.847)	<b>&lt;0.001</b>	25.635 (11; 0.007)	0.109	57.09%
IL-1	190	163	0.339 (-0.447-1.124)	0.398	30.367 (3; 1.156)	0.547	90.12%
IL -1RA	93	66	0.637 (-1.175-1.642)	0.340	13.837 (1; 0.000)	0.827	92.77%
IL-2	203	191	0.481 (0.394-1.356)	0.281	47.595 (3; 2.598)	0.735	93.69%
IL-4	173	150	0.233 (-1.175-1.642)	0.745	60.403 (2; 7.649)	1.471	96.69
IL-5	168	150	0.365 (-0.368-0.275)	0.500	33.906 (2; 4.339)	0.797	94.1%
IL-6	328	280	0.469 (-0.006-0.945)	0.053	70.370 (10; 3.761)	0.528	85.79%
IL-7	129	138	0.759	0.338	34.514	1.219	97.10%

---

			(-0.794-2.311)		(1; 4.231)		
IL-8	256	221	0.449	0.088	37.651	0.380	84.06%
			(-0.067-0.964)		(6; 0.000)		
IL-10	278	260	0.127	0.735	70.333	0.734	92.89%
			(-0.610-0.864)		(5; 8.737)		
IL-13	90	64	-0.196	0.233	0.268	0	0
			(-0.519-0.126)		(1; 0.605)		
IL-15	90	64	- 0.047	0.777	0.027	0	0
			(-0.368-0.275)		(1; 0.869)		
IFN $\gamma$	173	150	0.109	0.848	39.80	0.903	94.97%
			(-1.009-1.227)		(2; 2.282)		
sCD14	129	83	0.878	0.069	14.839	0.597	86.52%
			(-0.068-1.824)		(2; 0.000)		

---

Subgroups of sample type showed that plasma analysis increased the SMD of TNF- $\alpha$  and IL-6 to 0.620 (95% CI 0.280– -0.961) and 0.579 (95% CI -0.197– 1.356), respectively, while studies with serum no longer showed significant differences of TNF- $\alpha$  levels between AUD and HC ( $p=0.076$ ). For IL-6, both methods did not show significant differences between groups. See table 3 for more details of subgroup analyses.

Table 3: Subgroup analyses for sample type

	Number of studies	SMD	95% CI	p-value
TNF- $\alpha$				
Plasma	8	0.620	0.280– -0.961	0.000
Serum	3	0.517	-0.055 – 1.089	0.076
IL-6				
Plasma	5	0.579	-0.197– 1.356	0.144
Serum	5	0.407	-0.380 – 1.195	0.380

Age moderate the effect for IL-6 ( $p<0.0006$ ), with differences between groups among younger individuals, but not for TNF- $\alpha$ . Percentage of men and mean volume of alcohol ingestion did not moderate the effect for TNF- $\alpha$  or IL-6 (table 4).

For IL-6 and TNF- $\alpha$  we also did subgroup analyses for methods of cytokine assessment (ELISA or Multiplex), case selection (AUD or heavy drinkers), control selection (appropriate exclusion or not of former AUD or heavy drinkers from control group) and whether inflammatory diseases were explicitly excluded from both groups. However, each subgroup comprised less than 10 papers, making it



difficult to do sensitive analyses (that is, to exclude papers with confounding factors other than the one being considered for that subgroup). Therefore, it could have created biased results. In order to avoid misinterpretations of these analyses, we have decided to include it as supplementary information (tables S1-4) for consultation, as new studies can be added in future revisions of this meta-analysis.

Only a few studies assessed BMI <sup>10,11,21,23,24,26,32</sup> and liver enzymes <sup>11,22,29,32-34</sup> and almost all had similar mean values. Therefore, we could not perform subgroup analyses for these variables. Subgroups for psychiatric comorbidity, AUD symptom severity and days of abstinence could not be performed due to the small number of studies.

Table 4: Meta-regression for gender and age

	Number of studies	Beta	95% CI	p-value	R <sup>2</sup>
TNF- $\alpha$					
Men	10	0.007	-0.009 – 0.024	0.396	0.19
Age	8	-0.048	-0.109 – 0.013	0.124	0.53
Volume of alcohol	8	-0,002	-0.006 – 0.002	0.369	0.00
IL-6					
Men	8	0.019	-0.011 – 0.048	0.212	0.48
Age	8	-0.041	-0.022 – -0.061	0.0006	0.85
Volume of alcohol	6	-0.004	-0.010 – 0.003	0.291	0.25

#### 4. DISCUSSION:

This is the first meta-analysis comparing inflammatory markers between individuals with diagnosis of AUD and HC. Although inflammation has long been associated with alcohol consumption<sup>2</sup>, we have found that very few studies have focused on understanding its role in the progression and severity of alcohol use disorders. We have found that TNF- $\alpha$  is significantly increased in individuals with AUD in comparison to HC ( $p < 0,001$ ) and that IL 6 has a trend to statistical significance ( $p = 0.053$ ). Heterogeneity was high for almost all biomarkers and our meta-regressions and subgroup analyses could explain part of these discrepancies. Significant differences in TNF- $\alpha$  were found for plasma but not serum samples, suggesting that variation of methods and processing of cytokine may account as a source of heterogeneity. In addition, age moderated the effect for IL-6 suggesting that inflammation in AUD can be more evident among younger individuals.

TNF- $\alpha$  is a pro-inflammatory mediator of the innate immunologic response<sup>35</sup>. Several studies are showing the effects of this cytokine in the brain. It is related to inhibition of hippocampal neurogenesis, which could lead to atrophy and cognitive deficits, neurotoxicity induced by ethanol, as well as affective symptoms<sup>5,12,13,36,37</sup>. Studies on TNF- $\alpha$  and AUD are suggesting its role as a biomarker for illness duration and withdrawal symptoms severity<sup>22,23,38</sup>.

Studies in animals have shown that IL-6 modulates the consumption of alcohol. Higher levels of this cytokine are associated with increased preference or ingestion of alcohol and the opposite happens in IL-6 depleted mice<sup>7</sup>. In addition, IL-6 levels have been implicated with anxiety and depressive symptoms during

withdrawal, yet with conflicting results, and with comorbid depressive disorder<sup>23,39,40</sup>.

Another important factor in the discrepancy of cytokine concentration in different works is the variation of methods and processing of cytokine. The immunoassay used, the time of separation of plasma and serum, storage and number of freeze-thaw cycles can affect an adequate and reliable measurement of the cytokines<sup>41</sup>. In our results we found a significant difference in TNF- $\alpha$  in plasma but not in serum. In agreement, it was shown that serum and plasma are not interchangeable for multiplex assays in humans<sup>42</sup>. In a study that measured several cytokines on a biochip platform, including TNF- $\alpha$ , showed that plasma was more stable compared with serum and with less interference of processing factors, suggesting that plasma is a better matrix than serum for the evaluation of cytokines in clinical or research analyses<sup>43</sup>.

Specific changes in immune reactivity have been related to ageing in which a higher level of basal activity is found.<sup>44,45</sup> That may explain why our meta-regression showed that significant variations of IL-6 levels between AUD and HC were found only among younger samples. However, age did not moderate the effects for TNF- $\alpha$  levels, perhaps because of small number of studies, making it difficult to observe associations. Assessment of different age groups in future studies could help clarify this question.

Only a few studies included women in their samples and the total number of female participants was very low<sup>10,19,21,26,28,29</sup>. Studies on immunology have shown sex differences in cytokine expressions with females having stronger immune responses than males<sup>46,47</sup>. Nevertheless, animals' studies suggest that females are more vulnerable to the neurotoxic and neuroinflammatory effects of

ethanol<sup>48</sup>. Therefore, we cannot rule out the influence of this variable and future studies should separate analysis according to gender or perform single-gender studies, especially on women, as data are still scarce.

The amount of alcohol consumed did not moderate the results for TNF- $\alpha$  or IL-6. That is perhaps a reflex of lack of power, but other studies on biomarkers of AUD could not find an association with drinking behaviors either<sup>49,50</sup>. One possible explanation is that individual differences, such as genetics, would be more important than the volume of alcohol *per se*<sup>49</sup>.

Pre-clinical and clinical studies have shown increased levels of both pro-inflammatory (Th1) and anti-inflammatory (Th2) cytokines in AUD<sup>5,14</sup>. After an acute phase of Th1 response, and Th2 with a trophic, wound-healing function starts. This balance helps to prevent tissue damage and restores its integrity following an infection or trauma, although its effects in the brain are not clearly understood<sup>35</sup>.

High levels IL-1 may impact neuroplasticity and memory and may contribute to depressive disorder and binge drinking<sup>5,51,52</sup> while IL-8 role in alcoholics without hepatitis is controversial<sup>26,53</sup>. However, we did not find significant differences for these and other pro-inflammatory cytokines, perhaps because it was assessed by only a few studies.

We also did not find significant differences between Th2 cytokines (IL-4, 5, 10 and IL-13) in AUD and HC. This could mean that inappropriate anti-inflammatory response may contribute to the pro-inflammatory milieu found in AUD or that Th2 response would occur later in the course of the disorder. Nevertheless, more studies are needed to increase statistical power and clarify this question.

Because alcohol is known to cause some inflammatory diseases, such as hepatitis, we found a number of studies that were originally designed to assess this association. Although it resulted in a substantial quantity of titles found in the initial search, only a few comprised a subgroup of individuals with AUD without inflammatory disease to be eligible for inclusion<sup>19,21,25,27,29,30,32–34</sup>. It is of note that we did not exclude individuals with steatosis from our meta-analysis. In contrast to hepatitis, which is an acute and more severe form of ALD, steatosis is mild and can be diagnosed in 90% of individuals with AUD or heavy drinking<sup>2</sup>. Therefore, excluding it would limit the generalizability of our results. Besides, although injured hepatocytes can be a source of pro-inflammatory cytokines, we would consider it a confounding factor only if caused by an agent other than alcohol, as the brain can also be affected by systemic inflammation<sup>5,7</sup>.

A limitation found in studies on ALD was that, because volume of alcohol ingested per day is more relevant for organ damage than other criteria applied to evaluate AUD<sup>53</sup>, most of these studies did not carefully evaluate some other important variables, that is, severity of the disorder and how many days they had been on abstinence when sample was collected. However, the majority of studies designed to evaluate AUD did not give a detailed description of these elements either<sup>10,22,23,26,28,31</sup>. These are important information since immune signaling is being implicated in neuroprogression of other severe psychiatric disorders and the inflammatory response may vary whether alcohol is being consumed acute or chronically<sup>13,14,52</sup>.

Studies on inflammation and other severe mental illnesses have shown differences in immune signaling according to different features of the disorder. In schizophrenia, for example, studies have found increased inflammatory markers

during acute phase and return to normal levels after treatment with antipsychotics<sup>54</sup>. A meta-analysis on bipolar disorder and inflammation has shown different patterns of biomarker alterations for each phase of the disorder (that is, manic, depression or euthymia)<sup>55</sup>.

For substance use disorders, distinctive alterations in neurobiology have also been described<sup>4</sup>. According to Koob and Volkow (2010), addiction develops in three stages: intoxication/binge (incentive salience to substance use driven by positive reinforcement, that is, pleasure), negative affect/withdrawal (deficits in reward system and stress surfeit that leads to drug use to alleviate negative affect and other discomfort symptoms) and preoccupation/anticipation (deficit in executive function usually leading to impulsive behavior)<sup>4</sup>. Therefore, there may have important differences within and between individuals with AUD. In other words, one person may have increased biomarker levels during acute withdrawal syndrome but not after a few months of alcohol abstinence, and we may find individuals with both characteristics in a population of AUD. Assessing not only AUD diagnosis but also severity of disorder and alcohol consumption patterns (such as binge drinking or not, age at first use, years since problem use) would help to address this issue.

Finally, TNF- $\alpha$  levels are increased in schizophrenia and bipolar disorder and higher levels of IL-6 were found in post-traumatic stress disorder (PTSD), major depression and schizophrenia<sup>52,55-57</sup>. Because AUD is commonly comorbid with these disorders<sup>58</sup>, it would be important to evaluate whether psychiatric comorbidity moderated the results found in this meta-analysis. However, only four studies objectively excluded other psychiatric disorders<sup>10,11,24,28</sup> and three included depressive symptoms in the analyses<sup>11,23,24</sup>.

Our findings should be interpreted in light of some limitations. The small number of studies included in the meta-analysis may have restricted statistical power and prevented some important sensitive analyses. However, it has the strength to make a comprehensive search and selecting studies according to strict criteria to avoid finding biased results.

In conclusion, despite a large amount of evidence for alcohol and inflammatory diseases, there is still a lack of studies assessing the role of neuroimmune signaling in the development and severity of AUD. Our findings suggest that future studies should evaluate patterns of alcohol consumption thoroughly, as well as the other variables discussed above, in order to avoid confounding factors and permit a more comprehensive understanding of inflammation and AUD.

### **Acknowledgments**

We thank Dr. Michael Irwin, Dr. Sophie Leclercq and Dr. Yusuf Ransome for providing us with the data and details of their studies.

### **References**

1. Hingson, R. & Rehm, J. Measuring the Burden: Alcohol's Evolving impact. *Alcohol Res.* **35**, 122–127 (2014).
2. Osna, N. A., Donohue, T. M. & Kharbanda, K. K. Alcoholic Liver Disease : Pathogenesis and Current Management. **38**, 7–21 (2017).
3. Brière, F. N., Rohde, P., Seeley, J. R., Klein, D. & Lewinsohn, P. M. Comorbidity between major depression and alcohol use disorder from adolescence to adulthood. *Compr. Psychiatry* **55**, 526–533 (2014).
4. Koob, G. F. & Volkow, N. D. Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology* **35**, 217–238 (2010).
5. Crews, F. T., Lawrimore, C. J., Walter, T. J. & Coleman, L. G. The role of neuroimmune signaling in alcoholism. *Neuropharmacology* **122**, 56–73

- (2017).
6. Modabbernia, A., Taslimi, S., Brietzke, E. & Ashrafi, M. Cytokine alterations in bipolar disorder: A meta-analysis of 30 studies. *Biol. Psychiatry* **74**, 15–25 (2013).
  7. Dowlati, Y. *et al.* A Meta-Analysis of Cytokines in Major Depression. *Biol. Psychiatry* **67**, 446–457 (2010).
  8. Passos, I. C. *et al.* Inflammatory markers in post-traumatic stress disorder: A systematic review, meta-analysis, and meta-regression. *The Lancet Psychiatry* **2**, 1002–1012 (2015).
  9. Miller, B. J., Buckley, P., Seabolt, W., Mellor, A. & Kirkpatrick, B. Meta-analysis of cytokine alterations in schizophrenia: Clinical status and antipsychotic effects. *Biol. Psychiatry* **70**, 663–671 (2011).
  10. Réus, G. Z. *et al.* The role of inflammation and microglial activation in the pathophysiology of psychiatric disorders. *Neuroscience* **300**, 141–154 (2015).
  11. Bishehsari, F. *et al.* Alcohol and Gut-Derived Inflammation. *ALCOHOL Res.* **38**, 1–9 (2017).
  12. Leclercq, S., de Timary, P., Delzenne, N. M. & Stärkel, P. The link between inflammation, bugs, the intestine and the brain in alcohol dependence. *Transl. Psychiatry* **7**, e1048 (2017).
  13. Timary, P. De, Starkel, P., Delzenne, N. M. & Leclercq, S. A role for the peripheral immune system in the development of alcohol use disorders? *Neuropharmacology* **122**, 148–160 (2017).
  14. Barr, T., Helms, C., Grant, K. & Messaoudi, I. Opposing effects of alcohol on the immune system. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* **65**, 242–251 (2016).
  15. Zahr, N. M. Peripheral TNF $\alpha$  elevations in abstinent alcoholics are associated with hepatitis C infection. *PLoS One* **13**, 1–24 (2018).
  16. Yen, C.-H. *et al.* Differential cytokine levels between early withdrawal and remission states in patients with alcohol dependence. *Psychoneuroendocrinology* **76**, 183–191 (2017).
  17. Crews, F. T. *et al.* Cytokines and alcohol. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **30**, 720–730 (2006).
  18. Crews, F. T. *et al.* Neuroimmune Function and the Consequences of



- Alcohol Exposure. *Alcohol Res. Curr. Rev.* **37**, 331–351 (2015).
19. Neupane, S. P. Neuroimmune interface in the comorbidity between alcohol use disorder and major depression. *Front. Immunol.* **7**, (2016).
  20. Shamseer, L. *et al.* PRISMA-P (Preferred Reporting Items for Systematic review and Meta-Analysis Protocols ) 2015 checklist : recommended items to address in a systematic review protocol. *Bmj* **349**, g7647–g7647 (2015).
  21. Zhao, J., Stockwell, T., Roemer, A. & Chikritzhs, T. Is alcohol consumption a risk factor for prostate cancer ? A systematic review and meta – analysis. *BMC Cancer* 1–13 (2016) doi:10.1186/s12885-016-2891-z.
  22. Stockwell, T. & Zhao, J. Alcohol’s contribution to cancer is underestimated for exactly the same reason that its contribution to cardioprotection is overestimated. *Addiction* **112**, 230–232 (2017).
  23. Dersimonian, R. & Laird, N. Meta-Analysis in Clinical Trials \*. **188**, 177–188 (1986).
  24. Liu, Y. *et al.* Lipopolysaccharide downregulates macrophage-derived IL-22 to modulate alcohol-induced hepatocyte cell death. *Am. J. Physiol. Physiol.* **313**, C305–C313 (2017).
  25. Maes, M. *et al.* Serotonin-immune interactions in detoxified chronic alcoholic patients without apparent liver disease: activation of the inflammatory response system and lower plasma total tryptophan. *Psychiatry Res.* **78**, 151–161 (1998).
  26. Naveau, S. *et al.* Plasma levels of soluble tumor necrosis factor receptors p55 and p75 in patients with alcoholic liver disease of increasing severity. *J. Hepatol.* **28**, 778–784 (1998).
  27. Naveau, S. *et al.* Balance between pro and anti-inflammatory cytokines in patients with acute alcoholic hepatitis. *Gastroenterol. Clin. Biol.* **29**, 269–274 (2005).
  28. Nikou, T. *et al.* Alteration in the concentrations of Interleukin-7 (IL-7), Interleukin-10 (IL-10) and Granulocyte Colony Stimulating Factor (G-CSF) in alcohol-dependent individuals without liver disease, during detoxification therapy. *Drug Alcohol Depend.* **163**, 77–83 (2016).
  29. Soyly, A. R. *et al.* The role of serum cytokines in the pathogenesis of hepatic osteodystrophy in male cirrhotic patients. *Gastroenterol. Res. Pract.* **2012**, 425079 (2012).

30. Urbaschek, R. *et al.* Endotoxin, endotoxin-neutralizing-capacity, sCD14, sICAM-1, and cytokines in patients with various degrees of alcoholic liver disease. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **25**, 261–268 (2001).
31. Vidali, M. *et al.* Immune responses against oxidative stress-derived antigens are associated with increased circulating tumor necrosis factor- $\alpha$  in heavy drinkers. *Free Radic. Biol. Med.* **45**, 306–311 (2008).
32. Bird, G. L., Sheron, N., Goka, A. K., Alexander, G. J. & Williams, R. S. Increased plasma tumor necrosis factor in severe alcoholic hepatitis. *Ann. Intern. Med.* **112**, 917–920 (1990).
33. Di Gennaro, C. *et al.* Endothelial dysfunction and cardiovascular risk profile in long-term withdrawing alcoholics. *J. Hypertens.* **25**, 367–373 (2007).
34. Garcia-Valdecasas-Campelo, E. *et al.* Brain atrophy in alcoholics: relationship with alcohol intake; liver disease; nutritional status, and inflammation. *Alcohol Alcohol* **42**, 533–538 (2007).
35. Kiefer, F., Jahn, H., Schick, M. & Wiedemann, K. Alcohol intake, tumour necrosis factor- $\alpha$ , leptin and craving: factors of a possibly vicious circle? *Alcohol Alcohol* **37**, 401–404 (2002).
36. Heberlein, A. *et al.* TNF- $\alpha$  and IL-6 serum levels: neurobiological markers of alcohol consumption in alcohol-dependent patients? *Alcohol* **48**, 671–676 (2014).
37. Irwin, M. *et al.* Nocturnal proinflammatory cytokine-associated sleep disturbances in abstinent African American alcoholics. *Brain. Behav. Immun.* **18**, 349–360 (2004).
38. Laso, F. J. *et al.* Increased interleukin-12 serum levels in chronic alcoholism. *J. Hepatol.* **28**, 771–777 (1998).
39. Leclercq, S., De Saeger, C., Delzenne, N., de Timary, P. & Starkel, P. Role of inflammatory pathways, blood mononuclear cells, and gut-derived bacterial products in alcohol dependence. *Biol. Psychiatry* **76**, 725–733 (2014).
40. Leclercq, S. *et al.* Role of intestinal permeability and inflammation in the biological and behavioral control of alcohol-dependent subjects. *Brain. Behav. Immun.* **26**, 911–918 (2012).
41. Neupane, S. P. *et al.* High frequency and intensity of drinking may attenuate increased inflammatory cytokine levels of major depression in

- alcohol-use disorders. *CNS Neurosci. Ther.* **20**, 898–904 (2014).
42. Abbas, A. K., Murphy, K. M. & Sher, A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* **383**, 787–793 (1996).
  43. Baune, B. T. *et al.* Tumor necrosis factor gene variation predicts hippocampus volume in healthy individuals. *Biol. Psychiatry* **72**, 655–662 (2012).
  44. Crews, F. *et al.* BHT blocks NF- $\kappa$ B activation and ethanol-induced brain damage. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **30**, 1938–1949 (2006).
  45. Heberlein, A. *et al.* Joint Effects of the Epigenetic Alteration of Neurotrophins and Cytokine Signaling: A Possible Exploratory Model of Affective Symptoms in Alcohol-Dependent Patients? *Alcohol Alcohol* **52**, 277–281 (2017).
  46. Gruen, M. E. *et al.* A comparison of serum and plasma cytokine values using a multiplexed assay in cats. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **182**, 69–73 (2016).
  47. Chaturvedi, A. K. *et al.* Evaluation of multiplexed cytokine and inflammation marker measurements: A methodologic study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* (2011) doi:10.1158/1055-9965.EPI-11-0221.
  48. Guo, G. H., Dong, J., Yuan, X. H., Dong, Z. N. & Tian, Y. P. Clinical evaluation of the levels of 12 cytokines in serum/plasma under various storage conditions using evidence biochip arrays. *Mol. Med. Rep.* (2013) doi:10.3892/mmr.2013.1263.
  49. Giefing-Kröll, C., Berger, P., Lepperdinger, G. & Grubeck-Loebenstien, B. How sex and age affect immune responses, susceptibility to infections, and response to vaccination. *Aging Cell* **14**, 309–321 (2015).
  50. Boraschi, D. *et al.* The gracefully aging immune system. *Sci. Transl. Med.* **5**, 185ps8 (2013).
  51. Ortona, E., Pierdominici, M. & Rider, V. Editorial: Sex Hormones and Gender Differences in Immune Responses. *Front. Immunol.* **10**, 1–2 (2019).
  52. Brown, M. A. & Su, M. A. An Inconvenient Variable: Sex Hormones and Their Impact on T Cell Responses. *J. Immunol.* **202**, 1927–1933 (2019).
  53. Alfonso-Loeches, S., Pascual, M. & Guerri, C. Gender differences in alcohol-induced neurotoxicity and brain damage. *Toxicology* **311**, 27–34

- (2013).
54. Martins de Carvalho, L. *et al.* Effect of alcohol use disorder on cellular aging. *Psychopharmacology (Berl)*. (2019) doi:10.1007/s00213-019-05281-5.
  55. Pavanello, S. *et al.* Shortened telomeres in individuals with abuse in alcohol consumption. *Int. J. Cancer* **129**, 983–992 (2011).
  56. Réus, G. Z. *et al.* Neurochemical correlation between major depressive disorder and neurodegenerative diseases. *Life Sci.* **158**, 121–129 (2016).
  57. Gao, B., Ahmad, M. F., Nagy, L. E. & Tsukamoto, H. Inflammatory pathways in alcoholic steatohepatitis. *J. Hepatol.* **70**, 249–259 (2019).
  58. Dowlati, Y. *et al.* A Meta-Analysis of Cytokines in Major Depression. *Biol. Psychiatry* **67**, 446–457 (2010).
  59. Plana-Ripoll, O. *et al.* Exploring Comorbidity Within Mental Disorders Among a Danish National Population. *JAMA psychiatry* **8210**, 1–12 (2019).

## Data search

Keywords and number of studies found in each database.

PUBMED (inception to 18<sup>th</sup> February 2019): 9,361 citations

(Alcohol related disorder [MESH] OR Alcohol dependence[MESH] OR Alcohol abuse[MESH] OR Alcohol addiction[MESH] OR Alcoholi\*) AND (Inflammation OR "Inflammatory markers" OR Cytokine OR Interleukin OR IL OR Interferon OR IFN OR "C-Reactive Protein" OR CRP OR "Tumor necrosis factor" OR TNF OR Chemokine OR "Transforming growth factor" OR TGF OR Lymphocyte OR Macrophage OR Microglia) NOT (Review[ptyp] OR meta-analysis)

EMBASE (inception to 18<sup>th</sup> February 2019): 2,258

('alcohol related disorder':ti,ab,kw OR 'alcohol dependence':ti,ab,kw OR 'alcohol abuse':ti,ab,kw OR 'alcoholism':ti,ab,kw) AND ('inflammation':ti,ab,kw OR 'inflammatory markers':ti,ab,kw OR 'cytokine':ti,ab,kw OR 'interleukin':ti,ab,kw OR 'il':ti,ab,kw OR 'interferon':ti,ab,kw OR 'ifn':ti,ab,kw OR 'c-reactive protein':ti,ab,kw OR 'crp':ti,ab,kw OR 'tumor necrosis factor':ti,ab,kw OR 'tnf':ti,ab,kw OR 'chemokine':ti,ab,kw OR 'transforming growth factor':ti,ab,kw OR 'tgf':ti,ab,kw OR 'lymphocyte':ti,ab,kw OR 'macrophage':ti,ab,kw OR 'microglia':ti,ab,kw) NOT ('review':ti,ab,kw OR 'meta analysis':ti,ab,kw)

WEB OF SCIENCE (inception to 18<sup>th</sup> February 2019): 7,030

("Alcohol related disorder" OR "Alcohol dependence" OR "Alcohol abuse" OR "Alcohol addiction" OR Alcoholi\*) AND (Inflammation OR "Inflammatory markers" OR Cytokine OR Interleukin OR IL OR Interferon OR IFN OR "C-Reactive Protein" OR CRP OR "Tumor necrosis factor" OR TNF OR Chemokine OR

"Transforming growth factor" OR TGF OR Lymphocyte OR Macrophage OR Microglia) NOT (Review OR meta-analysis)

PSYCINFO (inception to 18<sup>th</sup> February 2019): 3,137

("Alcohol related disorder" OR "Alcohol dependence" OR "Alcohol abuse" OR "Alcohol addiction" OR Alcoholi\*) AND (Inflammation OR "Inflammatory markers" OR Cytokine OR Interleukin OR IL OR Interferon OR IFN OR "C-Reactive Protein" OR CRP OR "Tumor necrosis factor" OR TNF OR Chemokine OR "Transforming growth factor" OR TGF OR Lymphocyte OR Macrophage OR Microglia) NOT (Review OR meta-analysis)

Table S1: Methods of cytokine assessment

	Number of studies	SMD	95% CI	p-value
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>				
Multiplex	6	0.75	0.31 – 1.2	0.0009
ELISA	8	0.5	0.17 – 0.82	0.005
<b>IL-6</b>				
Multiplex	4	0.51	-0.033– 1.36	0.24
ELISA	7	0.44	-0.20 – 1.09	0.18

Key: ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay

S2: Subgroup of case selection for TNF- $\alpha$  and IL 6

	Number of studies	SMD	95% CI	p-value
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>				
AUD	6	0.66	0.29 – 1.03	0.0005
Heavy Drinkers	6	0.46	0.14 – 0.78	0.005
<b>IL-6</b>				
AUD	6	0.50	-0.032– 1.32	0.23
Heavy Drinkers	5	0.44	0.14 – 0.73	0.004

Key: AUD = alcohol use disorder

S3: Subgroup of control selection for TNF- $\alpha$  and IL 6

	Number of studies	SMD	95% CI	p-value
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>				
AUD/Heavy drinkers excluded	4	0.60	0.32 – 0.88	< 0.0001
Not specified	8	0.54	0.15 – 0.92	0.007
<b>IL-6</b>				
AUD/Heavy drinkers excluded	4	0.25	- 0.34– 0.84	0.41
Not specified	7	0.57	0.01 – 1.14	0.05

Key: Selection of controls based on exclusion of current diagnosis of alcohol use disorder (AUD) or heavy drinking

Table S4: Subgroup of studies according to exclusion of inflammatory diseases for TNF- $\alpha$  and IL 6

	Number of studies	SMD	95% CI	p-value
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>				
Diseases excluded	7	0.62	0.39 – 0.85	< 0.00001
Not specified	5	0.39	-0.21 – 0.98	0.20
<b>IL-6</b>				
Diseases excluded	7	0.30	-0.10 – 0.70	0.14
Not specified	4	0.69	-0.17 – 1.54	0.12

Table S5: Quality of studies assessed with the Newcastle-Ottawa quality assessment scale for case control studies

AUTHOR	Is the Case Definition Adequate?	Representativeness of Cases	Selection of Controls	Definition of Controls	Comparability Age	Comparability Sex	Ascertainment of Exposure	Same method of ascertainment for cases and controls	Non-Response Rate	Total
Bird et al., 1990	A (+1*)	A (+1*)	A (+1*)	B (0*)	No (0*)	No (0*)	A (+1*)	Yes (+1*)	C (0*)	5

Di Gennaro et al., 2007	A (+1*)	A (+1*)	A (+1*)	B (0*)	Yes (+1*)	Yes (1*)	A (+1*)	Yes (+1*)	C (0*)	7
Garcia-Valdecasas-Campelo et al., 2007	B (0*)	A (+1*)	A (+1*)	B (0*)	Yes (+1*)	Yes (1*)	A (+1*)	Yes (+1*)	C (0*)	6
Heberlein et al., 2014	A (+1*)	A (+1*)	B (0*)	B (0*)	Yes (+1*)	Yes (1*)	A (+1*)	Yes (+1*)	C (0*)	6
Irwin et al., 2004	A (+1*)	A (+1*)	A (+1*)	B (0*)	Yes (+1*)	Yes (1*)	A (+1*)	Yes (+1*)	B (0*)	7
Kiefer et al., 2002	B (0*)	A (+1*)	B (0*)	B (0*)	Yes (+1*)	Yes (1*)	A (+1*)	Yes (+1*)	A (+1*)	6
Laso et al., 1998	A (+1*)	A (+1*)	B (0*)	B (0*)	Yes (+1*)	Yes (1*)	A (+1*)	Yes (+1*)	C (0*)	6
Leclercq et al., 2014	A (+1*)	A (+1*)	B (0*)	B (0*)	Yes (+1*)	Yes (1*)	A (+1*)	Yes (+1*)	C (0*)	6
Liu et al., 2017	A (+1*)	A (+1*)	B (0*)	B (0*)	No (0*)	No (0*)	A (+1*)	Yes (+1*)	C (0*)	4
Maes et al., 1998	A (+1*)	B (0*)	B (0*)	B (0*)	Yes (+1*)	Yes (+1*)	A (+1*)	Yes (+1*)	A (+1*)	6
Naveau et al., 1998	A (+1*)	B (0*)	B (0*)	B (0*)	No (0*)	No (0*)	A (+1*)	Yes (+1*)	C (0*)	3
Naveau et al., 2005	A (+1*)	A (+1*)	B (0*)	B (0*)	No (0*)	No (0*)	A (+1*)	Yes (+1*)	C (0*)	4
Nikou et al. 2016	B (0*)	A (+1*)	B (0*)	B (0*)	Yes (+1*)	No (0*)	A (+1*)	Yes (+1*)	C (0*)	4
Soylu et al., 2012	B (0*)	A (+1*)	B (0*)	B (0*)	Yes (+1*)	Yes (+1*)	A (+1*)	Yes (+1*)	A (+1*)	6
Urbaschek et al., 2001	B (0*)	B (0*)	B (0*)	B (0*)	No (0*)	No (0*)	A (+1*)	Yes (+1*)	A (+1*)	3
Vidali et al., 2008	A (+1*)	A (+1*)	B (0*)	B (0*)	Yes (+1*)	Yes (+1*)	A (+1*)	Yes (+1*)	C (0*)	6
Yen et al., 2017	A (+1*)	A (+1*)	B (0*)	B (0*)	Yes (+1*)	Yes (+1*)	A (+1*)	Yes (+1*)	C (0*)	6
Zahr, 2018	A (+1*)	A (+1*)	A (+1*)	B (0*)	Yes (+1*)	No (0*)	A (+1*)	Yes (+1*)	C (0*)	6

Key: The scoring of each item to the total of the study quality assessment is represented between each parenthesis. Methods for measurement of inflammatory markers were considered for the item “ascertainment of exposure”. For the item “definition of controls”, the criteria for B (0\*) was no description of exclusion of lifetime alcohol use disorder or heavy drinking.



## 6 ARTIGO 2

Este artigo seria submetido na Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry (Fator de impacto = 4.361; Qualis A1), porém optou-se por refazê-lo com uma amostra maior em colaboração com outros grupos

### **Effects of crack cocaine use disorder and childhood trauma on telomere length among men**

Helena Ferreira Moura<sup>1,2</sup>, Jaqueline Bohrer Schuch<sup>1,2</sup>, Felipe Ornell<sup>1,2</sup>, Daniela Benzano<sup>1,2</sup>, Cibele Edom Bandeira<sup>3,4</sup>, Junior Pacer<sup>3</sup>, Bruna Santos da Silva<sup>3,4</sup>, Rodrigo Grassi-Oliveira<sup>5</sup>, Diego Luiz Rovaris<sup>6</sup>, Claiton Henrique Dotto Bau<sup>3,4</sup>, Eugenio Horácio Grevet<sup>1,4</sup>, Anderson Ravy Stolf<sup>7</sup>, Raffael Massuda<sup>8</sup>, Flavio Pechansky<sup>1,2</sup>, Felix H. P. Kessler<sup>1,2</sup>, Lisia von Diemen<sup>1,2</sup>

1. Graduate Program in Psychiatry and Behavioral Sciences, Department of Psychiatry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), RS, Brazil
2. Center for Drug and Alcohol Research, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), RS, Brazil
3. Department of Genetics, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil
4. ADHD Outpatient Program, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil
5. Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil
6. Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.
7. Faculty of Medicine, Federal University of Mato Grosso (UFMS)
8. Department of Psychiatry, Federal University of Paraná (UFPR), PR, Brazil

Corresponding author:

Lisia von Diemen  
 Ramiro Barcelos 2350  
 Zip Code: 90035-903  
 + 55 51 99968-7698  
 Porto Alegre – RS, Brazil  
 ldiemen@hcpa.edu.br

**Abstract**

**Background:** Telomere length (TL) is an important biomarker of aging and this process seems to be accelerated by childhood trauma and substance use. However, little is known about crack cocaine use disorder (CUD) and TL. Therefore, our aim was to investigate the influence of cocaine addiction and childhood trauma on TL in a male sample of CUD and compare to healthy controls (HC). Also, the impact of severity of CUD and clinical characteristics on TL was also evaluated.

**Methods:** Peripheral blood samples were collected from a male sample of 219 individuals with CUD and 217 HC. Patients were selected from detoxification unities and assessed with the Addiction Severity Index Scale (ASI-6) and childhood trauma questionnaire (CTQ). HC had no current or lifetime diagnosis of any substance use disorder. TL ratio was measured in triplicates using quantitative multiplex PCR.

**Results:** Telomere length did not differ between individuals with CUD and HC ( $p=0.094$ ). History of trauma was more prevalent in individuals with CUD than controls (57.1% vs 30%,  $p<0.001$ ). Subsequent analysis considering the presence of childhood trauma showed that compared to HC without trauma, shorter TL were observed in HC with trauma ( $p=0.018$ ) and CUD with trauma ( $p=0.018$ ). No associations were found between TL and other data related to drug use.

**Conclusions:** Our findings suggest that the presence of childhood trauma, rather than CUD, has a crucial effect on TL. The combined effect of trauma and CUD, as well as the amount or chronicity of crack cocaine use, did not seem to impact TL.

**Key words:** crack cocaine; telomere; addiction, drug dependence

## 1. Introduction

Telomeres are structures at the end of chromosomes that maintain DNA stability, and telomere attrition has been associated with the emergence of age-related diseases, such as diabetes and cancer <sup>1,2</sup>. A growing body of evidence links telomere shortening to many psychiatric disorders <sup>3-6</sup>. A recent meta-analysis found that telomere length (TL) was significantly shorter in substance use disorder (SUD) <sup>7</sup>. Studies have focused mainly on alcohol or cocaine use <sup>8-12</sup>, although others have analyzed samples with mixed substances <sup>13,14</sup>. Regarding crack cocaine addiction, only one study was conducted so far <sup>8</sup>, in which shorter TL was observed in women with cocaine use disorder (CUD) compared to controls. This study also suggests a deleterious effect of the presence of childhood trauma on TL.

The presence of childhood trauma is a relevant risk factor for psychiatric disorders and is highly prevalent in CUD <sup>8</sup>. Previous studies in healthy individuals have shown an association of shortened TL with the presence of childhood trauma <sup>15-17</sup>. However, in the context of drug addiction, this evidence is still scarce and conflicting <sup>8,11</sup>. Our hypothesis is that the combined presence of child trauma and CUD may have a greater impact on TL. Furthermore, other factors such as severity of addiction, sex, age, and clinical heterogeneity may also impact the telomere measurement. But there is a lack of studies assessing the influence of clinical characteristics of SUD, such as patterns of use and age of first use, on TL. Therefore, our aim was to investigate the influence of cocaine addiction and childhood trauma on TL in a sample of men with CUD and healthy controls (HC). Also, the impact of severity of CUD and clinical characteristics on TL was also evaluated.

## **2. Methods:**

### *2.1 Participants*

A sample of 219 men with CUD was selected at specialized public unities for voluntary alcohol and drug detoxification from Porto Alegre, Southern Brazil. Blood was collected after 1 to 2 days of hospitalization. The control group (HC) comprised 217 age matched healthy individuals from either the general population or blood donors from the Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Cases were assessed with Mini-Mental State Examination (MMSE) <sup>18</sup> for eligibility criteria. Diagnosis of CUD follows the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 4<sup>a</sup> edition (DSM-IV) criteria <sup>19</sup>. Addiction Severity Index-6 (ASI-6) was used to evaluate severity of substance use, including age at first use, years of use and associated clinical and psychosocial problems <sup>20</sup>. Cases and controls were assessed for the presence of psychiatric disorders using the Mini International Neuropsychiatric Interview (MINI) <sup>21</sup> or a screening version of the Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders (SCID-I) <sup>22</sup>. Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD) was screened using the Adult Self-Report Scale (ASRS) <sup>23</sup>. Early life trauma was assessed with the Brazilian version of Childhood Trauma Questionnaire (CTQ) <sup>24</sup> for which both continuous (scores) and categorical data were available. Presence of childhood trauma was characterized by the presence of moderate or severe scores in any type of trauma, including emotional abuse or neglect, physical abuse or neglect and sexual abuse.

Cases must have had crack cocaine as the main substance of abuse and the reason for hospitalization. Healthy controls had no current or lifetime

substance use disorder. Individuals must have had  $\geq 18$  years old. Individuals with cognitive impairment or Mini-Mental State Examination (MMSE) score  $< 18$ , unable to complete the questionnaire and with current psychotic symptoms or suicide risk were excluded.

## *2.2 Telomere Measurement*

Genomic DNA was extracted from peripheral blood using salting out technique <sup>25</sup> or Pure Link Genomic DNA kit (Invitrogen, Carlsbad, California, USA). Telomere length was measured in triplicate using multiplex quantitative PCR (qPCR) in Rotor-Gene Q (Qiagen, Hilden, Germany), as described by Cawthon <sup>26</sup> (full description in supplemental material). Briefly, this protocol measures the T/S ratio and involves the evaluation of the telomere repeat copy number to a single-copy gene copy number (i.e.: albumin gene) using a standard curve.

## *2.3 Ethical Approval*

All participants signed an informed consent before inclusion in the research. The study was approved by the HCPA Research Ethics Committee (GPPG HCPA: 2018-0488 and GPPG 16-0600) and by the National Commission of Ethics in Research.

## *2.4 Statistical Analysis*

Chi-square and Mann-Whitney tests were performed to compare demographic data, clinical characteristics, and childhood trauma between cases and controls. TL of individuals with CUD and HC were compared using Student's

t-test and ANCOVA adjusted for skin color, age and CTQ total scores. Given prior evidence of the influence of early life stress on TL, cases and controls were also compared considering the presence or absence of childhood trauma. For this analysis TL data was compared between four groups (cases with trauma, cases without trauma, controls with trauma and controls without trauma) using ANCOVA and adjusted for skin color and age. In addition, the effect of different types of trauma (no trauma, only abuse, only neglect, abuse+neglect) on TL was analyzed with one-way ANOVA in the CUD group.

Linear regression models were performed to analyze the relationship between TL and clinical characteristics, including age, childhood trauma, and psychiatric comorbidities, adjusted by the case control status. Data regarding drug use, including age of first crack cocaine use, years of crack cocaine use and severity of addiction, and their relationship with TL was also analyzed using linear regression models. A severity score of crack cocaine use was estimated considering data on years of crack cocaine use and age of first crack cocaine use. Years of crack cocaine use was valued as 1 point per year. First crack cocaine use at age 11 years old was valued 10 points, with a reduction of 1 point per year, reaching 0 point at age of 21 and above. The rationale for considering 21 years old were the evidence of higher severity of substance use below this age<sup>27</sup>. Then, this score was dichotomized by the median and TL was compared among those lower versus higher severity of crack cocaine use. In all analyses, a significance level of 5% was adopted.

### **3. Results:**

Demographic and clinical characteristics of cases and controls are described in **Table 1**. Individuals with CUD had significantly more childhood trauma than controls ( $p < 0.001$ , **Table 1**), especially regarding physical and emotional abuse ( $p < 0.001$ , **Supplementary table S1**). Linear regression analysis showed an effect of childhood trauma scores ( $B = -0.003$ ,  $p = 0.010$ ) on TL (**Supplementary table S2**). No other clinical characteristic, including tobacco use and psychiatric comorbidities, has shown significant results regarding TL.

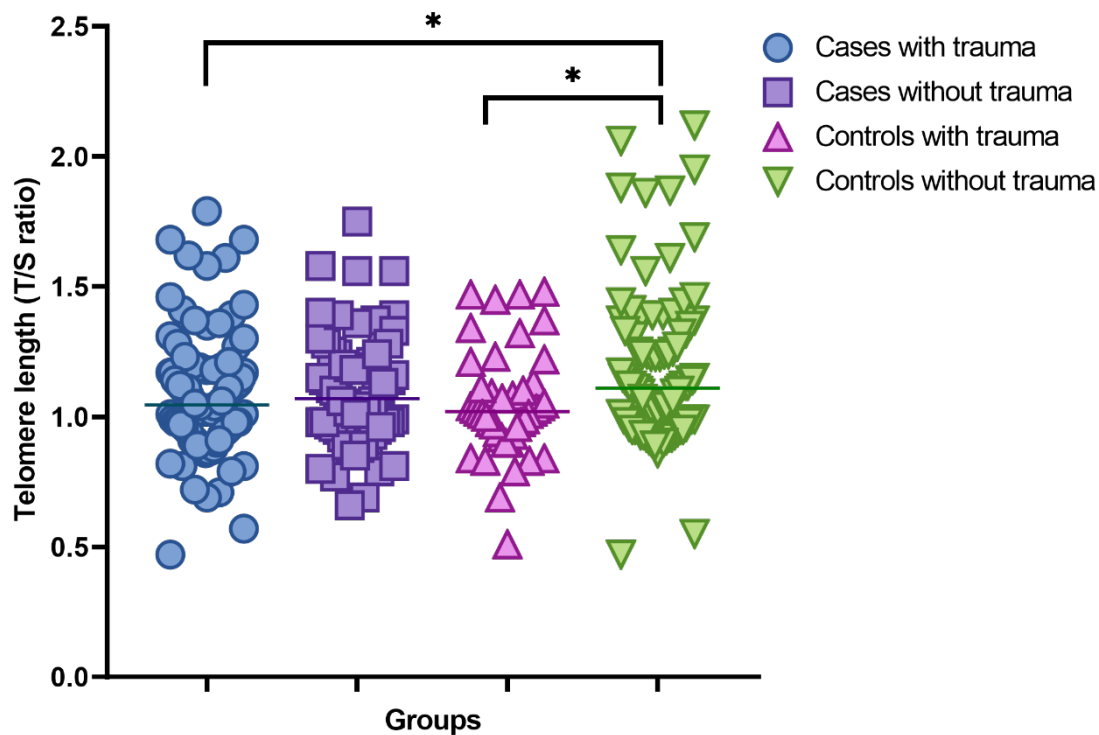
Telomere length did not differ between CUD and HC ( $p = 0.094$ , Table 1), even adjusting for age, skin color and CTQ total scores (CUD mean=1.09 and SD=0.22; HC mean=1.13 and SD=0.27;  $p = 0.288$ ). Subsequent analysis considering the presence of childhood maltreatment detected statistically significant differences between groups ( $p = 0.038$ ). Compared to HC without trauma, shorter TL were observed in HC with trauma ( $p = 0.018$ ) and CUD with trauma ( $p = 0.018$ ). No other significant differences were found between groups ( $p > 0.05$ , **Figure 1**).

**Table 1.** Sample characteristics

	<b>CUD (N=219)</b>	<b>HC (N=217)</b>	<b>p-value</b>
<b>Telomere length (T/S ratio)</b>	1.09 ± 0.2	1.14 ± 0.3	0.094
<b>Age</b>	29 [24-35]	30 [24-36]	0.567
<b>Years of regular use</b>	22 [17-28]	-	-
<b>Age of first use</b>	16 [14-19]	-	-
<b>ASI-6 (Drug score)</b>	53.13 ± 6.1	-	-
<b>Crack cocaine severity score</b>	11 [7-16]	-	-
<b>CTQ scores</b>	40 [32-50]	32 [28-39.5]	<b>&lt;0.001</b>
<b>Emotional abuse</b>	9 [6-13]	6 [5-9]	<b>&lt;0.001</b>
<b>Emotional neglect</b>	9 [7-13]	8 [6-11]	<b>0.005</b>
<b>Physical abuse</b>	8 [6-11]	6 [5-7]	<b>&lt;0.001</b>
<b>Physical neglect</b>	7 [5-9]	6 [5-7.5]	<b>0.003</b>
<b>Sexual abuse</b>	5 [5-5]	5 [5-5]	0.562
<b>Childhood trauma</b>	92 (57.1)	43 (30.0)	<b>&lt;0.001</b>
<b>Skin color</b>			0.462
<b>White</b>	139 (63.5)	146 (67.3)	
<b>Non-white</b>	80 (36.5)	71 (32.7)	
<b>Schooling</b>			<b>&lt;0.001</b>
<b>&lt; secondary school</b>	133 (60.7)	55 (25.3)	
<b>&gt; secondary school</b>	86 (39.3)	162 (74.7)	
<b>Major Depressive disorder (lifetime)</b>	48 (23.3)	24 (11.3)	<b>0.002</b>
<b>Bipolar disorder (lifetime)</b>	98 (47.6)	16 (7.5)	<b>&lt;0.001</b>
<b>ADHD symptoms</b>	61 (29.5)	23 (10.9)	<b>0.001</b>
<b>Antisocial personality disorder</b>	81 (39.9)	7 (3.3)	<b>&lt;0.001</b>
<b>Tobacco use (current)</b>	166 (75.8)	29 (13.4)	<b>&lt;0.001</b>

Data are as mean ± standard deviation, median [interquartile range] or N (%). CTQ= Childhood Trauma Questionnaire; ADHD= Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. CTQ (N): 163 CUD and 145 HC; Depressive and Bipolar Disorder (N): 206 CUD and 213 HC; ADHD (N): 207 CUD and 211 HC.

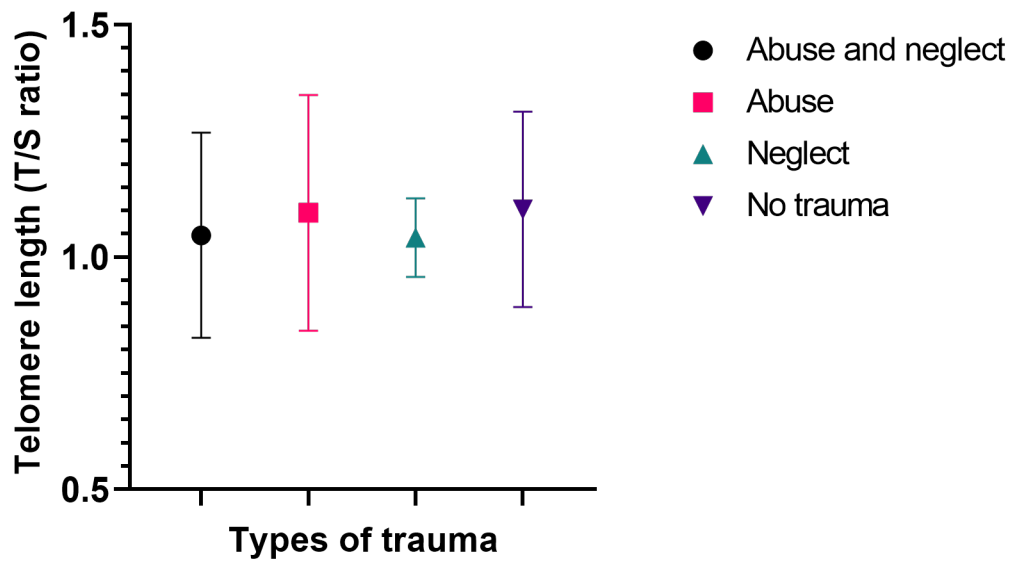




**Figure 1.** Association between childhood trauma and telomere length in crack cocaine users and controls. Analysis adjusted for skin color and age. TL (mean and standard deviation) – HC without trauma: ( $1.17 \pm 0.02$ ); HC with trauma: ( $1.06 \pm 0.04$ ); CUD without trauma: ( $1.10 \pm 0.03$ ); CUD with trauma: ( $1.08 \pm 0.03$ ).

\*  $p=0.018$

Among individuals with CUD, TL did not differ according to type of trauma ( $p=0.966$ ; **Figure 2**). Regarding substance use data, age of first crack cocaine use ( $p=0.662$ ), years of crack cocaine use ( $p=0.921$ ) and ASI-6 Drugs score ( $p=0.258$ ) were not associated with TL (**Supplementary table S3**). Moreover, no differences in TL were found among CUD according to severity of crack cocaine use (mean= $1.08$ , SD= $0.23$  for those below the median; and mean= $1.10$ , SD= $0.24$  for those above the median;  $p=0.659$ ).



**Figure 2.** Influence of type of trauma on TL in individuals with CUD. Data presented as mean and standard deviation. Abuse and neglect (n=43; 1.10 ±0.25); only abuse (n=33; 1.05 ±0.22); only neglect (n=12; 1.04 ±0.85); no trauma (n=69; 1.10 ±0.21, p=0.966).

#### 4. Discussion:

To the best of our knowledge, this study assessed TL in the larger clinical sample to date of male crack cocaine users and was the first to investigate the possible impact of severity of crack cocaine use in TL. In our study, significant differences in TL were found in individuals with trauma in both CUD and HC groups when compared to HC without trauma, suggesting that the association with shorter TL is more strongly explained by the history of trauma than by the crack cocaine use itself. Nevertheless, 57% of individuals with CUD had a history of trauma versus 30% of controls, which could suggest that crack users are at higher risk for accelerated aging in comparison to the healthy population. Additionally, the finding indicating that individuals with CUD without trauma had

similar TL to individuals with trauma (CUD or HC) is also interesting. Perhaps, CUD and trauma may have indistinguishable and non-cumulative effects on TL.

Several studies have shown an association of childhood trauma and early life adversities with accelerated aging<sup>17</sup>. Similarly to our findings, female crack cocaine users with history of trauma showed shorter TL in comparison to healthy controls with no history of trauma<sup>8</sup>. However, contrasting with our results, a significant difference was also found between cases without trauma and controls. This specific result could be influenced by gender, since evidence shows that women usually present higher severity of CUD and psychiatric comorbidities<sup>28,29</sup>. In fact, although mean age was similar in both studies, age at first use was higher in Levandowski's sample (20.6 y.o.) in comparison to ours (16 y.o.), suggesting that those females may have progressed faster to more severe CUD (that is, need for hospitalization). In addition, mean ASI-6 Drug severity score was higher in the female sample in comparison to our male sample. Furthermore, some studies indicate that the association between TL and trauma might depend on the type of trauma present<sup>8,17</sup>. However, our findings did not corroborate this association, possibly due to the small sample size in some types of trauma.

Tannous et al. (2019) found no significantly shorter TL in individuals with comorbid cocaine/alcohol use disorders compared to HC among individuals recruited from the community<sup>9</sup>. Their results may have been influenced by the mean older age (46 y.o.) of the sample, since it is suggested that studies with younger individuals could show larger effect sizes<sup>7,17</sup>. Nevertheless, although our study had a larger and younger sample, we could not confirm the association of CUD without trauma and shorter TL.

Different factors are associated with TL, and their shortening can be mediated by inflammation and oxidative stress <sup>1,15</sup>. In addition, childhood trauma has also been associated with high levels of oxidative stress during crack cocaine withdrawal syndrome, probably exposing these individuals to more neurological impairment <sup>30</sup>. A higher prevalence of childhood trauma was observed in our sample of individuals with CUD compared to controls. Therefore, this scenario is worrisome and should be further investigated in order to develop preventive and intervention strategies.

No relationship between severity of crack cocaine use and TL was found. Association between severity of drug use and TL was also not found for alcohol use disorder in a previous study <sup>11</sup>. The authors hypothesize that other factors, such as the individual's pharmacokinetics differences, may be more relevant for TL than the amount or chronicity of alcohol use. Perhaps this could be the case for crack cocaine as well. Other factors, such as physical exercise, nutrition, meditation and some medication prescribed for psychiatric symptoms commonly comorbid with CUD <sup>31</sup> (i.e., lithium, antidepressants and antipsychotics) have been associated with telomere stability <sup>15,32–34</sup>. Crack cocaine users in health care unities may have been more exposed to these protective factors than users without treatment. Besides that, genetic markers have been associated with TL regulation <sup>35</sup>. For instance, a genome-wide meta-analysis identified seven loci associated with LT, including some variants also related to chronic diseases (i.e.: cancer and pulmonary fibrosis) <sup>36</sup>. Overall, this scenario suggests a complex relationship between different protection and risk factors, where some of them, as childhood trauma and some chronic diseases, may have a stronger effect on TL.

Our results should be interpreted in light of some limitations. First, our study comprises a clinical sample and the results should be generalized to population samples with caution. Second, many genetic and environmental factors may influence TL measurement, including sleeping and exercising, and unfortunately, we were unable to assess or adjust for all of them<sup>15,32–34</sup>. Third, data on childhood trauma and severity of CUD were self-reported and may have been affected by recall bias. Finally, our cross-sectional design prevented us from analyzing changes in TL over time. Nevertheless, our study comprises the larger sample of individuals with CUD so far, and the HC were sex and age matched. Moreover, the unique characteristics of the Brazilian population, compared to European and North American samples, fill important gaps in the literature.

## 5. Conclusion

We have found that the presence of childhood trauma, rather than CUD per se, was associated with TL. The combined presence of trauma and CUD, as well as the amount or chronicity of crack cocaine use, did not seem to exponentiate the impact of such factors on TL. The high prevalence of trauma in these individuals is also worrisome, since it is associated with diverse deleterious outcomes and should be target for preventive efforts.

## References

1. López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M. & Kroemer, G. XThe hallmarks of aging. *Cell* **153**, (2013).
2. Blackburn, E. H., Epel, E. S. & Lin, J. Human telomere biology: A contributory and interactive factor in aging, disease risks, and protection.

- Science* (80-. ). **350**, 1193–1198 (2015).
3. Lindqvist et al. Psychiatric disorders and leukocyte telomere length: Underlying mechanisms linking mental illness with cellular aging. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **55**, 333–364 (2015).
  4. Czepielewski, L. S. et al. Telomere length in subjects with schizophrenia, their unaffected siblings and healthy controls: Evidence of accelerated aging. *Schizophr. Res.* **174**, 39–42 (2016).
  5. Colpo, G. D. et al. Is bipolar disorder associated with accelerating aging? a meta-analysis of telomere length studies. *J. Affect. Disord.* **186**, 241–248 (2015).
  6. Darrow, S. M. et al. The Association Between Psychiatric Disorders and Telomere Length: A Meta-Analysis Involving 14,827 Persons. *Psychosom. Med.* **78**, 776–787 (2016).
  7. Navarro-Mateu, F. et al. The association of telomere length with substance use disorders: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Addiction* 0–2 (2020) doi:10.1111/add.15312.
  8. Levandowski, M. L. et al. Crack cocaine addiction, early life stress and accelerated cellular aging among women. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **71**, 83–9 (2016).
  9. Tannous, J. et al. Measures of possible allostatic load in comorbid cocaine and alcohol use disorder: Brain white matter integrity, telomere length, and anti-saccade performance. *PLoS One* **14**, 1–17 (2019).
  10. Pavanello, S. et al. Shortened telomeres in individuals with abuse in alcohol consumption. *Int. J. Cancer* **129**, 983–992 (2011).
  11. Martins de Carvalho, L. et al. Effect of alcohol use disorder on cellular

- aging. *Psychopharmacology (Berl)*. (2019) doi:10.1007/s00213-019-05281-5.
12. Yamaki, N. *et al*. Telomere shortening in alcohol dependence: Roles of alcohol and acetaldehyde. *J. Psychiatr. Res.* **109**, 27–32 (2019).
  13. Yang, Z. *et al*. Drug addiction is associated with leukocyte telomere length. *Sci. Rep.* **3**, 1542 (2013).
  14. Savolainen, K. *et al*. History of mental disorders and leukocyte telomere length in late adulthood: The Helsinki Birth Cohort Study (HBCS). *J. Psychiatr. Res.* **46**, 1346–1353 (2012).
  15. Epel, E. S. & Prather, A. A. Stress, Telomeres, and Psychopathology: Toward a Deeper Understanding of a Triad of Early Aging. *Annu. Rev. Clin. Psychol.* **14**, 371–397 (2018).
  16. Tyrka, A. R. *et al*. Childhood Maltreatment and Telomere Shortening: Preliminary Support for an Effect of Early Stress on Cellular Aging. *Biol. Psychiatry* **67**, 531–534 (2010).
  17. Ridout, K. K. *et al*. Early life adversity and telomere length: A meta-analysis. *Mol. Psychiatry* **23**, 858–871 (2018).
  18. Brucki, S. M. D., Nitrini, R., Caramelli, P., Bertolucci, P. H. F. & Okamoto, I. H. Sugestões para o uso do mini-exame do estado mental no Brasil. *Arq. Neuropsiquiatr.* **61**, 777–781 (2003).
  19. American Psychiatric Association. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders*. (1994).
  20. Kessler, F. *et al*. Psychometric properties of the sixth version of the Addiction Severity Index (ASI-6) in Brazil. *Rev. Bras. Psiquiatr.* **34**, 24–33 (2012).

21. Amorim, P. Mini International Neuropsychiatric Interview (MINI): validação de entrevista breve para diagnóstico de transtornos mentais. *Rev. Bras. Psiquiatr.* **22**, 106–115 (2000).
22. First, M. B. Structured Clinical Interview for the DSM (SCID) . *Encycl. Clin. Psychol.* 1–6 (2015) doi:10.1002/9781118625392.wbecp351.
23. Mattos, P. *et al.* Transcultural adaptation of the Adult Self-Report Scale into portuguese for evaluation of adult attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). *Adapt. Transcult. para o Port. da escala Adult Self-Report Scale para avaliação do transtorno déficit aten o/hiperatividade em adultos* **33**, 188–194 (2006).
24. Grassi-Oliveira, R., Stein, L. M. & Pezzi, J. C. Tradução e validação de conteúdo da versão em português do Childhood Trauma Questionnaire Translation and content validation of the Childhood Trauma Questionnaire. *Rev. Saude Publica* **40**, 249–255 (2006).
25. Lahiri, D. K., Bye, S., Nurnberger, J. I., Hodes, M. E. & Crisp, M. A non-organic and non-enzymatic extraction method gives higher yields of genomic DNA from whole-blood samples than do nine other methods tested. *J. Biochem. Biophys. Methods* **25**, 193–205 (1992).
26. Cawthon, R. M. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res.* **30**, 47e – 47 (2002).
27. Volkow, N. D., Koob, G. F. & McLellan, A. T. Neurobiologic Advances from the Brain Disease Model of Addiction. *N. Engl. J. Med.* **374**, 363–71 (2016).
28. Quiñones-Jenab, V. Why are women from Venus and men from Mars when they abuse cocaine? *Brain Res.* **1126**, 200–203 (2006).
29. Sanvicente-Vieira, B. *et al.* Sex-based differences in multidimensional



- clinical assessments of early-abstinence crack cocaine users. *PLoS One* **14**, 1–19 (2019).
30. Sordi, A. O. *et al.* Effects of childhood trauma on BDNF and TBARS during crack-cocaine withdrawal. *Brazilian J. Psychiatry* **42**, 214–217 (2020).
  31. Paim Kessler, F. H. *et al.* Crack users show high rates of antisocial personality disorder, engagement in illegal activities and other psychosocial problems. *Am. J. Addict.* **21**, 370–380 (2012).
  32. Puterman, E., Lin, J., Krauss, J., Blackburn, E. H. & Epel, E. S. Determinants of telomere attrition over 1 year in healthy older women: Stress and health behaviors matter. *Mol. Psychiatry* **20**, 529–535 (2015).
  33. Conklin, Q. A., Crosswell, A. D., Saron, C. D. & Epel, E. S. Meditation, stress processes, and telomere biology. *Curr. Opin. Psychol.* **28**, 92–101 (2019).
  34. Squassina, A., Pisanu, C., Corbett, N. & Alda, M. Telomere length in bipolar disorder and lithium response. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **27**, 560–567 (2017).
  35. Li, C. *et al.* Genome-wide Association Analysis in Humans Links Nucleotide Metabolism to Leukocyte Telomere Length. *Am. J. Hum. Genet.* **106**, 389–404 (2020).
  36. Codd, V. *et al.* Identification of seven loci affecting mean telomere length and their association with disease. *Nat. Genet.* **45**, 422–427 (2013).

## 7 ARTIGO 3

Submetido, revisado e rejeitado por Psychiatry Research (Fator de Impacto = 2.118; Qualis B1); atualmente submetido em Public Health (Fator de Impacto = 1.774; Qualis B1)

### **Alcohol use in self-isolation during the COVID-19 pandemic in Brazil**

Helena F. Moura<sup>a</sup>, Lisia von Diemen<sup>a</sup>, Rugero A. Bulzing<sup>b</sup>, Jacob Meyer<sup>c</sup>, Igor Grabovac<sup>d</sup>, Guillermo F. López-Sánchez<sup>e</sup>, Kabir P. Sadarangani<sup>f,g</sup>, Mark A. Tully<sup>h</sup>, Lee Smith<sup>i</sup>, Felipe B. Schuch<sup>b</sup>

- a. Department of Psychiatry, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), RS, Brazil
- b. Department of sports methods and techniques, Federal University of Santa Maria (UFSM), RS, Brazil
- c. Department of Kinesiology, Iowa State University, Ames, IA, United States of America
- d. Department of Social and Preventive Medicine, Centre for Public Health, Medical University of Vienna, Vienna, Austria
- e. Vision and Eye Research Institute, School of Medicine, Faculty of Health, Education, Medicine and Social Care, Anglia Ruskin University, Cambridge, UK.
- f. Universidad Autónoma de Chile, Chile
- g. Escuela de Kinesiología, Facultad de Salud y Odontología, Universidad Diego Portales, Santiago 8370057, Chile
- h. Institute of Mental Health Sciences, School of Health Sciences, Ulster University, Newtownabbey, UK, BT37 0QB
- i. The Cambridge Centre for Sport and Exercise Sciences, Anglia Ruskin University, Cambridge, CB1 1PT, UK

Corresponding author:

Helena Ferreira Moura

Álvaro Alvim, 400 – Rio Branco

Zip Code: 90420-020

+ 55 51 3359-6472

Porto Alegre – RS, Brazil

Word count: 1715

**Abstract**

**Objectives:** To assess alcohol use and the perceived change in alcohol consumption (from pre to during the pandemic) in Brazilians during the COVID-19 pandemic, its correlates, and association with depressive, anxiety and co-occurring depressive and anxiety symptoms (D&A).

**Study design:** A cross-sectional study comprising 992 individuals in self-isolation.

**Methods:** Drinking was assessed using self-reported questionnaires. D&A symptoms were assessed using the Beck Depression and Anxiety Inventories (BDI and BAI).

**Results:** A total of 68.5% of participants reported alcohol consumption during the pandemic, and 22.7% of these reported increased alcohol use. Smoking was positively associated with alcohol consumption during the pandemic. Alcohol consumption was associated with anxiety (OR=1.40, 95% CI 1.06 – 1.85,  $p<0.01$ ) and D&A (OR=1.38, 95% CI 1.02 – 1.87,  $p=0.033$ ) symptoms.

**Conclusions:** Drinking during self-isolation was prevalent and associated with risk factors for alcohol use disorders. The long-term effects of high drinking rates and increased consumption should be proactively monitored and assessed.

Key words: alcohol; COVID-19; pandemic; depression; anxiety

## Introduction

The COVID-19 pandemic has caused an unprecedented global health crisis with consequences stemming not only from the morbidity and mortality of the virus, but also from preventive strategies <sup>1</sup>. Social distancing measures have been implemented worldwide to reduce infection transmission, generating considerable disruption in people's routine and psychological well-being <sup>2</sup>. In this scenario, changes in alcohol consumption are expected and may have consequences for the pandemic management and the population's mental health <sup>3</sup>.

Studies from previous global crises showed no changes in alcohol use in the overall population <sup>4</sup>. Notwithstanding, this appearance of stability occurred at the expense of decreased use among some populations while more vulnerable subgroups increased their use of alcohol <sup>4</sup>. Therefore, changes in the demographic profile of problem drinkers were observed. Additionally, countries can be affected differently. After the 2008 Great recession, problem drinking increased significantly more among less educated men in the US, whereas in Spain highly educated women were more affected<sup>4</sup>. Overall, anxiety and depressive symptoms mediated drinking behavior <sup>4</sup>.

So far, studies conducted during the COVID-19 pandemic have shown both increase and decrease in alcohol use, which can vary according to environmental, societal, and individual factors, including psychological distress <sup>4-7</sup>. However, except for an early descriptive data <sup>8</sup>, little is known about the Brazilian population's drinking behavior during self-isolation. Therefore, our aims were to: 1) assess alcohol use and changes during self-isolation in Brazil; 2)

assess the demographic correlates of alcohol use and changes; and 3) assess the associations of alcohol use and changes with depressive, anxiety and co-occurring depressive and anxiety symptoms. We hypothesize that drinking behavior would be associated with socioeconomic status, sex, age, clinical or psychiatric morbidity and psychiatric symptoms.

## **Methods**

### *Recruiting and inclusion criteria*

This study data are derived from of an online survey, and the methods are described elsewhere <sup>9</sup>. Individuals ( $\geq 18$  years) living in Brazil and in self-isolation (staying at home and leaving home only for essential activities, such as buying food or medicine or visiting a physician) due to the COVID-19 pandemic were eligible to participate. In Brazil, social distancing measures started in March and were heterogenous across states and cities, with self-isolation being a voluntary act. Data was collected from April 05 to May 11. The study was approved by the Federal University of Santa Maria Research Ethics Committee and by the National Commission of Ethics in Research [CONEP] (30.244.620.1.0000.5346).

### *Alcohol consumption use and increase during the pandemic (outcome)*

Alcohol consumption was assessed with two questions: “do you drink alcoholic beverages?” and, “now that you are in self-isolation, do you consider that: you are drinking more, drinking less or drinking the same amount”.

### *Demographic correlates*

Demographic data were collected, as well as days in self-isolation, current smoking and self-reported previous diagnosis of chronic physical diseases and psychiatric disorders.

#### *Mental health assessment*

Depressive symptoms were assessed with Beck Depression Inventory (BDI)<sup>10</sup>, anxiety symptoms were assessed with Beck Anxiety Inventory (BAI)<sup>11</sup>. The cutoffs used were: BDI>9=prevalent depressive symptoms<sup>10</sup>, BAI>7=prevalent anxiety symptoms<sup>11</sup>, and BDI>9 + BAI>7=prevalent co-occurring depressive and anxiety (D&A) symptoms.

#### *Statistical Analysis*

Descriptive data are shown using mean (standard deviation), or median and interquartile range (IQR) for continuous variables. Categorical variables are shown as absolute frequencies (%). Logistic regression models were used to evaluate the correlates of alcohol consumption, increase in alcohol consumption (before and during the self-isolation period), and the associations between alcohol consumption (yes x no) or increase in alcohol use (using “drinking the same amount” plus “drinking less” as reference group) and symptoms of depression, anxiety, or D&A. The models tested were adjusted for age, sex, ethnicity, marital status, employment, family income and household inhabitants. Results from the logistic regression models are presented as odds ratios (ORs). Statistical significance was set at  $p < 0.05$ . The statistical analysis was performed with SPSS version 22.0 (IBM Corporation).

## Results

Demographic data and other descriptive analyses are detailed in table 1.

**Table 1.** Sample characteristics: overall and stratified by alcohol consumption

	Category	Overall N=992* (%)	Alcohol consumption		Change in alcohol consumption**		
			Yes N=683 (68.9%)	No N=309 (31.1%)	Less N= 222 (32.5%)	More N=155 (22.7%)	No change N=305 (44.7%)
<b>Sex</b>	Women	713 (72.2)	478 (67)	235 (33.0)	140 (29.3)	114 (23.8)	224 (49.6)
	Men	274 (27.8)	201 (73.4)	73 (26.6)	80 (40)	40 (20)	80 (40)
<b>Age</b>	18-24 years	140 (14.1)	103 (73.6)	37 (26.4)	51 (49.5)	15 (14.6)	37 (35.9)
	25-34 years	381 (38.4)	267 (70.1)	114 (29.9)	89 (33.3)	66 (24.7)	112 (41.9)
	35-44 years	248 (25.0)	177 (71.4)	71 (28.6)	51 (28.8)	49 (27.7)	77 (43.5)
	45-54 years	121 (12.2)	79 (65.3)	42 (34.7)	20 (25.3)	18 (22.8)	41 (51.9)
	≥ 55-64 years	102 (10.3)	57 (55.9)	45 (44.1)	11 (19.6)	7 (12.5)	38 (67.9)
<b>Ethnicity</b>	White	756 (76.4)	533 (70.5)	223 (29.5)	161 (30.3)	123 (23.1)	248 (46.6)
	Non-White	233 (23.6)	147 (63.1)	86 (36.9)	60 (40.8)	32 (21.8)	55 (37.4)
<b>Marital Status</b>	Married	420 (42.8)	284 (67.6)	136 (32.4)	70 (24.7)	68 (24.0)	145 (51.2)
	No partner	562 (57.2)	393 (69.9)	169 (30.1)	149 (37.9)	87 (22.1)	157 (39.9)
<b>Employment</b>	Regular	551 (55.6)	368 (66.8)	183 (33.2)	106 (28.9)	90 (24.5)	171 (46.6)
	Unemployed	45 (4.5)	27 (60.0)	18 (40.0)	11 (40.7)	4 (14.8)	12 (44.4)
	Non-regular	395 (39.9)	287 (72.7)	108 (27.3)	104 (36.2)	61 (21.3)	122 (42.5)
<b>Monthly household income***</b>	<U\$231	34 (3.4)	22 (64.7)	12 (35.3)	9 (40.9)	7 (31.8)	6 (27.3)
	U\$232-U\$1,595	518 (52.3)	343 (66.2)	175 (33.8)	135 (39.4)	65 (19.0)	143 (41.7)
	U\$1,596-U\$2,079	150 (15.1)	109 (72.7)	41 (27.3)	30 (27.5)	28 (25.7)	51 (46.8)
	>U\$2,080	289 (29.2)	208 (72.0)	81 (28.0)	47 (22.7)	55 (26.6)	105 (50.7)
<b>Household inhabitants</b>	1	143 (14.4)	101 (71.1)	41 (28.9)	32 (301.7)	26 (25.7)	43 (42.6)
	2	335 (33.7)	236 (70.9)	97 (29.1)	66 (28)	61 (25.8)	109 (46.2)
	3	267 (26.8)	179 (67.3)	87 (32.7)	62 (34.6)	35 (19.6)	82 (45.8)
	4	185 (18.6)	127 (68.6)	58 (31.4)	45 (35.7)	26 (20.6)	55 (43.7)
	5 or more	65 (6.5)	39 (60.0)	26 (40.0)	16 (41)	7 (17.9)	16 (41)
<b>Current smoking</b>	No	941 (94.9)	643 (68.3)	298 (31.7)	212 (33)	141 (22)	289 (45)
	Yes	51 (5.1)	40 (78.4)	11 (21.6)	10 (25)	14 (35)	16 (40)
<b>Day in self-isolation</b>	Median (IQR)	28.00 (8.0)	28.00 (8.0)	28.00 (9.0)	28.00 (7.75)	25.00 (10.0)	28.00 (6.0)
	<b>Self-reported previous diagnoses of physical conditions</b>	No	61 (6.1)	44 (72.1)	17 (27.9)	17 (38,6)	13 (29.5)
	Yes	931 (93.9)	639 (68.6)	292 (31.4)	205 (32,1)	142 (22.3)	291 (45.6)

<b>Self-reported previous diagnoses of psychiatric conditions</b>	No	595 (60.0)	420 (70.6)	175 (29.4)	144 (27.7)	93 (17.9)	282 (54.3)
	Yes	397 (40.0)	263 (66.2)	134 (33.8)	99 (37.6)	62 (23.6)	102 (38.8)
<b>BAI</b>	Median (IQR)	6.00 (11.0)	7.00 (11.0)	5.00 (10.0)	7.00 (11.0)	7.00 (10.0)	6.00 (9.0)
<b>BDI</b>	Median (IQR)	9.00 (10.0)	9.00 (9.0)	8.00 (10.0)	10.00 (9.0)	9.00 (9.0)	8.00 (9.0)

### *Prevalence of alcohol consumption during the pandemics and its correlates*

A total of 683 (68.9%) of participants reported alcohol consumption whilst self-isolating. Smoking was significantly associated with higher alcohol consumption (OR=2.1, 95%CI 1.05 – 4.41, p=0.03). Aged 55-64 versus 18-24 years (OR=0.34, 95% CI 0.18 – 0.66, p<0.01), with a monthly household income ranging from U\$232-U\$1,595 (OR=0.53, 95% CI 0.39 – 0.83, p<0.01) were associated with lower alcohol consumption during self-isolation (see table S1).

### *Changes on alcohol consumption in self-isolation (pre to during) and correlates*

A total of 155 (22.7%) participants reported an increase in alcohol consumption, whereas 265 (32.5%) reported a reduction. Smoking was associated with an increase in alcohol consumption (OR=2.4, 95%CI 1.23 – 4.76, p=0.01) (see table S2). A household income ranging from U\$232-U\$1,595 was associated with a lower risk of an increase (OR=0.54, 95% CI 0.34 – 0.86, p<0.01) in alcohol consumption.

### *Associations of alcohol consumption and changes of alcohol consumption with depressive, anxiety and co-occurring depressive and anxiety symptoms*



Alcohol consumption during the self-isolation was associated with anxiety (OR=1.40, 95% CI 1.06 – 1.85,  $p<0.01$ ) and D&A symptoms (OR=1.38, 95% CI 1.02 – 1.87,  $p=0.033$ ) even after adjusting for confounding factors (OR=1.52, 95% CI 1.13-2.05,  $p=0.006$  and OR=1.48, 95% CI 1.07-2.04,  $p=0.018$ , respectively) in logistic regression models. We found no association between psychiatric symptoms and drinking more (see table S3).

## **Discussion**

We found that 68.5% of our participants reported drinking during the pandemic and, from those, 22.7% increased and 32.5% decreased their alcohol consumption. Smoking was positively associated with both drinking and increased drinking. Middle age adults were at a lower risk of drinking, whereas average income was associated with both lower risk of drinking and of increased drinking. Importantly, drinking was associated with anxiety and co-occurring depression and anxiety.

The prevalence of alcohol drinkers in Brazil is 66.4%, among which 38.4% reports binge drinking <sup>12</sup>. Additionally, 20% of binge drinkers consume 56% of all the country's alcohol <sup>13</sup>. The distribution of drinkers between age groups and sex in our sample was also similar to that found in a national survey, except that we found a higher prevalence among women (59% x 67%) <sup>12</sup>. Considering that the alcohol consumption in our sample resembled that of the Brazilian population, the prevalence of those who drink or increased use during isolation is worrisome. Alcohol consumption is related to a higher risk of infection and complications from respiratory viruses and an increase in interpersonal violence, reasons why the

World Health Organization (WHO) recommended restrictions to its's access during lock down <sup>14</sup>.

COVID-19 pandemic has brought financial insecurity and, consequently, a great psychological burden, especially to the working age population. Previous studies on economic crisis and alcohol use have shown that people with lower income reduce their drinking due to loss of resources, whereas the opposite occurs among those with higher incomes, in which the economic factor may be overlaid by drinking as a coping strategy <sup>15</sup>. However, we found that middle, but not low income was associated with a lower risk of alcohol use before and during the pandemic, possibly due to the availability of very cheap alcoholic beverages in Brazil. Considering that alcohol consumption increases the risk of infection and complications of COVID-19 <sup>3</sup>, reducing consumption among the poorest could mitigate the damage to this population, which has been most severely affected by the pandemic <sup>16</sup>.

Additionally, our middle-class sample was comprised predominantly of young adults. They may have a lower risk of drinking due to parenting responsibilities, starting a working career, or because they prefer to drink in social situations. Nevertheless, we did not find an association between young adults and drinking before or during self-isolation.

Notably, anxiety and co-occurring D&A symptoms were associated with drinking even after controlling for other covariates. These psychiatric comorbidities have been associated with higher risk for alcohol use disorders (AUD), faster progression of AUD, and a greater need for hospitalization for both AUD and comorbid psychiatric disorder <sup>17,18</sup>.

Quarantine, depression and drinking to cope were independently and positively associated with AUD symptoms three years after the epidemic of SARS in China<sup>19</sup>. Psychological distress due to social isolation, fear of contamination, grief and financial insecurity have been associated with quarantines<sup>2,20</sup> and may lead to alcohol use as a coping strategy<sup>3</sup>. In that sense, drinking to self-medicate negative emotions may have prevented some individuals to reduce their drinking during this period of less environmental stimuli (i.e. public places and events associated with drinking). However, psychiatric symptoms can also be a consequence of alcohol use. Neurobiological studies have found overlaps in the neural circuitry of both substance use disorders and depression and anxiety disorders<sup>21</sup>. Anyhow, because an increase in anxiety and depressive symptoms have been associated with the current pandemic<sup>2</sup>, careful assessment of alcohol use among individuals with these symptoms is imperative.

We found no association between psychiatric symptoms and increased alcohol use. One possible explanation is that individuals with anxiety and D&A symptoms already had high use of alcohol before the pandemic.

Not surprisingly, we have found that smoking was associated with both alcohol use and increased use. The combination of nicotine and alcohol is highly comorbid and is associated with cross-reinforcement in the reward system as well as with cross-tolerance, enhancing the risk of hazardous drinking<sup>17,22</sup>.

Our study has some limitations. First, we did not use validated scales for AUD. Also, alcohol consumption or even increasing alcohol consumption *per se* do not mean hazardous drinking. However, our findings of drinking being associated with known risk factors for AUD is worrisome and should encourage further investigation. Moreover, we have found that those drinking are more likely to

present anxiety and co-occurring D&A, which points to the need for targeting individuals with psychiatric symptoms. Another limitation is that the study sample is not representative from the Brazilian population. Women were overrepresented and most participants were from the Southern and Southeast regions of Brazil. Finally, this is a cross-sectional study and causal relationships cannot be inferred, and memory bias might play a role.

In conclusion, drinking during self-isolation was prevalent, varied across demographic subgroups and associated with higher risk of smoking and anxiety and D&A symptoms. The long-term effects of increased consumption can have implications for the public health. Therefore, it should be monitored and assessed, as both smoking and psychiatric symptoms have been associated with AUD.

### **Acknowledgements**

The study was approved by the Federal University of Santa Maria Research Ethics Committee and by the National Commission of Ethics in Research [CONEP] (30.244.620.1.0000.5346). This study was part financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Mark Tully is partly supported by funding as Director of the Northern Ireland Public Health Research Network by the Research and Development Division of the  
Public Health Agency (Northern Ireland).

## References

1. World Health Organization. *Coronavirus disease 2019 (COVID-19): situation report*. (2020).
2. Castaldelli-Maia, J. M., Marziali, M. E., Lu, Z. & Martins, S. S. Investigating the effect of national government physical distancing measures on depression and anxiety during the COVID-19 pandemic through meta-analysis and meta-regression. *Psychol. Med.* 1–13 (2021) doi:10.1017/S0033291721000933.
3. Ornell, F. *et al.* The COVID-19 pandemic and its impact on substance use: Implications for prevention and treatment. *Psychiatry Res.* **289**, 113096 (2020).
4. Gonçalves, P. D., Moura, H. F., do Amaral, R. A., Castaldelli-Maia, J. M. & Malbergier, A. Alcohol Use and COVID-19: Can we Predict the Impact of the Pandemic on Alcohol Use Based on the Previous Crises in the 21st Century? A Brief Review. *Front. Psychiatry* **11**, 1–10 (2020).
5. Vanderbruggen, N. *et al.* Self-Reported Alcohol, Tobacco, and Cannabis Use during COVID-19 Lockdown Measures: Results from a Web-Based Survey. *Eur. Addict. Res.* (2020) doi:10.1159/000510822.
6. Neill, E. *et al.* Alcohol use in Australia during the early days of the COVID-19 pandemic: Initial results from the COLLATE project. *Psychiatry Clin. Neurosci.* **74**, 542–549 (2020).
7. Wardell, J. D. *et al.* Drinking to Cope During COVID-19 Pandemic: The Role of External and Internal Factors in Coping Motive Pathways to Alcohol Use, Solitary Drinking, and Alcohol Problems. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **44**, 2073–2083 (2020).

8. Fiocruz. Convid. [https://convid.fiocruz.br/index.php?pag=bebiba\\_alcoolica](https://convid.fiocruz.br/index.php?pag=bebiba_alcoolica) (2020).
9. Schuch, F. B. *et al.* Associations of moderate to vigorous physical activity and sedentary behavior with depressive and anxiety symptoms in self-isolating people during the COVID-19 pandemic: A cross-sectional survey in Brazil. *Psychiatry Res.* **292**, 1–27 (2020).
10. Beck, A. T., Ward, C. H., Mendelson, M., Mock, J. & Erbaugh, J. An inventory for measuring depression. *Arch. Gen. Psychiatry* **4**, 561–571 (1961).
11. Beck, A. T., Epstein, N., Brown, G., Steer, R. A. & others. An inventory for measuring clinical anxiety: Psychometric properties. *J. Consult. Clin. Psychol.* **56**, 893–897 (1988).
12. Francisco Inácio Pinkusfeld Monteiro Bastos, Mauricio Teixeira Leite de Vasconcelos, Raquel Brandini De Boni, Neilane Bertoni dos Reis, C. F. de S. C. *III Levantamento Nacional sobre o uso de drogas pela população brasileira.* (2017).
13. Laranjeira, R., (Supervisão) & [et al.]. *II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas (LENAD).* (2012).
14. World Health Organization. Alcohol does not protect against COVID-19 and its access should be restricted during lock down Dispelling myths on alcohol and COVID-19 Restricting alcohol access during COVID-19 pandemic. <https://www.paho.org/en/news/14-4-2020-alcohol-does-not-protect-against-covid-19-and-its-access-should-be-restricted-during> (2020).
15. de Goeij, M. C. M. *et al.* How economic crises affect alcohol consumption

- and alcohol-related health problems: A realist systematic review. *Soc. Sci. Med.* **131**, 131–146 (2015).
16. Baqui, P., Bica, I., Marra, V., Ercole, A. & van der Schaar, M. Ethnic and regional variations in hospital mortality from COVID-19 in Brazil: a cross-sectional observational study. *Lancet Glob. Heal.* **8**, e1018–e1026 (2020).
  17. Castillo-Carniglia, A., Keyes, K. M., Hasin, D. S. & Cerdá, M. Psychiatric comorbidities in alcohol use disorder. *The Lancet Psychiatry* **6**, 1068–1080 (2019).
  18. Turner, S., Mota, N., Bolton, J. & Sareen, J. Self-medication with alcohol or drugs for mood and anxiety disorders: A narrative review of the epidemiological literature. *Depress. Anxiety* 851–860 (2018) doi:10.1002/da.22771.
  19. Wu, P. *et al.* Alcohol abuse/dependence symptoms among hospital employees exposed to a SARS outbreak. *Alcohol Alcohol.* **43**, 706–712 (2008).
  20. Brooks, S. K. *et al.* The psychological impact of quarantine and how to reduce it: rapid review of the evidence. *Lancet* **395**, 912–920 (2020).
  21. Brady, K. T. & Verduin, M. L. Pharmacotherapy of Comorbid Mood , Anxiety , and Substance Use Disorders. **6084**, 2021–2041 (2005).
  22. Verplaetse, T. L. & McKee, S. A. An overview of alcohol and tobacco/nicotine interactions in the human laboratory. *Am. J. Drug Alcohol Abuse* **43**, 186–196 (2017).

## 8 RESULTADOS COMPLEMENTARES

Os resultados apresentados a seguir, são fruto de um trabalho com objetivo, método e análises estatísticas semelhantes às descritas no artigo 2, porém, com uma amostra de pessoas com transtorno por uso de álcool (TUA). Segue uma breve descrição do estudo.

### 1 OBJETIVOS

Comparar o tamanho de telômeros entre casos de TUA e controles saudáveis (CS).

Avaliar se há associação entre aspectos clínicos do TUA com o tamanho dos telômeros.

### 2 MÉTODOS

#### 2.1 Seleção da amostra

Cento e oito indivíduos com TUA foram selecionados de uma amostra de conveniência da unidade de desintoxicação Álvaro Alvim, do Hospital de Clínicas de Posto Alegre (HCPA), em Porto Alegre (RS). O sangue foi coletado no 1º ou 2º. dia de internação. O grupo controle foi composto por uma amostra de 80 indivíduos do Banco de Sangue do HCPA e da população geral. O diagnóstico de TUA se baseou nos critérios do DSM-IV (172) e sua gravidade foi avaliada através da escala Addiction Severity Index - 6 (ASI-6) (145). Os casos e controles foram avaliados para a presença de comorbidades psiquiátricas com a escala Mini International Neuropsychiatric Interview (MINI) (146) ou com a versão de triagem da Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders (SCID-I) (147). Sintomas do transtorno de déficit de atenção e hiperatividade foram avaliados pela Adult Self-Report Scale (ASRS) (148). A presença de trauma na infância foi investigada pela versão brasileira da escala Childhood Trauma Questionnaire (CTQ) (149), a qual explora o histórico de abuso ou negligência física, emocional ou sexual. As respostas permitem a geração de dados contínuos (scores) e categóricos e ambos foram utilizados nas análises.



Para serem incluídos no estudo, os casos deveriam ter o álcool como principal substância de abuso e os controles não deveriam ter qualquer diagnóstico de transtorno por uso de substâncias. Todos os participantes deveriam ter 18 anos ou mais e ter condições clínicas e cognitivas de consentir em participar da pesquisa. Indivíduos com sintomas psicóticos graves ou risco de suicídio foram excluídos.

## **2.2 Medição dos telômeros**

O DNA genômico foi extraído do sangue periférico de casos e controles e analisado conforme descrito no artigo 2.

## **2.3 Análise estatística**

Os testes de qui-quadrado e Mann-Whitney foram realizados para comparar dados demográficos, características clínicas e trauma infantil entre casos e controles. Telômeros de indivíduos com TUA e CS foram comparados usando o teste t de Student e ANCOVA ajustada para cor da pele, idade e escores totais de CTQ. Dadas as evidências da influência de estressores precoces sobre os telômeros, casos e controles também foram comparados considerando a presença ou ausência de trauma infantil. Para esta análise, os dados de telômeros foram comparados entre quatro grupos (casos com trauma, casos sem trauma, controles com trauma e controles sem trauma) utilizando ANCOVA e ajustados para cor da pele e idade. Além disso, o efeito de diferentes tipos de trauma (sem trauma, apenas abuso, apenas negligência, abuso + negligência) em telômeros foi analisado com ANOVA de uma via no grupo TUA.

Modelos de regressão linear foram realizados para analisar a relação entre telômeros e características clínicas, incluindo idade, trauma na infância e comorbidades psiquiátricas, ajustadas pelo status de caso-controle. Dados sobre o uso de álcool, incluindo idade do primeiro uso, anos de uso e gravidade da dependência, e sua relação com telômeros também foram analisados por meio de modelos de regressão linear.

Para a avaliação da gravidade do TUA, foi criado um score formado a partir da idade de primeiro uso e anos de uso abusivo, seguindo os mesmos critérios adotados no artigo 2. Mais especificamente, a menor idade de início do consumo de álcool encontrada no estudo (13 anos) foi considerada como 10

pontos, com redução de um ponto por ano até os 20 anos (1 ponto). A partir de 21 anos, idade em que o cérebro completa seu amadurecimento, a pontuação foi de zero. Para os anos de uso, foi acrescentado 1 ponto para cada ano de uso de álcool. O score final resultou da soma desses valores. Em seguida, o score dicotomizado a partir da mediana e os tamanhos dos telômeros foram comparados entre aqueles com maior ou menor gravidade. Em todas as análises, o nível de significância escolhido foi de 5%.

### 3. RESULTADOS

Os dados demográficos e clínicos estão descritos na tabela 1. Não houve diferença entre os tamanhos de telômeros entre casos e controles ( $p=0,073$ ).

**Tabela 1. Características da amostra**

	Alcool (N=108)	Controles (N=80)	p
	Mean (SD)	Mean (SD)	
Tamanho de telômero (taxa T/S)	1,16 (0,3)	1,08 (0,2)	0,073
Idade	52,4 (8,6)	50,04 (9,1)	0,253
Anos de uso regular (média e intervalo interquartil)	25 (12,5 – 33,5)	-	-
Idade de primeiro uso (média e intervalo interquartil)	15 (13-18)	-	-
AI-6 (Drug score)			
CTQ scores	44,11(18)	37,3 (15,2)	<b>0,030</b>
Abuso emocional	10,00 (5,22)	7,81 (4,7)	<b>0,023</b>
Negligência emocional	9,79 (4,54)	9,16 (5,23)	0,521
Abuso físico	8,98 (5,1)	7,22 (3,0)	<b>0,014</b>
Negligência física	8,87 (4,0)	7,30 (3,24)	<b>0,021</b>
Abuso sexual	6,47 (3,7)	5,81 (2,3)	0,218

	N (%)	N (%)	
Trauma na infância	51 (51,0)	14 (37,8)	0,239
Etnia			0,095
Branços	63 (58,3)	57 (71,3)	
Não brancos	45 (41,7)	23 (28,7)	
Escolaridade			
< primário	68 (64,2)	29 (36,3)	
> secundário	38 (35,8)	51 (63,7)	<b>&lt;0,001</b>
Transtorno depressivo (na vida)	21 (19,6)	9(11,3)	0,179
Transtorno bipolar (na vida)	9 (8,5)	7 (8,8)	0,999
TDAH	16 (16,8)	5 (6,3)	0,056
Transtorno de personalidade antissocial	16 (18,8)	1 (1,3)	<b>0,001</b>
Tabagismo (atual)	8 (7,4)	7 (8,8)	0,789

A idade do primeiro uso e os anos de uso regular são apresentados como mediana e intervalo interquartil. O escore de gravidade do álcool é apresentado como mediana. CTQ = Questionário de Trauma na Infância; TDAH = Transtorno de Déficit de Atenção / Hiperatividade. CTQ (N): 100 AUD e 37 HC; Transtorno Depressivo e Bipolar (N): 107 AUD e 80 HC; TDAH (N): 95 AUD e 80 HC, Transtorno de personalidade antissocial (N): 85 AUD e 80 HC.

Após o ajuste de tamanho de telômero para idade, etnia e história de trauma, os resultados encontrados foram: para os casos (N= 100), média = 1,16 e DP = 0,34; para os controles (N=37), média = 1,04 e DP = 0,26;  $p = 0,182$ . O modelo de ajustamento que incluiu comorbidades psiquiátricas e tabagismo também não revelou diferenças significativas ( $p=0.205$ ).

Não foram encontradas diferenças no tamanho de telômero entre TUA de acordo com a gravidade do uso de álcool: média de 1,18 (DP = 0,33) para aqueles abaixo da mediana e média de 1,17 (DP = 0,34) para aqueles acima da mediana ( $p = 0,988$ );  $p=0,272$

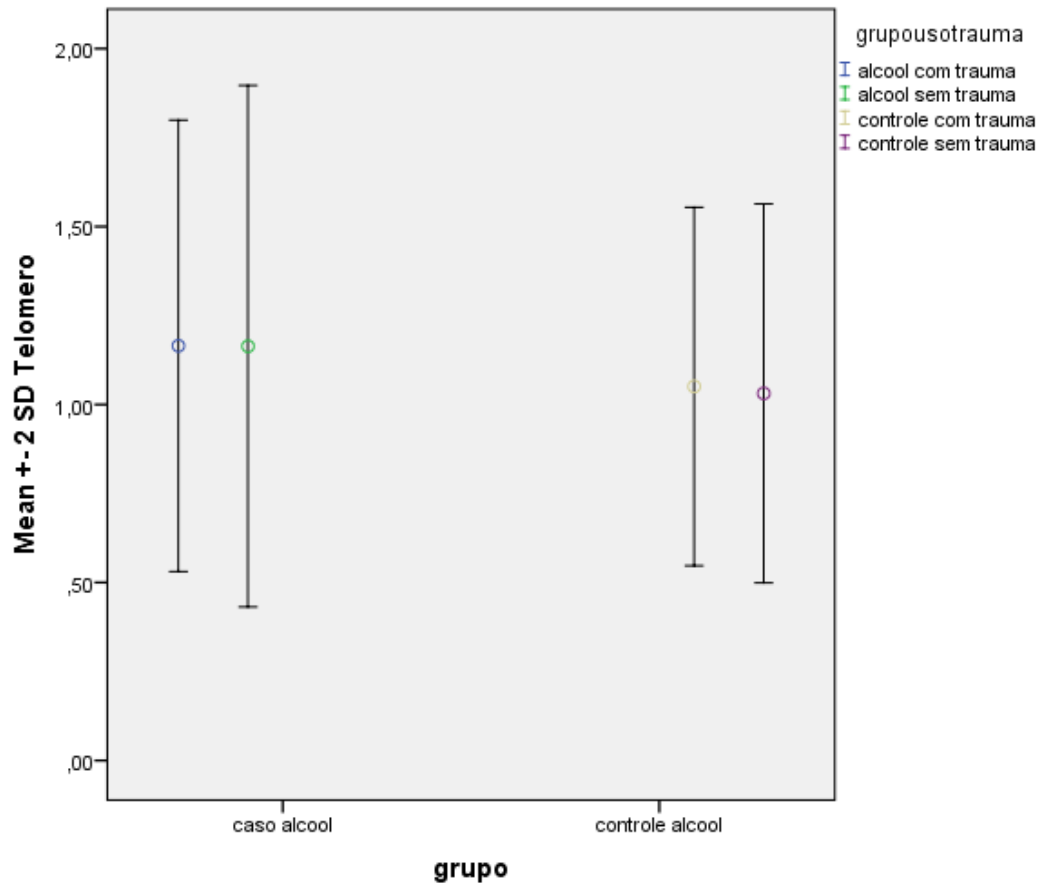


Figura 2 Medidas de telômero conforme o histórico de trauma

Média (DP) de cada grupo: TUA com trauma (N=51) = 1,17 (0,32); TUA sem trauma (N=49) = 1,16 (0,37); CS com trauma (N=14) = 1,05 (0,25); CS sem trauma (N=23) = 1,03 (0,27).

Tabela 4: Scores para tamanho de telômeros e covariáveis

Telomere length		
	Pearson correlation (r)	p-value
Anos de uso regular	-0,08	0,433
Anos de uso regular (ajustados para idade)	-0,03	0,768
Idade de primeiro consumo	-0,199	<b>0,044</b>
Idade	-0,02	0,805
CTQ scores	0,138	0,171
ASI scores		
Drugs	-0,055	0,580

## 9 CONCLUSÃO

O presente trabalho buscou avaliar marcadores biológicos associados ao envelhecimento precoce em indivíduos com transtorno por uso de álcool ou crack. Estressores ambientais, em especial o trauma na infância, são fatores de risco importantes tanto para o envelhecimento biológico como para a iniciação e progressão do uso de SPA. Dessa forma, sua avaliação também foi incluída neste estudo.

A identificação de uma assinatura que caracterize a progressão ou gravidade do TUS é desafiada pela complexidade do transtorno e pela presença de múltiplos fatores de confusão. O TUS apresenta diferentes apresentações clínicas, podendo transitar entre uso em binge da SPA, cronicidade do uso, síndrome de abstinência e abstinência prolongada. Ademais, todas elas podem sofrer influência das peculiaridades farmacológicas de cada SPA. A essa diversidade se somam as flutuações nos níveis dos próprios biomarcadores e à ausência de valores de referência.

O estado inflamatório crônico e moderado e o encurtamento dos telômeros são dois processos que se retroalimentam e levam ao envelhecimento celular progressivo. Clinicamente, o envelhecimento biológico se traduz em maior morbimortalidade, incluindo o declínio de funções cognitivas. Isto sugere que a inflamação e o encurtamento de telômeros podem estar associados aos mecanismos de neuroprogressão, processo que vem sendo identificado em transtornos psiquiátricos graves e tem sido relacionado à severidade do quadro e à resposta ao tratamento.

Nesse sentido, meta-análises para marcadores inflamatórios na esquizofrenia, depressão maior, transtorno bipolar e transtorno de estresse pós-traumático têm auxiliado a identificar uma associação entre determinadas citocinas e a gravidade do transtorno, perfil de sintomas e resposta ao tratamento. Entretanto, apesar de a relação entre o consumo de álcool e doenças inflamatórias já estar bem estabelecida, pouco se sabe sobre o papel da imunomodulação para o curso e gravidade do TUA, questão esta que foi objeto do primeiro artigo deste trabalho.

Das 14 citocinas avaliadas, apenas o TNF-alfa teve concentrações significativamente mais elevadas no TUA em comparação aos controles saudáveis. Porém, algumas limitações observadas durante este estudo devem ser consideradas.

Primeiramente, cerca de metade dos artigos incluídos tinha como objetivo principal avaliar o consumo de álcool com determinadas doenças clínicas. Nesses casos, considera-se mais importante avaliar o volume de álcool ingerido que a presença ou não de TUA. Assim, não utilizaram nenhuma escala validada para diagnóstico deste transtorno ou avaliação de sua gravidade mas, foram incluídas por descreverem que os indivíduos da amostra foram selecionados em unidades de desintoxicação. Conseqüentemente, as meta-análises para identificar o perfil inflamatório associado ao curso, fases e gravidade do TUA ficaram prejudicadas pela falta de poder estatístico. De forma semelhante, a exclusão do diagnóstico de TUA nos grupos controles também não foi realizada de forma criteriosa nesses estudos.

Outra limitação encontrada foi a grande variabilidade nos períodos de coleta em relação à data de último consumo de álcool, a qual chegou a variar de menos de 1 a 90 dias em uma mesma amostra. Por fim, considerando a elevada prevalência de comorbidades psiquiátricas em indivíduos com TUA e a associação destas com aumento de citocinas inflamatórias, seria importante incluir esta variável nas investigações. Entretanto, poucos estudos avaliaram a presença de comorbidades.

Dessa forma, para a melhor compreensão sobre o papel da imunomodulação no desenvolvimento, curso e gravidade do TUA, seria importante realizar uma seleção mais criteriosa de casos e controles através de escalas diagnósticas validadas para TUA. Os períodos de coleta para caracterizar intoxicação, síndrome de abstinência ou abstinência prolongada deveriam ser padronizados. Finalmente, fatores de confusão, dentre os quais as comorbidades psiquiátricas, deveriam ser incluídos nas investigações.

Quanto ao estudo dos telômeros, apenas indivíduos com TUC e trauma tiveram o TL significativamente menor em comparação aos controles saudáveis. A mesma associação não foi encontrada no estudo de indivíduos com TUA. No entanto, ainda não é possível excluir a possibilidade de o uso de SPA estar associado ao envelhecimento precoce.

O TL apresenta variações em uma mesma pessoa ao longo da vida. A alternância de exposição a fatores de risco e proteção pode fazer com que os telômeros se encurtem ou se regenerem, respectivamente. Assim, quanto mais próximo do evento estressor for realizada a medição, maior a chance de observar o efeito deste evento sobre o TL. Além disso, indivíduos que ultrapassam a média de idade de uma população tendem a apresentar telômeros mais longos que aqueles

com idade pouco abaixo dessa média. Isso pode sugerir que pertencem a uma coorte menos exposta aos fatores de risco para envelhecimento precoce, ou que apresentam uma genética que favorece a longevidade.

Nesse sentido, considerando que a coleta de material para a medição dos telômeros ocorreu nos primeiros dias de desintoxicação, a ausência de diferenças significativas entre casos e controles pode significar que este não seja o período que melhor represente o evento estressor relacionado ao uso de substâncias que seria responsável pelo encurtamento dos telômeros. Seria possível que os primeiros episódios de uso, ou o uso agudo, tivessem maior efeito sobre o TL? O uso crônico acionaria mecanismos de regeneração capazes de recuperar o TL? A quais fatores de proteção estes indivíduos estiveram expostos?

Outra possibilidade seria que a população de casos estudada esteja representando sobreviventes, ou seja, indivíduos com a genética favorável à longevidade. A resposta a esta hipótese é desafiada pela seguinte questão: qual seria a média de vida para aqueles com TUA ou TUC? A ausência de valores de referência para o TL também dificulta a interpretação dos resultados.

Essas dúvidas poderiam ser esclarecidas por estudos longitudinais, em especial se o seguimento puder partir do período de iniciação do uso de SPA. Além disso, a avaliação dos fatores de proteção para o TL, e não apenas dos fatores de risco, também poderia trazer contribuições relevantes para a compreensão e manejo dos TUS.

Por fim, além dos aspectos biológicos e individuais, o consumo de substâncias também sofre influência de questões ambientais e sociais. A pandemia de COVID-19 afetou a população como um todo e isso também se refletiu no uso do álcool. Grupos mais vulneráveis, como os de baixa renda ou com sintomas psiquiátricos, tiveram maior risco de beber durante o isolamento. Ambas as populações apresentam maior risco de progressão para o TUS ou transtornos de humor e ansiosos. Assim, considerando a prolongada duração da pandemia, dar seguimento a este estudo seria importante para avaliar esses possíveis desfechos, assim como os fatores de risco e proteção associados a eles.

Levantamentos *on-line* foram essenciais para a coleta de dados num contexto em que os contatos sociais ficaram restritos. Entretanto, dificuldades de acesso à internet e de divulgação do estudo podem ter prejudicado o recrutamento de participantes e limitado a generalização dos resultados. Estratégias para vencer tais



barreiras devem ser discutidas, mas é possível que possam se beneficiar dos esforços realizados pelas comunidades para melhorar a inclusão digital de populações menos favorecidas durante a pandemia.

## REFERÊNCIAS

1. Degenhardt L, Charlson F, Ferrari A, et al. The global burden of disease attributable to alcohol and drug use in 195 countries and territories, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Psychiatry*. 2018;5(12):987-1012. doi:10.1016/S2215-0366(18)30337-7
2. United Nations Office on Drugs and Crime. *World Drug Report 2019*. United Nations; 2019. <https://wdr.unodc.org/wdr2019/en/drug-demand-and-supply.html>
3. Abdalla RR, Madruga CS, Ribeiro M, Pinsky I, Caetano R, Laranjeira R. Prevalence of Cocaine Use in Brazil: Data from the II Brazilian National Alcohol and Drugs Survey (BNADS). *Addict Behav*. 2014;39(1):297-301. doi:10.1016/j.addbeh.2013.10.019
4. Rivera MA, Aufderheide AC, Cartmell LW, Torres CM, Langsjoen O. Antiquity of coca-leaf chewing in the south central andes: A 3,000 Year archaeological record of coca-leaf chewing from Northern Chile. *J Psychoactive Drugs*. 2005;37(4):455-458. doi:10.1080/02791072.2005.10399820
5. Koob GF, Mason BJ. Existing and Future Drugs for the Treatment of the Dark Side of Addiction. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2016;56(October 2015):1-24. doi:10.1146/annurev-pharmtox-010715-103143
6. Koob GF, Volkow ND. Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology*. 2010;35(1):217-238. doi:10.1038/npp.2009.110
7. Bachi K, Sierra S, Volkow ND, Goldstein RZ, Alia-Klein N. Is biological aging accelerated in drug addiction? *Curr Opin Behav Sci*. 2017;13:34-39. doi:10.1016/j.cobeha.2016.09.007
8. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. XThe hallmarks of aging. *Cell*. 2013;153(6). doi:10.1016/j.cell.2013.05.039
9. Blackburn EH, Epel ES, Lin J. Human telomere biology: A contributory and interactive factor in aging, disease risks, and protection. *Science (80- )*. 2015;350(6265):1193-1198. doi:10.1126/science.aab3389
10. Sordi AO, von Diemen L, Kessler FH, et al. Effects of childhood trauma on BDNF and TBARS during crack-cocaine withdrawal. *Brazilian J Psychiatry*. 2020;42(2):214-217. doi:10.1590/1516-4446-2019-0532
11. von Diemen L, Kapczinski F, Sordi AO, et al. Increase in brain-derived

- neurotrophic factor expression in early crack cocaine withdrawal. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2014;17(1):33-40. doi:10.1017/S146114571300103X
12. Sordi AO, Rgle, Pechansky F, Kessler FH, Enrique P, et al. Oxidative stress and BDNF as possible markers for the severity of crack cocaine use in early withdrawal. *Psychopharmacology (Berl)*. 2014;231(20):4031-4039.
  13. Milivojevic V, Ansell E, Simpson C, Siedlarz KM, Sinha R, Fox HC. Peripheral Immune System Adaptations and Motivation for Alcohol in Non-Dependent Problem Drinkers. *Alcohol Clin Exp Res*. 2017;41(3):585-595. doi:10.1111/acer.13317
  14. Kreek MJ, Nielsen DA, Butelman ER, LaForge KS. Genetic influences on impulsivity, risk taking, stress responsivity and vulnerability to drug abuse and addiction. *Nat Neurosci*. 2005;8(11):1450-1457. doi:10.1038/nn1583
  15. Berk M, Post R, Ratheesh A, et al. Staging in bipolar disorder: from theoretical framework to clinical utility. *World Psychiatry*. 2017;16(3):236-244. doi:10.1002/wps.20441
  16. Davis J, Moylan S, Harvey BH, Maes M, Berk M. Neuroprogression in schizophrenia: Pathways underpinning clinical staging and therapeutic corollaries. *Aust N Z J Psychiatry*. 2014;48(6):512-529. doi:10.1177/0004867414533012
  17. Ornell F, Schuch JB, Henrique F, Kessler P. Pandemia de medo e COVID-19: impacto na saúde mental e possíveis estratégias. *Rev Debates Psychiatry*. 2020;(April):1-7.
  18. Velavan TP, Meyer CG. The COVID-19 epidemic. *Trop Med Int Heal*. 2020;25(3):278-280. doi:10.1111/tmi.13383
  19. Griswold MG, Fullman N, Hawley C, et al. Alcohol use and burden for 195 countries and territories, 1990-2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet*. 2018;392(10152):1015-1035. doi:10.1016/S0140-6736(18)31310-2
  20. Francisco Inácio Pinkusfeld Monteiro Bastos, Mauricio Teixeira Leite de Vasconcelos, Raquel Brandini De Boni, Neilane Bertoni dos Reis CF de SC. *III Levantamento Nacional Sobre o Uso de Drogas Pela População Brasileira*. (FIOCRUZ/ICICT, ed.); 2017. <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/34614>
  21. Brasil. Presidência da República. Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas. *Relatório Brasileiro Sobre Drogas / Secretaria Nacional de Políticas Sobre*

- Drogas; IME USP; Organizadores Paulina Do Carmo Arruda Vieira Duarte, Vladimir de Andrade Stempliuk.; 2009.*
22. Nkansah-Amankra S, Minelli M. “Gateway hypothesis” and early drug use: Additional findings from tracking a population-based sample of adolescents to adulthood. *Prev Med Reports.* 2016;4:134-141. doi:10.1016/j.pmedr.2016.05.003
  23. Laranjeira R, (Supervisão), [et al.]. *II Levantamento Nacional de Álcool e Drogas (LENAD).;* 2012.
  24. Carlini E, Galduróz J, Noto A, Carlini C, Oliveira L, Nappo S. *II Levantamento Domiciliar Sobre o Uso de Drogas Psicotrópicas No Brasil: Estudo Envolvendo as 108 Maiores Cidades Do País: 2005.* (CEBRID – Centro Brasileiro de Informações Sobre Drogas Psicotrópicas : UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo., ed.); 2005. doi:/S0104-11692005000700017
  25. Berk M, Kapczinski F, Andreazza AC, et al. Pathways underlying neuroprogression in bipolar disorder: Focus on inflammation, oxidative stress and neurotrophic factors. *Neurosci Biobehav Rev.* 2011;35(3):804-817. doi:10.1016/j.neubiorev.2010.10.001
  26. Wollenhaupt-Aguiar B, Kapczinski F, Pfaffenseller B. Biological Pathways Associated with Neuroprogression in. *Brain Sci.* 2021;11(228).
  27. Bradburn S, Murgatroyd C, Ray N. Neuroinflammation in mild cognitive impairment and Alzheimer’s disease: A meta-analysis. *Ageing Res Rev.* 2019;50(January):1-8. doi:10.1016/j.arr.2019.01.002
  28. Mattson MP, Arumugam T V. Hallmarks of Brain Aging: Adaptive and Pathological Modification by Metabolic States. *Cell Metab.* 2018;27(6):1176-1199. doi:10.1016/j.cmet.2018.05.011
  29. Narvaez JCM, Magalhães P V., Fries GR, et al. Peripheral toxicity in crack cocaine use disorders. *Neurosci Lett.* 2013;544:80-84. doi:10.1016/j.neulet.2013.03.045
  30. Neupane SP. Neuroimmune interface in the comorbidity between alcohol use disorder and major depression. *Front Immunol.* 2016;7(DEC). doi:10.3389/fimmu.2016.00655
  31. T.J. W, F.T. C. Microglial depletion alters the brain neuroimmune response to acute binge ethanol withdrawal. *J Neuroinflammation.* 2017;14(1). doi:10.1186/s12974-017-0856-z

32. F.T. C, R.P. V. Neuroimmune basis of alcoholic brain damage. *Int Rev Neurobiol.* 2014;118:315-357. doi:10.1016/B978-0-12-801284-0.00010-5
33. Yang Z, Ye J, Li C, et al. Drug addiction is associated with leukocyte telomere length. *Sci Rep.* 2013;3(Table 3):1-6. doi:10.1038/srep01542
34. Navarro-Mateu F, Husky M, Cayuela-Fuentes P, et al. The association of telomere length with substance use disorders: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Addiction.* Published online 2020:0-2. doi:10.1111/add.15312
35. Spencer RL, Hutchison KE. Alcohol, aging, and the stress response. *Alcohol Res Health.* 1999;23(4):272-283.
36. Baan R, Straif K, Grosse Y, et al. Carcinogenicity of alcoholic beverages. *Lancet Oncol.* 2007;8(4):292-293. doi:10.1016/S1470-2045(07)70099-2
37. Verdejo-García A, Pérez-García M. Profile of executive deficits in cocaine and heroin polysubstance users: Common and differential effects on separate executive components. *Psychopharmacology (Berl).* 2007;190(4):517-530. doi:10.1007/s00213-006-0632-8
38. Degenhardt L, Singleton J, Calabria B, et al. Mortality among cocaine users: A systematic review of cohort studies. *Drug Alcohol Depend.* 2011;113(2-3):88-95. doi:10.1016/j.drugalcdep.2010.07.026
39. Belsky DW, Caspi A, Houts R, et al. Quantification of biological aging in young adults. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(30):E4104-E4110. doi:10.1073/pnas.1506264112
40. Li X, Ploner A, Wang Y, et al. Longitudinal trajectories, correlations and mortality associations of nine biological ages across 20-years follow-up. *Elife.* 2020;9:2019-2021. doi:10.7554/eLife.51507
41. Zhang J, Rane G, Dai X, et al. Ageing and the telomere connection: An intimate relationship with inflammation. *Ageing Res Rev.* 2016;25:55-69. doi:10.1016/j.arr.2015.11.006
42. Epel ES. The geroscience agenda: Toxic stress, hormetic stress, and the rate of aging. *Ageing Res Rev.* 2020;63:101167. doi:10.1016/j.arr.2020.101167
43. Lapham K, Kvale MN, Lin J, et al. Automated assay of telomere length measurement and informatics for 100,000 subjects in the genetic epidemiology research on adult health and aging (GERA) cohort. *Genetics.* 2015;200(4):1061-1072. doi:10.1534/genetics.115.178624

44. Armanios M. Telomeres and age-related disease: How telomere biology informs clinical paradigms. *J Clin Invest*. 2013;123(3):996-1002. doi:10.1172/JCI66370
45. Toupance S, Villemonais D, Germain D, Gegout-Petit A, Albuissou E, Benetos A. The individual's signature of telomere length distribution. *Sci Rep*. 2019;9(1):1-8. doi:10.1038/s41598-018-36756-8
46. Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res*. 2002;30(10):47e - 47. doi:10.1093/nar/30.10.e47
47. Epel ES, Prather AA. Stress, Telomeres, and Psychopathology: Toward a Deeper Understanding of a Triad of Early Aging. *Annu Rev Clin Psychol*. 2018;14(February):371-397. doi:10.1146/annurev-clinpsy-032816-045054
48. Epel ES, Merkin SS, Cawthon R, et al. The rate of leukocyte telomere shortening predicts mortality from cardiovascular disease in elderly men. *Aging (Albany NY)*. 2009;1(1945-4589 (Electronic)):81-88. doi:10.18632/aging.100007
49. Rode L, Nordestgaard BG, Bojesen SE. Peripheral blood leukocyte telomere length and mortality among 64 637 individuals from the general population. *J Natl Cancer Inst*. 2015;107(6):1-8. doi:10.1093/jnci/djv074
50. Zhu X, Han W, Xue W, et al. The association between telomere length and cancer risk in population studies. *Sci Rep*. 2016;6:1-10. doi:10.1038/srep22243
51. Stindl R. The Paradoxical Lengthening of Telomeres in Somatic Tissues of the Very Old: Aging Effect Meets Birth-Cohort Effect. *J Exp Zool Part B Mol Dev Evol*. 2016;326(4):213-214. doi:10.1002/jez.b.22677
52. Pepper G V., Bateson M, Nettle D. Telomeres as integrative markers of exposure to stress and adversity: A systematic review and meta-analysis. *bioRxiv*. Published online 2018. doi:10.1101/320150
53. Puterman E, Lin J, Krauss J, Blackburn EH, Epel ES. Determinants of telomere attrition over 1 year in healthy older women: Stress and health behaviors matter. *Mol Psychiatry*. 2015;20(4):529-535. doi:10.1038/mp.2014.70
54. Squassina A, Pisanu C, Corbett N, Alda M. Telomere length in bipolar disorder and lithium response. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2017;27(6):560-567. doi:10.1016/j.euroneuro.2015.10.008
55. Conklin QA, Crosswell AD, Saron CD, Epel ES. Meditation, stress processes, and telomere biology. *Curr Opin Psychol*. 2019;28:92-101. doi:10.1016/j.copsyc.2018.11.009
56. Lindqvist et al. Psychiatric disorders and leukocyte telomere length: Underlying

- mechanisms linking mental illness with cellular aging. *Neurosci Biobehav Rev.* 2015;55(1873-7528 (Electronic)):333-364. doi:10.1016/j.neubiorev.2015.05.007
57. Epel ES. Effect of Leukocyte Telomere Length on Total and Regional Brain Volumes in a Large Population-Based Cohort. *Aging (Albany NY).* 2009;8591(10):1-8. doi:10.1001/jamaneurol.2014.1926
  58. Czepielewski LS, Massuda R, Panizzutti B, et al. Telomere Length and CCL11 Levels are Associated With Gray Matter Volume and Episodic Memory Performance in Schizophrenia: Evidence of Pathological Accelerated Aging. *Schizophr Bull.* Published online 2017:1-10. doi:10.1093/schbul/sbx015
  59. Squassina A, Pisanu C, Vanni R. Mood Disorders, Accelerated Aging, and Inflammation: Is the Link Hidden in Telomeres? *Cells.* 2019;8(1):52. doi:10.3390/cells8010052
  60. Czepielewski LS, Massuda R, Panizzutti B, et al. Telomere length in subjects with schizophrenia, their unaffected siblings and healthy controls: Evidence of accelerated aging. *Schizophr Res.* 2016;174(1-3):39-42. doi:10.1016/j.schres.2016.04.004
  61. Darrow SM, Verhoeven JE, Révész D, et al. The Association Between Psychiatric Disorders and Telomere Length: A Meta-Analysis Involving 14,827 Persons. *Psychosom Med.* 2016;78(7):776-787. doi:10.1097/PSY.0000000000000356
  62. Colpo GD, Leffa DD, Kessler CA, Kapczinski F, Quevedo J, Carvalho AF. Is bipolar disorder associated with accelerating aging? a meta-analysis of telomere length studies. *J Affect Disord.* 2015;186:241-248. doi:10.1016/j.jad.2015.06.034
  63. Vance MC, Bui E, Hoepfner SS, et al. Prospective association between major depressive disorder and leukocyte telomere length over two years. *Psychoneuroendocrinology.* 2018;90(October 2017):157-164. doi:10.1016/j.psyneuen.2018.02.015
  64. Verhoeven JE, Révész D, Picard M, et al. Depression, telomeres and mitochondrial DNA: Between- and within-person associations from a 10-year longitudinal study. *Mol Psychiatry.* 2018;23(4):850-857. doi:10.1038/mp.2017.48
  65. Levandowski ML, Tractenberg SG, de Azeredo LA, et al. Crack cocaine addiction, early life stress and accelerated cellular aging among women. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2016;71:83-89.

- doi:10.1016/j.pnpbp.2016.06.009
66. Martins de Carvalho L, Wiers CE, Manza P, et al. Effect of alcohol use disorder on cellular aging. *Psychopharmacology (Berl)*. 2019;(Wellinger 2014). doi:10.1007/s00213-019-05281-5
  67. Pavanello S, Hoxha M, Dioni L, et al. Shortened telomeres in individuals with abuse in alcohol consumption. *Int J Cancer*. 2011;129(4):983-992. doi:10.1002/ijc.25999
  68. Tannous J, Mwangi B, Hasan KM, et al. Measures of possible allostatic load in comorbid cocaine and alcohol use disorder: Brain white matter integrity, telomere length, and anti-saccade performance. *PLoS One*. 2019;14(1):1-17. doi:10.1371/journal.pone.0199729
  69. Yamaki N, Matsushita S, Hara S, Yokoyama A, Hishimoto A, Higuchi S. Telomere shortening in alcohol dependence: Roles of alcohol and acetaldehyde. *J Psychiatr Res*. 2019;109(October 2018):27-32. doi:10.1016/j.jpsychires.2018.11.007
  70. Savolainen K, Räikkönen K, Kananen L, et al. History of mental disorders and leukocyte telomere length in late adulthood: The Helsinki Birth Cohort Study (HBCS). *J Psychiatr Res*. 2012;46(10):1346-1353. doi:10.1016/j.jpsychires.2012.07.005
  71. Yang Z, Ye J, Li C, et al. Drug addiction is associated with leukocyte telomere length. *Sci Rep*. 2013;3(Table 3):1542. doi:10.1038/srep01542
  72. Aida J, Yokoyama A, Izumiyama N, et al. Alcoholics show reduced telomere length in the oesophagus. *J Pathol*. 2011;223(3):410-416. doi:10.1002/path.2817
  73. Dowlati Y, Herrmann N, Swardfager W, et al. A Meta-Analysis of Cytokines in Major Depression. *Biol Psychiatry*. 2010;67(5):446-457. doi:10.1016/j.biopsych.2009.09.033
  74. Modabbernia A, Taslimi S, Brietzke E, Ashrafi M. Cytokine alterations in bipolar disorder: A meta-analysis of 30 studies. *Biol Psychiatry*. 2013;74(1):15-25. doi:10.1016/j.biopsych.2013.01.007
  75. Passos IC, Vasconcelos-Moreno MP, Costa LG, et al. Inflammatory markers in post-traumatic stress disorder: A systematic review, meta-analysis, and meta-regression. *The Lancet Psychiatry*. 2015;2(11):1002-1012. doi:10.1016/S2215-0366(15)00309-0



76. Réus GZ, Fries GR, Stertz L, et al. The role of inflammation and microglial activation in the pathophysiology of psychiatric disorders. *Neuroscience*. 2015;300(6):141-154.
77. Miller BJ, Buckley P, Seabolt W, Mellor A, Kirkpatrick B. Meta-analysis of cytokine alterations in schizophrenia: Clinical status and antipsychotic effects. *Biol Psychiatry*. 2011;70(7):663-671. doi:10.1016/j.biopsych.2011.04.013
78. Crews FT, Lawrimore CJ, Walter TJ, Coleman LG. The role of neuroimmune signaling in alcoholism. *Neuropharmacology*. 2017;122:56-73. doi:10.1016/j.neuropharm.2017.01.031
79. Modabbernia A, Taslimi S, Brietzke E, Ashrafi M. Cytokine alterations in bipolar disorder: A meta-analysis of 30 studies. *Biol Psychiatry*. 2013;74(1):15-25. doi:10.1016/j.biopsych.2013.01.007
80. Barr T, Helms C, Grant K, Messaoudi I. Opposing effects of alcohol on the immune system. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry*. 2016;65:242-251. doi:10.1016/j.pnpbp.2015.09.001
81. Zahr NM. Peripheral TNF $\alpha$  elevations in abstinent alcoholics are associated with hepatitis C infection. *PLoS One*. 2018;13(2):1-24. doi:10.1371/journal.pone.0191586
82. Yen C-H, Ho P-S, Yeh Y-W, et al. Differential cytokine levels between early withdrawal and remission states in patients with alcohol dependence. *Psychoneuroendocrinology*. 2017;76:183-191. doi:10.1016/j.psyneuen.2016.10.015
83. D'Sa C, Fox HC, Hong AK, Dileone RJ, Sinha R. Increased serum brain-derived neurotrophic factor is predictive of cocaine relapse outcomes: A prospective study. *Biol Psychiatry*. 2011;70(8):706-711.
84. García-Marchena N, Barrera M, Mestre-Pintó JI, et al. Inflammatory mediators and dual depression: Potential biomarkers in plasma of primary and substance-induced major depression in cocaine and alcohol use disorders. *PLoS One*. 2019;14(3):1-17. doi:10.1371/journal.pone.0213791
85. Maza-Quiroga R, García-Marchena N, Romero-Sanchiz P, et al. Evaluation of plasma cytokines in patients with cocaine use disorders in abstinence identifies transforming growth factor alpha (tgfa) as a potential biomarker of consumption and dual diagnosis. *PeerJ*. 2017;2017(10):1-20. doi:10.7717/peerj.3926
86. Li Z, He Y, Wang D, Tang J, Chen X. Association between childhood trauma and

- accelerated telomere erosion in adulthood: A meta-analytic study. *J Psychiatr Res.* 2017;93:64-71. doi:10.1016/j.jpsychires.2017.06.002
87. Ridout KK, Levandowski M, Ridout SJ, et al. Early life adversity and telomere length: A meta-analysis. *Mol Psychiatry.* 2018;23(4):858-871. doi:10.1038/mp.2017.26
  88. World Health Organization. *Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): Situation Report.*; 2020.
  89. Ornell F, Moura HF, Scherer JN, Pechansky F, Kessler FHP, von Diemen L. The COVID-19 pandemic and its impact on substance use: Implications for prevention and treatment. *Psychiatry Res.* 2020;289(May):113096. doi:10.1016/j.psychres.2020.113096
  90. Brooks SK, Webster RK, Smith LE, et al. The psychological impact of quarantine and how to reduce it: rapid review of the evidence. *Lancet.* 2020;395(10227):912-920. doi:10.1016/S0140-6736(20)30460-8
  91. Gonçalves PD, Moura HF, do Amaral RA, Castaldelli-Maia JM, Malbergier A. Alcohol Use and COVID-19: Can we Predict the Impact of the Pandemic on Alcohol Use Based on the Previous Crises in the 21st Century? A Brief Review. *Front Psychiatry.* 2020;11(December):1-10. doi:10.3389/fpsy.2020.581113
  92. Testino G. Are Patients with Alcohol Use Disorders at Increased Risk for Covid-19 Infection. *Alcohol Alcohol.* 2020;55(4):344-346. doi:10.1093/alcalc/agaa037
  93. Castaldelli-Maia JM, Marziali ME, Lu Z, Martins SS. Investigating the effect of national government physical distancing measures on depression and anxiety during the COVID-19 pandemic through meta-analysis and meta-regression. *Psychol Med.* Published online 2021:1-13. doi:10.1017/S0033291721000933
  94. Stockwell T, Andreasson S, Cherpitel C, et al. The burden of alcohol on health care during COVID-19. *Drug Alcohol Rev.* 2020;(June):8-12. doi:10.1111/dar.13143
  95. World Health Organization. Alcohol does not protect against COVID-19 and its access should be restricted during lock down Dispelling myths on alcohol and COVID-19 Restricting alcohol access during COVID-19 pandemic. Published 2020. Accessed December 10, 2020. <https://www.paho.org/en/news/14-4-2020-alcohol-does-not-protect-against-covid-19-and-its-access-should-be-restricted-during>

## ANEXOS

### PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O DOUTORADO

#### *Publicações*

1. Castaldelli-maia JM, Silva NR, Campos MRD, Moura HF, Zabert G, Champagne BM, et al. Implementing evidence-based smoking cessation treatment in psychosocial care units (CAPS) in Brazil. *Int J Soc Psychiatry*. 2017;
2. Ornell F, Moura HF, Scherer JN, Pechansky F, Kessler FHP, von Diemen L. The COVID-19 pandemic and its impact on substance use: Implications for prevention and treatment. *Psychiatry Res [Internet]*. 2020;289(May):113096. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2020.113096>
3. Gonçalves PD, Moura HF, do Amaral RA, Castaldelli-Maia JM, Malbergier A. Alcohol Use and COVID-19: Can we Predict the Impact of the Pandemic on Alcohol Use Based on the Previous Crises in the 21st Century? A Brief Review. *Front Psychiatry*. 2020;11(December):1–10
4. Padilha PP da S, Scherer JN, Moura HF, von Diemen L, de Magalhaes Narvaez JC, Ornell F. AIDS incidence in Rio Grande do Sul in older adults from 1997 to 2017: an ecological study. *J Epidemiol Infect Control*. 2020
5. Castaldelli-Maia JM, Gil F, Ventriglio A, Torales J, Florio L, Moura HF, et al. Substance Use Portrayal in Oscar-nominated Movies. *Curr Drug Res Rev*. 2020;12:10–5

#### Apresentação oral e de pôsteres em congressos

1. Participação e apresentação oral no 14th World Congress of Biological Psychiatry, evento realizado de 2 a 6 de junho de 2019, em Vancouver – Canadá. O título da apresentação foi “TNF-alpha and IL-6 in alcohol use disorder: A systematic review and meta-analysis” e ocorreu no dia 06 de junho de 2019.
2. Participação e apresentação de pôster no 32nd ECNP Congress, evento realizado de 7 a 10 de setembro de 2019, em Copenhague – Dinamarca. O título

- da apresentação foi “Anti-inflammatory cytokines in alcohol use disorder: a systematic review and meta-analysis” e ocorreu no dia 10 de setembro de 2019.
3. Participação e apresentação de pôster no NIDA International Poster Session at the College on Problems of Drug Dependence (CPDD), evento realizado de 22 a 24 junho de 2020, em formato virtual. O título da apresentação foi “Telomere Length in Patients With Alcohol or Crack Cocaine Use Disorders” e ocorreu no dia 23 de junho de 2020.
  4. Participação e apresentação de pôster no The College on Problems of Drug Dependence (CPDD), evento realizado de 22 a 24 junho de 2020, em formato virtual. O título da apresentação foi “NETFLIX depicts more tobacco use than Broadcast/Cable television” e ocorreu no dia 23 de junho de 2020.

## COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DE ARTIGO CIENTÍFICO

27/04/2021

Gmail - Brazilian Journal of Psychiatry - Manuscript ID BJP-2021-OA-1893



Helena Moura &lt;helenafmoura10@gmail.com&gt;

**Brazilian Journal of Psychiatry - Manuscript ID BJP-2021-OA-1893**

1 message

**BJP Editorial Office** <onbehalf@manuscriptcentral.com> Thu, Mar 18, 2021 at 7:30 PM

Reply-To: editorial@abp.org.br

To: ldiemen@hcpa.edu.br

Cc: helenafmoura10@gmail.com, fernandahansen@hotmail.com, fgalland@hcpa.edu.br, daiasilvello@gmail.com, frebelatto@hcpa.edu.br, fornell@hcpa.edu.br, rmassuda@gmail.com, gabriela.mferreira@yahoo.com.br, juliananscherer@gmail.com, felipe.schuch@ufsm.br, fkessler@hcpa.edu.br, ldiemen@hcpa.edu.br

18-Mar-2021

Dear Prof. Dimen:

Your manuscript entitled "Inflammation and Alcohol Use Disorder – a Systematic Review and Meta-Analysis" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Brazilian Journal of Psychiatry.

Your manuscript ID is BJP-2021-OA-1893.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc04.manuscriptcentral.com/rbp-scielo> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc04.manuscriptcentral.com/rbp-scielo>.

Thank you for submitting your manuscript to the Brazilian Journal of Psychiatry.

Sincerely,  
Editorial Office | Braz J Psychiatry  
[editorial@abp.org.br](mailto:editorial@abp.org.br)

27/04/2021

Gmail - A manuscript number has been assigned to your paper



Helena Moura &lt;helenafmoura10@gmail.com&gt;

---

**A manuscript number has been assigned to your paper**

1 message

---

**Public Health** <em@editorialmanager.com>  
Reply-To: Public Health <publichealth@rsph.org.uk>  
To: HELENA FERREIRA MOURA <helenafmoura10@gmail.com>

Wed, Apr 7, 2021 at 2:10 PM

Dear Helena,

Your submission entitled "Alcohol use in self-isolation during the COVID-19 pandemic in Brazil" has been been assigned the following manuscript number: PUHE-D-21-00935.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Managers as an author. The URL is <https://www.editorialmanager.com/puhe/>.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Melissa Davis  
Editorial Office  
Public Health

---

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/puhe/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.