

NÁDIA DE SOUSA DA CUNHA

Estudo de genes de susceptibilidade à dependência de cocaína:

o papel da MAO-A, COMT e 5-HTT

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

Área de concentração: Psiquiatria
Orientador: Prof. Dr. Homero Pinto Vallada
Filho

SÃO PAULO
2006

RESUMO

Estudo de genes de susceptibilidade à dependência de cocaína: o papel da MAO-A, COMT e 5-HTT.

O abuso de cocaína é um dos mais sérios e devastadores problemas sociais. Trata-se de transtorno psiquiátrico complexo com origens psicossocial e genética. Estudos mostram que os neurotransmissores monoaminérgicos podem estar etiologicamente relacionados à droga adicção. O objetivo deste estudo foi examinar a frequência alélica e genotípica do VNTR localizado na região promotora da MAO-A, três SNPs no gene da COMT: rs4680, rs165599 e rs737865 e uma variação de 44 pares de base na região regulatória do gene do transportador da serotonina (5-HTT) em 702 dependentes de cocaína e 866 indivíduos controle. Não houve diferença na frequência alélica e genotípica entre os grupos, para os polimorfismos da COMT e 5-HTT. Por outro lado, diferença estatisticamente significativa relacionada ao uVNTR da MAO-A (alelo 5: OR > 4.0) foi observada entre os grupos. Estes resultados sugerem que o polimorfismo uVNTR da MAO-A pode ser um fator de risco genético para desenvolvimento de dependência à cocaína na amostra estudada.

ABSTRACT

Study of susceptibility genes for cocaine addiction: role of MAO-A, COMT and 5-HTT.

Cocaine abuse is one of the most serious and socially damaging problems. It is a complex psychiatric disorder with both psychosocial and genetic origins. Studies show that monoamine neurotransmitter may be aetiologically related to drug addiction. The aim of this study was to examine the allelic and genotypic frequencies of a VNTR located in the MAO-A promoter, three SNPs in the COMT gene: rs4680, rs165599 and rs737865 and a 44-base pair length variation in the regulatory region of the serotonin transporter gene (5-HTT) in 702 cocaine dependents and 866 control subjects. There were no differences in the frequencies of allele and genotype between the groups for COMT and 5-HTT gene polymorphisms. In contrast, a statistically significant difference between the groups was observed for the MAO-A uVNTR (allele 5: OR > 4.0). These results suggest that the MAO-A uVNTR may be one of the genetic risk factors for cocaine dependence in this sample.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 01 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 02 |
| Cocaína | 02 |
| Genética dos transtornos de dependência química: cocaína | 08 |
| Estudos genético-epidemiológicos | 09 |
| Estudos em famílias..... | 09 |
| Estudos em gêmeos..... | 10 |
| Estudos em adotados | 11 |
| Análises de segregação | 12 |
| Estudos de genética molecular | 13 |
| Estudos de ligação | 13 |
| Estudos de associação alélica | 14 |
| Monoaminas | 14 |
| Catecolaminas | 15 |
| Monoamina Oxidase | 17 |
| Catecol-O-Metiltransferase | 21 |
| Serotonina | 26 |
| Transportador de Serotonina (5-HTT) | 28 |
| 3. JUSTIFICATIVA | 31 |
| 4. OBJETIVO | 33 |
| 5. HIPÓTESE | 34 |
| 6. MATERIAL E MÉTODOS | 35 |
| Material biológico | 35 |
| Pacientes | 35 |
| Controles | 38 |
| Métodos | 39 |
| Extração de DNA | 39 |
| Análise de polimorfismos gênicos | 39 |
| 7. ANÁLISE ESTATÍSTICA | 41 |

| | |
|---|-----------|
| 8. RESULTADOS | 42 |
| Caracterização da amostra estudada | 42 |
| Resultados dos genes investigados | 42 |
| MAO-A | 42 |
| COMT | 43 |
| 5-HTT | 46 |
| 9. DISCUSSÃO | 48 |
| 10. ANEXOS | 52 |
| 11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 69 |

1. INTRODUÇÃO

A cocaína, substância psicoativa atualmente consumida por 0,3% da população mundial, é o principal alcalóide ativo existente nas folhas do *Erythroxylon coca*.

O consumo da substância pode se dar por qualquer via de administração, com rápida e eficaz absorção pelas mucosas oral e nasal, bem como pela via pulmonar. Sabe-se que a euforia desencadeada reforça e motiva o desejo por um novo episódio de consumo, favorecendo o desenvolvimento da principal complicação crônica decorrente do uso: a dependência.

O abuso / dependência é caracterizado pelo conjunto de sintomas cognitivos, comportamentais e fisiológicos, que indicam que o indivíduo mantém o uso da droga, apesar dos problemas relacionados. Várias evidências sugerem que o abuso / dependência de drogas é classificado como um transtorno psiquiátrico. Além disso, estudos mostram que são justamente as complicações psiquiátricas decorrentes do uso da cocaína que mais levam os usuários à atenção médica, com quadros agudos de pânico, transtornos depressivos e psicoses agudas.

Já foi demonstrado que o comportamento de adicção decorre da complexa interação entre fatores genéticos e ambientais, que variam desde diferenças individuais no processo de metabolização de substâncias até manifestações psicológicas particulares, que levam o indivíduo a buscar a droga. Com o objetivo de melhor compreender o componente genético envolvido na manifestação deste transtorno, vários estudos vem sendo desenvolvidos, buscando-se relacionar os polimorfismos de genes alvo com o abuso de substâncias químicas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cocaína

O envolvimento do ser humano com substâncias psicoativas, em especial com a cocaína, tem suas origens em um passado longínquo. Há mais de 4500 anos as civilizações pré-colombianas dos Andes já conheciam e utilizavam a folha extraída da planta *Erythroxylon coca* (Ferreira *et al*, 2001).

A cocaína, um éster de ácido benzóico e metilecgonina é o principal alcalóide ativo existente nas folhas do *Erythroxylon coca*. Esta substância foi pela primeira vez isolada em 1860 por Niemann, que descreveu seu gosto amargo e o efeito peculiar que produzia na língua, tornando-a dormente e quase insensível. Em 1884, Sigmund Freud no livro *Über Coca* relata o primeiro estudo detalhado sobre os efeitos fisiológicos da cocaína, sugerindo possíveis aplicações da substância (Apud Leite *et al*, 1999). Na mesma época, a cocaína passou a ser utilizada durante procedimentos odontológicos e na anestesia local da córnea (Leite *et al*, 1999).

Nos Estados Unidos, por volta de 1885, a cocaína foi adicionada a um medicamento popular, considerado o protótipo da Coca-Cola, com indicações para uso como estimulante e contra dor de cabeça. Até meados do século 20 (1903-1906), esta bebida continha aproximadamente 60 mg de cocaína em 230 ml. A partir de 1900, surgiram vários medicamentos e bebidas à base de cocaína, que permaneceram no mercado até 1914, quando seu uso e venda tornaram-se ilegais nos EUA (Leite *et al*, 1999).

Entretanto, a partir dos anos 70, com as restrições impostas à comercialização das anfetaminas, o uso de cocaína tornou-se generalizado nos EUA. No início da década de 80, com a introdução do crack, o consumo aumentou de forma alarmante (Leite *et al*, 1999). Atualmente, a cocaína e o crack são consumidos por 0,3% da população mundial (UNODCCP, 2001), sendo que a maior parte dos usuários (70%) concentra-se nas

Américas. A população de usuários é jovem, variando dos 15 aos 45 anos, com predomínio na faixa etária entre 20 e 30 anos (Colliver *et al*, 1991). No Brasil, cerca de 2% dos estudantes já usaram cocaína pelo menos uma vez na vida e 0,2% o crack (Galduroz *et al*, 1997). Nas cidades do estado de São Paulo, a cocaína é classificada como a 3ª substância ilícita mais utilizada (2,1% da população já utilizou), atrás dos solventes (2,7%) e da maconha (6,6%) (Galduroz *et al*, 2000). Em uma pesquisa realizada com 770 estudantes de ensino médio de uma escola pública de São Paulo, pôde-se constatar que a cocaína e os solventes apresentam taxas de uso semelhantes (22,5% e 26,9%, respectivamente), ficando com o terceiro lugar do ranking entre as drogas mais utilizadas. Neste mesmo estudo, observou-se também que a prevalência do uso de solventes, alucinógenos e cocaína foi maior no sexo masculino (Queiroz *et al*, 2001).

O consumo da cocaína pode se dar por qualquer via de administração, com rápida e eficaz absorção pelas mucosas oral e nasal, bem como pela via pulmonar ou através de solução intravenosa (Gold, 1993). A euforia desencadeada reforça e motiva, na maioria dos indivíduos, o desejo por um novo episódio de consumo.

O risco de o indivíduo evoluir para situações de abuso e dependência, tem como importante fator à forma de uso (administração), visto que quanto mais rápido o início da ação, quanto maior a intensidade e quanto menor a sua duração, maior será a probabilidade de repetir a experiência. Portanto, frequência e duração do uso, também influenciam (Hatsukami *et al*, 1996).

Em um estudo realizado com objetivo principal de detectar o perfil de uso concomitante de álcool e cocaína, foram recrutados 110 participantes, dos quais oito reportaram uso de duas formas da cocaína (pó e crack), 69 faziam uso apenas da droga em pó, e 33 de crack. Ainda no mesmo estudo, observou-se que o pó era utilizado por via

intranasal. Já com relação aos usuários de crack, a maioria (86%) reportou uso através do fumo, e apenas 14% utilizam-no na por via endovenosa (Gossop *et al*, 2006).

A cocaína apresenta dois mecanismos de ação distintos (Leri *et al*, 2003):

1. Bloqueia a recaptação de noradrenalina, dopamina e serotonina, nos sistemas nervoso central e periférico;
2. Bloqueia os canais de sódio voltagem-dependente, produzindo o efeito de anestesia.

O bloqueio na recaptação dos neurotransmissores provoca aumento na concentração destes, com conseqüente exacerbação de seus efeitos fisiológicos (Harris *et al*, 1973). Além disto, sabe-se que as propriedades reforçadoras da cocaína e de outras substâncias como anfetamina e nicotina, estão associadas à capacidade que estas possuem de aumentar a concentração de dopamina no líquido extracelular, na região do núcleo *accumbens*, (Muller, 2006) desencadeando as elevações de humor e excitação sexual apresentadas pelos usuários. Observa-se também, que os usuários de cocaína apresentam aumento do estado de vigília, euforia, sensação de bem-estar e autoconfiança elevada (Muller 2006, Carrera 2004).

Estudos demonstraram que a cocaína produz aumento dose-dependente da frequência cardíaca e da pressão arterial, acompanhado de aumento na frequência respiratória, sudorese, espasmos musculares e tremor leve de extremidades. Segundo o Manual de Estatística e Diagnóstico de Transtornos Mentais da Associação Americana de Psiquiatria em sua quarta edição (DSM-IV Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders – fourth edition, APA 1994), o diagnóstico para a intoxicação por cocaína (DSM-IV: 292.89), baseia-se na manifestação de sintomas mencionados acima, e também na presença de outros critérios, como os apresentados abaixo (Quadro1).

Quadro 1 – Critérios diagnósticos do DSM-IV para a intoxicação por cocaína – 292.89 (APA, 1994).

1. Uso recente de cocaína.
2. Comportamento mal-adaptativo ou alterações psicológicas (euforia; embotamento afetivo; alterações de sociabilidade e de relacionamento interpessoal; hipervigília; ansiedade, tensão, raiva; comportamento estereotipado; julgamento, função social e/ou ocupacional prejudicados) que se desenvolvem durante ou logo após o uso de cocaína.
3. Dois ou mais dos seguintes sintomas, apresentados durante ou logo após o uso de cocaína:
 - a. taquicardia ou bradicardia;
 - b. dilatação da pupila;
 - c. aumento ou diminuição da pressão arterial;
 - d. transpiração ou arrepios;
 - e. náusea ou vômito;
 - f. perda de peso evidente;
 - g. agitação ou retardo psicomotor;
 - h. dor muscular, depressão respiratória, dor torácica ou arritmia cardíaca;
 - i. confusão, convulsão, discinesia, distonia ou coma.
4. Os sintomas não são decorrentes de uma condição médica / clínica geral e não podem ser melhor explicados através da relação com nenhum outro transtorno mental.

No organismo, a cocaína é extensamente convertida a produtos de biotransformação por meio de processos enzimáticos-químicos predominantemente no fígado, sendo muito pouco excretada na urina, em sua forma inalterada (Gilman *et al*, 2005). A cocaína é metabolizada em éster de metilecgonina e em benzoilecgonina -representando cerca de 75 a 90% dos metabólitos (Jatlow, 1998) e em menor escala, em ecgonina e norcocaína – metabólito biologicamente ativo (Shuster *et al*, 1992).

As complicações psiquiátricas decorrentes do uso da cocaína são as que mais levam os usuários à atenção médica, com quadros agudos de pânico, transtornos depressivos e

psicoses agudas (Brody *et al*, 1990). As conseqüências cardiovasculares também são freqüentes, sendo a angina *pectoris* a queixa mais recorrente (Derlet *et al*, 1989). Com relação aos problemas cerebrovasculares, sabe-se que um terço dos acidentes vasculares cerebrais, estão associados ao consumo de drogas (Sloan *et al*, 1991).

Dentre as complicações agudas decorrentes do uso de cocaína, a *overdose*, que se manifesta como falência de um ou mais órgãos, é a mais conhecida. Por outro lado, sabe-se que a síndrome da dependência (Lima *et al*, 2002), caracterizada pelo conjunto de sintomas cognitivos, comportamentais e fisiológicos, é um dos exemplos de complicação crônica (Leite *et al*, 1999).

De acordo com o DSM – IV, a dependência é definida como o agrupamento de três ou mais sintomas listados no quadro 2, surgindo em qualquer momento num período de 12 meses.

Quadro 2 – Critérios diagnósticos do DSM-IV para a dependência (APA, 1994).

Um padrão mal-adaptativo do uso da substância, levando a prejuízos clínicos e sociais, manifestando-se por 3 ou mais dos critérios seguintes, surgindo em qualquer momento num período de 12 meses:

1. Tolerância, definida como um dos que se segue:
 - a. necessidade de quantidades maiores da substância para obter o efeito desejado;
 - b. efeito diminuído com o uso contínuo da mesma quantidade da substância;
2. Abstinência manifestada por:
 - a. síndrome de abstinência característica;
 - b. utilização da mesma substância (ou outra muito semelhante), para aliviar os sintomas de abstinência;
3. Utilização da substância em grandes quantidades ou por período maior que o pretendido;
4. Desejo persistente ou esforços sem sucessos para reduzir ou controlar o uso;
5. Emprego de grande parte do tempo em atividades necessárias para obter a substância, utilizando-a ou recuperando-se de seus efeitos;
6. Redução de atividades sociais, ocupacionais ou recreacionais, devido ao uso da substância;
7. Uso contínuo da substância, apesar do conhecimento dos problemas físicos, psicológicos que podem ser causados ou exacerbados pela mesma.

Em um estudo realizado em 2002, observou-se que enquanto 1% dos usuários de álcool e 1,5% dos usuários de maconha desenvolvem dependência dentro de um ano após início do uso, neste mesmo intervalo, 5,5% dos usuários de cocaína progrediram para abuso/dependência; sugerindo que o intervalo de tempo entre abuso e dependência pode variar entre as drogas, e sendo aparentemente este intervalo mais curto para a cocaína do que para o álcool e maconha (Wagner, Anthony, 2002).

Ainda de acordo com o DSM-IV, 1994 a diferença entre abuso e dependência baseia-se na intensidade e frequência de administração da mesma, sendo estas menores no abuso; porém está delimitação clínica precisa entre abuso e dependência, é na maioria das vezes muito difícil.

É importante ressaltar que até o momento, nenhum medicamento ou tratamento mostrou-se eficaz para proporcionar alívio dos sintomas de abstinência, tampouco para atuar sobre o comportamento de busca pela cocaína.

2.2 Genética dos transtornos de dependência química: cocaína

O abuso/dependência de cocaína é um transtorno psiquiátrico e clínico que decorre da complexa interação entre fatores genéticos e ambientais, que variam desde diferenças individuais no processo de metabolização de substâncias até manifestações psicológicas particulares que levam o indivíduo buscar a droga de forma repetitiva.

A ausência de um padrão regular de transmissão genética afasta a hipótese da relação entre a dependência e o modelo mendeliano, segundo o qual apenas um único par de genes seria responsável pela manifestação da alteração. Por outro lado, a natureza poligênica parece exercer influência significativa sobre a hereditariedade dos comportamentos aditivos (Comings *et al*, 1997). De acordo com esta teoria, cada gene contribui de forma adicional com 5% da variância para determinado comportamento (Comings, 1998). O efeito genético é desencadeado através da atuação conjunta de vários genes, gerando uma situação de vulnerabilidade, que em interação com o ambiente produz o fenótipo final. Esse modelo, compreendendo a herança genética e a sua modulação ao longo do desenvolvimento, por efeitos biológicos (Petronis, 1999) e ambientais (Hallikainen *et al*, 2000), é chamado de modelo epigenético e parece ser o mais adequado

para a compreensão do papel da genética nas dependências químicas. A droga adicção é, portanto, enquadrada na classe de doenças genéticas conhecidas por doenças complexas ou doenças poligênicas.

Em virtude da relação apresentada entre componentes genéticos, manifestação de doenças complexas e comportamento aditivo, diversos estudos genético-epidemiológicos e estudos de genética molecular vem sendo desenvolvidos, buscando-se compreender as causas e conseqüências da interação entre os fatores citados.

2.2.1 Estudos genético-epidemiológicos

Os estudos genético-epidemiológicos compreendem os estudos em famílias, em gêmeos, em adotados e análise de segregação; porém estes não são muito freqüentes com relação ao abuso/ dependência de cocaína. Assim sendo, serão citados os resultados obtidos com diversos tipos de dependência química.

Estudos em famílias

O primeiro tipo de estudo com o objetivo de investigar a existência de um componente genético ou hereditário em uma doença é o estudo em famílias. Neste tipo de estudo analisa-se a freqüência ou prevalência da doença em familiares de portadores da manifestação (também chamados de probandos), comparando-os com familiares de indivíduos saudáveis (grupo controle) (Meira-Lima *et al*, 2003).

Se os pais dos probandos afetados apresentarem maior freqüência da doença, isto sugere que o fator genético, o fator ambiental específico da família, ou ambos contribuem para o surgimento da doença / transtorno (Saxon *et al*, 2005). Por exemplo, no estudo realizado por Merikangas *et al* (1998), avaliando 231 probandos e 61 indivíduos controles,

observou-se que a taxa de dependência de droga entre os pais dos controles foi de 3.5%. Já quando se analisou os pais de probandos dependentes, as taxas variaram de 20.5% para opióides, 14.9% para cocaína e 21.3% para maconha. Assim, enquanto este estudo demonstrou que a adicção está associada ao fator familiar, a limitação óbvia é que não se pode determinar o quanto esta transmissão provém do gene ou do ambiente.

Em geral, os estudos em famílias vêm demonstrando a agregação familiar do alcoolismo, comprovada pela prevalência de alcoolismo três a quatro vezes maior entre parentes de primeiro grau de dependentes. Entretanto, a inter-relação entre a agregação para o alcoolismo e outras drogas não é tão clara. Enquanto alguns estudos mostram um padrão de transmissão conjunta para dependência de álcool e de outras drogas, como cocaína ou heroína, outros demonstram padrões específicos de agregação para cada droga, como opiáceos, álcool, maconha, cocaína e nicotina (Meira-Lima *et al.*, 2003).

Estudos em gêmeos

Através dos estudos conduzidos em gêmeos podem-se separar os fatores genéticos dos ambientais na agregação familiar. Nestes estudos compara-se o número de pares de gêmeos monozigóticos (MZ) em que os dois indivíduos são portadores da mesma doença, com o número de pares de gêmeos dizigóticos (DZ) em que os dois indivíduos também são afetados. Este tipo de estudo baseia-se no fato de que os gêmeos MZ e DZ sofrem influência ambiental semelhante, contudo, os MZ são geneticamente idênticos, enquanto que os DZ compartilham apenas a metade de sua carga genética (50% dos genes em comum) (Saxon *et al.*, 2005). Assim, em doenças determinadas pelo ambiente, a concordância entre os MZ e os DZ seria próxima, enquanto que, nas doenças genéticas a concordância nos MZ seria significativamente maior que nos DZ (Meira-Lima *et al.*, 2003).

Segundo o estudo de Kendler *et al* (2000), realizado com 1198 pares de gêmeos homens, a taxa de concordância para a dependência de cocaína entre os gêmeos monozigóticos foi de 0.41, enquanto que para os gêmeos dizigóticos foi de apenas 0.13.

Diversos estudos sobre alcoolismo, envolvendo gêmeos, mostram influências genéticas moderadas ou fortes no sexo masculino, com estimativa de herdabilidade (um conceito epidemiológico que avalia o quanto de um traço é devido a fatores genéticos) variando de 40 a 60% (Meira-Lima *et al*, 2003).

Os estudos relacionados à dependência de cocaína indicam diferenças na herdabilidade entre homens e mulheres. Enquanto que o valor da herdabilidade para uso de cocaína nas mulheres foi de 39% (Kendler, Prescott, 1998), nos homens o mesmo índice chega a 70% (Kendler *et al* 2000).

Estudos em adotados

Com o objetivo de discriminar ainda mais a participação do ambiente da influência do componente genético, utiliza-se a estratégia de investigação da doença em adotados. Esses estudos seguem basicamente dois modelos; no primeiro investiga-se a frequência da doença entre os pais biológicos e os pais adotivos de crianças adotadas que vieram a desenvolver a doença; e no segundo, observa-se a frequência da doença nos filhos biológicos de portadores de doença que foram adotados ao nascer, comparando com filhos biológicos de pais saudáveis, também adotados logo após o nascimento (Saxon *et al*, 2005).

Os trabalhos que examinaram a questão do alcoolismo / dependência de drogas em adotados mostram invariavelmente, prevalência significativamente maior de dependência em filhos de pais biológicos que apresentam o transtorno, sem diferença entre

os sexos (Meira-Lima *et al*, 2003). Segundo Cadoret *et al* (1986), a taxa de abuso de drogas é quatro vezes maior para os adotados cujos pais biológicos apresentam problemas com álcool, quando comparados aos adotados de pais biológicos sem o transtorno.

Análises de segregação

Os estudos de segregação são realizados para determinação do possível modelo de herança genética de um transtorno. Para isso é necessário estudar todos os membros de uma família e a partir da distribuição dos afetados, determinar o tipo de modelo de herança genética mais provável (Meira-Lima *et al*, 2003).

Atualmente, verifica-se que a maioria dos transtornos psiquiátricos não apresenta um padrão de transmissão compatível com um modelo de herança mendeliana simples. Desta forma, os modelos multifatoriais de herança foram elaborados pressupondo a existência de um traço latente (característica ainda não expressa como fenótipo), referido como “tendência”. Assim, os fatores genéticos e ambientais que influenciariam a expressão do transtorno o fariam por um efeito sobre a “tendência” do indivíduo. Aqueles cuja “tendência” ultrapassasse um determinado limiar exibiriam a enfermidade, e os que não ultrapassassem não a exibiriam (Meira-Lima *et al*, 2003).

Os principais modelos de transmissão propostos (locus principal único, modelo oligogênico, modelo poligênico e modelo misto) diferenciam-se de acordo com o número de genes atuando para determinar a “tendência” e bem como pela presença ou não dos fatores ambientais associados (Meira-Lima *et al*, 2003).

2.2.2 Estudos de Genética Molecular

A partir dos resultados dos estudos genético-epidemiológicos apontando para a presença de um componente genético para o abuso/dependência da cocaína, e com o desenvolvimento da genética molecular, passou-se a investigar possíveis *loci* que pudessem estar associados com o fenótipo apresentado. As duas principais estratégias utilizadas são os estudos de ligação e os estudos de associação alélica.

Estudos de Ligação

Os estudos de ligação são investigações que buscam identificar genes de grande magnitude, também chamados de genes Mendelianos, como o principal fator etiológico de um transtorno. A estratégia mais utilizada é a seleção de famílias com um grande número de membros e a presença de vários afetados. Estes estudos baseiam-se no princípio de que dois *loci* gênicos situados muito próximos no mesmo cromossomo tendem a ser herdados conjuntamente (ligados), sem sofrer influência das permutas gênicas (*crossing over*). A principal limitação dessa estratégia é o pressuposto de que a doença em estudo seja causada por um único gene (Meira-Lima et al, 2003).

Estudos de Associação Alélica

Uma outra modalidade de investigação da genética molecular, que foi a ferramenta utilizada no presente trabalho, é o chamado estudo de associação ou de caso-controle. Nessa abordagem, compara-se a frequência de um determinado alelo polimórfico, de um gene possivelmente relacionado com a etiopatogenia da doença (chamado de gene candidato), entre dois grupos de indivíduos (afetados *versus* controles). Se a diferença entre esses grupos for estatisticamente significativa, a variante estudada poderá estar associada

com o desenvolvimento da doença. Os estudos de associação apresentam a vantagem de possibilitarem a detecção de genes que apresentam efeitos discretos ou moderados na determinação de uma doença (genes de pequena magnitude), o que os torna mais adequados para o estudo das doenças complexas (Meira-Lima *et al*, 2003).

2.3 Monoaminas

Como dito anteriormente, sabe-se que a cocaína, assim como outros psicoestimulantes, interagem com os neurônios monoaminérgicos no sistema nervoso central.

As monoaminas ou aminas biogênicas, constituem a principal classe de neurotransmissores do sistema nervoso central, e são assim denominadas por apresentarem um grupamento amina (-NH₂) na molécula. São sintetizadas a partir dos aminoácidos triptofano e tirosina, dando origem respectivamente a serotonina e às catecolaminas.

Uma vez que tanto a cocaína como outros psicoestimulantes, interagem com os neurônios monoaminérgicos no sistema nervoso central, promovendo as respostas já mencionadas, a abordagem à respeito da função dos neurotransmissores monoaminérgicos faz-se essencial neste momento.

2.3.1 Catecolaminas

As catecolaminas, assim denominadas por apresentarem o radical catecol, constituem um grupo de substâncias químicas neurotransmissoras que inclui a noradrenalina, adrenalina e dopamina. São sintetizadas a partir do aminoácido tirosina, proveniente da hidroxilação da fenilalanina ingerida na dieta, sendo que cerca de três quartos desta é convertida à tirosina (Siegel et al, 1998, Brody, 1999).

Sabe-se que a primeira etapa da síntese é catalisada pela tirosina hidroxilase, que converte a tirosina no derivado catecol 3,4 – dihidroxifenilalanina (DOPA) (Purves *et al.*, 2001). Subseqüentemente, e ainda no citoplasma, a DOPA, sob ação da dopa-descarboxilase, é convertida à dopamina. Esta, por sua vez, através da enzima dopamina beta-hidroxilase – presente exclusivamente nas vesículas – dá origem à noradrenalina, que fica aí retida em associação com adenosina trifosfato (ATP), até ser liberada quando da chegada de um potencial de ação no terminal nervoso simpático. Desta forma, a dopamina beta-hidroxilase representa a enzima terminal na biossíntese de catecolaminas no neurônio simpático pós-ganglionar (Aires, 1999; Berne, 1996).

Na medula da supra renal, noradrenalina e adrenalina coexistem, de forma que a síntese desta última, ocorre devido à presença e ação da enzima feniletanolamina N-metiltransferase. Assim, a noradrenalina é N-metilada para formar a adrenalina no citoplasma, e a partir daí há o armazenamento nas vesículas das células cromafins, sendo liberada somente em resposta a estimulação da mesma (Berne, 1996).

Sabe-se que a acetilcolina, liberada durante a estimulação neuronal, aumenta a condutividade da membrana da célula cromafim ao sódio, estimulando o influxo deste íon. Este por sua vez, promove a despolarização da membrana plasmática, desencadeando o influxo de cálcio pelos canais sensíveis à voltagem. O aumento da concentração citosólica de cálcio promove a translocação dos grânulos de secreção para a superfície da célula, ocasionando a fusão e conseqüente liberação do conteúdo dos mesmos para o espaço extracelular (Johnson, 2000).

Uma vez liberadas, as catecolaminas podem ter um dos seguintes destinos: (1) ligação aos adrenoceptores específicos, através dos quais exercem seus efeitos fisiológicos, (2) recaptação pelas próprias terminações nervosas simpáticas para sua estocagem,

reutilização ou metabolização ou (3) inativação, sendo ortometiladas pela ação da catecol-O-metiltransferase (COMT) e/ ou desaminadas por ação da monoamina oxidas (MAO) (Aires, 1999). (figura 1)

A MAO é uma enzima mitocondrial, enquanto a COMT é citoplasmática e extracelular. Embora ambas enzimas sejam encontradas na maioria dos tecidos, é no fígado e rins que existem em maior concentração. Por ação da COMT e na presença do doador de radicais metil (S-adenosilmetionina), noradrenalina e adrenalina são convertidas respectivamente, em normetanefrina e metanefrina (figura 1). A recaptação das catecolaminas pelas terminações nervosas, além de constituir um importante mecanismo de reaproveitamento das substâncias liberadas (não utilizadas e não inativadas), contribui para limitar sua ação fisiológica ao retirá-las do local da liberação. Uma vez ortometiladas pela COMT, a noradrenalina e a adrenalina sofrem desaminação oxidativa pela MAO, dando origem ao ácido vanilmandélico (AVM) e metoxihidroxifenilglicol, que são excretados na urina (Aires, 1999).

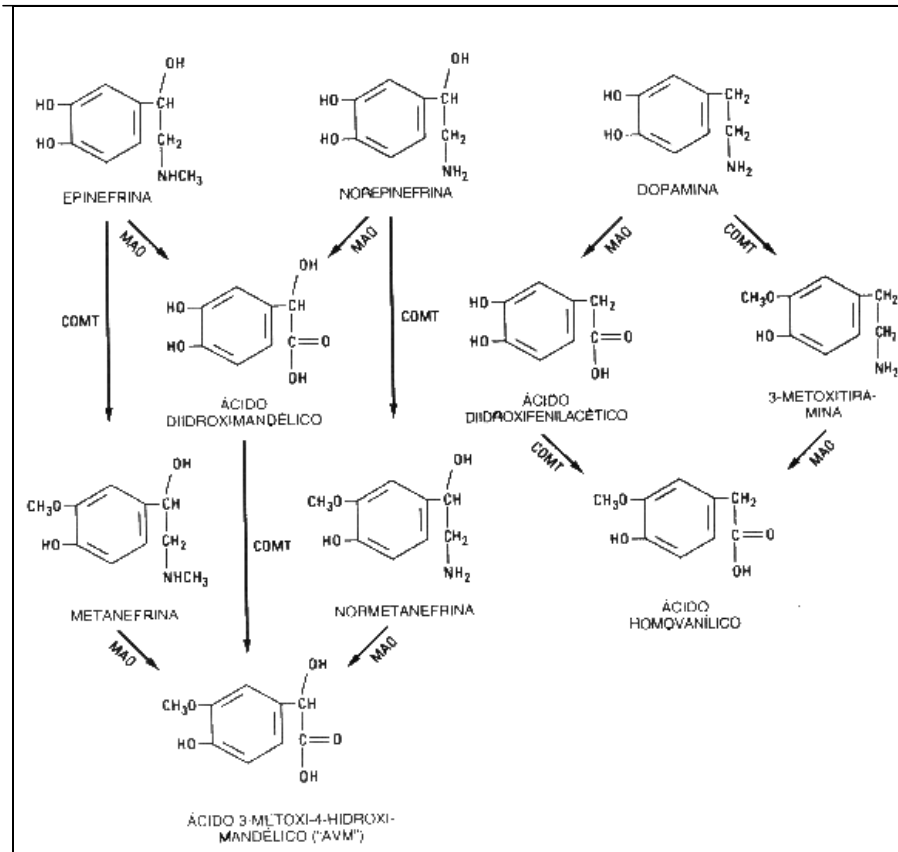


Figura 1 – Representação esquemática da cascata de inativação das catecolaminas pela MAO e COMT.

2.3.1.1 Monoamina Oxidase

Com já foi dito anteriormente, a monoamina oxidase (MAO), é uma enzima localizada na membrana externa das mitocôndrias, que catalisa a degradação oxidativa de diferentes aminas biológicas, incluindo neurotransmissores como a serotonina, norepinefrina e dopamina; e outras aminas presentes na dieta, como triptamina e feniletilamina (Sabol *et al*, 1998).

Humanos e outros mamíferos apresentam duas formas desta enzima, denominadas MAO-A e MAO-B, e codificadas por genes localizados no braço curto do cromossomo X, entre as regiões p11.23 e p11.4. Estas apresentam estruturas semelhantes, composta por 15 éxons, distribuídos em 70 Kb (Furlong *et al*, 1999).

As duas isoenzimas distinguem-se de acordo com a especificidade pelos diferentes tipos de substrato. Sabe-se que a MAO-A degrada preferencialmente serotonina e norepinefrina enquanto a MAO-B, apresenta maior afinidade por feniletilaminas e benzilamina. Outro aspecto que também as distingue é a distribuição tecidual das mesmas. Apesar de ambas serem encontradas no cérebro e em fibroblastos, somente a MAO-A está presente em trofoblastos, e a MAO-B em plaquetas (Bach *et al*, 1988).

Várias linhas de pesquisa indicam que a monoamina oxidase, em particular a MAO-A, desempenha papel importante sobre o comportamento humano (Sabol *et al*, 1998), sendo que alterações na estrutura do gene da MAO-A têm sido relacionadas a doenças psiquiátricas e distúrbios de comportamento (Gerra *et al*, 2004). Cabe ressaltar que estudos em animais também evidenciaram tal associação (Furlong *et al*, 1999).

Diversos polimorfismos da MAO-A (OMIN # 309850) estão descritos na literatura, incluindo: repetição de dinucleotídeo (MAOA-CA) próximo ao éxon 2 (Black *et al*, 1991); número variável de repetições em tandem de 23 pb próximo ao éxon 1 (Hinds *et al*, 1992); dois polimorfismos do comprimento do fragmento de restrição (*Fnu4HI* e *EcoRV*) (Lim *et al*, 1994), entre outros (Huang *et al*, 2004; Sabol *et al*, 1998). No entanto, nenhum deles parece afetar a atividade ou expressão da enzima, e tentativas de associações de polimorfismos com transtorno afetivo bipolar e alcoolismo apresentam resultados controversos (Sabol *et al*, 1998).

Buscando encontrar polimorfismos em seqüências regulatórias, Sabol *et al* (1998), descreveram um polimorfismo funcional na região promotora da MAO-A (MAO-A u-VNTR: *upstream variable number of tandem repeat*), que consiste de repetições de 30 pb, localizadas entre as posições - 1142 a -1262 em relação códon ATG, de início de transcrição. A seqüência ACC (A / G / C) G (C / T) é internamente repetida cinco vezes, totalizando o fragmento de 30 pb (figura 2). Inicialmente, foram descritos alelos com 3, 3,5, 4 e 5 cópias, mas recentemente foi detectada uma nova variante com 6 cópias, porém, de ocorrência rara (Huang *et al*, 2004). Os fragmentos gerados variam de 176 pb a 266 pb.

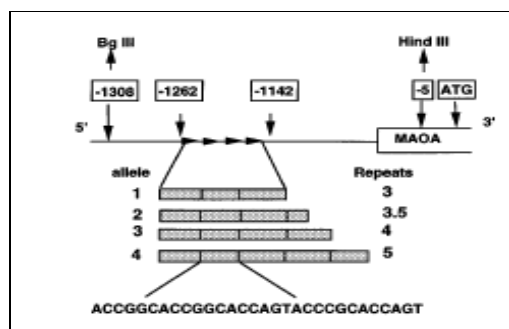


Figura 2 – Representação esquemática do polimorfismo *u-VNTR* da MAO-A

Neste mesmo estudo, observou-se que os alelos com 3,5 e 4 cópias da seqüência de 30 pb apresentam eficiência 2 a 10 vezes maior do que a dos alelos com 3 e 5 cópias, sugerindo assim a existência de um comprimento ótimo para a região. Observou-se também, que os alelos com 3 e 4 cópias são os mais freqüentes na população (36% e 62%, respectivamente), enquanto que os alelos com 3,5 e 5 cópias, são raros. Existe, ainda,

substantial diferença na frequência alélica entre os diferentes grupos étnicos, sendo que o alelo com 4 cópias é aproximadamente duas vezes mais comum que o alelo com 3 cópias na população branca/espanhóis, enquanto o alelo com 3 cópias é mais frequente que o alelo com 4 cópias, em asiáticos ($p < 0,001$).

Desde então, estudos vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de verificar a incidência dos alelos, possíveis diferenças na atividade enzimática dos mesmos e a relação destas alterações com transtornos psiquiátricos. Em 1999, Deckert e colaboradores reproduziram o resultado de Sabol *et al* (1998) demonstrando que os alelos com 3,5 e 4 cópias apresentam alta atividade de transcrição, e observaram o mesmo comportamento para o alelo com 5 cópias. Em 2002, Balciune e colaboradores observaram uma tendência de maior atividade enzimática nos indivíduos que apresentam o alelo com 4 cópias, porém não estatisticamente significativa. Mais recentemente, Gerra *et al* (2004) investigaram 104 dependentes de heroína e 95 indivíduos controles e observaram a ocorrência dos alelos com 3; 3,5; 4 e 5 cópias, sendo a frequência do alelo de 3 cópias significativamente maior no grupo de dependentes. (34.6% *versus* 18.9%, $p < 0,05$)

Em um estudo realizado com 172 homens alcoólatras e 152 indivíduos controles, observou-se uma frequência de 99% dos alelos com 3 e 4 cópias, tanto no grupo controle, quanto nos pacientes (Saito *et al*, 2002). Observaram ainda que nos pacientes, os alelos de baixa atividade (3 e 5 cópias) são mais frequentes que os alelos de alta atividade, o que se mostra de forma oposta no grupo controle. Em um estudo brasileiro envolvendo abuso/dependência de álcool, Contini *et al* (2006) investigaram 125 pacientes e 235 indivíduos controles, e observaram a associação do alelo de 3 cópias com a dependência de álcool ($p < 0.05$). Vale registrar ainda, que o mesmo alelo foi mais frequente no grupo de

[NC1] Comentário: Será que devemos colocar este dado, já que não houve associação e sim apenas uma TENDENCIA. ???????????????

indivíduos com abuso de outras drogas, do que nos alcoólatras sem abuso de outras drogas ($p < 0.01$).

2.3.1.2 Catecol-O-Metiltransferase

A enzima catecol-O-metiltransferase (COMT) apresenta-se amplamente distribuída por todo organismo, porém é predominante no citoplasma. Esta enzima promove a transferência do grupo metil do co-substrato S-adenosil-L-metionina, para o grupo 3-hidróxi das catecolaminas, levando à inativação desses compostos.

A COMT apresenta duas isoformas. Tanto a forma solúvel (S-COMT – códon 108), quanto a ligada à membrana (MB-COMT – códon 158), são codificadas por um único locus localizado no cromossomo 22, na região q11.21. Este gene é composto por seis éxons, sendo os dois primeiros não codificadores, e o terceiro apresentando os dois promotores (P1:proximal e P2:distal) que controlam a expressão da enzima. A forma solúvel (S-COMT) apresenta 221 aminoácidos, enquanto que a ligada à membrana (MB-COMT) contém 50 aminoácidos adicionais (funcionando como um gancho junto à membrana celular) (Mannisto *et al*, 1999).

Já em 2001, Saito e colaboradores identificaram 33 polimorfismos de um único nucleotídeo, conhecido pela sigla inglesa SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) no gene da COMT (OMIN # 116790); sendo 5 na região flanqueadora 5', 21 nos íntrons, 4 nos éxons e 3 na região flanqueadora 3'. Hoje são conhecidos mais de 50 SNPs (HapMap).

De acordo com a literatura, a capacidade catalítica da enzima é, em parte, determinada por um polimorfismo funcional, decorrente da transição de guanina por adenina (G 1947 A) no códon 108 (ou 158 para o COMT-MB). Este polimorfismo é

responsável pela substituição do aminoácido valina (GTG) por metionina (ATG), gerando uma enzima com menor atividade (Uhl *et al*, 2002).

Segundo Matsumoto *et al* (2004), a homozigidade para o alelo da metionina leva à redução da atividade catalítica de 3 a 4 vezes, comparando com a homozigidade para o alelo da valina. Foi demonstrado também que a heterozigidade determina enzima com atividade intermediária. Este polimorfismo, conhecido com Val 108 / 158 Met (rs 4680), é classificado como RFPL (*Restriction Fragment Polymorphism Length*), isto é, polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição. A troca de bases (G→A) que ocorre neste caso, gera um novo sítio de clivagem para a enzima de restrição (neste caso, *NlaIII*), de forma que o alelo valina (alta atividade) apresenta dois fragmentos: 136 pb e 81 pb; e o alelo metionina (baixa atividade) apresenta 3 fragmentos: 96 pb, 81 pb e 40 pb (não visível).





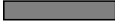
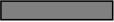
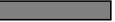
| | GG | GA | AA |
|--------|---|---|---|
| 136 pb |  |  | |
| 96 pb | |  |  |
| 81 pb |  |  |  |

Figura 3 – Representação esquemática do polimorfismo Val 108/158 Met do gene codificante da COMT após amplificação e digestão com a enzima *NlaIII*. Alelo G (Val): 136 e 81 pb; Alelo A (Met):96 e 81pb.

De acordo com Manisto *et al* (1999), algumas diferenças com relação à frequência dos alelos têm sido observadas em diferentes grupos étnicos. Neste sentido, o alelo de baixa atividade mostra-se menos freqüente em quenianos do que em caucasianos. Já o alelo de alta atividade apresenta maior freqüência nos americanos negros do que nos brancos.

Neste mesmo sentido, Palmatier e colaboradores (1999) realizaram um estudo com 1314 indivíduos de 30 diferentes populações, e confirmaram que a freqüência dos alelos da COMT varia significativamente entre as diferentes regiões geográficas ($\chi^2 = 177.45$, $df = 4$, $p = 0.0001$) e populações ($\chi^2 = 306.79$, $df = 29$, $p = 0.0001$) do mundo. Ainda de acordo com Palmatier *et al* (1999), a heterozigosidade global observada foi de 0.38. O valor mais alto da heterozigosidade regional foi de 0.48 para a população Européia, e o mais baixo,

0.29, obtido na América do Sul. Valores intermediários foram observados na África (0.33), Leste da Ásia (0.36) e Américas do Norte e Central (0.45).

Estudos vêm sendo desenvolvidos com objetivo de relacionar o polimorfismo Val 108 / 158 Met da COMT ao surgimento e/ou predisposição a certas doenças. Até o momento esta associação foi observada somente em pacientes com transtorno obsessivo-compulsivo e esquizofrênicos de comportamento agressivo. Entretanto quando analisam-se os resultados obtidos com relação à dependência / abuso de substâncias, estes mostram-se inconsistentes.

Tiihonen *et al* (1999) observaram associação entre o alcoolismo tipo 1 (desenvolvimento tardio) e o alelo de baixa atividade (met) em uma população finlandesa, sugerindo que indivíduos com esta variante podem apresentar redução na degradação de dopamina, o que os tornaria mais vulneráveis à dependência de álcool. Wang *et al* (2001) encontraram resultado semelhante no estudo desenvolvido com 70 pacientes de origem alemã. Entretanto, Ishiguro *et al* (1999) e Hallikainen *et al* (2000) não encontraram associação entre o polimorfismo Val 108/158 Met e o alcoolismo.

Vandenbergh *et al* (1997), em um estudo envolvendo 309 usuários de cocaína, reportaram maior frequência do alelo de alta atividade (val) nestes pacientes, levando-os a crer que este alelo aumentaria a vulnerabilidade ao abuso de drogas. Da mesma forma, Horowitz *et al* (2000) observaram associação entre uso de heroína e o alelo val, em uma população de Israel.

Diante dos resultados conflitantes à respeito da relação entre o polimorfismo Val 108/158 Met (rs 4680) e o abuso de drogas/ outras doenças psiquiátricas, bem como do amplo número de SNPs existentes no gene da COMT, outros polimorfismos vêm sendo estudados com o objetivo de melhor compreender a interação entre estes fatores. Exemplos

de dois polimorfismos não-codificadores são: o SNP rs 165599 localizado no íntron 1 da MB-COMT , que pode apresentar substituição de G (guanina) por A (adenina), e o SNP rs 737865 localizado na região 3' flanqueadora, com os alelos C (citosina) ou T (timina) (Chen *et al*, 2004).

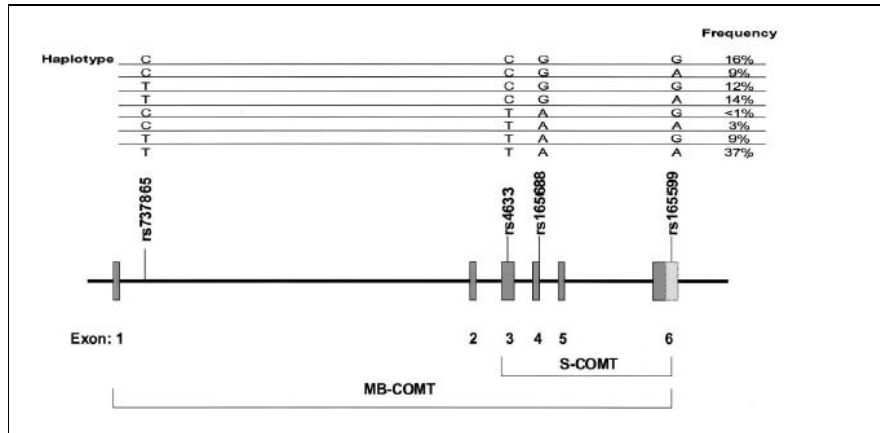


Figura 4 - Esquema representativo da estrutura do gene da COMT, indicando as formas MB e S – COMT e posição dos SNPs.

Bray *et al* (2003), em um estudo desenvolvido com amostras de tecido cerebral de pacientes esquizofrênicos, investigaram os polimorfismos Val 108 / 158 Met, rs 165599 e rs 737865, reportando associação do haplótipo da COMT com o transtorno estudado. O autor cita ainda, a interessante evidência observada no estudo de Shifman *et al* (2002), de que a associação entre esquizofrenia e o polimorfismo Val 108 / 158 Met é modesta, mas quando esta análise é realizada como parte de um haplótipo (combinação específica de alelos, presentes em alguma área definida do genoma), incluindo os SNPs rs 165599 e rs 737865, são observados resultados estatisticamente significantes ($p = 9.5 \times 10^{-8}$).

2.3.2 Serotonina

A serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT), é sintetizada a partir do aminoácido triptofano absorvido da dieta alimentar. A serotonina encontra-se em diferentes partes do corpo (o próprio nome origina-se da observação inicial de uma substância encontrada no

sangue – no soro). No caso do sistema nervoso central, o triptofano atravessa a barreira hematoencefálica, acoplado a um transportador específico, entra no neurônio serotoninérgico, onde é hidroxilado em uma reação catalizada pela enzima L-triptofano-5-monooxigenase, mais conhecida como triptofano-hidroxilase e carboxilado pela enzima triptofano-carboxilase, sendo convertido a 5-hidroxitriptamina, que é armazenada nas vesículas. Durante o impulso nervoso, a serotonina é liberada na fenda sináptica, e promove seus efeitos ligando-se aos diferentes tipos de receptores do elemento pós-sináptico. A serotonina não utilizada é recaptada pelo transportador de 5-HT e, no citoplasma do neurônio, é degradada a ácido 5-hidroxiindolacético (5 HIAA) pela enzima MAO (Siegel *et al*, 1998, Purves *et al*, 2000).

O sistema serotoninérgico atua em uma imensa variedade de funções, dentre as quais, no desempenho motor de músculos e vísceras, regulação dos sistemas cardiorespiratório e endócrino, regulação da temperatura, na percepção sensorial, na aprendizagem, memória, no comportamento alimentar e sexual e também em estados psíquicos como humor, vício, depressão entre outros.

Os receptores para a serotonina são complexos e difusamente distribuídos pelo SNC. Segundo Muller (2006), cada tipo e subtipo de receptor serotoninérgico (há pelo menos 13 sub-tipos identificados até o momento: 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E}, 5-HT_{1F}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆ e 5-HT₇), contribui diferentemente para a obtenção dos efeitos comportamentais decorrentes do uso da cocaína.

2.3.2.1 Transportador de Serotonina (5-HTT)

Em circunstâncias normais, o principal mecanismo de inativação da sinalização monoaminérgica – neste caso serotoninérgica – no cérebro, é a recaptção do neurotransmissor mediada pelo transportador específico (5-HTT ou SERT: serotonin transporter, NET: norepinephrine transporter, DAT: dopamine transporter) (Rothman *et al*, 2003).

O gene que codifica o transportador da serotonina, SLC6A4 (*Solute Carrier Family 6, member 4*) localiza-se no cromossomo 17 região q11.1-q12 e está organizado em 14 éxons apresentando em torno de 35 kb (Heils *et al*, 1996). Três polimorfismos no SLC6A4 (OMIN # 182138) têm sido reportados: repetição em tandem no éxon 2, polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição(*PstI*) na região 3' UTR (*untranslated region*), e uma segunda repetição na região promotora(Geletter *et al*, 1999).

O polimorfismo na região promotora do gene que codifica o transportador da serotonina consiste em uma inserção/ deleção (INS / DEL) de 44 pb, envolvendo a repetição de 6 a 8 elementos, que está localizado a aproximadamente 1kb acima do sítio de iniciação da transcrição do gene SLC6A4. Os fragmentos *l* e *s* (*l*: *long* e *s*: *short*) originados, apresentam respectivamente 528 pb e 484 pb (Patkar *et al*, 2002).





| | <i>ll</i> | <i>ls</i> | <i>ss</i> |
|---------------|---|---|---|
| 528 pb |  |  | |
| 484 pb | |  |  |

Figura 5 – Representação esquemática do polimorfismo para a região promotora do gene SLC6A4 após amplificação.

Experimentos iniciais demonstraram que as variantes *l* e *s* apresentam diferenças na eficiência transcricional. Lesch *et al* (1996), em um estudo com 505 indivíduos observaram a frequência de 57% para o alelo *l* e 43% para o alelo *s*. Os genótipos, distribuídos de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg, apresentaram os valores de 32% *ll*, 49% *ls*, and 19% *ss*.

Alterações no funcionamento do 5-HTT têm sido associadas a vários transtornos como depressão, ansiedade, transtorno afetivo bipolar, transtorno obsessivo-compulsivo, esquizofrenia, abuso de drogas e transtornos alimentares (Heils *et al*, 1996). Estudos *post-mortem* e de neuroimagem, reportam ainda alterações no 5-HTT em indivíduos abusadores de cocaína (Patkar *et al*, 2004).

Os estudos com o polimorfismo do transportador de serotonina, em populações de dependentes químicos, vêm sendo desenvolvidos, porém os resultados mostram-se conflitantes. Enquanto Lichtermann *et al* (2000) em um estudo realizado com 92 pacientes e pais, reportaram associação do alelo *s* com alcoolismo ($p < 0.006$), Patkar *et al* (2004),

não observaram diferenças na distribuição genotípica entre os 138 dependentes de cocaína e os 60 indivíduos sadios analisados.

Já em outro estudo, realizado com 141 indivíduos dependentes de cocaína e uso concomitante de álcool, cujo objetivo principal foi investigar o quanto os diferentes genótipos influenciam na resposta ao tratamento, observou-se que não há diferenças entre os indivíduos com genótipos *ll*, *ls*, *ss* com relação à redução do uso de cocaína. Porém, apesar do estudo ter demonstrado que não há associação das variantes com a severidade do uso de cocaína, os resultados sugerem que o polimorfismo pode distinguir respondedores de não-respondedores ao tratamento comportamental, em termos de uso de álcool (Manelli *et al*, 2005).

3.JUSTIFICATIVA

O abuso/dependência de cocaína é um problema médico, grave e que vem acometendo progressivamente um número maior de jovens, tornando-se também um importante problema de saúde pública, não só pelo grande número de pessoas afetadas como pelas conseqüências agudas e crônicas do uso/ abuso dessa droga.

Evidências sugerem que o abuso/dependência de drogas, em particular com relação à cocaína, decorre de uma complexa interação entre fatores genéticos e ambientais, que variam desde diferenças individuais no processo de metabolização de substâncias até manifestações psicológicas e culturais particulares que levam o indivíduo buscar a droga. Dentro desta complexidade, o objetivo da nossa investigação foi o estudo das variações genéticas de *loci* que poderiam estar associados ao maior risco para o desenvolvimento do abuso/ dependência à cocaína.

Resultados em diferentes tipos de estudos tem mostrado o envolvimento da enzima monoamina oxidase, em particular a MAO-A, na participação e regulação do comportamento humano (Sabol *et al*, 1998). Além disso, alterações na estrutura do gene têm sido também associadas a transtornos psiquiátricos e outros distúrbios de comportamento (Gerra *et al*, 2004). A cocaína age em diferentes sistemas monoaminérgicos, e a MAO-A é uma enzima que participa no equilíbrio e disponibilidade dessas monoaminas em determinadas regiões cerebrais. Sendo assim, esta enzima torna-se importante candidata a investigações relacionadas a dependência de cocaína.

Estudos de associação alélica envolvendo polimorfismos do gene que codifica a COMT (principalmente o Val108/158Met) também têm sido investigados para diferentes transtornos psiquiátricos, e alguns resultados sugerem associação com transtorno obsessivo-compulsivo e esquizofrenia. Entretanto, até o momento não há qualquer estudo

na literatura investigando o gene da COMT em abuso/ dependência de cocaína em uma amostra com várias centenas de pacientes.

Além disto, o gene que codifica o transportador da serotonina é um importante gene candidato, pois um dos sítios de ação da própria cocaína se faz sobre essa molécula. Até o momento, não existem relatos na literatura científica internacional sobre a investigação desse gene em abuso/ dependência de cocaína. Por fim, estudos *post-mortem* e de neuroimagem, reportam também alterações no 5-HTT em indivíduos abusadores de cocaína (Patkar *et al*, 2004).

4. OBJETIVO

O objetivo do presente estudo foi investigar a distribuição dos polimorfismos de genes candidatos para o abuso/ dependência de cocaína, abaixo relacionados, em uma amostra de moradores da cidade de São Paulo.

MAO-A: *u*-VNTR

COMT: rs 4680, rs 165599, rs 737865

5-HTT (SLC6A4): 5-HTTLPR

5. HIPÓTESE

H_0 (nula): Não há diferença entre a distribuição das variantes dos genes estudados entre os grupos (pacientes e controles)

H_1 (alternativa): Existem diferenças na distribuição das variantes genéticas entre os grupos.

H_0 / H_1

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Material Biológico

6.1.1 Pacientes

Os casos de abuso/dependência de cocaína analisados neste trabalho são provenientes do banco de DNA do projeto de Genética e Farmacogenética (PROGENE) do Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Duas teses de doutorado utilizaram esses mesmos pacientes em seus estudos (Messas 2001 e Guindalini 2005). Originalmente os pacientes foram investigados em um estudo para detecção do perfil de usuários graves de cocaína na cidade de São Paulo. Tomaram parte neste esforço o Centro de Estudos de Epidemiologia Clínica (GRIDEC) e a Unidade de Pesquisa em Álcool e Drogas (UNIAD), ambos pertencentes à Escola Paulista de Medicina (EPM) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Deste trabalho quatro teses de doutoramento já foram originadas. Na primeira delas investigou-se a estimativa de prevalência de tuberculose entre os usuários, na segunda a estimativa de infecção por HIV, hepatite B, HTLV-I / II e sífilis, na terceira, analisou-se a influência de polimorfismos localizados nos genes de receptores de dopamina 2 (DRD2) e 3 (DRD3) e na quarta analisou-se o efeito da estratificação populacional e outras variáveis de confusão em estudos genéticos de associação. A título de esclarecimento será feita uma breve apresentação da metodologia utilizada na seleção dos pacientes. Descrições mais detalhadas podem ser obtidas nas teses citadas acima.

Sete serviços de atendimento a dependentes de drogas na região metropolitana de São Paulo tomaram parte no estudo: Casa de Saúde de Santana, Centro Psiquiátrico de Soa Bernardo do Campo, Hospital Geral de Taipas, Sanatório Charcot, Hospital Psiquiátrico da

Água Funda, Comunidade Terapêutica Bezerra de Menezes e a Unidade de Pesquisa em Álcool e Drogas (UNIAD), da EPM-UNIFESP, esta em regime ambulatorial. A avaliação e coleta de material biológico realizaram-se no período de agosto de 1997 a outubro de 1998.

Para a seleção dos pacientes e dos serviços procedeu-se inicialmente a um levantamento das instituições de saúde especializadas no atendimento hospitalar a usuários / dependentes de drogas na região metropolitana de São Paulo, durante o ano de 1996. Tendo como fonte de dados o Sistema de Informações Hospitalares do Sistema Único de Saúde (SIH / SUS) do Ministério da Saúde, esta prospecção pôde abranger hospitais contratados, filantrópicos, universitários públicos ou privados, hospitais públicos federais, estaduais e municipais. A partir desta fonte de dados identificou-se todos os serviços com registro de internações com qualquer diagnóstico da Classificação Internacional de Doenças, nona edição (CID 9, então vigente) relacionada ao uso de substância química. De um universo de 36 instituições da saúde detectadas, selecionou-se aquelas que apresentaram pelo menos 50 internações no ano de 1996. Inicialmente seis serviços foram selecionados (Casa de Saúde de Santana, Centro Psiquiátrico de São Bernardo do Campo, Hospital Geral de Taipas, Sanatório Charcot, hospital Psiquiátrico da Água Funda e Instituto Morumbi de Psiquiatria); porém posteriormente o Instituto Morumbi de Psiquiatria foi excluído, visto que 85% de suas internações tinham como motivo principal quadros psicóticos relacionados ao uso de drogas e não o diagnóstico estrito de dependência. Do conjunto de serviços não conveniados ao SUS foram escolhidos dois: a Comunidade Terapêutica Bezerra de Menezes, em São Bernardo do Campo e a UNIAD / EPM-UNIFESP. Após este processo, todos os serviços acima relatados receberam ofício com exposição de motivos e cópia do projeto, com solicitação para realização da pesquisa. Todos os sete serviços aprovaram a realização da pesquisa.

Todos os pacientes submetidos a tratamento nestas instituições, com mais de 17 anos de idade, de ambos os sexos, moradores da região metropolitana da capital e em condições físicas e mentais de participarem de uma entrevista, foram incluídos no estudo. Foram excluídos pacientes com história exclusiva de dependência de álcool ou drogas de administração por via oral. Cada paciente, após esclarecimentos sobre os objetivos do projeto, assinou um termo de consentimento informado. Todos os pacientes selecionados satisfizeram os critérios de diagnóstico de dependência de cocaína a partir das diretrizes da CID 10, complementados por informações obtidas a partir de um questionário desenvolvido e validado em uma população de dependentes químicos em São Paulo. (Dunn, Laranjeira 2000) (Anexo A). Este questionário foi respondido por cada paciente a partir de uma entrevista conduzida individualmente no local do tratamento psiquiátrico, pela equipe de trabalho do projeto, anteriormente treinada e sob supervisão do pesquisador responsável por esta seção do trabalho.

De cada participante coletou-se 35 ml de sangue por punção venocubital, utilizando-se material estéril e descartável. Destes 35 ml de sangue, 10 ml contendo EDTA (anticoagulante) foram utilizados para a extração de DNA e 25 ml (sem anticoagulante) foram destinados a exames sorológicos pertinentes aos outros estudos associados. O número de casos obtidos neste estudo foi de 718.

O primeiro estudo genético-molecular, bem como seu respectivo termo de consentimento pós-informação, foram aprovados pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq do HC da FMUSP (protocolo número 499/99). Cabe ressaltar que o presente trabalho foi também aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq, como um subprojeto, em 15 de maio de 2005.

6.1.2 Controles

Os indivíduos controles utilizados nesse estudo também fazem parte do banco de DNA do Projeto de Genética e Farmacogenética (PROGENE) do Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Esses indivíduos foram recrutados no banco de Sangue do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (PROSANGUE). Nesta unidade todos os doadores de sangue, sempre voluntários, são submetidos a um questionário conduzido por uma enfermeira na equipe, investigando doenças contagiosas e uso de substâncias químicas (medicamentos e outras substâncias) (Anexo B). Todos os sujeitos com história de uso abusivo ou contato recente com qualquer droga de potencial abuso são impedidos de realizar doação. Durante o ato de coleta de sangue, foi realizada uma breve entrevista com cada doador, conduzida pelo autor ou pela colaboradora, investigando possíveis diagnósticos psiquiátricos ao longo da vida. Doadores com sinais de alguma condição psiquiátrica ou com história de internação psiquiátrica, foram excluídos do estudo. Estimativas da literatura indicam que em tal procedimento reflete-se uma real abstinência de drogas em aproximadamente 96% dos casos.

Este projeto foi formalmente submetido à direção do banco de Sangue, que autorizou a realização em suas dependências. De cada participante foram coletados aproximadamente 10 ml de sangue venoso periférico, para análise de DNA.

Todos os indivíduos controles do estudo também concordaram formalmente em participar, assinando o termo de consentimento, após esclarecimentos sobre a finalidade do trabalho. (Anexo C)

6.2 Métodos

6.2.1 Extração de DNA

Como citado, cerca de 10 mL de sangue venoso periférico foram coletados de indivíduos com estória de abuso/dependência de cocaína e de indivíduos controle utilizando-se tubos contendo etilenodiaminotetracético (EDTA). Após coleta, os tubos foram devidamente armazenados a -4°C para posterior extração de DNA.

O DNA genômico foi extraído de sangue total utilizando-se o método *salting out*, descrito por Miller *et al* (1988) (Anexo D). Após a extração, a viabilidade do material extraído foi visualizada em gel de agarose 0,8% e a concentração foi obtida por leitura em espectrofotômetro Gene Quant (Pharmacia Biotech).

6.2.2 Análise de polimorfismos gênicos

As análises dos polimorfismos gênicos foram realizadas pela técnica de reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction – PCR*) (Anexo E). A reação de amplificação foi realizada utilizando-se: 100ng de DNA genômico, 15mM MgCl₂, 500mM KCl, 100mM Tris-HCl (pH=8,0), 20 pmol de cada oligonucleotídeo específico, 200µM de cada deoxinucleotídeo trifosfato e 0,5U *Taq* DNA polimerase.

A amplificação foi realizada em termociclador Peltier Thermal Cycler-200 (MJ Research) utilizando-se as seguintes condições: 1 ciclo de 95°C por 5 minutos para a denaturação inicial do material genômico, 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C (COMT) / 58,3°C (MAO-A) / 60°C (5-HTT) por 1 minuto e 72°C por 1 minuto para a amplificação do segmento gênico de interesse e 1 ciclo de 72°C por 6 minutos para a extensão final do fragmento.

Para MAO-A

O produto amplificado foi analisado em gel de agarose 4% e corado com brometo de etídeo para visualização dos fragmentos através da luz ultra-violeta.

Para COMT

Para o polimorfismo Val 108/ 158 Met a técnica PCR foi associada à digestão do material amplificado pela enzima de restrição *NlaIII* (sítio de reconhecimento 5' CATG 3' 3' GTAC 5') conforme indicações do fabricante.

O produto amplificado foi analisado em gel de agarose 4% e corado com brometo de etídeo para visualização dos fragmentos sob luz ultra-violeta.

Como relação aos outros dois polimorfismos, rs 737865 (região 3' flanqueadora) e rs 165599 (íntron 1), solicitou-se a genotipagem através da companhia K Biosciences (www.kbioscience.co.uk), Hoddesdon/ Herts.

Para 5-HTT

O produto amplificado foi analisado em gel de agarose 2% e corado com brometo de etídeo para visualização dos fragmentos através da luz ultra-violeta.

7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise dos dados, calculou-se a frequência dos alelos (variantes polimórficas) e genótipos no grupo de usuários de cocaína e no grupo controle, através do teste de qui-quadrado, utilizando-se os programas SPSS (v.13.0) para COMT e 5-HTT e Unphased / Cocaphase (Dudbridge, 2003) para MAO-A. Os resultados também foram checados via simulação utilizando o programa CLUMP (Sham and Curtis). O teste de hipóteses qui-quadrado (X^2) foi utilizado para verificar se a frequência com que um determinado acontecimento – neste caso a frequência de um alelo ou genótipo – observado em uma amostra desviou significativamente ou não da frequência com que ele era esperado.

Também pelo SPSS, foi realizada a análise de regressão logística, tendo como covariáveis a idade, sexo e etnia. Por fim, realizou-se a análise de haplótipo com a combinação dos três SNPs da COMT (rs 737865, rs 4680, rs 165599) e as três possíveis combinações (rs 737865 e rs 4680, alelos 737865 e rs 165599, e rs 4680 e rs 165599), através do programa Whapp (Purcell, 2003).

Verificou-se também se a distribuição dos alelos dos polimorfismos estudados encontravam-se em equilíbrio nas amostras de pacientes e controles (equilíbrio de Hardy-Weinberg), através do programa HWE (Ott, 1988).

8. RESULTADOS

8.1 Caracterização da amostra estudada

Participaram deste estudo um número total de 702 usuários de cocaína e 866 controles, variando de acordo com cada polimorfismo estudado.

8.2 Resultados dos genes investigados

8.2.1 MAO-A

Com relação ao polimorfismo u-VNTR da MAO-A, foi necessária a utilização de um programa específico, tanto para verificar o equilíbrio da distribuição dos alelos, quanto para o cálculo de qui-quadrado; para que fosse feita a distinção entre homens e mulheres, visto que o gene codificante da MAO-A está localizado no cromossomo X. Este programa não fornece o valor para a verificação do equilíbrio da distribuição dos alelos, mas informa se amostra está ou não em equilíbrio. No presente estudo, a distribuição alélica para MAO-A estava em equilíbrio.

Analisando-se a Tabela 1, pode-se notar que houve diferença estatisticamente significativa na distribuição alélica entre os grupos caso e controle ($OR > 4$), o que sugere que este gene, pode estar relacionado com a suscetibilidade a dependência de cocaína na amostra estudada.

Tabela 1 - Distribuição dos alelos entre os grupos caso e controle para o polimorfismo da MAO-A.

| Número de cópias do alelo | Caso | Frequência | Controle | Frequência | OR |
|---------------------------|------|------------|----------|------------|------|
| 3 | 6 | 0.0098 | 22 | 0.0325 | 1 |
| 4 | 161 | 0.2644 | 253 | 0.3743 | 2.33 |
| 5 | 440 | 0.7225 | 394 | 0.5828 | 4.09 |
| 6 | 2 | 0.0032 | 7 | 0.0103 | 1 |

Graus de liberdade = 3

$p = 4.47 \text{ e-}007$ (valor assintótico do $p - p < 0,00001$)

Significância global = 0,000999

8.2.2 COMT

A distribuição das frequências dos genótipos e alelos dos polimorfismos da COMT estão apresentadas na Tabela 2, onde nota-se que nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre os grupos.

Tabela 2 - Distribuição dos genótipos e alelos entre os grupos caso e controle para os polimorfismos da COMT.

| Polimorfismo | Casos | Controles | X₂ | df | p |
|-------------------------|--------------|------------------|----------------------|-----------|----------|
| COMT / rs 4680 | | | | | |
| Genótipo | | | | | |
| GG | 185 | 234 | | | |
| GA | 246 | 326 | 0.136 | 2 | 0.934 |
| AA | 78 | 100 | | | |
| Alelos | | | | | |
| G | 616 | 794 | | | |
| A | 402 | 526 | 0.031 | 1 | 0.86 |
| COMT / rs 165599 | | | | | |
| Genótipo | | | | | |
| GG | 147 | 174 | | | |
| GA | 319 | 399 | 0.185 | 2 | 0.912 |
| AA | 213 | 258 | | | |
| Alelos | | | | | |
| G | 613 | 747 | | | |
| A | 745 | 915 | 0.011 | 1 | 0.91 |
| COMT / rs 737865 | | | | | |
| Genótipo | | | | | |
| CC | 35 | 54 | | | |
| CT | 273 | 291 | 4.405 | 2 | 0.111 |
| TT | 383 | 494 | | | |
| Alelos | | | | | |
| C | 343 | 399 | | | |
| T | 1039 | 1279 | 0.45 | 1 | 0.50 |

Foi realizada também análise de regressão logística, para os polimorfismos da COMT, tendo como co-variáveis: etnia, sexo e idade, porém nenhum resultado estatisticamente significativo foi observado. (rs 4680 p= 0.858, rs 165599 p= 0.682, rs 737865 p= 0.444)

Como foram estudados três SNPs no gene da COMT, foi possível a realização da análise de haplótipo. Não foram observados resultados estatisticamente significantes (Tabela 3), porém obteve-se maior frequência da combinação G – A – A (rs737865 -rs4680 -rs165599) no grupo de pacientes, com valor de p = 0.025 (Tabela 4).

Tabela 3 - Distribuição dos SNPs analisados na COMT.

| Haplótipo | X ₂ | df | p |
|-------------------------------|----------------|----|-------|
| rs 737865, rs 4680, rs 165599 | 7.839 | 6 | 0.25 |
| rs 737865, rs 4680 | 5.935 | 3 | 0.115 |
| Rs 737865, rs 165599 | 0.772 | 3 | 0.856 |
| rs 4680, rs 165599 | 3.274 | 3 | 0.351 |

Tabela 4 - Frequência estimada dos haplótipos mais comuns entre caso e controle.

| Identificação | Haplótipo | Casos | Controles | p |
|---------------|-----------|-------|-----------|-------|
| 1 | A G A | 10.4% | 11.1% | 0.602 |
| 2 | A G G | 29.1% | 27.7% | 0.403 |
| 3 | A A A | 30.4% | 30.9% | 0.769 |
| 4 | A A G | 5.0% | 6.6% | 0.128 |
| 5 | G G A | 9.0% | 10.8% | 0.158 |
| 6 | G G G | 11.8% | 10.7% | 0.400 |
| 7 | G A A | 4.0% | 2.2% | 0.025 |
| 8 | G A G | 0.3% | 0.0% | 0.117 |

De acordo com a Tabela 5, observa-se que os polimorfismos da COMT apresentaram equilíbrio na distribuição dos alelos, de acordo HWE.

Tabela 5 -Valores de HWE para casos e controles.

| Polimorfismo | HWE | HWE |
|----------------|----------|-----------|
| | Casos | Controles |
| COMT rs 4680 | p = 0.79 | p = 0.44 |
| COMT rs 165599 | p = 0.18 | p = 0.39 |
| COMT rs 737865 | p = 0.13 | p = 0.21 |

8.2.3 5-HTT

A distribuição das frequências dos genótipos e alelos do polimorfismo do 5-HTT estão apresentadas na Tabela 6, onde nota-se que nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre os grupos.

Tabela 6 - Distribuição dos genótipos e alelos entre os grupos casos e controles.

| Polimorfismo | Casos | Controles | χ^2 | df | p |
|--------------|-------|-----------|----------|----|------|
| Genótipos | | | | | |
| <i>ll</i> | 250 | 304 | | | |
| <i>ls</i> | 306 | 370 | 0.60 | 2 | 0.73 |
| <i>ss</i> | 151 | 166 | | | |
| Alelos | | | | | |
| <i>l</i> | 806 | 978 | | | |
| <i>s</i> | 608 | 702 | 0.46 | 1 | 0.49 |

Analisando-se a distribuição dos alelos, de acordo com a equação de Hardy-Weinberg, a amostra estudada não se apresenta em equilíbrio ($p = 0.006$).

9. DISCUSSÃO

O presente estudo investigou genes de vulnerabilidade para o abuso/dependência de cocaína em três *loci*, MAO-A, COMT e 5-HTT em uma amostra tipo caso-controle, tendo encontrado uma associação da MAO-A (alelo 5 OR > 4).

Estudos com ratos DAT KO (know-out) indicam que estes animais mantêm a habilidade para aquisição e administração de cocaína, quando comparados aos animais WT (wild-type), sugerindo assim que os efeitos reforçadores da cocaína podem ser mediados via mecanismos DAT-independentes (Apud Elliot *et al*, 2005). Assim, apesar dos principais efeitos farmacológicos e comportamentais da cocaína, serem mediados pela dopamina, estudos tem indicado múltiplos papéis para o sistema monoaminérgico (Elliot, 2005).

Diversos estudos vêm sendo desenvolvidos com objetivo de investigar possível associação da COMT, enzima importante na degradação das catecolaminas, com as dependências em geral, porém os resultados mostram-se controversos (Tiihonen *et al* 1999, Wang *et al* 2001, Ishiguro *et al* 1999, Hallikainen *et al* 2000, Vandenbergh *et al* 1997, Horowitz *et al* 2000).

No presente estudo, investigou-se a associação de três polimorfismos do gene da COMT (rs 4680, rs 165599, rs 737865) com a dependência de cocaína. Segundo a literatura, trata-se do primeiro estudo que analisa os polimorfismos rs 165599, rs 737865 com relação à dependência de substâncias.

Os resultados evidenciaram a não associação dos polimorfismos com a dependência de cocaína, na amostra estudada. Este resultado corrobora com os obtidos por Ishiguro *et al* (1999) e Hallikainen *et al* (2000), os quais não observaram associação do polimorfismo rs

4680 com a dependência de álcool; porém difere dos estudos de Vandenberg *et al* (1997) e Horowitz *et al* (2000), que reportaram maior frequência do alelo Val em usuários de cocaína e heroína, respectivamente.

Por outro lado, através da análise de haplótipo, observou-se maior frequência da combinação G – A – A (rs737865 -rs4680 -rs165599) no grupo de pacientes, com valor de $p = 0.025$. Este resultado assemelha-se ao obtido por Shifman *et al* (2002), no qual os pesquisadores indicam que o polimorfismo Val/ Met representa pequeno ou nenhum efeito sobre o risco de desenvolvimento de esquizofrenia, mas que outros polimorfismos (rs737865, rs165599) são associados à esquizofrenia individualmente ou em combinação haplotípica com o Val/ Met.

Analisando-se os resultados obtidos com o estudo do polimorfismo do 5HTT, conclui-se que nenhum resultado estatisticamente significativo foi observado na população estudada ($\chi^2 = 0.60$, $p = 0.73$). Resultado semelhante foi obtido no estudo de Patkar e colaboradores (2004), onde participaram 138 dependentes de cocaína e 60 indivíduos controles. Tanto a distribuição alélica quanto a genotípica não diferiram entre os grupos. De forma semelhante, Manelli e colaboradores (2005), não observaram diferenças entre indivíduos sadios e dependentes quando analisou-se a redução do uso de cocaína.

Em contraposição ao resultado obtido no presente estudo, Gerra e colaboradores (2004), em estudo com 101 dependentes de heroína e 101 indivíduos controles observaram frequência maior do genótipo *ss* entre os dependentes de cocaína ($p = 0,02$) e Lichtermann e colaboradores (2000) em um estudo realizado com 92 pacientes e pais, reportaram associação do alelo *s* com alcoolismo ($p < 0.006$).

Entretanto, os resultados observados em nosso estudo, mostram que os alelos não se apresentam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Este fato pode estar relacionado a possíveis

erros na genotipagem da amostra ou à presença de uma estratificação étnica populacional (“admixture”). Sabe-se que no Brasil há um grande número de filhos tendo pais com distintas origens étnicas. Dessa maneira, formam-se sub-populações com perfis distintos do ponto de vista genético, levando a um desequilíbrio da distribuição dos alelos. Por outro lado, recentemente Camila Guindalini (2005) abordou esse problema em sua tese de doutorado, concluindo que tais desequilíbrios das amostras são igualmente distribuídos nos grupos de controle e de caso, quando trabalha-se com grandes amostras, coletadas em uma mesma região. No presente estudo, amostras aleatórias foram re-analisadas, confirmando-se os resultados iniciais.

Com relação o polimorfismo uVNTR da MAO-A, resultado estatisticamente significativo foi observado, visto que o alelo com 5 cópias apresenta-se com maior frequência no grupo caso do que nos controles (72% e 58%, respectivamente. OR > 4).

Resultados estatisticamente significantes foram observados nos estudos de Gerra *et al* (2004) - onde o alelo de 3 cópias foi significativamente maior no grupo de dependentes ($p < 0,05$) - e Saito *et al* (2002) - onde os alelos de baixa atividade, isto é, de 3 e 5 cópias foram mais frequentes nos pacientes do que nos controles.

Associação do alelo de 3 cópias com a dependência de álcool ($p < 0,05$) também foi observada, em um estudo brasileiro envolvendo 125 pacientes e 235 indivíduos controles. Este mesmo alelo foi mais frequente no grupo de indivíduos com abuso de outras drogas, do que nos alcoólatras sem abuso de outras drogas ($p < 0.01$) (Contini *et al*, 2006).

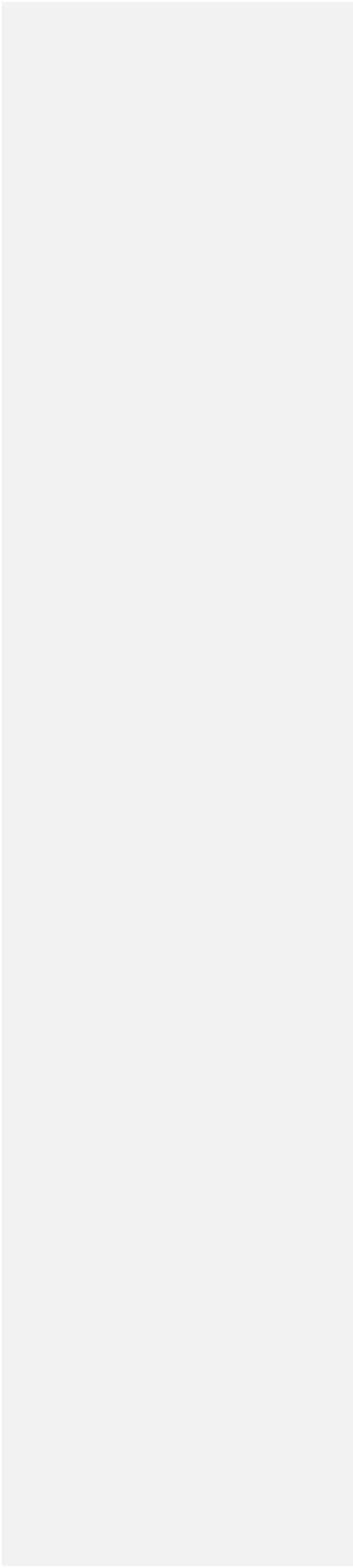
Até o presente momento, não é de nosso conhecimento que existam, na literatura internacional, resultados provenientes de investigações genéticas de caso-controle com amostras maiores do que a apresentada neste trabalho, ressaltando assim a importância deste estudo. Além disto, cabe ressaltar que análises semelhantes a estas, que tiveram início

em 1998, continuarão a ser realizadas, com o objetivo de investigarmos outros polimorfismos em genes candidatos. Nestes estudos futuros, informações sobre o grau de mistura racial ("admixture") serão também incorporadas.

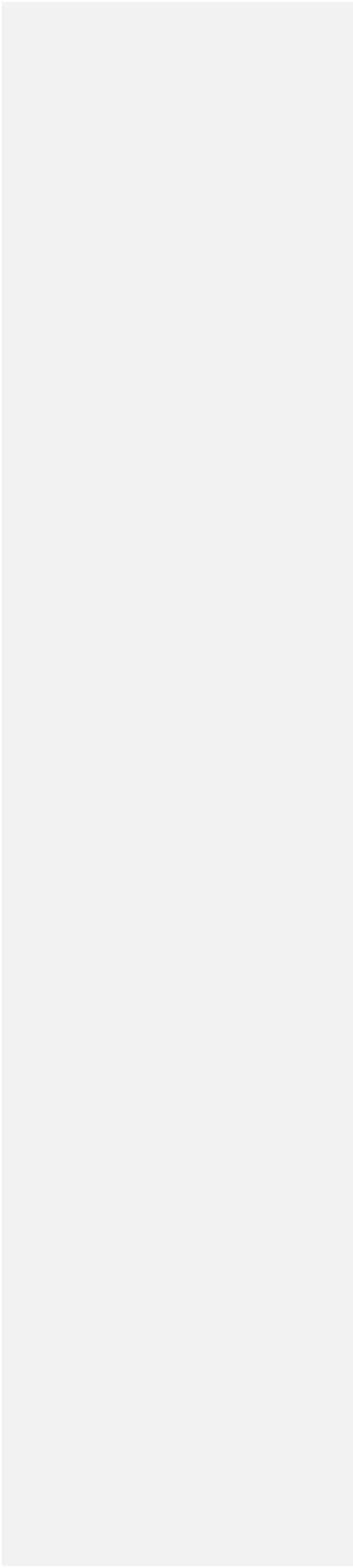
De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, conclui-se que os polimorfismos 5-HTTLPR, rs4680, rs165599 e rs737865 não caracterizam-se como fatores de risco para o desenvolvimento da dependência à cocaína. Entretanto, o alelo 5 do polimorfismo uVNTR da MAO-A mostrou-se um alelo de risco para o desenvolvimento deste transtorno psiquiátrico na amostra estudada.

10. ANEXOS

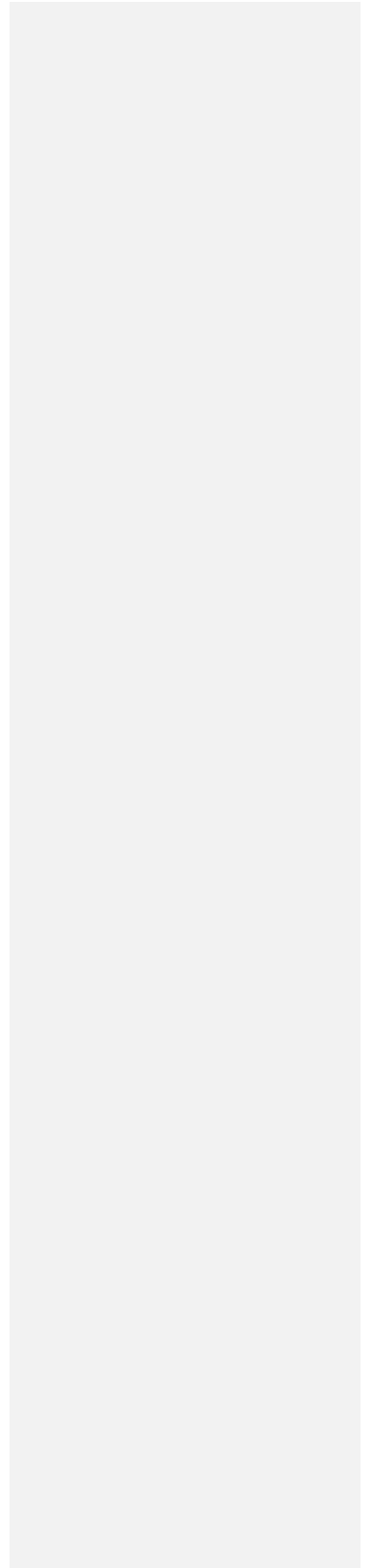
Anexo A



Anexo B



Anexo C



Anexo D

Protocolo de Extração de DNA de sangue periférico: método *salting out*, descrito por Miller *et al.* (1988)

1. Transferir o volume total de sangue (10 ml) para um tubo de propileno completando para 50 ml com solução de lise (NH_4Cl 1550mM; KHCO_3 100mM; EDTA 10mM pH = 7,4) e homogeneizar, invertendo o tubo várias vezes;
2. Manter o tubo no gelo por 30 minutos para alise da membrana celular;
3. Centrifugar por 15 minutos a 1800 rotações por minutos (rpm);
4. Desprezar o sobrenadante a lavar o precipitado em 10 ml da solução de lise;
5. Centrifugar por 15 minutos a 1800 rpm;
6. Desprezar o sobrenadante e ressuspender o precipitado em 3 ml de solução de lise de membrana nuclear (Tris-HCl 100mM pH = 8,0; NaCl 4M; EDTA 20mM pH = 8,2);
7. Adicionar 50 μl de pronase E ou 70 μl de proteinase K em concentração de 10mg / ml e 300 μl de SDS 10%;
8. Homogeneizar levemente e incubar à temperatura de 37°C por um período de 12 – 24 horas;
9. Após a incubação, adicionar 1 ml de NaCl 6M e misturar vigorosamente;
10. Centrifugar por 20 minutos a 2500 rpm;
11. Transferir o sobrenadante para um tubo limpo e centrifugar novamente por 15 minutos a 2500 rpm;
12. Transferir o sobrenadante para um tubo de vidro. Precipitar o DNA adicionando-se duas vezes o volume de etanol absoluto e invertendo algumas vezes cuidadosamente;
13. Coletar o DNA com auxílio de capilar de vidro com a extremidade soldada;
14. Lavar o DNA em etanol 70%;
15. Colocar o DNA em um tubo de micro centrífuga devidamente identificado;

16. Dissolver o DNA no tubo acrescentando-se 400 μl de solução TE^{-4} (Tris-HCl 10mM pH = 8,0; EDTA 100 mM pH = 7,4) e desprezar o capilar de vidro;
17. Incubar a 65°C por 30 minutos e
18. Armazenar as amostras a 4°C.

Anexo E

Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)

A reação de polimerização em cadeia é a técnica de amplificação do DNA ou RNA *in vitro*, utilizando-se basicamente de uma reação enzimática catalisada pela polimerase (enzima termoestável) cuja atividade depende de íons magnésio e ocorre em três etapas: *melting* (ou desnaturação), *annealing* (ou anelamento, hibridização) e *extension* (ou extensão). Metodologicamente a PCR requer os três passos (Hirata *et al*, 1997):

1. Desnaturação – Inicialmente é necessário que as duas fitas de DNA a ser amplificado sejam separadas. A elevação da temperatura entre 90°C a 95°C promove a separação da dupla fita em duas fitas simples.

2. Anelamento – A polimerase para assumir suas funções, isto é anexar as bases complementares, transformando as fitas simples em duplas fitas, necessita de um fragmento de DNA já ligado na região previamente escolhida. A solução, então é demarcar as extremidades do DNA de interesse nas duas longas fitas simples, tornando-as duplas apenas nesse intervalo. Para isso adicionam-se à solução, os *primers* ou iniciadores que são pequenos fragmentos sintéticos de DNA de fita simples – oligonucleotídeos de 20 a 30 bases nitrogenadas de comprimento – que são sintetizados *in vitro* baseado na seqüência do DNA a ser amplificado sendo eles complementares à seqüência do segmento de DNA de interesse. A hibridização dos *primers* descrito como *annealing*, deve ser feita a uma temperatura inferior a da desnaturação (45° a 60°C).

3. Extensão – Quando os *primers* encontram e ligam-se aos segmentos complementares, a DNA-polimerase pode assumir sua função. Inicia-se a partir dos pequenos fragmentos de DNA de fita dupla (resultado do anelamento do *primer*), incorporando uma um os nucleotídeos correspondentes, isto é, as bases juntamente com as moléculas de açúcar e

fosfato. A DNA-polimerase liga os nucleotídeos entre si, completando assim as fitas simples e tornado-as duplas (extensão). Os fragmentos de DNA recém-formados fornecem mais moldes para a montagem de novas fitas nos ciclos subseqüentes. Após cada ciclo, o número de fragmentos se duplica, de um formando-se 2 e então novamente 4, 8, 16, 62, 64,128 e assim por diante. Teoricamente após 20 ciclos têm-se cerca de um milhão, após 30 ciclos, cerca de um bilhão de cópias do fragmento de DNA de interesse.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aires MM. Fisiologia. ed.2.Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,1999.p.836-837.

American Psychiatric Association (APA): Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. Fourth edition (DSM-IV). 1994; 175-229.

Formatado: Espaçamento entre linhas: simples

Bach A W, Lan N C, Johnson D L, Abell C W, Bembenek M E, Kwan S W, Seeburg P H, Shih J C. cDNA cloning of human liver monoamine oxidase A and B: molecular basis of differences in enzymatic properties. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988; 85: 4934 – 4938.

Balciuniene J, Emilsson L, Orelund L, Petterson U, Jazin EE. Investigation of the functional effect of monoamine oxidase polymorphisms in human brain. *Human Genetics*. 2002; 110: 1-7.

Berne RM. *Fisiologia*. ed.3. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,1996.p.912-913

Black G C M, Chen Z Y, Craig I W, Powell J F, et al. Dinucleotide repeat polymorphism at the MAO-A locus. *Nucleic Acids Research*. 1991; 19: 689.

Bray NJ, Buckland PR, Williams NM, Williams HJ, Norton N, Owen MJ, O'Donovan MC. A haplotype implicated in Schizophrenia Susceptibility is Associated with Reduced COMT Expression in Human Brain. *American Journal of Human Genetic*. 2003; 73: 152-161.

Brody S L, Slovis C M, Wrenn K D. Cocaine-related medical problems: consecutive series of 233 patients. *Am J Med*. 1990; 88: 325 – 331.

Brody TM, Larner J, Minneman HN. *Farmacologia Humana*. ed.2. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,1994. p.75

Carrera M R A, Meijler M M, Janda K D. Cocaine pharmacology and current pharmacotherapies for its abuse. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2004; 12: 5019 – 5030.

Chen X, Wang X, O'Neill AF, Walsh D, Kendler KS. Variants in the catechol-*o*-methyltransferase (COMT) gene are associated with schizophrenia in Irish high-density families. *Molecular Psychiatry*. 2004; 9: 962-967.

Colliver J D, Kopstein A N. Trends in cocaine abuse reflected in emergency room episodes reported by DANW. *Public Health Rep*. 1991; 106: 59 – 67.

Comings D, Gade R, Wu S, Chiu C, Muhleman D, Sacier G, Ferry L, et al. Studies of the potential role of the dopamine D1 receptor gene in addictive behaviors. *Molecular Psychiatry*. 1997; 2:44-56.

Comings D. Why different rules are required for polygenic inheritance: lessons from studies of the DRD2 gene. *Alcohol*. 1998; 16(1): 61-70.

Contini V, Marques F Z C, Garcia C E D, Hutz M H, Bau C H D. MAOA-uVNTR polymorphism in a Brazilian sample: Further support for the association with impulsive behaviors and alcohol dependence. *Am J Med Genet.Part B Neuropsychiatry Genetics*. 2005; 141 (3): 305 – 308.

Deckert J, Catalano M, Syagailo YV, Bosi M, Okladnova O, Bella DD, Nothen MM, Maffei P, Franke P, Fritze J, Maier W, Propping P, Beckmann H, Bellodi L, Lesch KP. Excess of high activity monoamine oxidase A gene promoter alleles in female patients with panic disorder. *Human Molecular Genetics*. 1999; 8(4): 621-624.

Derlet R W, Albertson T E. Emergency department presentation of cocaine intoxication. *Ann Emerg Med*. 1989; 18: 182 – 186.

Dudbridge F, Unphased / Cocaphase. 2003
Available from: <http://www.rfcgr.mrc.ac.uk/~fdudbrid/software/unphased/>

Dunn J, Laranjeira R R. The development of a structured interview to evaluate cocaine use and risk behaviour. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 2000; 22 (1): 11 – 16.

Elliot J M, Beveridge, T J R. Psychostimulants and monoamine transporters: upsetting the balance. *Current Opinion in Pharmacology*. 2005; 5: 94 – 100.

Ferreira-Filho O. Estimativa da prevalência de tuberculose infecção e doença entre usuários de cocaína, internados em alguns serviços hospitalares da grande São Paulo. Tese (Doutoramento). 1999. Escola Paulista de Medicina – Universidade Federal de São Paulo.

Ferreira P E M, Martini R K. Cocaína: lendas, história e abuso. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 2001; 2: 23.

Furlong RA, Ho L, Rubinsztein JS, Walsh C, Paykel ES, Rubinsztein D. Analysis of the Monoamine Oxidase A (MAOA) Gene in Bipolar Affective Disorder by Association Studies, Meta-Analyses, and Sequencing of the Promoter. *American Journal of Medical Genetics (Neuropsychiatric Genetics)*. 1999; 88: 398-406.

Galduroz J C, Noto A R, Carlini E A. I Levantamento nacional sobre o uso de drogas psicótropicas – Parte A. Estudo envolvendo as 24 maiores cidades do Estado de São Paulo. São Paulo: Centro Brasileiro de Informações sobre drogas psicótropicas (CEBRID). Universidade Federal de São Paulo. 2000.

Galduroz J C, Noto A R, Carlini E A. IV Levantamento sobre o uso de drogas entre estudantes de 1º e 2º graus em 10 capitais brasileiras. São Paulo: Centro Brasileiro de Informações sobre drogas psicótropicas (CEBRID); 1997.

Gelernter J, Cubells JF, Kidd JR, Pakstis AJ, Kidd KK. Population Studies of polymorphisms of the Serotonin Transporter Protein Gene. *American Journal of Medical Genetics (Neuropsychiatric Genetics)*. 1999; 88: 61-66.

Gerra G, Garofano L, Bosari S, Pellegrini C, Zaimovic A, Moi G, Bussandri M, Moi A, Brambilla F, Mamei A, Pizzamiglio M, Donnini C. Analysis of monoamine oxidase A (MAO-A) promoter polymorphism in male heroin-dependent subjects: behavioural and personality correlates. *Journal of Neural Transmission*. 2004; 111: 611-621.

Formatado: Espaçamento entre linhas: simples

Gilman AG, Hardman JG, Limbird (editores). As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 11.ed.. Rio de Janeiro: McGrawHill, 2005.

Formatado: Inglês (EUA)

Formatado: Inglês (EUA)

Gold M S. Cocaine. New York: Plenum Medical Book Company. 1993.

Goldsmith H, Gottesman I, Lemery K. Epigenetic approaches to developmental psychopathology. *Development and Psychopathology* 1997; 9: 365-87.

Gossop, Michael, Manning, Victoria, Ridge, Gayle. Concurrent use of alcohol and cocaine: differences in patterns of use and problems among users of crack cocaine and cocaine powder. *Alcohol & Alcoholism*. 2006; 41: 121- 125.

Guindalini CSC. O efeito da estratificação populacional e outras variáveis de confusão em estudos genéticos de associação: investigação de genes candidatos para a dependência de cocaína. Tese (Doutoramento), Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2005.

Hallikainen T, Lachman H, Saito T, Volavka J, Kauhanen J, Salonen JT, Rynnane OP, Koulu M, Karvonen MK, Pohjalaine T, Syvalahti E, Hietala J, Tiihonen J. Lack of association between the functional variant of the catechol-O-methyltransferase (COMT) gene and early-onset alcoholism associated with severe antisocial behavior. *American Journal of Medical Genetics*. 2000; 96: 348-352.

Harris J E, Baldessarini R J. *Neuropharmacology*. 1973; 669:12.

Formatado: Inglês (EUA), Não Realce

Formatado: Inglês (EUA)

Hatsukami D K, Fischman M W. Crack cocaine and cocaine hydrochloride. Are the differences myth or reliability? *JAMA*. 1996; 276: 1580 – 1587.

Heils A, Teufel A, Petri S, Stöber G, Riederer P, Bengel D, Lesch, KP. Allelic variation of human serotonin transporter gene expression. *Journal of Neurochemistry* 1996; 66: 2621-2624.

Hinds H L, Hendricks R W, Craig I W, Chen Z Y, et al. Characterization of a highly polymorphic region near the first exon of the human MAOA gene containing a GT dinucleotide and a novel VNTR motif. *Genomics*. 1992; 13: 869 – 897.

Hirata, MH, Hirata, RDC. Reação de Polimerização em Cadeia. [apostila]. In: Curso de Atualização sobre Aplicação da PCR em Laboratório Clínico e Medicina Forense. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo; 1997.p.28-29.

Horowitz R, Kotler M, Shufman, Aharoni S, Kremer I, Cohen H, Ebstein RP. Confirmation of an Excess of the High Enzyme Activity COMT val Allele in Heroin Addicts in a Family-Based Haplotype Relative Risk Study. *American Journal of Medical Genetics (Neuropsychiatric Genetics)*. 2000; 99: 599-603.

Huang Y, Cate SP, Battistuzzi C, Oquendo MA, Brent D, Mann JJ. An Association between a Functional Polymorphism in the Monoamine Oxidase A Gene Promoter,

Impulsive Traits and Early Abuse Experiences. *Neuropsychopharmacology*. 2004; 29: 1498-1505.

Ishiguro H, Haruo ST, Toru M, Saito T, Arinami T. Association study between high and low activity polymorphism of catechol-O-methyltransferase gene and alcoholism. *Psychiatric Genetics*. 1999; 9: 135-138.

Jatlow, P. *Yale J. Biol. Med.* 1988; 6:105.

Johnson LR. *Fundamentos da Fisiologia Médica*. ed.2. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.467.

Kendler K S, Karkowski L M, Neale M C, Prescott C A. Illicit psychoactive substance use, heavy use, abuse and dependence in a US population-based sample of male twins. *Arch Gen Psychiatry*. 2000; 57: 261 – 269.

Laranjeira RR, coordenador. *Usuários de substâncias psicoativas – abordagem, diagnóstico e tratamento*. São Paulo: Conselho Regional de Medicina do Estado de São Paulo (CREMESP) / Associação Médica Brasileira; 2002. p.93-106

Leite MC, Andrade AG et al. *Cocaína e crack - dos Fundamentos ao Tratamento*. Porto Alegre: Artes Médicas Sul Ltda; 1999. p.15

Leri F, Bruneau J, Stewart J. Understanding polydrug use: review of heroin and cocaine co-use. *Addiction*. 2003; 98 (1): 7-22.

Lesch KP, Bengel D, Heils A, Sabol SZ, Greenberg BD, Petri S, Benjamin J, Müller CR, Hamer DH, Murphy DL. Association of Anxiety-Related Traits with a Polymorphism in the Serotonin Transporter Gene Regulatory Region. *Science*. 1996; 274: 1527-1531.

Lichtermann MD, Hranilovic D, Trixler M, Franke P, Jernej B, Delmo CD, Knapp M, Schwab SG, Maier W, Wildenauer DB. Support for Allelic Association of a Polymorphic Site in the Promoter Region of the Serotonin Transporter Gene with Risk for Alcohol Dependence. *American Journal of Psychiatry*. 2000; 157: 2045-2047.

Lim L C, Powell J, Sham P, Castle D, et al. Evidence for a genetic association between alleles of monoamine oxidase A gene and bipolar affective disorder. *Am J Med Genet*. 1995; 60: 325 – 331.

Lima M S, Soares B G, Reisser A A, Farrell M. Pharmacological treatment of cocaine dependence: a systematic review. *Addiction*. 2002; 97: 931 – 949.

Mannelli P, Patkar A A, Murray H W, Certa K, Peindl K, Mattila-Evenden M, Berrettini W H. Polymorphism in the serotonin transporter gene and response to treatment in African American cocaine and alcohol-abusing individuals. *Addict Biol*. 2005; 10 (3): 261 – 268.

Mannisto PT, Kaakkola S. Catechol-O-methyltransferase (COMT): biochemistry, molecular biology, pharmacology and clinical efficacy of the new selective COMT inhibitors. *Pharmacological Reviews*. 1999; 51(4) : 594-622.

Matsumoto C, Shinkai T, Hori H, Ohmori O, Nakamura J. Polymorphisms of dopamine degradation enzyme (COMT and MAO) genes and tardive dyskinesia in patients with schizophrenia. *Psychiatry Research*. 2004; 127: 1-7.

Meira-Lima IV, Vallada HP. Genética dos Transtornos Psiquiátricos. In: Flávio Kapczinski, João Quevedo, Ivan Izquierdo (org.) *Bases Biológicas dos Transtornos Psiquiátricos*. ed.2. Porto Alegre, 2003. p. 121-133.

Merikangas K R, Stolar M, Stevens D E, et al. Familial transmission of substance abuse disorders. *Arch Gen Psychiatry*. 1998; 55: 973 – 979.

Messas, GP. Análise do papel do polimorfismo Bal I (Ser9Gly) do gene do receptor dopaminérgico subtipo 3 (DRD3) na dependência de cocaína. Tese (Doutoramento), Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2001.

Miller AS, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from nucleated cells. *Nucleic Acids Research*. 1988; 16: 1215.

Muller, Christian P, Huston, Joseph P. Determining the region-specific contributions of 5-HT receptors to the psychostimulant effects of cocaine. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2006; 27.

Ott J, HWE. *Utility Programs for Analysis of Genetic Linkage*. 1988

Palmatier MA, Kang AM, Kidd KK. Global variation in the frequencies of functionally different catechol-O-Methyltransferase. *Biological Psychiatry*. 1999; 46: 557 – 567.

Patkar AA, Berretini WH, Hoehe M, Thornton CC, Gottheil E, Hill K, Weinstein SP. Serotonin transporter polymorphisms and measures of impulsivity, aggression, and sensation seeking among African-American cocaine dependent individuals. *Psychiatry Research*. 2002; 110: 103-115.

Patkar AA, Berretini WH, Mannelli P, Gopalakrishnan R, Hoehe MR, Bilal L, Weinstein S, Vergare M. Relationship between serotonin transporter gene polymorphisms and platelet serotonin transporter sites among African-American cocaine-dependent individuals and healthy volunteers. *Psychiatric Genetics*. 2004; 14: 25-32.

Petronis, A. The regulation of D2 dopamine receptor gene expression: epigenetic factors should not be forgotten. *Mol Psychiatry* 1999; 2: 212-3.

Purcell S, Sham P, whap. 2003.

Available from: <http://www.genome.wi.mit.edu/~shaun/whap/>

Purves D, Augustine G J, Fitzpatrick D, Katz L C, Lamantia A-S, McNamara J O, Williamis M S. Neuroscience. United States of America. 2001. 2 ed.

Queiroz, S, Scivoletto S, Silva MMS, Strassman PG, Andrade AG, Gattaz WF. Uso de drogas entre estudantes de uma escola pública de São Paulo. *Revista de Psiquiatria Clínica*. 2001; 4: 176-182.

Formatado: Inglês (EUA)

Rothman RB, Baumann MH. Monoamine transporters and psychostimulant drugs. *European Journal of Pharmacology*. 2003; 479: 23-40.

Sabol SZ, Hu S, Hamer D. A functional polymorphism in the monoamine oxidase A gene promoter. *Human Genetics*. 1998; 103: 273-279.

Saito T, Lachman HM, Diaz L, Hallikainen T, Kauhanen J, Salonen JT, Ryyanen OP, Karvonen MK, Syvalahti E, Pohjalainen T, Hietala J, Tiihonen J. Analysis of monoamine oxidase A (MAOA) promoter polymorphism in Finnish male alcoholics. *Psychiatry Research*. 2002; 109: 113-119.

Saito, S, Iida A, Sekine A, Miura Y, Sakamoto T, Ogawa C, Kawauchi S, Higuchi S, Nakamura Y. Identification of 197 genetic variations in six human methyltransferase genes in the Japanese population. *Journal of Human Genetics*. 2001; 46: 529-537.

Saxon A J, Oreskovich M R, Brkanac Z. Genetic Determinants of Addiction to Opioids and Cocaine. *Harv Rev Psychiatry*. 2005; 13: 218 – 232.

Shifman S, Bronstein M, Sternfeld M, Pisanté-Shalom A, Lev-Lehman E, Weizman A, Reznik I, Spivak B, Grisaru N, Karp L, Schiffer R, Kotler M, Strous RD, Swartz-Vanetik M, Knobler HY, Shinar E, Beckmann JS, Yakir B, Risch N, Zak NB, Darvasi A. A highly significant association between a COMT haplotype and schizophrenia. *American Journal of Human Genetic*. 2002; 71: 1296-1302.

Siegel G J, Agranoff B W, Fischer S K, Albers R W, Uhler M D. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. Michigan: health Research Institute – University of Michigan. 1999. 6ed.

Shuster A M, Gololobov G V, Kashuk O A, Bogomolova A E, Smirnov I V, Gabibov A G. *Science*. 1992; 665: 1.

Sloan M A, Kittner J K, Rigamonti D, Price T R. Occurrence of stroke associated with use/abuse of drugs. *Neurology*. 1991; 41: 1358 – 1364.

SPSS for windows version 13.0

Tiihonen J, Hallikainen T, Lachman H, Saito T, Volavka J, Kauhanen J, Salonen JT, Ryyanen OP, Koulou M, Karvonen MK, Pohjalainen T, Syvalahti E, Hietala J. Association between the catechol-O-methyltransferase (COMT) gene and type 1 alcoholism. *Molecular Psychiatry*. 1999; 4: 286-289.

Turchi, M. Perfil de risco e estimativa de ocorrência de infecções de transmissão sanguínea ou sexual – HIV, hepatite B, HTLV-I/II e sífilis – entre usuários de cocaína em São Paulo, Tese (Doutoramento). Escola Paulista de Medicina – Universidade Federal de São Paulo, 2000.

Uhl G R, Hall F S, Sora I. Cocaine, reward, movement and monoamine transporters. *Molecular Psychiatry* 2002, 7: 21-26.

United Nations Office for Drug Control and Crime Prevention (UNODCCP). Global illicit drug trends 2001 [online]. Vienna: UNODCCP, 2001.

Available from: URL: http://www.undcp.org/adhoc/report_2001-06-26_1/report_2001-06-26_1.pdf

Vandenbergh DJ, Rodriguez LA, Miller IT, Uhl GR, Lachman HM. High-activity catechol-O-methyltransferase allele is more prevalent in polysubstance abusers. *American Journal of Medical Genetics (Neuropsychiatric Genetics)*.1997; 74: 439-42.

Wagner F A, Anthony J C. From first drug use to drug dependence: developmental periods of risk for dependence upon marijuana, cocaine and alcohol. *Neuropsychopharmacology*. 2000; 26: 479 – 488.

Wang T, Franke P, Neidt H, Cichon S, Knapp M, Lichtermann D, Maier W, Propping P, Nothen MM. Association study of the low-activity allele of catechol-O-methyltransferase and alcoholism using a family-based approach. *Molecular Psychiatry*. 2001; 6: 109-111.