

André Brooking Negrão

Variantes genéticas de risco para a dependência de crack/cocaína: estudo de associação do tipo gene candidato e epistasia

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

Programa de Psiquiatria

Prof. Dr. Homero Pinto Vallada Filho

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 5890, de 20 de dezembro de 2010.

A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Negrão, André Brooking

Variantes genéticas de risco para a dependência de crack/cocaína : estudo de associação do tipo gene candidato e epistasia / André Brooking Negrão. -- São Paulo, 2012.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Psiquiatria.

Orientador: Homero Pinto Vallada Filho.

Descritores: 1.Cocaína 2.Cocaína crack 3.Transtornos relacionados ao uso de cocaína 4.Catecol O-metiltransferase 5.Proteínas da membrana plasmática de transporte de dopamina 6.Estudos de associação genética 7.Epistasia genética 8.Butirilcolinesterase

USP/FM/DBD-028/12

Dedicatória

À May e ao Núbio

Agradecimientos

Ao Prof. Dr. Homero, meu orientador durante a tese e tutor do meu futuro como pessoa e pesquisador.

Ao Dr. Alexandre Pereira que me recebeu de braços abertos no Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Incor e que aguçou meu interesse e impulsionou meu aprendizado da genética humana.

À Christina, à Julia e ao Rodrigo, pelo ambiente acolhedor em casa e pela compreensão silenciosa do quão importante foram para mim as longas horas dedicadas a esta tese.

À Banca de Qualificação, composta pela Profa. Dra. Silvana Chiavegatto, Prof. Dr. André Malbergier e, Prof. Dr. Hermano Tavares. Agradeço suas sugestões e as orientações pessoais que me foram dadas porque elas serviram para aprimorar esta tese.

À Mirian Moretti, quem me guiou inicialmente para a clínica do dependente químico, parceira nos Ambulatórios de Crack e Cocaína tanto na UNIFESP como na USP.

Ao Prof. Dr. Arthur Guerra, que propiciou a mim e a equipe da qual fiz parte, o apoio institucional na condução do Ambulatório de Crack e Cocaína do GREA nos anos de 2005 a 2007.

Aos pesquisadores que idealizaram o projeto e construíram os arquivos, bancos de dados e de amostras biológicas utilizadas nesta tese: Prof. Dr. Ronaldo Laranjeira, Prof. Dr. Guilherme Messas, Profa. Camila Guindalini e Nádia da Costa, Ms.

À Sra. Kátia Ichi, fundamental no apoio logístico para recuperar as planilhas de tantos anos de projetos com as amostras do Programa de Genética e Farmacogenética do Instituto de Psiquiatria do HCFMUSP.

À Felícia Knobloch, minha terapeuta, interlocutora sábia, por estar sempre atenta para desfazer comigo as armadilhas internas que ameaçaram a concretização do meu doutorado.

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação.2005.

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

Normas do Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa, de janeiro de 2009.

Sumário

LISTA DE SIGLAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

ABSTRACT

1. APRESENTAÇÃO	1
2. INTRODUÇÃO	3
2.1. Dependência de crack e de cocaína.....	4
2.1.1. Impacto do uso	4
2.2. Fatores de risco no desenvolvimento das dependências químicas.....	5
2.2.1. Uma síndrome clínica arraigada no tempo e decorrente de um fator ambiental claro.....	5
2.2.2. A neuroplasticidade induzida pela droga é o substrato do início e da perpetuação da síndrome da dependência.....	5
2.2.3. Porcentagem da transição do uso para a dependência de cocaína em estudos epidemiológicos.....	7
2.2.4. Porcentagem da transição do uso para a dependência de cocaína em modelos experimentais.....	8
2.2.5. Relevância da neuroplasticidade como fator de risco biológico....	9
2.2.6. Modelo de susceptibilidade em três níveis.....	10
2.3. Vulnerabilidade sociodemográfica e cultural.....	10
2.4. Vulnerabilidade psicológica e psiquiátrica.....	12
2.5. Vulnerabilidade genética.....	15
2.5.1. Herdabilidade.....	15
2.5.2. Tipos de estudos e principais achados para as dependências do álcool e da nicotina.....	16
2.5.2.1. Enzimas metabolizadoras do álcool.....	18
2.5.2.2. Complexo dos receptores nicotínicos.....	19

2.6.	Marcadores genéticos de risco para a dependência de cocaína.....	20
2.6.1.	Sistema de recompensa dopaminérgico.....	21
2.6.2.	Sistema gabaérgico.....	23
2.6.3.	Sistema canabinóide.....	24
2.7.	Considerações sobre os estudos de vulnerabilidade genética.....	26
2.8.	Gene candidato: butirilcolinesterase.....	27
2.9.	Epistasia.....	30
2.9.1.	Conceito e exemplos.....	30
2.9.2.	Interação de dois genes do sistema dopaminérgico cerebral: COMT e DAT.....	33
2.9.2.1.	Estudos de associação genética para COMT ou DAT1 na dependência de cocaína.....	35
2.9.2.2.	Limitação das análises convencionais e o modelo de redução dimensional multifatorial.....	36
2.9.3.	Interação de dois ou mais loci na dependência de cocaína.....	37
3.	OBJETIVOS.....	38
3.1.	Objetivo geral.....	39
3.2.	Objetivos específicos.....	39
4.	MÉTODOS.....	40
4.1.	Amostragem e extração do DNA.....	41
4.2.	Histórico das genotipagens.....	41
4.3.	Aprovação do Comitê de Ética.....	42
4.4.	Objetivo específico 1.....	43
4.4.1.	Critérios de inclusão e exclusão.....	43
4.4.2.	Escolha dos marcadores.....	44
4.4.3.	Genotipagem.....	45
4.4.4.	Análise.....	45
4.5.	Objetivo específico 2.....	46

4.5.1.	Critérios de inclusão e exclusão.....	46
4.5.1.1.	Amostra para o estudo do polimorfismo Val158Met da COMT.....	46
4.5.1.2.	Amostra para o estudos de associação de locus isolado para DAT1 e para a interação DAT1*COMT.....	47
4.5.2.	Genotipagem.....	47
4.5.3.	Análise.....	48
4.5.3.1.	Teste do poder estatístico	48
4.5.3.2.	Frequência dos genótipos entre casos e controles.....	48
4.5.3.3.	Testes de interação.....	48
4.6	Objetivo específico 3.....	50
4.6.1.	Critérios de inclusão e exclusão do sujeitos.....	50
4.6.2.	Escolha dos genes e polimorfismos.....	50
4.6.3.	Seleção dos polimorfismos.....	53
4.6.4.	Parametrização e análise univariada.....	53
4.6.5.	Análise multivariada.....	54
4.6.5.1.	Algoritmo do MDR.....	54
4.6.5.2.	Validação cruzada.....	54
4.6.5.3.	Redução das dimensões genóticas.....	55
4.6.5.4.	Escolha do Modelo.....	56
5.	RESULTADOS.....	58
5.1.	Objetivo específico 1.....	59
5.1.1.	Variáveis clínicas.....	59
5.1.2.	Caso-controle.....	59
5.1.2.1.	Equilíbrio de HW.....	59
5.1.2.2.	Frequências dos alelos e dos genótipos.....	60
5.1.2.3.	Regressão logística.....	60
5.1.3.	Subgrupos de fenótipos.....	61
5.2.	Objetivo específico 2.....	68
5.2.1.	Frequência dos genótipos e modelos de herança.....	68

5.2.2.	Teste dos modelos genéticos de interação gênica.....	71
5.3.	Objetivo específico 3.....	72
5.3.1.	Análise univariada.....	72
5.3.2.	Análise multivariada.....	73
6.	DISCUSSÃO.....	75
6.1.	Objetivo específico 1.....	76
6.2.	Objetivo específico 2.....	79
6.3.	Objetivo específico 3.....	84
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	86
7.1.	Objetivo específico 1.....	87
7.2.	Objetivo específico 2.....	88
7.3.	Objetivo específico 3.....	89
8.	CONCLUSÕES.....	91
9.	ANEXOS.....	93
10.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	106
11.	APÊNDICE.....	

Listas

LISTA DE SIGLAS

BChE	Enzima butirilcolinesterase
BCHE	Gene da butirilcolinesterase
COMT	Catecol-O-metiltransferase
DAT	Transportador de dopamina
DAT1	Gene do transportador de dopamina
GABRA2	Gene do receptor do tipo A do ácido gama-amino butírico
GWAs	<i>Genome wide association studies</i>
HWE	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
IPq-HC-FMUSP	Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
LD	Desequilíbrio de ligação
MAF	Alelo de menor frequência
MDR	Redução dimensional multifatorial
OR	<i>Odds ratio</i>
ProGene	Programa de Genética e Farmacogenética do IPq-HC-FMUSP
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo simples
TDAH	Transtorno do déficit de atenção e hiperatividade
VNTR	Número variável de repetições em tandem

LISTA DE TABELAS

	Pag.
Tabela 1. Polimorfismos selecionados para o objetivo 3.....	52
Tabela 2. Características dos pacientes dependentes de cocaína e dos controles.....	62
Tabela 3. Resultados do teste de HWE para os marcadores do gene BCHE onde são exibidos os valores de p, os alelos para cada marcador e a frequência do alelo menos comum (MAF).....	63
Tabela 4. Comparação das frequências dos alelos e genótipos do polimorfismo rs1803274 no gene BCHE estudados nos pacientes com dependência de cocaína e, controles normais segundo três modelos de dominância (*valores de p significativos adotando-se intervalo de confiança de 95%).....	64
Tabela 5. Comparação das frequências dos alelos e genótipos do polimorfismo rs 4680662 no gene BCHE estudados em pacientes com dependência de cocaína e controles normais segundo três modelos de dominância (*valores de p significativos adotando-se intervalo de confiança de 95%).....	65
Tabela 6. Comparação das frequências dos alelos e genótipos do polimorfismo rs 4263329 no gene BCHE estudados em pacientes com dependência de cocaína e controles normais segundo três modelos de dominância (*valores de p significativos adotando-se intervalo de confiança de 95%).....	66
Tabela 7. Frequência dos genótipos para os três marcadores polimórficos do gene BCHE nos pacientes dependentes de cocaína separados de acordo com a via preferencial de administração (*valores de p significativos de acordo com teste geral de associação e os valores em parêntesis representam porcentagens).....	67
Tabela 8. Frequência dos genótipos para os marcadores Val158Met do gene COMT e os VNTRs para 3'UTR e Intron8 do gene DAT1 (*valores de p significativos de acordo com teste geral de associação e os valores em parêntesis representam porcentagens)	69
Tabela 9. Resultados dos testes de modelos de dominância para os marcadores Val158Met do gene COMT e dos VNTRs 3'UTR e Intron8 para o gene DAT1.....	70

Tabela 10.	Valores das ORs e os respectivos valores de p para os testes de interação entre marcador Val158Met e o marcador 3'UTR VNTR.....	71
Tabela 11.	Valores das razões de chance (OR) e os respectivos valores de p para os testes de interação entre marcador Val158Met e o marcador Intron8 VNTR.....	72
Tabela 12.	Modelos gerados pelo MDR para os 12 genes e 40 marcadores...	73

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Produtos da biotransformação e combustão da cocaína	28
Figura 2. .Esquema da mutação não-sinônima da 'variante K' no gene BCHE..	30
Figura 3. Passos metabólicos da síntese e da degradação da dopamina	34
Figura 4. Representação esquemática da posição dos marcadores ao longo do gene BCHE	44
Figura 5. Passos no funcionamento do método MDR...	56
Figura 6. Diagrama de entropia gerado pelo programa MDR para todos os marcadores que foram usados na geração dos modelos de ordem 1 até 5 entre pacientes com dependência de cocaína e controles...	74

Resumo

NEGRÃO, AB. *Variantes genéticas de risco para a dependência de crack/cocaína: estudo de associação do tipo gene candidato e epistasia*. Tese (Doutorado). São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2012.

O uso da cocaína e do crack tornou-se um problema de saúde pública importante no Brasil por conta de prejuízos significativos do ponto de vista médico, psicológico e social que ele acarreta. Estudos de gêmeos e, em famílias, sugerem que a dependência de cocaína é uma doença complexa, com participação importante de fatores genéticos. Os estudos genéticos sobre usuários de cocaína são poucos e padecem de problemas metodológicos, tais como, amostras pequenas, com alto grau de miscigenação populacional e um número limitado de marcadores genéticos pesquisados. Além disto, há pouco sendo feito no sentido de verificar como os genes já associados à dependência de cocaína interagem entre si, ou seja, de investigações sobre a epistasia genética. Com o intuito de aprofundar a investigação dos aspectos biológicos da dependência de cocaína, nós estudamos, através de um estudo caso-controle, uma amostra de inicial de 746 pacientes dependentes de crack/cocaína hospitalizados em clínicas especializadas para o tratamento de dependência química na cidade de São Paulo, que foram comparados a 891 controles normais, sem história prévia de abuso ilegal de substâncias. Os objetivos desta tese foram: 1) verificar a associação de três polimorfismos (rs1803274, rs4263329, rs4680662) para o gene da butirilcolinesterase (BCHE), uma enzima envolvida na metabolização da cocaína no desenho do tipo gene candidato; 2) testar a hipótese de interação entre o marcador funcional Val158Met do gene para a enzima catecol-O-metiltransferase (COMT) e os marcadores do tipo VNTR das regiões 3'UTR e Intron8 do gene do transportador da dopamina (DAT1) e; 3) numa análise de caráter exploratório, verificar a interação gene-gene de 40 polimorfismos em 12 genes com plausibilidade biológica para a dependência da cocaína. A análise estatística fez uso de modelos de regressão logística para a interação de marcadores nos dois genes, COMT e DAT1 e, do programa "Multifactor Dimensionality Reduction" (MDR) para a análise multivariada. A análise envolvendo os marcadores para o gene BCHE não se mostraram associados ao fenótipo da dependência de cocaína porém, encontrou-se uma associação do marcador funcional rs1803274 ($p=0,001$; $OR=5,83$; $IC95\%=2,10 - 16,16$) nos usuários exclusivos de crack, a forma cheirada da cocaína quando comparados aos grupos de uso exclusivo da cocaína na forma cheirada ou, de uso das duas formas de administração. Os marcadores do tipo VNTR da DAT1 não interagiram em um modelo de regressão logística com o marcador Val158Met da COMT. Finalmente, os modelos construídos pelo programa MDR não forneceram interações gene-gene que tivessem uma previsibilidade além do acaso. Dentro de uma perspectiva genética, os estudos futuros para a dependência de cocaína devem aprimorar a caracterização fenotípica, por meio de subgrupos divididos por sintomas clínicos e pelo uso de fenótipos intermediários, fazer um rastreio minucioso dos marcadores ao longo dos genes de interesse e, usar de métodos analíticos para as interações gene-gene e gene-ambiente.

NEGRÃO, AB. *Genetic risk variants for crack/cocaine dependence: gene candidate association study and epistasis*. Thesis. São Paulo. “Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo”; 2012.

The use of crack/cocaine has become a major public health problem in Brazil due to its manifold problems in the medical, psychological and social realms. Twin and family studies have documented the role played by genetic factors and environment in cocaine addiction. Genetic association studies in cocaine addiction are few and have methodological problems: small sample size, population stratification and a paucity of genetic markers have been studied so far. There is also a lack of knowledge on how the genes already shown to be associated with cocaine addiction interact, that is, genetic epistasis. In order to advance the knowledge of biological factors in cocaine addiction we investigated, by means of a case-control study, 746 patients with crack/cocaine dependence admitted to specialized clinics for the treatment of drug addiction in the city of São Paulo. They were compared to 891 control subjects with no previous history of illegal drug abuse. The objectives of this thesis were: 1) investigate the association of three SNPs (rs1803274, rs4263329, rs4680662) in the butirilcholinesterase gene (BCHE) that encodes an enzyme involved in cocaine metabolism; 2) test the hypothesis of an interaction between the functional marker Val158Met of the catechol-o-metiltransferase enzyme (COMT) gene and two VNTRs markers, 3'UTR and Intron8, of the dopamine transporter gene (DAT1) and, 3) in an exploratory analysis, investigate the gene-gene interaction of 40 polymorphisms in 12 genes with a biological plausibility for cocaine addiction. Logistic regression was used to assess COMT*DAT1 gene-gene interaction and, the “Multifactor Dimensionality Reduction” (MDR) program was used for the other multivariate analysis. Genetic variants for the BCHE gene were not associated with cocaine addiction but, an association was found between the functional marker rs1803274 ($p=0,001$; OR=5,83; IC95%=2,10 - 16,16) and crack users compared to those that snorted cocaine or used both forms of administration. The DAT1 VNTRs did not interact with the COMT Val158Met marker. Finally, the models generated by the MDR program did not provided any predictive gene-gene interaction better than chance. Future studies investigating genetic risk factors for cocaine dependence should improve phenotype characterization (clinically derived subgroups and use of endophenotypes) and should also make a thorough scan of the genetic markers along the genes of interest including gene-gene and gene-environment analysis.

1. Apresentação

Estudos epidemiológicos clássicos revelam que uma história familiar de dependência de substâncias, o início precoce do uso de substâncias psicoativas, a oferta facilitada e a presença de transtornos mentais associados são alguns dos fatores de risco para a dependência de cocaína. Dentre estes, a presença de história familiar para dependência química é o fator preditor mais importante (Merikangas et al. 1998b). Tal como outras doenças crônicas e prevalentes na população geral, a dependência de cocaína é tida como uma doença complexa onde uma susceptibilidade genética interage com fatores de risco ambientais para a sua apresentação. Porém, a confirmação da existência de fatores de risco genéticos para a dependência de substâncias é assunto relativamente recente, em particular para a dependência da cocaína. Com o desenvolvimento rápido da biologia e genética molecular na última década, pesquisadores tem procurado identificar regiões cromossômicas ou genes associados com a etiopatogenia da dependência de substâncias.

O intuito desta tese foi de acrescentar conhecimento no que tange aos marcadores genéticos de susceptibilidade para a dependência de crack e de cocaína. Em linhas gerais, este propósito foi obtido através da exploração de duas abordagens num estudo de associação populacional. Uma abordagem tradicional, qual seja, a busca de marcadores de risco genético para um único gene num desenho tipo gene candidato. A segunda abordagem adotou a noção intuída, porém pouco pesquisada até o momento, do efeito combinado ou epistático entre genes. A epistasia definida como um componente ubíquo da arquitetura genética humana, tanto da saúde como da doença, uma vez que ela direciona as interações biomoleculares determinantes dos sistemas biológicos, do mesmo modo que os genótipos interagem entre si. Na prática, foram pesquisadas covariáveis de ordem genética que tivessem um efeito marginal ou, modulassem o efeito de outra variável de risco genético em dependentes de cocaína no nosso meio (Moore & Williams 2009).

2. Introdução

2.1. Dependência de crack e de cocaína

Descrições registradas do uso prejudicial da cocaína para a saúde já eram feitas no final do século XIX, porém ela só adquiriu o status de doença para a nosologia psiquiátrica oficial em 1980 (Washton, 1989). Na década de 90, com o advento da sua forma fumada, o crack, o consumo da cocaína passa a se tornar um problema de saúde pública marcadamente pela velocidade do estabelecimento de prejuízos intensos associados ao seu uso (Duailibi et al. 2008). O termo dependência de cocaína será doravante usado para designar tanto a forma cheirada, o cloridrato de cocaína ou pó, bem como a forma fumada, o crack; quando a distinção entre as duas formas for de importância isto será salientado no texto. De modo semelhante, os termos dependência química e adicção serão adotados como sinônimos porque alguns autores preferem um termo ao outro.

2.1.1. Impacto do uso

O último relatório do Escritório das Nações Unidas contra Drogas e Crime (UNODC), publicado em junho de 2007, revela que a prevalência anual do uso de crack/cocaína ao redor do globo tem se mantido estável (WHO 2007). Porém, as prevalências em alguns países, tomadas isoladamente, aumentaram nos últimos anos. Dentre estes países, encontra-se o Brasil, onde a prevalência anual do uso de crack/cocaína aumentou de 0,4% para 0,7% na população geral, respectivamente, entre os anos de 2001 e 2005 (Galduroz et al. 2005; Galduroz et al. 2003). Os estudos feitos no nosso meio, mostrando o impacto do uso de crack/cocaína, verificaram que há uma maior expressão de comportamentos impulsivos, tais como, envolvimento com o crime e taxas de soro positividade para o vírus da imunodeficiência humana e do vírus da hepatite C, quando comparados com a população geral (Ferreira Filho et al. 2003; Pechansky et al. 2003; vonDiemen et al. 2009). Numa amostra de seguimento por 12 anos de usuários de crack/cocaína na cidade de São Paulo, a taxa de mortalidade observada foi 7 vezes mais alta do que aquela na população geral ajustada para idade e sexo (Dias et al. 2008; Ribeiro et al. 2004).

2.2. Fatores de risco no desenvolvimento das dependências químicas

2.2.1. Uma síndrome clínica arraigada no tempo e decorrente de um fator ambiental claro

A pessoa com uma dependência de substância psicoativa exibe um padrão de uso maladaptativo em que existem necessariamente uma perda de controle sobre o consumo da substância associada a uma manutenção deste uso ao longo do tempo, apesar das consequências negativas para o usuário. Dentre estas consequências, a perda do interesse em atividades que antes eram prazerosas para aquela pessoa. Mesmo este padrão sendo interrompido temporariamente, persistem memórias ligadas ao uso que, num extremo, desencadeiam vontades intensas, as "fissuras" que levam a um novo consumo e com isto ao restabelecimento rápido do padrão maladaptativo anterior (Koob & Kreek 2007). Esta é uma situação clássica para a epidemiologia, qual seja, uma substância (agente), o uso estabelecido ao longo do tempo e das circunstâncias (o meio ambiente) e, uma modificação duradoura no comportamento (o indivíduo). O pesquisador nesta área, além de identificar possíveis fatores de risco, deve apoiar-se na tentativa de operacionalizar um modelo em que se vislumbre de que modo a combinação de componentes causais, incluída aqui a quantificação ou suficiência de cada componente, contribuem na susceptibilidade para a dependência química.

2.2.2. A neuroplasticidade induzida pela droga é o substrato do início e da perpetuação da síndrome da dependência

A combinação mais parcimoniosa de um modelo de susceptibilidade seria restringir a procura ao fator ou agente necessário, seja ele a cocaína ou qualquer outra droga de abuso, investigando somente os aspectos farmacológicos intrínsecos da substância de abuso e as mudanças estruturais e/ou funcionais (neuroplasticidade) decorrentes do uso. De fato, este foi, por muito tempo, o ponto de partida dos estudos

em modelos animais de auto-administração, ou seja, da primazia das características adictivas do álcool, cocaína e heroína (Swendsen & LeMoal 2011). Um dos pilares da pesquisa biológica experimental nas dependências químicas foi demonstrar que a integridade funcional e anatômica das vias dopaminérgicas mesolímbicas, particularmente no núcleo accumbens, é condição necessária para gerar o comportamento de auto-estimulação, assemelhado à perda de controle sobre o uso do dependente químico (Koob et al. 1998). Ou seja, é possível reproduzir, no paradigma da auto-estimulação, o comportamento de perda de controle sobre o uso verificado em humanos e mais, a elevação dos níveis basais de dopamina no sistema de recompensa cerebral é reconhecida como parte integrante da instalação da dependência química (Volkow et al. 2009). A neuroplasticidade da recaída é investigada no chamado 'modelo animal de recaída' ("reinstatement") (Kalivas & McFarland 2003). Após um período de auto-administração, em que se mimetiza a forma de administração da cocaína em rato como ela se dá no início do uso em dependentes químicos, ou seja, na forma de "binges" intermitentes, priva-se o rato da droga até que ele extinga, em geral depois de dias, qualquer comportamento associado ao uso. Neste ponto, simula-se uma 'recaída', verificada como o retorno de comportamentos do período de auto-administração, ao se apresentarem estímulos pareados anteriormente com o uso da droga ou mesmo com estresse experimental. Isto simula, de modo verossímil, o que foi descrito acima, como a permanência no universo subjetivo do dependente químico do que induz a fissuras e secundariamente, novo uso e re-instalação da síndrome. Os achados expandiram as vias tidas como necessárias para a verificação da instalação, perpetuação e re-instalação da auto-estimulação para regiões dorsais do estriado e para as ações do hormônio liberador da corticotropina na amígdala extendida (Koob & Kreek 2007; Volkow et al. 2011). O mérito dos estudos experimentais em adicção tem sido o de expandir o leque de variáveis biológicas a serem investigadas nos dependentes químicos.. Em resumo, estudos experimentais demonstram que cada droga de adicção conhecida é capaz de mimetizar aspectos centrais da adicção e cada droga tem uma valência ou poder de adicção (Ahmed 2011).A susceptibilidade à adicção seria, de modo unilateral, determinada pela valência da droga de adicção (O'Connor et al. 2011; Haertzen et al. 1983).As alterações da neuroplasticidade subsequentes,

tanto no homem, como nos modelos experimentais, são uma resposta farmacológica do cérebro independentemente do arcabouço genético do indivíduo. O impacto desta postura é visto no número de estudos de associação que fundamentaram a busca de fatores de risco genético nas dependências químicas nas vias dopaminérgicas e correlatas nos últimos anos (Li & Burmeister 2009). A busca de um modelo parcimonioso seria aceitável se duas ordens de observações existissem: 1) indivíduos de uma mesma cepa responderiam em uníssono aos efeitos da droga, ajustadas as curvas de dose-resposta e 2) pessoas de uma população tida como homogênea fariam percursos semelhantes uma vez ultrapassada a fase de experimentação de cocaína.

2.2.3. Porcentagem da transição do uso para a dependência de cocaína em estudos epidemiológicos

A busca de fatores de susceptibilidade deve se ajustar às evidências dos estudos experimentais, mas também ao que se verifica na prática clínica. É fato sabido que só uma parcela das pessoas que iniciam o uso de uma substância vão progredir para um uso frequente ou, num grau mais intenso, para uma dependência química (Anthony et al. 1994; Chen et al. 2004). Realizado entre 1990 a 1992, um estudo de levantamento comunitário, mostrou que nas cidades americanas, a taxa de transição do uso para dependência de cocaína foi de 17%, ou seja, de cada 6 pessoas que usaram cocaína uma vez na vida, uma delas progrediu para a dependência no intervalo de dois anos (Anthony & Petronis 1995). O mesmo grupo de pesquisa identificou, numa amostra maior, quase 90 mil sujeitos, entrevistada entre 1995 a 1998, usando "*latent class analysis*", 927 sujeitos que fizeram uso pela primeira vez de cocaína e/ou crack 12 meses antes do estudo (Reboussin & Anthony 2006). O risco individual de pertencer a um modelo revelado pela análise de classes latentes, compatível com os critérios de dependência química, variou de 6 a 9%. O modelo mais parcimonioso, oriundo da análise, revela um risco próximo a 6% em 24 meses (Reboussin & Anthony 2006). O fato de iniciar o uso de cocaína na forma de crack aumentou o risco para a transição para dependência nesta amostra. Uma estimativa para além de dois anos, a partir do início do uso, revela que em 10 anos do início,

16% de uma outra amostra comunitária fez a transição para a dependência de cocaína (Wagner & Anthony 2002). Não temos estudos, no nosso meio, sobre a questão da transição do uso para a dependência de cocaína, porém em um estudo muito assemelhado metodologicamente ao estudo de Reboussin e Anthony, 2006, verificou-se, numa amostra comunitária da região oeste da cidade de São Paulo, que a transição do abuso de álcool para a dependência ocorreu em 28% dos indivíduos (Silveira et al. 2011). Estes dados, em conjunto, mostram que a parcela de pessoas que evoluem para uma adição não passa de 16%, mesmo depois de uma década da exposição inicial à cocaína. Estes dados reduzem a relevância dos aspectos estritamente farmacológicos da cocaína na susceptibilidade para a dependência e servem para aquilatar a valência da cocaína dentre os demais componentes de risco em um modelo causal.

2.2.4. Porcentagem da transição do uso para a dependência de cocaína em modelos experimentais

O mesmo parece ser verdadeiro quando se olha de maneira detalhada para os estudos em roedores, em especial, ratos, usados em laboratórios de auto-administração. Desde cedo, nestes experimentos, foi observado que uma parcela dos ratos mantinham: a) padrões de consumo constante, sem escalar o uso, b) a aquisição de comportamentos de busca ocorria de modo facilitado, quando ocorria, em animais classificados como buscadores de novidade; c) diferenças individuais extremas na aquisição e extinção dos comportamentos de auto-administração (Ahmed 2011). Do mesmo modo como é feito em estudos epidemiológicos retrospectivos, verificou-se que apenas 8% de um total de 184 ratos mantinham a auto-administração de cocaína quando submetidos a um protocolo de escolha onde cocaína e sacarina (um estímulo palatável, mas sem valor nutritivo) eram oferecidos ao mesmo tempo (Cantin et al. 2010). Este é um exemplo de estudo experimental de protocolos mais recentes, que avaliam a valência da cocaína quando ela é oferecida numa situação em que o rato tem acesso, ao mesmo tempo, tanto para a auto-administração da cocaína como para sacarina. Diferente do protocolo clássico de auto-administração, em que o rato só

tem a cocaína ou só tem o veículo no contexto da experimentação, os protocolos de escolha mimetizam as situações do mundo natural e humano, onde há uma diversidade de estímulos apetitivos. Invariavelmente, a maioria dos ratos prefere a sacarina e só uma parcela inferior a 15% demonstra o padrão consistente de uso ao longo do tempo mesmo quando privados de alimento ou diante de um repertório maior de estímulos palatáveis (Cantin et al. 2010; Lenoir et al. 2007). Esta subamostra consome quantidades suficientes de cocaína compatíveis com as alterações de neuroplasticidade vistas nos estudos convencionais de auto-administração. Estes experimentos requerem reprodução mas apontam, como visto acima, que os determinantes da dependência recaem também em fatores constituintes do indivíduo e do meio que o circunda.

2.2.5. Relevância da neuroplasticidade como fator de risco biológico

Já vimos acima o impacto da elucidação da neuroplasticidade no início do uso e no estabelecimento de comportamentos compatíveis com a dependência química no homem. Porém, estes achados são tidos como consequências do uso e, diante das limitações ainda existentes (necessidade de reprodução) ainda estão longe de serem qualificados como fatores de risco. Em resumo, temos o seguinte quadro: 1) a parcela contributória dos fatores inerentes da cocaína em si, no conjunto dos componentes de susceptibilidade a partir de dados epidemiológicos, é menor do que se imaginava; 2) os estudos de “*choice*” demonstram que há muito mais a explorar em termos de sistemas biológicos de vulnerabilidade em modelos animais que vão além do efeito da cocaína sobre o sistema de recompensa; 3) fica implícito, ainda mais à luz das baixas porcentagens entre humanos e ratos que transitam para os comportamentos da adicção à cocaína, a existência de fatores biológicos de proteção ou resiliência. Na prática, devemos ampliar o leque não só dos componentes a serem investigados mas, de integrar o conhecimento estabelecido. Até recentemente, a maior parte da pesquisa de fatores genéticos em amostras clínicas de usuários de cocaína foi feita com a premissa de vulnerabilidade biológica no sistema de recompensa (Goldman et al. 2005). Dois pesquisadores, George Koob e Le Moal,

2005, pesquisadores que são referências internacionais nas neurociências da adicção, dizem claramente que as pesquisas básicas e clínicas deverão dar mais atenção a neurocircuitos que vão além das vias dopaminérgicas do sistema de recompensa (Koob & LeMoal 2006a).

2.2.6. Modelo de susceptibilidade em três níveis

Adotou-se o modelo de susceptibilidade proposto por Swenden e Le Moal, 2011, que leva em conta os achados neurobiológicos nas adicções e os incorpora a aspectos ligados ao ambiente geral e do indivíduo em três níveis: sociodemográficos/culturais, ligados a traços de personalidade e comorbidade com doenças mentais e, biológicos e genéticos (Swendsen & LeMoal 2011). Será feita nesta seção a revisão dos fatores de risco já estabelecidos para as dependências químicas com ênfase, naturalmente, naqueles mais pertinentes para a dependência de cocaína. A vulnerabilidade biológica foi discutida acima e genética será revista em uma seção própria.

2.3. Vulnerabilidade sociodemográfica e cultural

Este nível inclui a população tida de modo amplo, incluindo aspectos como a localização geográfica e cultural, e variáveis pertinentes ao indivíduo dentro do contexto de uma dada população (idade do início do uso, gênero, raça, etc.). Dentre estes fatores, consistentemente tem-se o gênero masculino e a idade de início do uso como associados ao desenvolvimento de dependências químicas de modo geral, ou seja, independentemente da droga de abuso. Fatores como o ambiente cultural e as situações adversas de vida parecem exercer algum papel, porém estes achados são provenientes de análises multivariadas, em que se fez uso de inúmeras co-variáveis, não permitindo assim uma generalização dos achados para outras populações (Merikangas et al. 2009; Szapocznik et al. 2007).

Quanto mais precoce a idade de início do uso, particularmente, antes dos 16 anos, maior é o risco da ocorrência de problemas associados ao uso (por exemplo, dirigir intoxicado) e, da transição, do uso, para a dependência química (Grant & Dawson 1998). O efeito é consistente e grande porque, a cada ano ganho, o risco cai em 5% para a chance de transitar do uso para a dependência (Anthony & Petronis 1995; Pitkanen et al. 2005; Silveira et al. 2011). Para a cocaína, o risco para problemas clínicos associados pelo uso foi 1,6 vezes maior nos adolescentes que iniciaram antes dos 17 anos comparado ao uso iniciado acima dos 18 anos (Chen et al. 2009). De acordo com uma perspectiva psicobiológica, o adolescente não tem o aparo fronto-cortical suficientemente amadurecido para equacionar traços como o aumento da impulsividade visto neste período do desenvolvimento (Toga et al. 2006). Isto justificaria a busca de novidades e o correr riscos que estão associados com o uso de drogas (Crews et al. 2007). Pertencer ao sexo masculino é um preditor para a dependência de álcool e outras substâncias incluindo cocaína (Grant et al. 2009; Kalaydjian et al. 2009). Estudos mais recentes, têm estratificado a influência do gênero de modo a clarificar a sua importância ao longo das fases de uso inicial, uso regular e estabelecimento da dependência (Kalaydjian et al. 2009; Silveira et al. 2011). Homens exibem um risco maior do que mulheres para o uso inicial e regular de álcool, porém há uma atenuação deste risco quando se avalia a transição do uso problemático para a dependência (Kalaydjian et al. 2009).

A importância da caracterização destes fatores de risco se dá na pesquisa e na prevenção. Um exemplo de como este fator de risco pode nortear o achado de marcadores de risco genético foi feito com fumantes (Grucza et al. 2010). Os autores dividiram sua amostra de acordo com o início do uso de nicotina e encontraram novos marcadores associados com o uso, partindo da premissa de que a susceptibilidade genética para a dependência a nicotina varia de acordo como momento ao longo das fases de desenvolvimento do indivíduo em que se dá a exposição à nicotina. De fato, os autores identificaram, de um total inicial de mais de 3 mil marcadores do tipo polimorfismo de nucleotídeo simples (SNP), 13 deles associados à idade de início do uso de nicotina. Do ponto de vista preventivo, uma grande parcela dos programas em escolas e junto à sociedade alertam sobre o risco

do uso precoce e promovem ações no sentido de retardar ao máximo a data de início do uso (Winters et al. 2007).

2.4. Vulnerabilidade psicológica e psiquiátrica

Um segundo nível diz respeito a fatores de ordem psiquiátrica ou psicológica, incluídos aqui aspectos tais como traços de personalidade ou comorbidades com outras doenças psiquiátricas. Esta área é extensamente estudada e os achados convergem no sentido de que ter um transtorno psiquiátrico aumenta a chance de um transtorno de uso de drogas e vice-versa. A verificação de comorbidade entre transtornos mentais e dependências químicas é observada em estudos transversais de amostras clínicas (Ford et al. 2009). Do mesmo modo, estudos feitos na comunidade em diferentes países, adotando metodologias comuns constata a mesma ordem de associação (Merikangas et al. 1998a). Mais do que isto, o número e a gravidade de transtornos associados acompanha os estágios de uso, abuso e dependência das substâncias (Swendsen et al. 2010). Neste estudo prospectivo de Swendsen et al., 2010, a presença de transtorno bipolar ou déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) aumentou em 3 vezes a chance da transição do estágio de abuso para dependências de drogas ilícitas. Infelizmente, os estudos prospectivos não possuem poder suficiente para estratificar o efeito da comorbidade para a cocaína em separado. A comorbidade para o uso de outras substâncias é comum e o encontro de usuários dependentes somente de cocaína é de menos de 10% em um estudo com amostra de conveniência colhida em clínicas ambulatoriais e em unidades de desintoxicação (Bierut et al. 2008; Duailibi et al. 2008). No estudo de Bierut et al., 2008, foi feita a comparação entre os dependentes de cocaína em atendimento e controles comunitários pareados rigidamente por sexo, idade e endereço postal. Encontraram-se as seguintes taxas de comorbidade, para dependentes e controles, respectivamente: nicotina 63%/34%, álcool 73%/34% e cannabis 54%/26%. Vale ressaltar que as taxas nos controles são altas e indicam que eles eram expostos a fatores de risco para estas substâncias tanto como os casos. Porém, eles tinham uma taxa 4 vezes maior de dependência de cocaína do que o

grupo de casos em atendimento (Bierut et al. 2008). São também consistentes as associações entre temperamento e transtornos de personalidade com as dependências químicas, embora onexo causal seja menos claro por conta do baixo número de estudos prospectivos neste tópico (Compton et al. 2005). Uma área mais recente de estudos é a que investiga traços como a impulsividade e a busca de sensação, em parte, pela primazia da suposta neurobiologia em comum, o sistema mesolímbico dopaminérgico (Fernandez-Serrano et al. 2012; Paloyelis et al. 2010).

Na prática, é bem reconhecido, do ponto de vista de saúde pública, que a comorbidade é um marcador de pior prognóstico para o paciente (Merikangas & Kalaydjian 2007). O quadro é menos definido quando se pensa na comorbidade para as dependências químicas a partir de um modelo de vulnerabilidade, isto é, se a associação seria causal ou haveria uma etiologia compartilhada entre os transtornos. As evidências a partir de estudos epidemiológicos prospectivos demonstram que as alterações de comportamento ou mesmo diagnósticos de transtornos mentais antecedem temporalmente o início do uso (Swendsen et al. 2010). A independência dos diagnósticos é atestada pelas taxas de concordância em estudos de gêmeos (Kendler et al. 2003). Justapostas estas duas abordagens, a hipótese mais aceita é dos transtornos mentais estabelecerem umnexo causal, levando às dependências químicas. A alta comorbidade com outras dependências químicas em usuários de cocaína comparados a controles pareados da mesma comunidade aponta no sentido de uma vulnerabilidade comum para as dependências químicas (Bierut et al. 2008). Isto é reforçado por um cuidado que estes mesmos investigadores tiveram ao desenhar e analisar os dados da pesquisa. A vulnerabilidade aumentada pode ser atributo de uma maior exposição a drogas, facilitando a transição até a dependência. O desenho do estudo usou controles comunitários pareados para a mesma vizinhança dos pacientes e a análise considerou o contato ou não com a droga de modo a utilizar a noção de prevalência condicionada. Ou seja, as proporções de comorbidades entre casos e controles foram corrigidas para a prevalência do uso ao menos uma vez na vida para cada droga no todo da amostra, esta sendo a prevalência condicionada. Feito este ajuste, os dependentes de cocaína mantinham taxas elevadas quando comparados aos controles comunitários, de diagnóstico de dependência de cocaína, álcool, nicotina e cannabis.

A hipótese da vulnerabilidade comum para as dependências químicas é corroborada por estudos prospectivos, tanto em gêmeos como em amostras da comunidade, que indicam que o risco do desenvolvimento de dependências químicas dão indícios de uma fator de risco comum ou de vários fatores altamente correlacionados estatisticamente (Grant & Dawson 1998; Kendler et al. 2008; Prescott et al. 2006; Rhee & Waldman 2002; Young et al. 2006). Dentro desta perspectiva, a vulnerabilidade comum justifica o pressuposto de que há uma susceptibilidade genética comum a estes transtornos. Exemplo disto vem de um estudo de vulnerabilidade genética do tipo ligação, em que foram identificadas regiões nos cromossomos 4, 5, 9–11 e 17, onde parece ser mais possível o encontro da susceptibilidade genética para múltiplas substâncias, incluída a cocaína (Agrawal & Lynskey 2008).

Um capítulo que sempre atraiu os pesquisadores na área de susceptibilidades para transtornos psiquiátricos é do papel exercido por eventos vitais ou situações desfavoráveis ao longo do desenvolvimento do indivíduo sobre o desencadeamento de transtornos mentais *sensu lato*. Atualmente, este é um assunto em ebulição, impulsionado pela plethora de plataformas de genotipagem de um lado e, por outro lado, da combinação da oferta de modelos matemáticos e a disposição dos pesquisadores em explorar o capítulo da interação entre genes e ambiente nas doenças complexas (Duncan & Keller 2011). Um dos estudos mais influentes na área de interação gene-ambiente, é o de Caspi et al., 2003, que gerou mais de 3.000 citações relacionadas e foi reproduzido, total ou integralmente (Caspi et al. 2003). Os investigadores demonstraram uma relação positiva e progressiva entre o número de relatos de eventos vitais estressores e o risco do desenvolvimento da depressão quanto maior fosse o número de alelos curtos (ausência, um ou dois alelos curtos presentes) na região promotora do gene do transportador de serotonina (Caspi et al. 2003). Não encontramos relatos de estudos com esta abordagem para a dependência de cocaína embora existam achados positivos em estudos de dependentes de álcool e nicotina (Bierut et al. 2010).

2.5. Vulnerabilidade genética

2.5.1. Herdabilidade

A herança das dependências químicas em pessoas da mesma família é um fato porque há taxas mais altas de portadores nos pais e nos parentes de indivíduos afetados do que as taxas em indivíduos controles sem qualquer dependência química observados em vários estudos genético-epidemiológicos em famílias (Bierut et al. 1998). Mais especificamente, as maiores taxas foram encontradas em parentes de probandos com dependência de cocaína e, de heroína (Meller et al. 1988; Merikangas et al. 1998). Porém, estes dados não provam que há uma transmissão genética uma vez que a agregação familiar pode se dar tanto por fatores genéticos como por fatores ambientais (por exemplo, o costume de beber em reuniões familiares). Duas ordens de evidências são a prova definitiva da herança genética: os estudos em gêmeos e os estudos de adoção. Nos estudos de gêmeos, compara-se a taxa de concordância do diagnóstico da dependência em gêmeos monozigóticos (idênticos geneticamente) com a taxa em gêmeos dizigóticos (50% de afinidade genética). Para que se comprove a influência genética, espera-se que mais duplas afetadas sejam vistas entre os monozigóticos do que os dizigóticos. Estudos em gêmeos demonstraram que boa parte da agregação familiar no que diz respeito a dependência química de cocaína pode ser explicada por fatores genéticos em contraposição a influências familiares não-genéticas (Gynther et al. 1995; Kendler et al. 2000). Mais ainda, a partir dos padrões de correlação entre gêmeos monozigóticos e dizigóticos nos estudos de gêmeos, é possível quantificar um valor numérico que expressa a influência genética sobre uma doença, a herdabilidade. Uma revisão de coortes de gêmeos revelou que a dependência química de cocaína está entre as doenças psiquiátricas com maior taxa de herdabilidade, 79%. (Agrawal & Lynskey 2008). Nunca é demais ressaltar alguns pontos: nenhuma dependência de substância é 100% determinada geneticamente, segundo, parte do que contribui para a dependência é de ordem ambiental (disponibilidade, estressores ambientais, etc.) e, por último, as taxas de herdabilidade para as dependências químicas são mais altas do que outras doenças

crônicas como diabetes mellitus tipo 2 (entre 41% e 55%) e colite ulcerativa (50%) (Malecki & Klupa 2005; Tysk et al. 1988). O papel dos fatores genéticos não é estático e interage com o ambiente ao longo do desenvolvimento do indivíduo. Isto foi demonstrado recentemente por Kendler et al., 2008, através de uma coorte de gêmeos mono e dizigóticos (Kendler et al. 2008). Acompanhando gêmeos a partir do início da adolescência, os autores observaram que fatores ambientais exercem relevância na busca inicial pelo uso de drogas e nos padrões de uso na adolescência. Após os 30 anos de vida, diminui progressivamente o papel do ambiente e há o predomínio de influências genéticas nos indivíduos dos pares de gêmeos que eram diagnosticados como dependentes químicos de álcool, maconha ou nicotina. Os achados deste estudo vêm de encontro com duas meta-análises que demonstraram que com o aumento da idade diminuem os efeitos ambientais comuns e aumenta a herdabilidade sobre a adicção a drogas (Bergen et al. 2007; Rhee & Waldman 2002). Uma vez que o número de gêmeos para estas substâncias era pequeno não foi possível quantificar estatisticamente os efeitos do ambiente ao longo do tempo para usuários de cocaína.

2.5.2. Tipos de estudos e principais achados para as dependências do álcool e da nicotina

Determinada a herdabilidade e sendo esta alta, os investigadores buscam identificar os endereços específicos ao longo da molécula do ácido desoxirribonucléico (DNA) humano envolvidos com a dependência. A isto se chama de estudos de genética molecular da susceptibilidade a dependência química. Os avanços tecnológicos dentro da área da genética são diários e com isto há sempre a expectativa da descoberta de genes, as tais regiões do DNA, que serão determinantes para a vulnerabilidade desta ou daquela doença. Calcula-se hoje que temos aproximadamente 3 bilhões de pares de bases (a menor unidade constituinte de um gene) porém, cada indivíduo parece diferir do outro em apenas 0,1% desde total, ou seja, é nesta fração que se pode achar diferenças entre indivíduos susceptíveis e não

susceptíveis. A estas diferenças entre indivíduos para um mesmo endereço na molécula de DNA é que se dá o nome de variante genética ou marcador genético. Os marcadores ou polimorfismos podem estar contidos em genes que codificam proteínas ou em regiões reguladoras de genes ou mesmo, sem função conhecida.

Duas estratégias principais são usadas na identificação de variações genéticas que participam da vulnerabilidade para as dependências químicas: a abordagem do gene candidato e a varredura completa do genoma. Nos estudos de gene candidato, parte-se de uma hipótese de plausibilidade biológica para as dependências químicas e isto dita a escolha do gene, e conseqüentemente, de quais serão os marcadores genéticos a serem usados na pesquisa. Em geral, pesquisa-se um número limitado de genes e marcadores genéticos em amostras clínicas que variam de dezenas e centenas de indivíduos afetados. Na varredura inteira do genoma, ao contrário, nenhuma hipótese de plausibilidade biológica é feita *a priori*, apenas de que há pelo menos um gene de susceptibilidade ao longo do genoma. Esta varredura pode seguir dois princípios, ser um estudo de ligação ou de associação. Estudos de ligação partem do pressuposto do conceito de ligação gênica. Este conceito refere-se ao fato de que dois loci gênicos (endereços específicos dentro da fita de DNA) situados fisicamente próximos um do outro tendem a ser herdados conjuntamente ('ligados') sem sofrerem influência das permutas gênicas durante a meiose. Por exemplo, um marcador do gene de susceptibilidade para a dependência de cocaína, ainda desconhecido, pode estar fisicamente próximo a um marcador já conhecido. Agora, se este marcador, cuja localização já é conhecida, for sempre herdado junto com a doença, muito provavelmente o marcador do gene de susceptibilidade terá sua localização nas vizinhanças deste marcador conhecido. Este tipo de investigação necessita de famílias grandes com múltiplos afetados e presta-se melhor para estudos no qual o possível gene tem um grande efeito sobre o fenótipo como é o caso das doenças mendelianas. Nos estudos do tipo associação genômica ampla (GWAS), parte-se de casos e controles não aparentados sendo que, para cada marcador genético, é feito um teste independente de associação. Este tipo de estratégia têm a vantagem de poder detectar genes que apresentam efeitos discretos ou moderados na determinação de um transtorno, o que o torna mais adequado nas doenças poligênicas. São estudos que hoje em dia recrutam milhares de indivíduos afetados e

rastreiam milhões de SNPs num único estudo (Wellcome Trust Case Control Consortium 2007).

Um levantamento dos achados mais expressivos e reproduzidos de marcadores genéticos dentre das dependências químicas até o momento foi feito abaixo. A descrição dos achados deu ênfase para a importância da integração das abordagens de identificação dos marcadores e pela relevância dos achados para a susceptibilidade genética específica e comum às várias drogas de adição. Uma vez que os estudos de associação do tipo gene candidato para cocaína são o foco principal desta tese, a revisão destes achados foi feita numa seção à parte.

2.5.2.1. Enzimas metabolizadoras do álcool

Variantes genéticas das enzimas hepáticas de metabolização do etanol são um dos achados mais robustos e reproduzidos dentro do campo das susceptibilidades genéticas para as dependências químicas. Historicamente, já se sabia que pessoas de origem asiática têm uma tendência a apresentar rubor facial e mal estar geral quando ingerem álcool por conta do acúmulo de acetaldeído oriundo da metabolização deficiente do etanol (Edenberg 2007). Sabia-se também que são duas as famílias de enzimas envolvidas nesta via, a família das isoenzimas álcool desidrogenase (ADH) que convertem o álcool em acetaldeído e que é convertido em acetato pela família das isoenzimas aldeído desidrogenases (ALDH) (Ducci & Goldman 2008). O acúmulo tóxico de acetoaldeído se dá por uma atividade enzimática reduzida de ALDH, aumentada de ADH ou da combinação destas situações. Variantes gênicas para estas duas enzimas são comuns e muitas delas são funcionais, ou seja, levam a alterações expressivas da atividade enzimática. Mais especificamente, o alelo ALDH2*2 produz uma enzima mais lenta e o alelo ADH1B*2 a uma enzima mais ativa. Estas informações são o terreno ideal para um estudo do tipo gene candidato, uma alteração bioquímica plausível com o fenótipo, isto é, infere-se que pessoas que não tenham o acúmulo em níveis tóxicos do acetaldeído ingiram mais álcool somado à presença de marcadores de variabilidade dentro do gene. Verificou-se que as frequências do alelo ADH1B*2 em dependentes de álcool era menor do que as vistas nos controles, um efeito protetor

(Edenberg 2007). Interessantemente, estudos de ligação independentes, vieram a confirmar que a região cromossômica 4q onde se encontra o gene do ADH1B é herdada com maior probabilidade entre as pessoas protegidas para a dependência ao álcool (Prescott et al. 2006; Reich et al. 1998). Esta é uma região onde se encontram 07 genes para diferentes formas da enzima ADH. Embora os estudos de ligação não possam confirmar o achado da variante gênica, uma vez que detectam extensões longas de pares de bases, elas reforçam os achados dos estudos de associação gene candidato. Outra contribuição dos estudos de ligação foi abrir um leque válido de possibilidades para testar novas variantes gênicas na região cromossômica 4q. Por exemplo, nesta região esta o gene ADH4 que tem polimorfismos não-codificantes, ou seja, que não levam a uma alteração na sequência de aminoácidos desta isoenzima. Porém, estes polimorfismos tem sido consistentemente encontrados como marcadores de proteção em estudos de associação em amostras independentes (Edenberg 2007; Guindalini et al. 2005a). A interpretação sobre o efeito destas variantes genéticas é que seus portadores depuram de modo deficiente o acetaldeído assim, terão uma chance menor de desenvolver a dependência ao álcool pois, sempre que utilizarem o álcool, experimentarão os efeitos desagradáveis ocasionados pelo acetaldeído em maior concentração do que as pessoas que tem variantes genéticas que metabolizam normalmente o álcool (Edenberg 2007). Em resumo, o estabelecimento de variantes da ADH como fatores de proteção para a dependência de álcool partiu de estudos gene candidato que foram corroborados por estudos de ligação que, por sua vez, impulsionaram o encontro de associação de novas variantes para o fenótipo. Isto é um exemplo bem acabado da contribuição recíproca nos estudos de vulnerabilidade genética para a dependência de álcool e que se beneficiou de particularidades da metabolização hepática do álcool mais do que seus efeitos na neuroplasticidade da adicção no encontro desta vulnerabilidade.

2.5.2.2. Complexo dos receptores nicotínicos

A quantidade de GWAS na área de comportamentos associados ao uso de nicotina já é em número suficiente para que se façam meta-análises envolvendo

80.000 casos e que se beneficiam de um ajuste unificador do fenótipo entre estudos de diferentes centros, o uso do número de cigarros fumados como variável independente (Thorgeirsson et al. 2010). Esta meta-análise revelou que genes associados a dois complexos para receptores nicotínicos, um no cromossomo 15 (subunidades CHRNA5, CHRNA3, e CHRNB4) e outro no cromossomo 8 (subunidades CHRNA6, CHRNB3). Além de serem dados reproduzidos, chama a atenção a grandeza da significância estatística: para um dos marcadores do tipo SNP, ors16969968, ela é da ordem de $p=4,48 \times 10^{-33}$. Os mesmos marcadores tem sido associados com o diagnóstico de dependência e com o fato de ser fumante pesado (Saccone et al. 2010). Embora estes dados sejam expressivos eles explicam uma parcela pequena da variância, algo que tem sido chamado “*missing heritability*” por conta da parcela faltante diante dos valores de herdabilidade (50% para a dependência de nicotina) (Eichler et al. 2010). Alguns pontos são levantados para justificar o número pequeno de achados nos GWAS. Primeiro, eles trabalham com um limiar alto de detecção, ou seja, a análise é ajustada para detectar um certo tamanho de efeito porém, discute-se que as variantes genéticas em doenças complexas são de pequeno efeito o que pode levar uma taxa alta de falso-negativos nestes estudos. Segundo, eles deixam de detectar o efeito de variantes não tão comuns na população geral. Isto é o caso das variantes do gene da ADH que não tem sido detectadas nos GWAS embora seu papel tenha sido comprovado nos estudos de gene candidato e de ligação.

2.6. Marcadores genéticos de risco para a dependência de cocaína

Há apenas dois estudos do tipo genômica amplo para dependência de cocaína (Gelernter et al. 2005; Yu et al. 2008). Num estudo de ligação, usando amostras de probandos e familiares de origem caucasiana e afro-descendente, nenhuma região cromossômica mostrou-se significativa para as duas populações tomadas em conjunto (Gelernter et al. 2005). Esses autores reclassificaram a amostra fazendo uso de análise de cluster e anotando a presença ou não de sintomas paranóides induzidos pelo uso da cocaína. Através deste artifício, mostraram uma

região de ligação no cromossomo 12q para aqueles pertencentes ao grupo classificado com usuário pesado de cocaína, de início precoce e baixa morbidade. Outro sinal de significância foi visto no cromossomo 9q no sub-grupo apresentando os sintomas de paranóia, apenas em afro-descendentes. O fato da amostra ser constituída de usuários tanto de heroína como cocaína e, não ter sido feita a correção para testagens múltiplas decorrentes das várias segmentações na análise, diminuem a força e a especificidade destes achados. No estudo do tipo associação, os autores usaram 5.633 marcadores genéticos e o único resultado próximo à significância estatística foi de um gene que previamente não sugeriria um papel com a neurobiologia da adição, o gene MANEA. Ele está localizado no cromossomo 6 e codifica uma enzima que participa da regulação metabólica de carboidratos, a alfa-endomanosidase (Yu et al. 2008). Achados como estes são comuns em GWAs e, excetuando-se a possibilidade de serem falso-positivos, podem apontar para novas vias bioquímicas na susceptibilidade a doenças. A maioria dos estudos de susceptibilidade genética para amostras específicas de pacientes com diagnóstico de dependência de cocaína é do tipo gene candidato. Esses estudos, descritos abaixo, foram agrupados de acordo com as hipóteses de plausibilidade biológica aventadas pelos autores. Foram selecionados apenas os estudos em que havia pelo menos uma reprodução com os mesmos genes em amostras de usuários de cocaína independentes ou mesmo em amostras com outras classes de drogas de abuso. Alternativamente, foram escolhidos genes paradigmáticos para cada uma destas hipóteses.

2.6.1. Sistema de recompensa dopaminérgico

Um dos efeitos farmacológicos da cocaína é bloquear o transportador de dopamina (DAT), elevando as concentrações de dopamina na fenda sináptica, particularmente de neurônios no sistema de recompensa (Koob & LeMoal 2006b). Como exposto anteriormente, a neuroplasticidade das vias mesolímbicas dopaminérgicas é parte integrante da neurobiologia da adição. É a partir destas premissas que os estudos a seguir são justificados.

O gene para o transportador da dopamina (DAT1), localizado no cromossomo 5p15.3, contém polimorfismos amplamente utilizados em estudos de associação na psiquiatria. Estes polimorfismos são do tipo repetições em tandem de número variável (VNTR) onde cada unidade de repetição é constituída por uma sequência de bases. O polimorfismo se dá porque as pessoas têm números variáveis destes blocos de bases. Os VNTRs mais estudados nas dependências químicas são o VNTR de 40 bp localizado na região não traduzida do gene (VNTR 3' UTR) e o VNTR de 30bp localizado no intron8 (VNTR Intron8) do gene (Vandenbergh et al. 2007). Os alelos do VNTR 3'UTR são designados pelo número de repetições e os mais frequentes são o 9R e o 10R, da mesma forma, os alelos mais comuns do VNTR Intron8 variam entre 5R a 7R. Outro aspecto interessante destes polimorfismos é que há indícios de respostas funcionais distintas de acordo com a composição dos genótipos (Guindalini et al. 2006a; Heinz et al. 2000).

Guindalini et al., 2006, encontraram uma associação do alelo 6R para o VNTR Intron8 em 699 pacientes brasileiros com dependência de cocaína porém, num estudo posterior, com uma amostra de 169 casos na Espanha, encontrou-se uma associação nominal do alelo 5R com a dependência de cocaína (Fernandez-Castillo et al. 2010; Guindalini et al. 2006a). Os próprios autores do estudo espanhol discutem que seu achado não se sustenta diante da correção para múltiplas testagens e mais, o alelo 6R e não o 5R é aquele que tem uma resposta diferenciada a cocaína em vetores de expressão (Guindalini et al. 2006a). Vários estudos não encontraram uma associação para o polimorfismo VNTR 3' UTR porém, a associação foi vista numa subamostra de 58 pacientes que apresentavam paranóia induzida pela cocaína (Ballon et al. 2007; Guindalini et al. 2006a; Lohoff et al. 2010). Em suma, há controvérsias a respeito do papel dos polimorfismos no DAT1, por conta da ausência de reprodução consistente dos resultados (Shumay et al. 2010).

2.6.2. Sistema gabaérgico

Historicamente, os primeiros achados de fatores de risco genético do sistema gabaérgico vieram dos estudos de ligação em dependência de álcool, ou seja, a partir de uma abordagem estritamente localizatória ao longo do genoma e não funcional (Li & Burmeister 2009). Entre as regiões de alto sinal de ligação, estava uma no cromossomo 4p12 que continha, entre outros genes, o aglomerado de genes para o receptor do tipo A para o ácido gama-amino butírico (GABA-A) que contém 4 genes: GABRG1, GABRA2, GABRA4 e, GABRB1 (Ducci & Goldman 2008). Do ponto de vista funcional, estudos experimentais mostram que inter-neurônios gabaérgicos, localizados na área tegmental ventral, são inibitórios sobre a ação de neurônios dopaminérgicos que se projetam para o núcleo accumbens (Gallegos et al. 1999; Steffensen et al. 1998). Desta maneira, a atividade gabaérgica modula a atividade de neurônios dopaminérgicos, particularmente nos eventos de tolerância e aquisição de comportamentos de recompensa pela droga. No primeiro estudo de associação entre a região 4p12 e alcoolismo, foram avaliados 69 SNPs ao longo dos quatro genes para o receptor A (Edenberg et al. 2004). O gene GABRA2 foi tido como aquele mais fortemente associado ao alcoolismo particularmente nos marcadores localizados do intron 3 do gene. Estes mesmos marcadores foram vistos em alcoolistas de populações de caucasianos, índios americanos, asiáticos, mas não em americanos afro-descendentes (Covault et al. 2004; Covault et al. 2008). Interessantemente, em mais de um estudo de associação com alcoolismo, o efeito só foi verificado naqueles sujeitos com comorbidade com uso de drogas ilícitas (Agrawal et al. 2006). Na única amostra em que todos os pacientes tinham diagnóstico de dependência de cocaína (n=699), e faziam uso de álcool, Dixon e cols, 2010, verificaram a associação com três SNPs encontrados nos estudos para dependência de álcool anteriores, ou seja, nas regiões entre o intron 3 e intron 7 do gene (Dixon et al. 2010).

Os estudos de Agrawal et al., 2006 e Dixon et al., 2010, apontam para uma vulnerabilidade específica no gene GABRA2 para substâncias ilícitas e talvez, mais especificamente para cocaína (Agrawal et al. 2006; Dixon et al. 2010). Já vimos, na revisão geral para susceptibilidade genética, que os achados do gene ADH são

específicos para dependência do álcool e algo assemelhado pode ser aventado para o gene GABRA2 e a dependência de cocaína. Na prática clínica, sabemos que os usuários de cocaína são poliusuários, logo, a busca de fatores de risco genético nestes usuários deve-se direcionar no sentido de reproduzir os marcadores em regiões de susceptibilidade geral já descritos nas dependências químicas. Ao mesmo tempo, a busca por marcadores deve levar em conta as particularidades da dependência de cocaína como, por exemplo, os passos de metabolização específicos para a cocaína, tal como ocorre com as variantes do gene ADH no alcoolismo.

2.6.3. Sistema canabinóide

É frequente o uso associado de cannabis em dependentes de cocaína, por exemplo, na amostra do ProGene, o uso nos últimos trinta dias variou entre 43% a 63% (Dunn & Laranjeira 1999; Guindalini et al. 2006b). O uso concomitante e frequente das duas substâncias leva a indagações a respeito da relação delas para a neurobiologia da adição. Do ponto de vista terapêutico, há pesquisas explorando o potencial do papel de endocanabinóides na reinstalação do uso depois de períodos estendidos de privação de cocaína com vistas à possibilidade de uso de antagonistas dos receptores de cannabis no tratamento das adições (De vries et al, 2001; Orio et al, 2009)

Dentre os genes do sistema endocanabinóid, está o gene para o receptor do tipo 1 para a cannabis (CNR1) que se encontra no cromossomo 6q14 e já foi objeto de estudo de associação (Hoehe et al. 2000). Destacamos dois estudos, que foram conduzidos pelo grupo do Dr. Joel Gelernter na Universidade de Yale. Esse grupo tem contribuído muito para a elucidação da susceptibilidade genética da dependência de cocaína, sendo dele o único estudo de GWAs em usuários de cocaína além de vários estudos de estudos do tipo gene candidato (Yu et al. 2008). Até 2007, os resultados sobre a associação de marcadores para o gene CNR1 e a dependência de substâncias, incluindo a cocaína, eram controversos (Benyamina et al. 2011a). Em 2007, Zuo et al.,2007, publicaram o primeiro artigo sobre a associação de cocaína e o CNR1 numa amostra mista, em que há 550 dependentes químicos para várias substâncias, sendo que 311 deles tem o diagnóstico de dependência de cocaína (Zuo

et al. 2007). Diferentemente dos estudos anteriores, eles ampliaram a varredura sobre o gene fazendo uso de 10 marcadores do tipo SNP (designados SNP 1 a SNP 10 no artigo) e inovaram a análise estatística ao incorporarem a noção de epistasia, qual seja, da possibilidade da interação de um marcador sobre o outro na constituição do fenótipo (Cordell 2009). Outro cuidado metodológico, poucas vezes usado nos estudos até então nesta área, foi corrigir os resultados para confundidores tais como miscigenação (uso de 38 marcadores genéticos para etnia), idade e sexo. Feitas as análises convencionais de um estudo gene candidato do tipo caso-controle (testes de associação, análise do possível modelo de herança e, correção para testagens múltiplas) foi encontrada uma associação para só um marcador, o SNP 3. Quando os autores procederam para a análise por meio da regressão logística multivariada e também pela razão de probabilidade positiva (“positive likelihood ratios” - LR+) para cada genótipo de risco, ou seja, quando se levou em conta a possibilidade de interação entre genótipos, eles encontraram uma associação importante entre o SNP 3 e o SNP 8 (Zuo et al. 2007; Zuo et al. 2009). Tal fato, como é discutido pelos autores do trabalho, tem relevância na medida em que, primeiro, encontrou-se uma associação com um marcador que não seria notada se não fosse feita a análise de interação entre loci, segundo, porque a associação do SNP 8 condizia com estudos anteriores de associação para este marcador e dependência a múltiplas substâncias (Zhang et al. 2004). Finalmente, os autores verificaram que estes dois marcadores não estavam em desequilíbrio de ligação (LD) e pertenciam a blocos haplotípicos distintos, o que reforça a independência entre eles e valoriza a importância do achado da interação entre os loci. Mais recentemente, o mesmo grupo publicou uma reprodução do estudo de 2007 em que fazem uso de 4 amostras independentes (populacional/famílias de afetados em duas etnias distintas) num total de 1.920 casos, todos com diagnóstico de dependência de cocaína (Zuo et al. 2009). Mais um vez, na análise isolada de cada SNP, foi encontrada uma associação desta vez somente para o SNP 8. Ao fazer a análise para interação genotípica, notaram que o nível de significância aumentou para a combinação dos genótipos formados pelos SPN 3 e SNP8, como no estudo anterior. Para mostrar a relevância da diferença do encontro de associação de um locus e da interação entre loci eles estimam a contribuição no risco da presença de alelos afetados. Com isto, demonstram que a presença da

combinação dos genótipos eleva o risco em 3 vezes quando comparado ao SNP visto isoladamente, ilustrando, de mais um modo, como se faz importante a investigação da associação entre loci.

2.7. Considerações sobre os estudos de vulnerabilidade genética

Uma das críticas feitas aos estudos de susceptibilidade genética de doenças complexas é que, a despeito de todo investimento feito até agora, os genes encontrados representam no máximo 20% da variância da herdabilidade (Bierut 2011). O argumento é, em certa extensão, circular porque a hipótese corrente de susceptibilidade para as doenças e traços complexos é que tratam-se de fenótipos poligênicos, onde cada gene contribui com um tamanho de efeito pequeno para a porção herdada geneticamente. De fato, os estudos de associação, tanto de gene candidato como GWAS, são prova disto porque detectaram genes distintos e o seu efeito, medido pelas razões de chance, são próximas de 1,5 (Wellcome Trust Case Control Consortium 2007). Este pressuposto mantido, a pesquisa na área de susceptibilidade para a descoberta de mais genes nas dependências químicas pode-se beneficiar das seguintes orientações: 1) diminuir a heterogeneidade do fenótipo ou trabalhar com a noção de fenótipos intermediários; 2) expandir o leque de vias biológicas pesquisadas e; 3) não se restringir a busca de marcadores codificantes porque há evidências que regiões consideradas silenciosas (regiões intrônicas) tem ganhado papel relevante no controle transcricional (Cordell & Clayton 2005). Ainda, sugere-se incorporar a interação gene-ambiente e gene-gene na exploração de marcadores de susceptibilidade genética como modo de aumentar a parcela da variância do fenótipo explicada pela genética (Duncan & Keller 2011).

A revisão da literatura, nas seções anteriores, mostra que os estudos com amostras de dependentes de cocaína incorporaram alguns destes aprimoramentos. Para citar apenas um estudo, no de Zuo et al., 2009, foram aprimorados: a) o fenótipo, porque a totalidade dos pacientes incluídos é dependente de cocaína ao contrário de estudos anteriores que incluíam estes pacientes num grupo constituído de dependentes químicos de drogas ilícitas ou dependentes químicos de drogas que

não o álcool; b) as vias biológicas, porque partiram do dado epidemiológico de comorbidade mais do que as fundamentações fisiológicas para identificar os marcadores no gene do receptor canabinóide; c) a noção de epistasia foi incorporada na análise; d) a correção dos achados positivos para a estratificação populacional e, finalmente, e) amostras independentes e maiores, foram 4 amostras, sendo que a maior delas era constituída de 664 dependentes de cocaína (Zuo et al. 2009). Estes cuidados metodológicos também foram incorporados nos estudos feitos a partir da amostra de dependentes de cocaína do ProGene, marcadamente a correção para estratificação populacional. O propósito desta tese foi de continuar as pesquisas com a amostra do ProGene com a incorporação de dois aspectos citados acima: a busca de um marcador de risco genético num gene candidato fora da hipótese de neuroplasticidade e a exploração da epistasia. A revisão para estes dois temas encontra-se nas próximas seções.

2.8. Gene candidato: butirilcolinesterase

Há dois metabólitos originados da degradação inicial da cocaína, a benzoilecgonina (BE), que é catalizada por carboxilesterases hepáticas (Brzezinski et al. 1994) e, o éster de ecgonina metil que é catalizada pela butirilcolinesterase (BChE) (Kolbrich et al. 2006) (Figura 1). Embora a BE seja o principal metabólito da degradação da cocaína, alterações na atividade da BChE exercem um impacto fisiológico significativo no metabolismo da cocaína (Carmona et al. 2000; Carmona et al. 1998). A pirólise da cocaína, a partir da sua forma básica, o crack, leva à formação de um metabólito que por sua vez é degradado pela BChE. Assim sendo, a exploração desta enzima e, conseqüentemente, o gene que a codifica, são de plausibilidade biológica tanto para o uso da cocaína na sua forma cheirada como na sua forma fumada. A BChE é uma glicoproteína tetramérica com uma massa molecular de 342kDa que hidroliza os ésteres de colina. Ela é sintetizada primordialmente no fígado e, em mamíferos, ela é distribuída na mucosa intestinal, plasma e na substância branca do sistema nervoso central (Goodall 2004). A BChE participa do metabolismo de drogas como a heroína, anestésicos locais como a

procaína e na hidrólise de relaxantes musculares como o suxametônio e o mivacúrio, além da cocaína.

Um atrativo adicional de se estudar marcadores genéticos de susceptibilidade da atividade da BChE advém do fato de que a enzima tem sido testada como um novo agente no tratamento da dependência de cocaína. Brevemente, Brimijoin et al., 2008, demonstraram que uma hidrolase mutante, derivada da BChE humana, suprimiu os efeitos da intoxicação aguda da cocaína e aboliu a reinstalação do condicionamento da droga em ratos (Brimijoin et al. 2008). Tendo em mente possíveis mecanismos de vulnerabilidade específicos para a adicção à cocaína é possível postular que, polimorfismos no gene que codifica a BChE, levariam a perfis enzimáticos diferentes, gerando indivíduos com maior ou menor susceptibilidade para entrar em comportamentos aditivos. Por exemplo, se um indivíduo for portador de uma mutação que diminua a atividade de transcrição do gene e ele fizer uso da cocaína ele terá níveis séricos de cocaína mais altos do que a população geral. Como consequência, serão facilitadas, neste indivíduo, as alterações na circuitaria de recompensa cerebral tão necessárias para o estabelecimento da dependência química. Analogamente, o portador de uma mutação que leve a uma maior atividade hidrolítica da BChE poderia estar protegido do risco do estabelecimento da adicção pela cocaína.

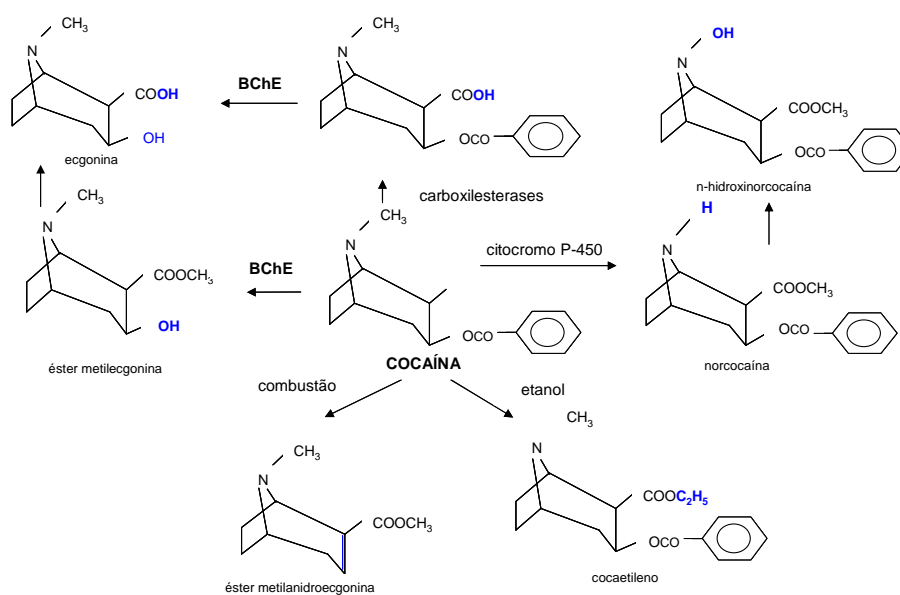


Figura 1. Produtos da biotransformação e combustão da cocaína (adaptado de Martins 2011)

A BChE é codificada pelo gene BCHE localizado no braço longo do cromossomo 3 (3q26) (Arpagaus et al. 1990). O gene é constituído de 4 exons e 3 introns sendo que o exon 2 é o responsável pela codificação da sub-unidade que contém o sítio catalítico da enzima. Mais de 65 mutações do gene foram descritas, sendo que elas geram de variantes 'silenciosas', ou seja, sem atividade catalítica a variantes com diferentes graus de perturbação da atividade da enzima (Darvesh et al. 2003; Mikami et al. 2008; Valle et al. 2011). Historicamente, foram descritas e nomeadas as variantes da enzima mais frequentes na população caucasiana e as mutações associadas a partir da forma selvagem. Por exemplo, uma mutação no codon 70 gera a enzima 'atípica' que tem uma atividade enzimática 30% abaixo da referência (McGuire et al. 1989). Desde a sua descrição, a caracterização de pessoas homozigotas para esta mutação é importante porque elas exibem um efeito prolongado da apnéia quando do uso da succinilcolina, um relaxante muscular, em procedimentos cirúrgicos (Loewenstein-Lichtenstein et al. 1995). Outra variante comum, chamada de 'variante K', exibe uma mutação do tipo SNP não-sinônima no codon 539, levando à substituição do aminoácido alanina por treonina com uma redução em 33% da atividade enzimática para o portador do alelo A em homozigose (Bartels et al. 1992) (Figura 2).

Saber que há variantes com atividade funcional alterada é fundamental diante da hipótese, a ser aventada nesta tese, de diferenças individuais nos fenótipos de dependência da cocaína determinados por genótipos distintos no BCHE. Porém, estas mutações clássicas são raras (Darvesh et al. 2003). Recentemente, foi observado que mutações comuns estão associadas com medidas de alterações da atividade enzimática da colinesterase (Howard et al. 2010). Os autores estudaram 256 SNPs em 30 genes em 287 trabalhadores rurais expostos a pesticidas que contém organofosforados, agentes químicos que bloqueiam a atividade das colinesterases, levando a um aumento das concentrações de acetilcolina e risco de intoxicação. Os autores precisavam determinar, a priori, se mutações comuns estariam associadas a alterações da atividade das colinesterases antes de inferir que existiriam trabalhadores contendo genótipos mais ou menos vulneráveis aos organofosforados. As 5 associações mais significativas encontradas neste estudo de associação foram em SNPs no gene BCHE e todas tinham um alelo de menor frequência (MAF)

≥ 0.05 . Estes achados dão crédito à hipótese de se investigar polimorfismos comuns do gene BCHE na população geral porque eles têm impacto funcional e há indivíduos genotipicamente distintos em uma mesma amostra.

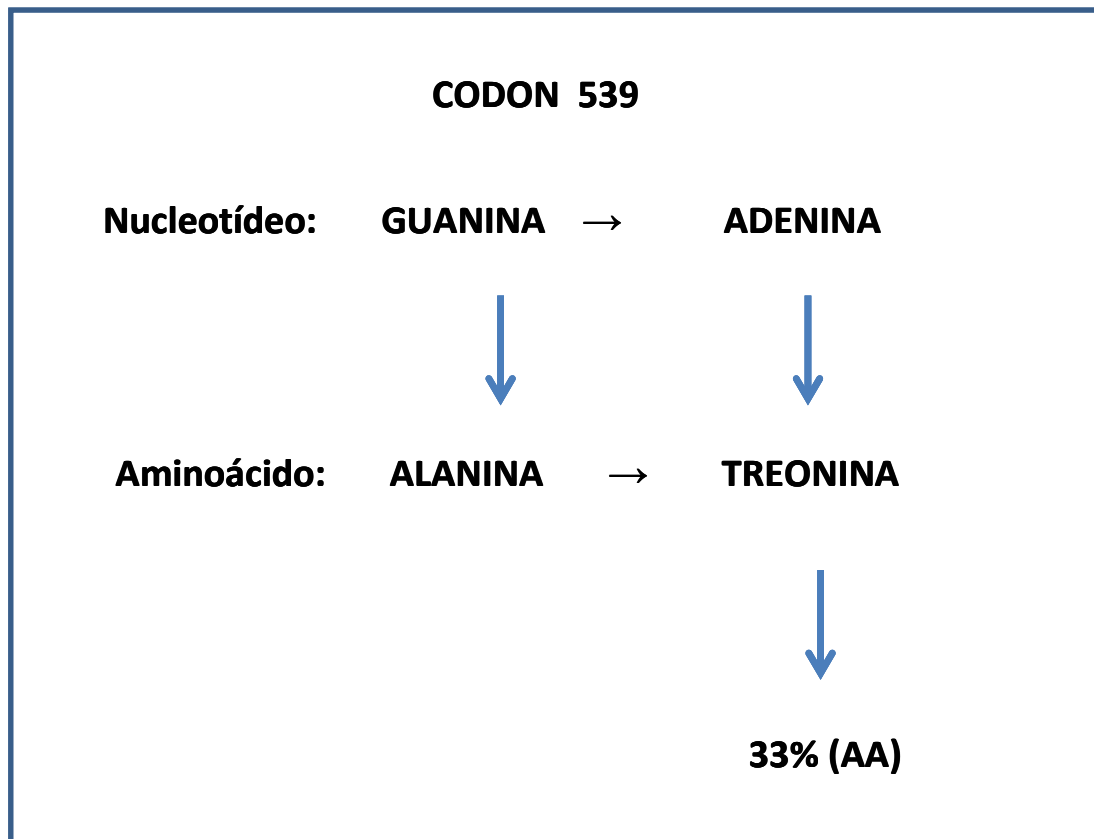


Figura 2. Esquema da mutação não-sinônima da 'variante K' no gene BCHE.

2.9. Epistasia

2.9.1. Conceito e exemplos

Diferentemente de doenças raras onde um único gene está associado ao estado de portador, nas doenças complexas, nelas incluídas os transtornos mentais, assume-se que há vários genes associados ao estado de portador. De fato, em doenças como a esquizofrenia e mesmo a dependência de cocaína, já existem vários genes candidatos descritos associados a estas condições (Cordeiro et al. 2009; Negrão & Vallada 2012). Se partirmos da premissa que alguns destes genes candidatos estão verdadeiramente associados a determinada doença, há que se investigar de que

maneira a combinação destes genes participa da susceptibilidade da doença. Em outras palavras, estamos falando do conceito de epistasia, ou seja, da interação de dois ou mais genes na determinação de um traço/fenótipo (Cordell 2002). Pesquisadores engajados na área de genética em psiquiatria tem ressaltado o desafio que será, daqui em diante, o entendimento do modo em que se dá a combinação de fatores ambientais e genéticos de um lado e, do outro lado, a interação entre os genes descobertos a partir dos estudos de associação genética na gênese dos transtornos mentais (Agrawal & Lynskey 2009).

Há inúmeros genes identificados como associados a dependência de cocaína em estudos caso-controle como revisto anteriormente nesta introdução (Goldman et al. 2005; Li & Burmeister 2009; Negrão & Vallada 2012). No mais das vezes, os pesquisadores investigaram um gene por vez. São poucos os estudos onde dois ou mais genes foram estudados e, até o presente momento, não há estudos em que se levou em conta a quantificação da interação gene-gene na dependência a cocaína. Isto se deve a limitações metodológicas, como amostras de número insuficiente de indivíduos para as testagens estatísticas. Outro aspecto se deve a um viés conceitual, num primeiro momento, o foco dos pesquisadores era voltado para se verificar a existência ou não da associação de um determinado gene candidato. Por outro lado, há um número crescente de estudos em que se investigou a epistasia ou interação gene-gene em outras doenças complexas (Phillips 2008). São poucos os estudos sobre epistasia dentro da área da saúde mental e um número menor ainda dentro das dependências químicas até o momento. Alguns estudos foram resumidos abaixo com o intuito de exemplificar a abrangência da investigação da epistasia bem como para demonstrar o caminho percorrido por investigadores na área a partir da limitação dos achados com genes isolados.

A diabetes do tipo 2 é tida como uma doença complexa onde vários genes interagem com o ambiente na constituição do fenótipo (Wellcome Trust Case Control Consortium 2007). Yang et al., 2010, partiram de uma abordagem tradicional, qual seja, a investigação de oito marcadores em sete genes do sistema renina-angiotensina aldosterona, um sistema clinicamente envolvido com a diabetes do tipo 2, através de um estudo de genes candidatos num desenho associação do tipo caso-controle (Yang et al. 2010). Porém, eles também fizeram a análise adicional da epistasia destes sete

genes sendo que os resultados são apresentados por gênero porque dois dos genes estão presentes no cromossomo X. Nos homens, não foi encontrada nenhuma associação entre os marcadores vistos individualmente e o estado de ter a doença mas, quando se fez a análise de interação, pode-se observar que quatro genes se ajustaram ao modelo estatístico de interação sendo que as razões de chance dos quatro genes combinados conferiam um risco de 4% de ter a doença. Já nas mulheres, um dos genes se mostrou associado no teste para locus isolado e o modelo de interação detectou três genes em epistasia, gerando razões de chance de 2,76. Os autores fizeram uso de duas estratégias de análise de interação, a regressão logística, que não detectou a interação, e um método não paramétrico conhecido como redução dimensional multifatorial (MDR) donde surgiram os resultados positivos (Hahn et al. 2003).

Os achados do estudo de Yang et al., 2010, exemplificam bem uma situação comum nos estudos de associação genética, qual seja, a não detecção de um achado positivo quando se olha para um locus isoladamente. Isto fica evidente no achado negativo no grupo dos homens e de somente um gene associado, de sete genes com plausibilidade biológica para a diabetes, no grupo das mulheres. Quando a análise levou em conta a interação destes sete genes, detectaram-se mais genes associados com a doença, ou seja, genes que teriam sido deixados de lado numa análise de locus isolado. Outro aspecto criticado nos estudos de associação de locus isolado é que, quando do encontro de uma associação, o tamanho do efeito é pequeno, as razões de chance não superam o valor de 1,3, como é o caso do diabetes (Moore & Williams 2009). Ou seja, um achado genético que explica porcentualmente pouco da variância genética para a doença. Mais uma vez, a interação gênica pode evidenciar tamanhos de efeito maiores, como foi o caso na análise dos homens, onde a presença da combinação dos quatro genes predizia uma chance de 4% de ter a doença. Finalmente, um comentário metodológico: muitas vezes um modelo matemático linear pode não incluir a multitude de possibilidades de interação biológica e, para isto, modelos não paramétricos, tal como o método do MDR usado no estudo da diabetes, podem ser mais vantajosos quando se fala em epistasia (Motsinger & Ritchie 2006).

2.9.2. Interação de dois genes do sistema dopaminérgico cerebral: COMT e DAT

Dentre os estudos em neuropsiquiatria, há uma série de pesquisas em neuroimagem funcional sobre o papel individual e combinado de dois genes em particular, DAT1 e o gene para a enzima catecol-O-metil transferase (COMT) (Yacubian et al. 2007). Estes genes, através dos seus transcritos, exercem um papel importante na regulação nos níveis de dopamina cerebral (Figura 3). Além disto, há estudos recentes em que se verificou a interação de ambos em regiões distintas de atividade e função cerebral: memória de trabalho e atividade do sistema de recompensa (Caldu et al. 2007; Dreher et al. 2009; Prata et al. 2009). Por conta da importância da circuitaria dopaminérgica do sistema de recompensa para as dependências químicas, o trabalho de Yacubian et al., 2007, será revisto aqui em maior detalhe (Yacubian et al. 2007). O estudo foi feito em voluntários normais e investigou o quanto polimorfismos nestes dois genes, DAT1 e COMT, interferiram na ativação, medida pelo fluxo cerebral via ressonância nuclear magnética funcional, do núcleo estriado durante a execução de um paradigma utilizando um jogo de cartas com ganho real em dinheiro. Os genes DAT1 e COMT se prestam a servir como genes candidatos do fenótipo em questão, ativação do núcleo estriado durante uma prova de recompensa, por conta da extensa associação entre o sistema de recompensa cerebral e a atividade dopaminérgica (Wise & Rompre 1989). Mais, há polimorfismos bem definidos para estes dois genes. O gene da COMT apresenta um polimorfismo bastante estudado, o Val158Met, no codon158 em que a valina é substituída por metionina, levando ao portador homizigoto para metionina (met/met) uma redução de 4 vezes na atividade da enzima (Lachman 2008). Já o DAT1 apresenta, como visto anteriormente, o polimorfismo do tipo VNTR 3'UTR (Kang et al, 1999) (Guindalini et al. 2006a). Este polimorfismo foi usado porque havia provas funcionais, em voluntários normais, demonstrando que a taxa de ativação do DAT nas regiões do estriado em estudos de imagem era dependente do genótipo do indivíduo para o VNTR 3'UTR (Shumay et al. 2010).

No paradigma usado pelos autores, a ativação do núcleo estriado revelaria a antecipação de ganho no jogo para cada sujeito, levando-se em conta a magnitude e também a probabilidade do ganho. Interessantemente, os autores não encontraram um efeito marginal (“main effect”) para nenhum dos genótipos, porém, verificam uma interação significativa, corrigida para testagens múltiplas, entre o COMT e DAT, na ativação do núcleo estriado. Ou seja, se os autores tivessem restringido a análise para cada gene isoladamente, perderiam o achado da interação. Ainda, esta interação foi do tipo multiplicativa não-linear, onde os genótipos do tipo met/val tanto 10R como 9R demonstraram as maiores ativações e os genótipos met/met 10R e val/val 9R as menores ativações. Estudos subsequentes, usando o fluxo sanguíneo cerebral regional como variável dependente, demonstraram a interação destes mesmos genes para ativação na mesma região, núcleo estriado bem como em regiões corticais (Caldu et al. 2007; Dreher et al. 2009; Prata et al. 2009).

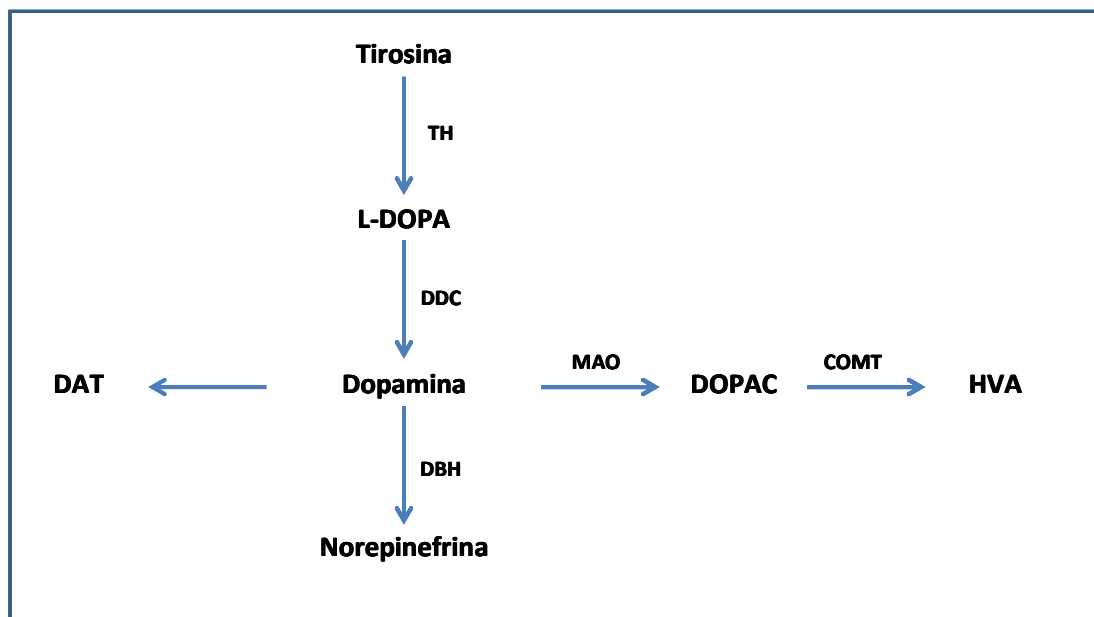


Figura 3. Passos metabólicos da síntese e da degradação da dopamina (TH, tirosina hidroxilase; DDC, dopamina descarboxilase; DAT, transportador da dopamina; MAO, monoamino oxidase; DOPAC, ácido dihidroxifenilacético; COMT, catecol-O-metil transferase; HVA, ácido homovanílico e; DBH, dopamina-β-hidroxilase)

2.9.2.1. Estudos de associação genética para COMT ou DAT1 na dependência de cocaína

A associação dos polimorfismos citados acima para os genes COMT ou DAT1 já foram objeto de estudo, inclusive na amostra de usuários de cocaína do Progene. Guindalini et al., 2006, fizeram uma varredura de marcadores genéticos para o DAT1 em 699 pacientes da amostra do Progene incluindo o polimorfismo 3'UTR VNTR (Guindalini et al. 2006a). Os autores, como citado anteriormente, encontraram uma associação forte para o polimorfismo do tipo VNTR Intron8, sendo que o genótipo contendo seis repetições (6R) em homozigose conferia razões de chance de 1,45 com um intervalo de confiança (IC) entre 1,18 a 1,78 para a dependência de cocaína. Esta associação se manteve para os ajustes na regressão logística para gênero, idade e um índice para controle da estratificação populacional.

O polimorfismo Val158Met do COMT é possivelmente o mais estudado quando se fala na busca de associação entre marcadores genéticos e doenças neuropsiquiátricas (Lachman 2008). No que tange o uso de substâncias, o polimorfismo Val158Met foi associado com as dependências de álcool, meta-anfetamina e em poliusuários (Tiihonen et al. 1999). Porém, estes achados não foram reproduzidos (Cevoli et al. 2006; Kweon et al. 2005). Um fator a mais que complica o entendimento do papel deste polimorfismo é que não há um consenso de qual seja o alelo que confere um aumento do risco para o uso de substâncias uma vez que há estudos em o alelo val foi mais frequente nos casos, e também em que o alelo met foi o mais frequente (Lachman 2008).

Há dois estudos independentes que investigaram os mesmos marcadores (rs737865, Val158Met e rs165599) em amostras de usuários de cocaína com resultados conflitantes. Cunha, 2007, em sua dissertação de mestrado, utilizando-se de 702 usuários de cocaína da amostra do ProGene, não encontrou uma associação entre os alelos e os genótipos para estes marcadores (Cunha 2007). Os achados foram corrigidos para possíveis confundidores como a idade, sexo e etnia e isto não alterou o resultado negativo para a associação. Em contrapartida, num estudo mais recente, observou-se a associação entre o polimorfismo Val158Met e a dependência de

cocaína em 330 usuários de cocaína da raça negra (Lohoff et al. 2010). As frequências alélicas e genotípicas para o polimorfismo Val158Met diferiram significativamente, sendo que, entre pacientes com dependência de cocaína, a frequência do alelo Met foi de 35% e dos controles normais foi de 27%, com uma OR de 1.44 (IC: 1, 12 - 1,86) (Lohoff et al. 2010). No que tange ao grupo das dependências químicas, não há relatos, até o presente momento, de estudos de associação genética entres estes dois genes e amostras de pacientes com dependência de cocaína.

2.9.2.2. Limitação das análises convencionais e o modelo de redução dimensional multifatorial

Os modelos paramétricos tem suas limitações quando do seu uso na busca de interação entre loci. Se um locus encontra-se dentro de um padrão complexo de colinearidade como outros loci incluídos no modelo de análise, questiona-se o quanto se pode concluir a partir de um eventual achado de interação. Diante das limitações da abordagem paramétrica nas situações de dimensionalidade elevada existem métodos não paramétricos que tem em comum técnicas baseadas em “data mining” e “machine learning” para dar conta de investigar interações em múltiplos loci. Dentre estes, existe o MDR, um método de redução da complexidade dos dados (Cordell 2009).

A pedra de toque do MDR é reduzir a informação contida em ‘n’ dimensões para uma única dimensão. No caso específico do MDR, a capacidade preditiva de múltiplos loci é agrupada numa única dimensão classificatória de predição de risco, com dois níveis, alto e baixo. Ou seja, a informação contida em vários loci é reduzida para um preditor que classifica um indivíduo como tendo alto ou baixo risco para o estado de doente. Uma vez determinado este preditor, ou como os autores a nomeiam, a variável genotípica de múltiplos loci em uma única dimensão (“one-dimensional multilocus-genotype variable”), ele é avaliado estatisticamente na sua capacidade de predizer o estado de doente através dos métodos de “cross-validation” e de testes de permutação. É importante que seja ressaltado aqui que o MDR esta

inserido no contexto de uma área do conhecimento, de caracter exploratório, a “data mining”(Moore 2010; Yang et al. 2010). Neste contexto, a noção de reduzir múltiplas dimensões para um número menor ou mesmo para uma dimensão única é feita de modo corrente nos trabalhos de “data mining”. O mesmo vale para a técnica de “cross-validation”.

2.9.3. Interação de dois ou mais loci na dependência de cocaína

A amostra em estudo na presente tese tem um número expressivo de sujeitos dependentes de cocaína (n=746) comparado aos estudos de associação populacional na literatura e já originou a identificação de 04 genes associados ao estado de portador de dependência de cocaína (Cordeiro et al. 2009; Dixon et al. 2010)). Levando-se em conta os 9 genes que foram objetos de publicações e mais aqueles que foram estudados em teses e dissertações, temos um total de 14 genes já investigados (Messas et al. 2005; Cunha 2007; Cordeiro et al., 2009). Porém, não foi feita qualquer análise de interação em busca de epistasia nestes estudos. A importância dos achados acima para esta tese é que a busca pela epistasia, por exemplo, em genes associados à atividade da dopamina, tais como o COMT e o DAT1, oferece a possibilidade de corrigir achados negativos ou mesmo díspares de associação genética isolada dos estudos anteriores. Além disto, a visão em conjunto dos marcadores já estudados abre a possibilidade de um melhor entendimento do papel de variantes genéticas agindo simultaneamente no risco para a dependência de cocaína.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Explorar a associação de marcadores genéticos como fatores de risco para a dependência de cocaína através de um estudo de associação do tipo gene candidato além de explorar a hipótese da associação de fatores de risco genético por meio da análise da interação entre dois ou mais marcadores genéticos.

3.2. Objetivos específicos

- Objetivo específico 1. Investigar a associação de marcadores para o gene BCHE num estudo caso-controle do tipo gene candidato
- Objetivo específico 2. Verificar se existe interação entre marcadores funcionais dos genes COMT e DAT1, já estudados previamente nesta amostra e, se esta interação acrescenta um ganho no tamanho do efeito utilizando-se um modelo de regressão logística.
- Objetivo específico 3. Verificar a interação entre marcadores em mais de dois loci a partir dos marcadores já investigados nesta amostra acrescidos de novos marcadores através do uso do método da redução dimensional multifatorial para um total de 40 marcadores em 12 genes.

4. Métodos

4.1. Amostragem e extração do DNA

A procedência dos casos e controles, os critérios de inclusão e exclusão iniciais e, a descrição do método para extração do DNA utilizado no primeiro estudo em que estes sujeitos foram objeto de pesquisa encontra-se no Anexo A. Resumidamente, os casos são 746 pacientes que preencheram os critérios diagnósticos de dependência de cocaína pela Classificação Internacional de Doenças, nona edição (CID 10) e há 891 controles oriundos do Banco de Sangue da Hospital das Clínicas da FMUSP.

4.2. Histórico das genotipagens

Uma vez que dois dos objetivos específicos desta tese foram a verificação dos efeitos da epistasia sobre o fenótipo, foi necessário reunir as genotipagens pertinentes nos diferentes bancos de dados que foram feitos a partir da extração inicial de DNA tanto para casos como para controles. Antes da feitura desta tese, foram constituídos 04 bancos de dados contendo genotipagens distintas entre eles, a saber, uma primeira amostra utilizada para a genotipagem de dois genes em receptores da dopamina, quando as genotipagens foram feitas no laboratório de Neurociências (LIM-27), uma segunda amostra, quando as genotipagens foram feitas no Instituto de Psiquiatria de Londres, a terceira amostra, quando as genotipagens foram feitas no Laboratório de Psicopatologia Experimental do Ipq-HC-FMUSP e, finalmente, uma amostra final, em que as genotipagens foram feitas num laboratório comercial, a Prevention Genetics, Marshfield, WI (<http://www.preventiongenetics.com/>)

Uma vez que o número de casos e controles difere em cada amostra, ou seja, nem todos os indivíduos foram submetidos às mesmas genotipagens, foi necessário triar os sujeitos de modo a reunir aqueles que tinham genotipagens presentes nos diferentes bancos de dados. Além disto, foi necessário uma certificação, particularmente para o uso em modelos de interação, que diferentes genotipagens estavam alinhadas para exatamente o mesmo indivíduo. A união das genotipagens

existentes num único banco de dados consistiu em agrupar diferentes bancos de dados e checar, um a um, os sujeitos, tanto casos como controles. A checagem manual foi necessária porque cada investigador adotou um código identificador próprio para os indivíduos do seu banco de dados. Foi tomado o cuidado de se identificar na planilha criada para a presente tese um identificador para denotar a presença ou ausência dos sujeitos nos quatro bancos de dados anteriores a este estudo. Outro cuidado adicional foi fazer uso de dois marcadores genéticos para checar discrepâncias entre diferentes bancos de dados. Um deles, um marcador de gênero, genotipado pela Prevention Genetics, foi útil porque ele apresenta uma cópia única para homens e cópia dupla para mulheres sendo que isto foi usado para alinhar as genotipagens e checar sujeitos discrepantes quanto aos dados sociodemográficos de gênero. O outro marcador foi o SNP rs1042098 que foi genotipado tanto na amostra enviada para o Instituto de Psiquiatria de Londres bem como para o Prevention Genetics, sendo assim, ele serviu para alinhar as genotipagens e excluir indivíduos discrepantes para este marcador na amostra de estudo. Finalmente, uma vez que nesta tese utilizaram-se de diferentes tamanhos e critérios de seleção da mesma amostra original e, de diferentes ferramentas de análise estatística para abordar cada um dos três objetivos específicos, a descrição metodológica foi feita em seções destinadas a cada um dos objetivos específicos propostos.

4.3. Aprovação do Comitê de Ética

Os trabalhos anteriores que geraram as duas teses e a dissertação citadas acima foram aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CaPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. O presente projeto foi aprovado pela CAPPesq, como um subprojeto a partir do primeiro estudo genético-molecular submetido pelo ProGene e aprovado segundo o protocolo número 499/99 (Anexo B).

4.4. Objetivo específico 1

4.4.1. Critérios de inclusão e exclusão

Casos. A partir da amostra mais numérica de casos disponíveis, ou seja, de 746 indivíduos, foram excluídos 09 amostras por conta de quantidades de DNA menores que 100ng após a extração, 32 amostras por constituírem sujeitos repetidos ou por terem dados sociodemográficos e clínicos incompletos. Mais 07 indivíduos foram excluídos por não apresentarem alinhamento entre as diferentes plataformas de genotipagem quanto aos genótipos dos dois marcadores utilizados para esta finalidade, o marcador de gênero da PG e o SNP rs1042098. Em suma, a amostra de casos ficou constituída por 698 sujeitos.

Controles. A partir da amostra mais numerosa de controles disponíveis, ou seja, de 891 indivíduos, foram excluídos 23 sujeitos por não terem dados sociodemográficos, 18 controles por não apresentarem alinhamento entre as diferentes plataformas de genotipagem quanto aos genótipos dos dois marcadores utilizados para esta finalidade, o marcador de gênero da PG e o SNP rs1042098 e, 112 controles que não foram enviados para genotipagem para a BCHE por conta de insuficiência de quantidade mínima de DNA extraído. A amostra de controles ficou constituída por 738 sujeitos.

4.4.2. Escolha dos marcadores

A seleção dos marcadores, SNPs, seguiu os critérios delineados por Tabor et al., 2002: avaliação da literatura em que determinado SNP foi utilizado em estudos de associação com um fenótipo semelhante ao do projeto -no nosso caso, perfis distintos de metabolizadores para a BCHE; SNPs que estivessem numa região do gene associado a uma consequência funcional, por exemplo, região promotora do gene e, quando vários marcadores são escolhidos para o mesmo gene escolher SNPs em blocos de haplótipos em desequilíbrio de ligação alto a partir do International HapMap Project (<http://www.hapmap.org/>) (Tabor et al. 2002). Assim, foi escolhido o rs1803274 porque ele é uma variante comum, conhecida com variante-K que leva a uma redução da atividade da Bche (McGuire et al. 1989). Os outros dois SNPs, rs4263329 e rs4680662, foram selecionados com base na estrutura de desequilíbrio de ligação do gene e frequência populacional de acordo com o HapMap. Um esquema com a representação destes marcadores ao longo do gene por ser visto na figura 4.

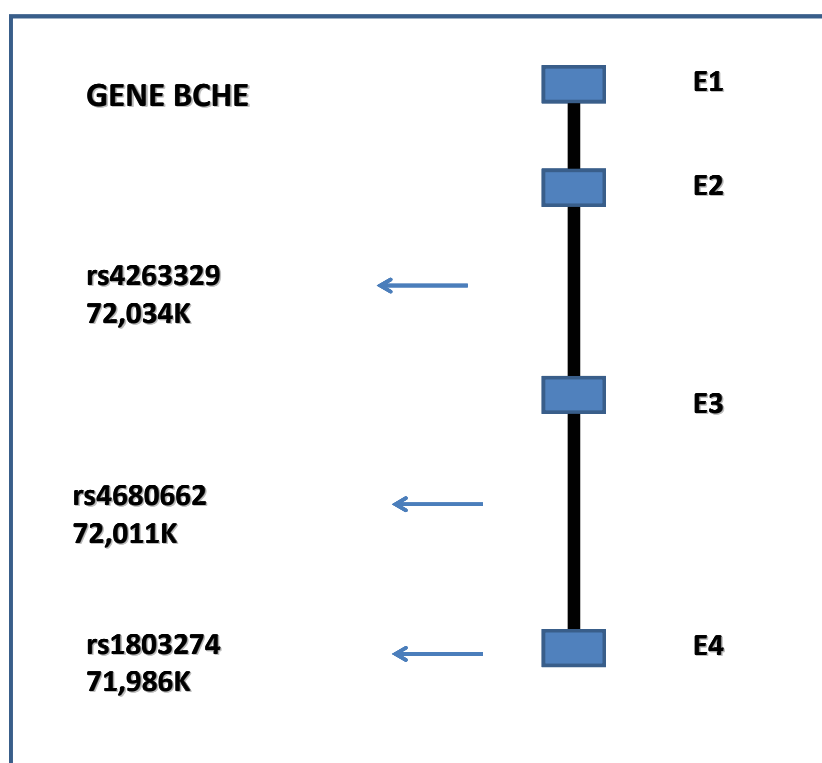


Figura 4. Representação esquemática da posição dos marcadores, medidos em pares de bases, ao longo do gene BCHE. Os blocos de E1 a E4 representam os quatro exons do gene

4.4.3. Genotipagem

A genotipagem dos SNPs selecionados para esse projeto foi realizada pela Prevention Genetics (<http://www.preventiongenetics.com/>).

4.4.4. Análise

Os passos da análise seguem os procedimentos já estabelecidos para estudos de associação do tipo gene candidato (Balding 2006). Primeiro, foi verificado se os genótipos dos três marcadores encontravam-se dentro do equilíbrio de Hardy-Weinberg na amostra de pacientes e controles por meio do programa Haploview (Barrett et al. 2005). Em seguida, foi feito um teste geral de associação, o teste de associação genotípica com dois graus de liberdade, e foram feitos três testes individuais em que foram definidos os modelos genéticos de herança (aditivo, dominante e recessivo). As variáveis testadas no modelo dominante e recessivo foram do tipo binário. O teste geral de associação foi feito através do qui-quadrado e os modelos genotípicos foram feitos através da regressão logística. O melhor modelo foi ajustado para idade e gênero por meio de regressão logística.

A amostra dos pacientes foi subdividida para que se fizesse a comparação entre as vias de administração de cocaína em: 1) usuários de cocaína inalada, ou seja, pacientes que faziam uso preferencial de cocaína na forma de pó; 2) usuários de crack, pacientes que faziam uso de cocaína na forma fumada e; 3) usuários duplos, pacientes que faziam uso das duas formas de cocaína. A estratificação da amostra de pacientes, para fins de análise, é um recurso frequentemente utilizado e justifica-se porque há características clínicas e demográficas que fazem estes três subgrupos distintos entre si (Farrer et al. 2009; Guindalini et al. 2006). Os passos da análise genética foram realizados para a comparação entre os grupos de pacientes e controles e também entre os três subgrupos de pacientes divididos de acordo com a via de administração de cocaína.

A frequência dos alelos e haplótipos bem como as medidas de desequilíbrio de ligação foram obtidas por meio do programa Haploview (versão 4.2) e foram realizadas para diferenciar pacientes de controles. Os testes de associação e a determinação das razões de chance e intervalos de confiança foram estimados através do programa SPSS, versão 17. Finalmente, o programa QUANTO foi utilizado para estimar o poder estatístico da amostra assumindo-se uma razão de chance de 1,5, a prevalência da doença em 0,13%, uma frequência do alelo menor de 0,27 e um nível de significância de 0,05 (Gauderman 2002; Gauderman & Morrison 2006). Os valores de poder do teste, de acordo com os modelos de herança foram de 63% para o recessivo, 95% para o dominante e 99% para o aditivo.

4.5. Objetivo específico 2

4.5.1. Critérios de inclusão e exclusão

4.5.1.1. Amostra para o estudo do polimorfismo Val158Met da COMT

Casos. A partir da amostra mais numerosa, de 746 casos, foram excluídos 20 pacientes que não tinham dados sociodemográficos, 12 pacientes que não foram enviados para genotipagem dos marcadores para COMT, 04 pacientes que não estavam alinhados para o marcador genotipado em comum nos primeiros estudos do grupo e na genotipagem por um laboratório comercial, o rs1042098 e, 02 casos que não tinha alinhamento entre o marcador genético de gênero e a informação sociodemográfica. O total de excluídos foi de 38 pacientes, ou seja, 5% da amostra dos sujeitos disponíveis, restando 708 pacientes para esta análise.

Controles. A partir da amostra mais completa de 891 controles, foram excluídos 29 sujeitos sem dados sociodemográficos, 08 controles por não estarem alinhados com o marcador genético de gênero, 11 controles por não se alinharem com o marcador rs1042098 e, 10 controles por não terem genotipagem para nenhum dos três marcadores para a COMT. O total de controles excluídos foi de 58, ou seja, 6% dos controles disponíveis, restando 833 controles para esta análise.

4.5.1.2. Amostra para o estudos de associação de locus isolado para DAT1 e para a interação DAT1*COMT

Casos. A partir da amostra mais numerosa, de 746 casos, foram excluídos 20 pacientes que não tinham dados sociodemográficos, 11 pacientes que não foram enviados para genotipagem dos marcadores VNTR para DAT, 05 pacientes que não estavam alinhados para o marcador genotipado em comum nos primeiros estudos do grupo e na genotipagem por um laboratório comercial, o rs1042098 e, 02 casos que não tinham alinhamento entre o marcador genético de gênero e a informação sociodemográfica. O total de excluídos nesta etapa foi de 38 pacientes, ou seja, 5% da amostra dos sujeitos disponíveis, restando 708 pacientes para esta análise. Para a amostra contendo o marcador 3'UTR VNTR foram incluídos somente os portadores dos alelos mais frequentes (9R e 10R), ficando ela constituída de 688 casos. Para a amostra contendo o marcador Intron8 VNTR foram incluídos somente os portadores dos alelos mais frequentes (5R e 6R), ficando ela constituída por 659 casos.

Controles. A partir da amostra mais completa de 891 controles, foram excluídos 29 sujeitos sem dados sociodemográficos, 08 controles por não estarem alinhados com o marcador genético de gênero, 11 controles por não se alinharem com o marcador rs1042098. O total de controles excluídos foi de 48, ou seja, 5% dos controles disponíveis, restando 843 controles para esta etapa. Do mesmo modo feito para os casos, para a amostra de contendo o marcador 3'UTR VNTR foram incluídos somente os portadores dos alelos mais frequentes (9R e 10R), ficando ela constituída de 826 controles e paara a amostra contendo o marcador Intron8 VNTR foram incluídos somente os portadores dos alelos mais frequentes (5R e 6R), ficando ela constituída por 792 controles.

4.5.2. Genotipagem

O polimorfismo Val158Met ou rs4680 foi genotipado pela empresa Prevention Genetics (<http://www.preventiongenetics.com/>). As genotipagens para os dois VNTRs (3'UTR e Intron8) foram obtidos a partir das planilhas de genotipagens

provenientes do estudo de Guindalini et al., 2006, onde se encontra a descrição do método laboratorial usado (Guindalini et al. 2006a).

4.5.3. Análise

4.5.3.1. Teste do poder estatístico da amostra

O programa QUANTO foi utilizado para estimar o poder estatístico da amostra neste estudo em específico levando-se em conta a prevalência da doença em 0,13% um nível de significância de 0,05 (Gauderman 2002; Gauderman & Morrison 2006). O poder do teste para a interação foi obtido usando-se o ajuste para o programa para interação gene-gene, sendo que os parâmetros usados para os dois genes foram de uma razão de chance de 1,5 ("main effect"), uma frequência do alelo menor de 0,27 e uma razão de chance para a interação de 1,8. Para um modelo genético em que o efeito dos dois genes é do tipo dominante, o poder do teste foi de 67% e, para o modelo em que um dos genes foi dominante e o outro recessivo foi de 35%.

4.5.3.2. Frequências genótipos entre casos e controles

Os testes de associação para os genótipos dos marcadores isoladamente seguiram as descrições feitas na seção dos Métodos para o Objetivo específico 1 sendo que não foram feitas aqui as análises de LD.

4.5.3.2. Testes de interação

Se tomarmos como exemplo um estudo caso-controle em que o estado de portador seja a variável de desfecho, a abordagem da regressão logística é construir um modelo probabilístico para a doença. Consegue-se a quantificação do efeito de

um locus único através da interpretação dos seus respectivos coeficientes de regressão enquanto mantêm-se fixos os parâmetros dos loci remanescentes (Kooperberg et al. 2007).

O conceito de regressão logística é melhor entendido tendo-se o conceito de regressão linear. A noção de regressão linear envolve um preditor x que leva a um desfecho quantitativo y , sendo que y assume vários valores de acordo com o preditor x numa representação linear em que

- $y = mx + c$
- onde m é o regressor da inclinação e c o regressor da intercepção, quando $x=0$.

Diferentemente, na regressão logística, trabalha-se com a noção de probabilidade de ter a doença, ou seja, o desfecho não assume vários valores mas agora é a probabilidade de ter ou não a doença. A equação usada, tem elementos de um modelo linear mas leva em conta a quantificação dos regressores onde se lida com tantos modelos lineares quanto forem os preditores envolvidos. Mais importante, isto é feito de modo que se tenha um termo que leva em conta a interação de todos os preditores combinados. Em testes de interação em genética, usa-se comumente a base logarítmica de razões de chance da doença, expresso por

$$\text{Ln}(n(p/1-p))$$

Tomando-se como exemplo, dois loci esta razão é determinada pelas variáveis x_b e x_c que representam os loci, B e C, os regressores beta e gama para B e C, respectivamente, o termo $ix_b x_c$ para a integração e alfa para o regressor da intercepção:

$$\text{Ln}(n(p/1-p)) = \text{alfa} + \text{beta } x_b + \text{gama } x_c + ix_b x_c$$

O teste de hipótese de interação procura saber se $i=0$, assim sendo, a razão de chance para a doença fica restrita aos efeitos individuais de B ou C, determinados

pelos modelos lineares respectivos. Assim, uma vantagem oferecida no uso da regressão logística é que além da detecção da interação pode-se testar para o efeito marginal ("main effect") de cada genótipo isoladamente, ou seja, pode-se proceder ao teste combinado de associação de cada locus isoladamente levando em conta a interação.

4.6. Objetivo específico 3

4.6.1. Critérios de inclusão e exclusão do sujeitos

Casos. A partir da amostra mais numerosa, de 746 casos, foram excluídos 20 pacientes que não tinham dados sociodemográficos, 04 pacientes que não estavam alinhados para o marcador genotipado em comum nos primeiros estudos do grupo e na genotipagem por um laboratório comercial, o rs1042098 e, 02 casos sem alinhamento entre o marcador genético de gênero e a informação sociodemográfica, restando 720 pacientes para o início desta análise.

Controles. A partir da amostra mais completa de 891 controles, foram excluídos 29 sujeitos sem dados sociodemográficos, 08 controles por não estarem alinhados com o marcador genético de gênero, 10 controles por não se alinharem com o marcador rs1042098 restando 844 controles para o início desta análise.

4.6.2. Escolha dos genes e polimorfismos

No que diz respeito aos possíveis processos biológicos subjacentes a dependência química, foram utilizados os genes já estudados previamente com a amostra de dependentes de cocaína do ProGene além dos três marcadores para o gene BCHE descritos na seção dos métodos para o objetivo 1. A plausibilidade biológica a eles conferida encontra-se na tabela 1. A descrição pormenorizada dos critérios de escolha e os métodos de genotipagem para os marcadores referentes a estes genes encontra-se nos trabalhos de doutorado e artigos publicados (Cordeiro et al. 2009; Dixon et al. 2010; Messas et al. 2005; Cunha 2007). Com intuito de ampliar a gama de cobertura para os marcadores de alguns dos genes previamente estudados,

foram incluídos cinco novos marcadores para os genes dos receptores da dopamina DRD2/DRD3, do gene DAT1 e do gene da dopamina beta-hidroxilase (DBH). As genotipagens dos marcadores extras para genes foram feito sob contrato com o Prevention Genetics.

Tabela 1. Polimorfismos selecionados para o objetivo 3.

Via biológica	Gene	Locus	Polimorfismo (s)
Metabolização da cocaína	Butirilcolinesterase (<i>BCHE</i>)	3q26.1	rs1803274, rs4263329 e rs4680662
Sistema transdução do sinal	Proteína quinase IV dependente de calmodulina/Ca ²⁺ (<i>CaMKIV</i>)	5q21.3	rs1457115 e rs9285875
Metabolização de catecolaminas	Catecol-O-metil transferase (<i>COMT</i>)	22q11.21	rs165599, rs4680 e rs737865
Transportador de neurotransmissor	Transportador de Dopamina (<i>DAT1</i>)	5p15.3	rs11564773, rs1042098, rs1564752, rs2042449, rs27048, rs2963238, rs3756450, rs460000, rs6347 e rs6876225
Metabolização da dopamina	Dopamina Beta-hidroxilase (<i>DBH</i>)	9q34	rs1611115 e rs77905
Receptor de membrana	Receptor D2 da dopamina (<i>DRD2</i>)	11q23	rs1079594 e rs1799732
Receptor de membrana	Receptor D3 da dopamina (<i>DRD3</i>)	3q13.3	rs7629232
Receptor de membrana	Receptor do tipo A, $\alpha 2$ para o ácido gama-aminobutírico (<i>GABRA2</i>)	4p12	rs1372472, rs189957, rs279871, rs894269 e rs9291283
Transdução do sinal	Quinase para o receptor acoplado a proteína G (<i>GSK</i>)	19q13.2	rs558934, rs5761116 e rs576895
Metabolismo Xenobiótico	Glutaciona-S-transferase (<i>GSTP1</i>)	11q13	rs947894
Ritmos circadianos	Proteína homóloga 1 do período circadiano (<i>PER1</i>)	17p13.1	rs2253820, rs2304911, rs30277172 e rs885747
Ritmos circadianos	Proteína homóloga 2 do período circadiano (<i>PER2</i>)	2q37.3	ID2222180, ID2222181, rs2304672 e rs2304674

4.6.3. Seleção dos polimorfismos

Foram adotados passos de rastreio para selecionar os marcadores utilizados na análise pelo MDR como descarte de marcadores por erros grosseiros de genotipagem. Marcadores que apresentaram valores para o equilíbrio de HW acima do limiar estabelecido pelo programa Haploview ($p < 0.001$) também foram descartados por tratar-se de possíveis erros de genotipagem ou de efeitos de estratificação populacional. Marcadores que falharam em um teste de independência estatística ajustado para este estudo também foram excluídos. Para o teste de independência utilizou-se do recurso do programa Haploview conhecido como 'tagger', utilizado para selecionar marcadores num mesmo gene que estejam em desequilíbrio de ligação porém, foi feito um ajuste para que o programa considerasse marcadores de diferentes genes como pertencendo ao mesmo gene utilizando-se a associação de alelos dois a dois e um valor para o coeficiente de correlação para o desequilíbrio de ligação (r^2) de 0,8. Os marcadores do tipo VNTR, como era o caso de três marcadores para o gene DAT1, foram descartados porque se fosse adotada a estratégia de restringir a análise aos VNTRs apenas para os mais freqüentes - prática comum nos estudos de locus simples com estes VNTRs -isto acarretaria uma perda de sujeitos importante uma vez que há pouca sobreposição dos sujeitos, entre os alelos mais freqüentes para os três VNTRs. Ao todo, foram selecionados 40 marcadores em 12 genes (Tabela 1).

4.6.4. Parametrização e análise univariada

Uma vez que a maioria dos marcadores não tem definido qual seu padrão de dominância genética, optou-se por escolher, para cada polimorfismo, o modelo de dominância que apresentava o menor valor de p gerado na análise de regressão logística no teste dos genótipos. Este procedimento, qual seja, a parametrização dos genótipos, cumpre as finalidades de se apropriar do que seria o melhor modelo de dominância genética para cada polimorfismo visto individualmente. Na prática, um determinado polimorfismo, contendo dois alelos, pode contribuir com duas

dimensões (modelo recessivo ou dominante) ou com três dimensões, como é o caso do modelo aditivo. A parametrização seguiu a descrição já feita na seção dos métodos para o objetivo específico 1. A análise estatística foi feita com o uso do programa SPSS (versão 17.0) e do programa Haploview. O cálculo das frequências alélicas, equilíbrio de HW, testagem de modelos de dominância e comparação das frequências genóticas foram feitas como já descrito na seção dos métodos para os objetivos 1 e 2.

4.6.5. Análise Multivariada

4.6.5.1. Algoritmo do MDR

O algoritmo do MDR realiza duas operações básicas (Hahn et al. 2003). Uma delas é criar modelos de interação por meio da redução das dimensões genóticas para uma única dimensão de alto/baixo risco e a segunda operação é a determinação do modelo que exercerá a melhor predição para a identificação dos casos através da validação cruzada ("cross-validation"). De modo a tornar mais compreensível o algoritmo, será descrita em primeiro lugar a validação cruzada.

4.6.5.2. Validação Cruzada (CV)

A CV consiste em um conjunto de medidas para diagnosticar o desempenho de um determinado modelo, servindo também para selecionar um modelo mais adequado dentre outros em uma lista disponível.

Usualmente, um conjunto de exemplos é dividido em dois subconjuntos disjuntos: o conjunto de treinamento que é usado para o aprendizado do conceito e o conjunto de teste, usado para medir o grau de efetividade do conceito aprendido. Os subconjuntos são normalmente disjuntos para assegurar que as medidas obtidas, utilizando o conjunto de teste, sejam de um conjunto diferente do usado para realizar o aprendizado, tornando a medida estatisticamente válida (Hahn et al. 2003). O

modelo é gerado com o subconjunto de treinamento e testa-se o seu desempenho preditivo no subconjunto de teste. Nos trabalhos sobre interação gênica que fazem uso do MDR, a amostra é dividida em 10 partes (Figura 5). A redução das dimensões genóticas e consequente geração do modelo é feita com 9/10 da amostra (treinamento) e a validação cruzada vai avaliar o desempenho preditivo com o 1/10 restante da amostra (teste). Este procedimento é feito por 10 vezes, usando diferentes 'random number seeds', de modo a reduzir a chance de se observar resultados espúrios devido a divisão aleatória que é feita dos dados na pizza de 10 partes. O resultado destas avaliações será o erro preditivo do teste. A CV gera outra medida de avaliação do modelo que é a consistência da validação cruzada; ela é uma medida do número de vezes em o modelo gerado pelo algoritmo é identificado em cada uma das 10 fatias possíveis contendo 9/10 da amostra. Por extensão, o valor máximo da consistência de validação cruzada é de 10 em 10 (10/10) (Hahn et al. 2003; Moore 2010; Ritchie 2011).

4.6.5.3. Redução das dimensões genóticas

O programa parte de uma amostra de treino e seleciona um elenco de 'n' fatores genéticos. A descrição daqui em diante e a figura correspondente (figura 5) tomarão como exemplo um elenco de dois loci, cada um contendo três genótipos, sendo que teremos um total de nove combinações possíveis para os seis genótipos. Estes 06 fatores genéticos serão representados graficamente numa tabela multifatorial do tipo 3X3 (figura 5). Cada célula oriunda do cruzamento dos genótipos será preenchida pela contagem dos casos e dos controles que possuem a sua combinação genotípica. A seguir, é calculada a razão entre o número de casos para o de controles para cada uma das células nesta grade multifatorial. Cada célula nesta representação multifatorial é então nomeada como sendo de "alto risco" se a razão de casos e controles alcançar ou exceder um limiar (por exemplo, 1) ou é nomeada como sendo de "baixo risco" se o limiar não é alcançado. É nesse passo que se obtém a redução das várias dimensões representadas na grade para uma única dimensão com dois níveis, "alto risco" e "baixo risco". Numa situação em que se tem

mais de dois loci, o algoritmo fará combinações de todos os loci tomados dois a dois (figura 5, “step 5”). O programa seleciona o modelo que tiver o menor número de indivíduos erroneamente identificados, ou seja, este modelo de dois loci será aquele que apresentará o menor erro classificatório entre todos os possíveis modelos de dois loci. É importante que se ressalte que o MDR é capaz de criar modelos para mais de dois fatores, no caso aqui, loci. Independentemente do número de fatores, os passos do programa são os mesmos para dois ou mais loci.

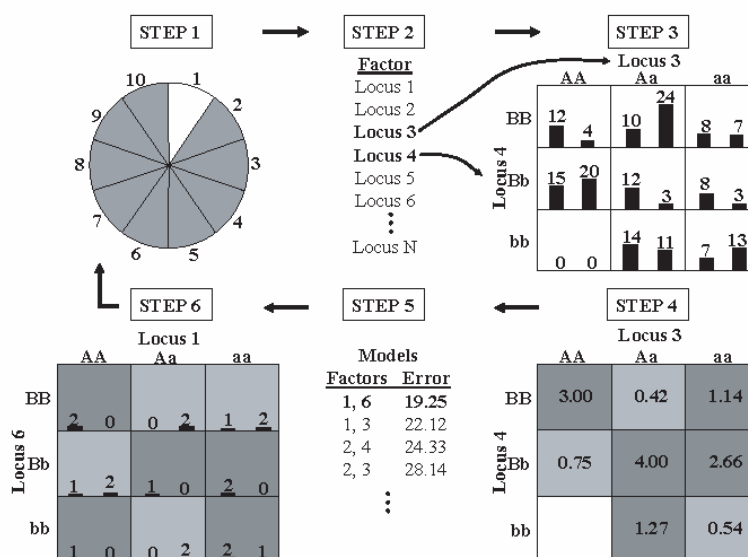


Figura 5. Passos no funcionamento do método MDR (adaptado de Hahn et al., 2003) (Hahn et al. 2003)

4.6.5.4. Escolha do Modelo

Uma vez que um modelo é gerado na etapa descrita logo acima, ele é submetido aos passos da validação cruzada. Ao término da CV o pesquisador deve decidir qual modelo escolher. Isto porque o programa gera quantos modelos forem determinados, ou melhor, se há um número de fatores maior que dois, para cada modelo de dois ou mais loci será feita a CV. No final, tem-se uma tabela em que são listados o melhor modelo para dois loci, para tres loci e assim por diante. Tem-se adotado nos estudos que utilizaram o MDR a dupla de valores máximos da

consistência de validação cruzada e o erro preditivo (teste de acurácia balanceada). (Gui et al. 2011a). Finalmente, pode-se fazer um teste estatístico do modelo escolhido de modo a quantificar a magnitude do CV e do erro preditivo.

5. Resultados

5.1. Objetivo específico 1

5.1.1. Variáveis clínicas

Um resumo das características sociodemográficas e clínicas da amostra para este estudo pode ser visto na tabela 2. Os pacientes e controles são diferentes no que diz respeito a distribuição entre gêneros ($\chi^2=185,8$, $gl=3$, $p<0.0001$), há significativamente mais mulheres no grupo controle (32%) do que em casos (4%) e há mais mulheres do que homens (96%) quando os casos são vistos isoladamente. Algo semelhante ocorre no que diz respeito às médias das idades ($F=62,1$, $gl=1434$, $p<0.001$), controles são mais velhos ($31,3\pm 9,8$ anos) do que os casos ($26,8\pm 7,2$ anos). No que diz respeito ao perfil de gravidade clínica da amostra de pacientes, a maioria deles fez uso de maconha (97%), eram fumantes (84%) e, um pouco mais da metade (63%) fez uso de mais de 50 unidades de álcool por semana. No que diz respeito a uma medida do impacto social da adicção, mais da metade (54%) foi presa ao menos uma vez ao longo da vida. Os subgrupos de usuários de cocaína, divididos de acordo com a forma preferencial de administração, eram 23% de usuários de cocaína inalada, 9% de usuários de crack e a maioria, 68% fazia uso das duas vias de administração da cocaína.

5.1.2. Caso-controle

5.1.2.1. Equilíbrio de HW

Na Tabela 3 encontram-se os valores de p para o teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg em relação a cada locus estudado do gene BCHE. Nenhum dos polimorfismos desviou do equilíbrio e os valores para os MAF são todos acima de 0,05.

5.1.2.2. Frequências dos alelos e dos genótipos

Nas tabelas 4 a 6 encontram-se as frequências alélicas e genotípicas dos três polimorfismos nos grupos de casos e pacientes. Para as colunas contendo as frequências absolutas (FA) e as frequências relativas (FR) dos alelos, o valor de p refere-se às probabilidades encontradas a partir das tabelas de contingência geradas pelo programa Haploview e encontra-se na linha dos totais para os alelos. Quanto aos genótipos, estes foram agrupados de modo que foram construídos três modelos de dominância (aditivo, recessivo e dominante) a partir do alelo com menor frequência, tido como alelo de risco. Atribui-se um valor de 1 a 3 para os três genótipos no modelo aditivo, sendo que o genótipo contendo o alelo de risco em homozigose recebia o valor 3 e, para os modelos recessivo e dominante, atribuíram-se dois valores, 1 e 2, para a união dos genótipo recessivo com o heterozigoto e do genótipos dominante com o heterozigoto, respectivamente. A análise estatística dos modelos de dominância foi feita através da regressão logística e os valores de p estão na linha dos totais para cada modelo de dominância.

5.1.2.3. Regressão logística

As tabelas 4 a 6 mostram as comparações entre casos e controles para os três marcadores do gene BCHE. As frequências dos alelos para os três marcadores não foram diferentes para casos e controles. No que diz respeito à análise de genótipos, verificou-se uma frequência mais alta de indivíduos portadores do genótipo G/G (3%) entre os controles comparados com os pacientes (1%) com $p=0,05$ (OR=0,44; IC95%=0,19 - 1,01) para o modelo recessivo do marcador rs4263329. Porém, uma vez feito o ajuste no modelo de regressão logística para gênero e idade esta associação deixou de ser significativa ($p>0,13$). As frequências genotípicas para os outros dois marcadores não foram diferentes entre pacientes e controles para nenhum dos modelos de dominância. As medidas de LD e frequência de blocos haplotípicos ao longo do gene BCHE não evidenciaram qualquer associação com o estado de dependência de cocaína (dados não exibidos).

5.1.3. Subgrupos de fenótipos

No que diz respeito aos resultados para os testes de associação para os grupos de pacientes adotou-se uma estratégia de análise diferente daquela usada para o teste de associação entre casos e controles porque havia neste caso três grupos para o teste de hipótese. Assim, o primeiro passo foi um teste de associação geral (teste de qui-quadrado) levando em conta os três subgrupos de pacientes e os três genótipos para cada marcador. Os resultados dos testes gerais de associação para a via preferencial de administração de cocaína podem ser vistos na Tabela 7. Dos três marcadores testados foi observada uma associação entre os genótipos e os subgrupos para o marcador rs 1803274 ($\chi^2=15,20$, $gl=4$, $p=0,004$). Uma vez que as frequências relativas dos pacientes pertencentes ao grupo de uso exclusivo de crack diferiam das frequências relativas dos outros dois subgrupos, particularmente quanto ao genótipo A/A uma nova etapa de testes foi realizada. Desta vez, o grupo de usuários de crack foi comparado com o conjunto dos restantes dos usuários (usuários de cocaína inalada e usuários duplos) e também foi comparado com o grupo de usuários de cocaína inalada por si só. Para esta etapa, foi verificado o melhor modelo de dominância tal como feito para o estudo de casos e controles através da regressão logística sendo que esta análise foi feita somente para o marcador rs 1803274. O melhor modelo de dominância para esta associação foi o modelo recessivo que mostra que os portadores em homozigose para o alelo de risco (A) eram mais frequentes nos pacientes que faziam uso preferencial de crack quando comparados com usuários de cocaína inalada ($p=0,027$; $OR=4,36$; $IC95\%=1,18 - 16,04$) e com o conjunto dos usuários de cocaína inalada somados aos usuários duplos ($p=0,001$; $OR=5,83$; $IC95\%=2,10 - 16,16$).

Tabela 2. Características dos pacientes dependentes de cocaína e dos controles.

	Pacientes	Controles
n	698	738
Idade±DP	26,8±7,2	31,3±9,8
Limites das Idades	17-56	18-72
Gênero		
	<i>Masculino</i>	669 (96%) 501 (68%)
	<i>Feminino</i>	29 (4%) 237 (32%)
Forma de Administração		
	<i>Usuários de Cocaína Inalada</i>	(23%) 160
	<i>Usuários de Crack</i>	(9%) 61
	<i>Usuários Duplos</i>	(68%) 477
Fumar		
	<i>Sim</i>	585 (84%)
	<i>Não</i>	111 (16%)
Uso de álcool		
	<i>< 50 unidades/semana</i>	417 (63%)
	<i>> 50 unidades/semana</i>	247 (37%)
Uso de maconha		
	<i>Nunca usou</i>	23 (3%)
	<i>Usou alguma vez</i>	666 (97%)
Histórico Criminal		
	<i>Sim</i>	373 (54%)
	<i>Não</i>	324 (46%)

Tabela 3. Resultados do teste de Equilíbrio Hardy-Weinberg para os marcadores do gene BCHE onde são exibidos os valores de p , os alelos para cada marcador e a frequência do alelo menos comum (MAF)

Marcador	Alelos	MAF	p
rs 1803274	G:A	0,183	0,88
rs 4680662	G:A	0,34	0,61
rs 4263329	A:G	0,142	0,25

Tabela 4. Comparação das frequências dos alelos e genótipos do polimorfismo rs 1803274 no gene BCHE estudados nos pacientes com dependência de cocaína e, controles normais segundo três modelos de dominância (*valores de p significativos adotando-se intervalo de confiança de 95%)

		Casos		Controles		<i>p</i>
		FA	FR	FA	FR	
	Alelos	G	1112	0,82	1167	0,80
		A	236	0,18	275	0,20
		Total	1348		1442	
Modelo aditivo	Genótipos	G/G	457	0,66	477	0,67
		A/G	201	0,3	215	0,3
		A/A	18	0,04	30	0,03
		Total	676		722	
Modelo recessivo	Genótipos	A/A+G/A	658	0,97	692	0,96
		G/G	18	0,03	30	0,04
		Total	676		722	
Modelo dominante	Genótipos	A/A	457	0,68	477	0,66
		A/G+G/G	219	0,32	245	0,34
		Total	676		722	

Tabela 5. Comparação das frequências dos alelos e genótipos do polimorfismo rs 4680662 no gene BCHE estudados em pacientes com dependência de cocaína e controles normais segundo três modelos de dominância (*valores de p significativos adotando-se intervalo de confiança de 95%)

		Casos		Controles		p	
		FA	FR	FA	FR		
Alelos	G	911	0,66	920	0,66	0,87	
	A	467	0,34	478	0,34		
	Total	1378					
Modelo aditivo	Genótipos	G/G	297	0,43	303	0,43	0,89
		A/G	317	0,46	316	0,45	
		A/A	75	0,11	81	0,12	
		Total	689		700		
Modelo recessivo	Genótipos	G/G+A/G	614	0,89	619	0,88	0,95
		A/A	75	0,11	81	0,12	
		Total	689		700		
Modelo dominante	Genótipos	G/G	392	0,57	303	0,57	0,69
		A/G+A/A	297	0,43	397	0,43	
		Total	689		700		

Tabela 6. Comparação das frequências dos alelos e genótipos do polimorfismo rs 4263329 no gene BCHE estudados em pacientes com dependência de cocaína e controles normais segundo três modelos de dominância (*valores de p significativos adotando-se intervalo de confiança de 95%)

		Casos		Controles		<i>p</i>	
		FA	FR	FA	FR		
Alelos	G	1172	0,86	1236	0,86	0,83	
	A	196	0,14	202	0,14		
	Total	1368		1438			
Modelo aditivo	Genótipos	G/G	497	0,73	538	0,74	0,85
		A/G	180	0,26	165	0,23	
		A/A	8	0,01	19	0,03	
		Total	685		722		
Modelo recessivo	Genótipos	G/G+A/G	677	0,99	703	0,97	0,05*
		A/A	8	0,01	19	0,03	
		Total	685		722		
Modelo dominante	Genótipos	G/G	497	0,73	538	0,75	0,40
		A/G+A/A	188	0,27	184	0,25	
		Total	685		722		

Tabela 7. Frequência dos genótipos para os três marcadores polimórficos do gene BCHE nos pacientes dependentes de cocaína separados de acordo com a via preferencial de administração (*valores de p significativos de acordo com teste geral de associação e os valores em parêntesis representam porcentagens)

	Genótipos			n	χ^2	p
	AA	AG	GG			
rs 1803274						
Usuários de cocaína inalada	4 (2,6)	45 (29,0)	106 (68,4)	155		
Usuários de crack	6 (10,6)	14 (24,1)	38 (65,5)	58		
Usuários duplos	8 (1,7)	142 (30,7)	313 (67,6)	463		
TOTAL	(2,7)	(29,7)	(67,6)	676	15,20	0,004*
rs 4680662						
Usuários de cocaína inalada	16 (10,1)	77 (48,7)	65 (41,1)	158		
Usuários de crack	4 (6,6)	29 (47,5)	28 (45,9)	61		
Usuários duplos	55 (11,7)	211 (44,9)	204 (43,4)	470		
TOTAL	(10,9)	(46,0)	(43,1)	689	2,10	0,718
rs 4263329						
Usuários de cocaína inalada	107 (68,2)	46 (29,3)	4 (2,5)	157		
Usuários de crack	46 (76,7)	13 (21,7)	1 (1,7)	60		
Usuários duplos	344 (73,5)	121 (25,9)	3 (0,6)	468		
TOTAL	(72,6)	(26,3)	(1,2)	685	5,48	0,241

5.2. Objetivo específico 2

5.2.1. Frequência dos genótipos e modelos de herança

Os resultados do teste geral de associação bem como a frequência dos genótipos em casos e controles encontram-se na Tabela 8. Os resultados não foram significativos para o marcador Val158Met da COMT nem para o marcador do tipo VNTR 3' UTR do gene DAT1. Há uma diferença significativa para a frequência dos genótipos do marcador do tipo VNTR Intron8 do gene DAT1 ($\chi^2=18,26$, $gl=2$, $p<0,001$) sendo que há uma maior frequência do genótipo 6R/6R nos casos (52%) quando comparados aos controles (43%). O passo seguinte na análise foi verificar qual dos modelos de herança genética apresentavam o menor valor de p para cada um dos marcadores sendo que os resultados podem ser vistos na Tabela 9. O modelo dominante foi aquele com melhor a predição para os marcadores Val158Met e VNTR 3' UTR e o modelo recessivo ajustou-se melhor para o marcador VNTR Intron8. Estas informações foram importantes porque elas determinaram o desenho do modelo genético de interação entre dois loci testado a seguir. Quanto ao marcador VNTR Intron8 observa-se que a diferença mais importante das frequências genóticas entre casos e controles é devido, de fato, a maior frequência do genótipo 6R/6R ($p<0,0001$; $OR=1,46$; $IC95\%=1,18 - 1,79$) evidenciado pelo modelo recessivo de herança.

Tabela 8. Frequência dos genótipos para os marcadores rs4680 do gene COMT e os VNTRs para 3'UTR e Intron8 do gene DAT1 (*valores de p significativos de acordo com teste geral de associação e os valores em parêntesis representam porcentagens)

	Genótipos			n	χ^2	p
rs4680	G/G	G/A	A/A			
Casos	257 (36,7)	331 (47,2)	113 (16,1)	701		
Controles	285 (34,8)	409 (49,9)	125 (15,3)	819		
TOTAL	(35,7)	(48,7)	(15,7)		1,07	0,59
3'UTR VNTR	10R/10R	10R/9R	9R/9R			
Casos	348 (52,8)	252 (38,2)	59 (9,0)	659		
Controles	443 (55,9)	271 (34,2)	78 (9,8)	792		
TOTAL	(54,5)	(36,0)	(9,4)		2,57	0,28
Intron 8 VNTR	5R/5R	5R/6R	6R/6R			
Casos	73 (10,6)	258 (37,5)	357 (51,9)	688		
Controles	74 (9,0)	400 (48,4)	352 (42,6)	826		
TOTAL	(9,7)	(43,5)	(46,8)		18,26	0,0001*

Tabela 9. Resultados dos testes de modelos de dominância para os marcadores rs4680 do gene COMT e dos VNTRs 3'UTR e Intron8 para o gene DAT1

Marcador	Modelo	OR (IC 95%)	p
rs4680	Aditivo	0,98 (0,85-1,34)	0,77
	Dominante	0,92 (0,74-1,14)	0,45
	Recessivo	1,06 (0,80-1,40)	0,64
3'UTR	Aditivo	1,05 (0,90-1,22)	0,52
	Dominante	1,13 (0,92-1,39)	0,23
	Recessivo	1,11 (0,78-1,59)	0,56
Intron8	Aditivo	1,97 (1,02-1,39)	0,024*
	Dominante	0,83 (0,59-1,15)	0,28
	Recessivo	1,46 (1,18-1,79)	0,0001*

* Modelos de dominância genética de acordo com o teste de regressão logística

5.2.2. Teste dos modelos genéticos de interação gênica

Na Tabela 10 estão os resultados para a análise de interação adotando-se um modelo dominante para o polimorfismo Val158Met e um modelo dominante para o polimorfismo 3'UTR VNTR sendo que as categorias de referência são o genótipo G/G para Val158Met e o genótipo 10R/10R para 3'UTR VNTR. Observa-se que para a interação não há um achado significativo bem como não foi visto um resultado marginal para os marcadores tomados isoladamente.

Tabela 10. Valores das razões de chance (OR) e os respectivos valores de *p* para os testes de interação entre o marcador Val158Met e o marcador 3'UTR VNTR na amostra de casos e controles do objetivo específico 2

Modelo genético	<i>P</i>	OR (IC 95%)
rs4680 A/_	0,302	0,85 (0,63 - 1,14)
3'UTR VNTR 9R/_	0,747	1,05 (0,74 - 1,50)
rs4680 A/_ * 3'UTR VNTR 9R/_	0,635	1,11 (0,71 - 1,72)

Na Tabela 11 estão os resultados para a análise de interação adotando-se um modelo dominante para o polimorfismo Val158Met e um modelo recessivo para o polimorfismo Intron8 VNTR sendo que as categorias de referência são o genótipo G/G para Val158Met e o genótipo 5R/_ para o Intron8 VNTR. Observa-se que não há interação entre os dois genótipos ditos como de risco e há um achado significativo e, como já fora visto anteriormente na análise do marcador isolado, há um efeito marginal para o genótipo 6R/6R.

Tabela 11. Valores das razões de chance (OR) e os respectivos valores de p para os testes de interação entre o marcador Val158Met e o marcador Intron8 VNTR na amostra de casos e controles do objetivo específico 2

Modelo genético	p	OR (IC 95%)
rs4680 A/_	0,58	0,92 (0,68 - 1,23)
Intron8 VNTR 6R/6R	0,02	1,48(1,05 -2,09)
rs4680 A/_ * Intron8 VNTR 6R/6R	0,91	0,97 (0,63 - 1,50)

5.3. Objetivo específico 3

5.3.1. Análise univariada

As frequências alélicas e genótípicas para controles e casos, bem como, as razões de chance associadas com os modelos de herança (aditivo, dominante e recessivo) para cada um dos marcadores estão no Anexo C. Todas as frequências genótípicas estão dentro do esperado de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg (dados não exibidos).

As comparações feitas para todos os genótipos e alelos geraram resultados positivos para cinco marcadores previamente relatados para esta amostra. Feita a correção para múltiplas testagens (p corrigido = $0,05/78$ testes) pela adoção do método de Bonferroni, nenhum marcador atingiu o valor corrigido de significância de $p = 0,0006$.

5.3.2. Análise Multivariada

O programa MDR foi ajustado na sua capacidade de gerar modelos que contivessem até 5 ordens de interação, ou seja, foram feitas todas as combinações possíveis entre os polimorfismos para cada ordem de interação até 5. O melhor modelo para cada uma destas ordens, bem como os valores para o teste de acurácia balanceada e para o de validação cruzada, podem ser vistos na Tabela 12. O melhor modelo de interação, levando-se em conta uma combinação dos valores do teste de acurácia balanceada e da validação cruzada é o modelo de ordem 3, contendo os marcadores COMT rs737865, PER1 rs2253820 e DAT1 rs2963238 (teste de acurácia balanceada: 0,53; validação cruzada: 6/10). Ou seja, o modelo contendo estes marcadores é capaz de prever corretamente o estado de ser dependente de cocaína em 52% dos casos. O segundo melhor modelo é o de ordem de 2 fatores, compreendendo os marcadores DAT1 rs1564752 e PER1 rs2253820 (teste de acurácia balanceada: 0,52; validação cruzada: 5/10). Os testes de permutação para avaliar a significância dos modelos não foram realizados porque a melhor predição, levando-se em conta os valores do teste de acurácia balanceada (54%) e validação cruzada (10/10), foi com a presença isolada do marcador PER1 rs2253820. Mesmo assim, o marcador PER1 rs2253820 tem um valor preditivo muito próximo a 50%.

Tabela 12. Modelos gerados pelo MDR para os 12 genes e 40 marcadores.

	N.o de variáveis no modelo	Variantes incluídas na melhor combinação para cada um dos modelos	Teste da acurácia	Validação cruzada
Modelos Genéticos	1	PER 1 rs2253820	0,54	10/10
	2	DAT1rs1564752 + PER1 rs2253820	0,52	5/10
	3	COMT rs737865 +PER1 rs2253820 +DAT1 rs2963238	0,53	6/10
	4	PER 1 rs2253820 + GABRA2 rs 189957 + DAT1 rs2963238 + DAT1 rs6347	0,51	5/10
	5	CAMK4 rs1457115 + DAT1 rs2963238 + DBH rs779 + GABRA2 rs218957 + GSTP1 rs947894	0,48	3/10

A título de ilustração, na figura 6 estão representados, através de cores e distância contada a partir da margem direita, uma análise de interação de todos os marcadores elencados nos 5 modelos gerado pelo MDR. Por exemplo, na borda inferior do diagrama, vê-se que o marcador DAT1 rs 1564752 esta conectado ao marcador PER1 rs2253820. A cor da linha, neste caso, vermelha, indica um efeito sinérgico forte. A linha laranja, que conecta os marcadores COMT rs 737865 e o marcador GSTP1 947894, indica um efeito sinérgico moderado. Os marcadores, isolados ou agrupados, conectados com uma linha amarela sugerem um efeito independente. Quanto mais próximos da margem direita, há um sinal mais forte de interação. Por exemplo, os marcadores DAT1 rs156472 e PER1 rs2253820 parecem ter uma ação sinérgica forte, porém quando computados no modelo 3, seu poder de predição, junto ao terceiro marcador, é pouco melhor que o acaso, assim sendo, encontram-se mais próximos da borda esquerda.

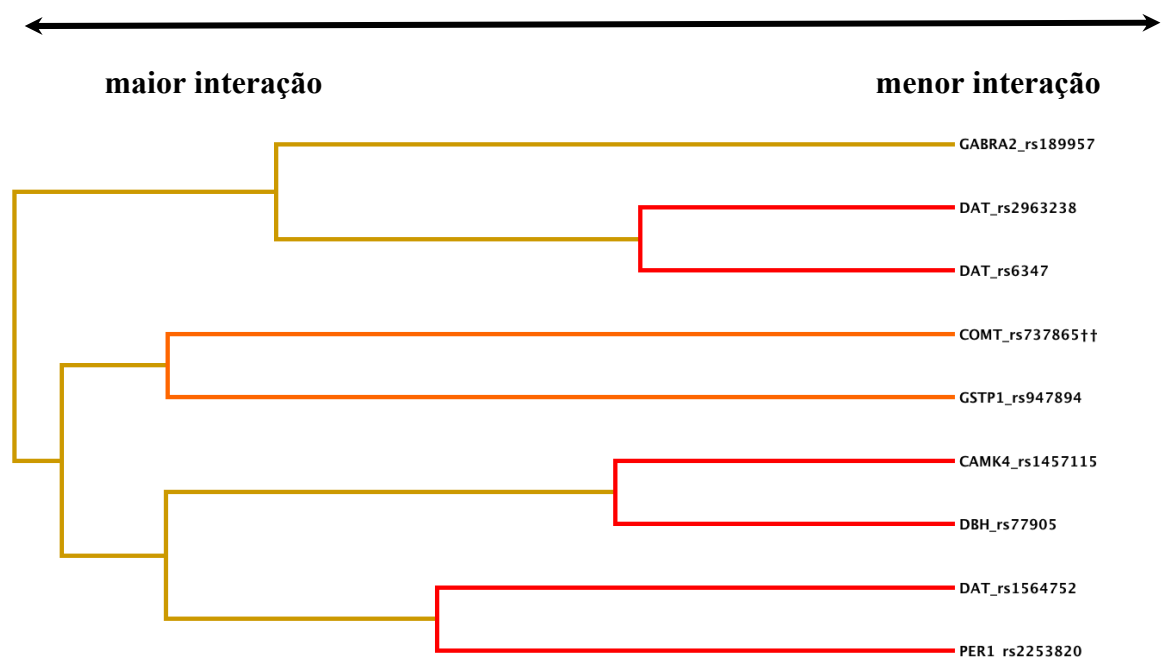


Figura 6. Diagrama de entropia gerado pelo programa MDR para todos os marcadores que foram usados na geração dos modelos de ordem 1 até 5 entre pacientes com dependência de cocaína e controles.

6. Discussão

6.1. Objetivo específico 1

A partir de uma amostra de 698 pacientes com dependência de cocaína foram avaliados três marcadores genéticos do tipo SNP para o gene BCHE. Um destes marcadores, o SNP rs 4263329 mostrou evidencia de estar nominalmente associado a um efeito protetivo, uma vez que foi encontrado em maior frequência no grupo de controles do que em pacientes. O achado mais consistente deste estudo foi a associação significativa entre o genótipo A/A do SNP rs 1803274 e o uso de cocaína na sua forma inalada, o crack quando foi avaliado o grupo de pacientes isoladamente.

A seguir, serão feitas considerações a respeito do cuidado metodológico deste estudo. São comuns em estudos de associação, particularmente nos estudo do tipo caso-controle para genes candidatos, o encontro de achados falso-positivo. Um cuidado metodológico é avaliar o efeito de fatores confundidos sobre os resultados. Isto ficou evidente no que diz respeito ao encontro da associação para o marcador rs 4263329 porque, uma vez feita o ajuste para dois confundidores, o gênero e a idade, não foi mais verificada a associação nominal. O mesmo foi feito para o encontro do achado positivo da associação do SNP rs 1803274 sendo que desta feita, a OR manteve-se estatisticamente significativa demonstrando que o resultado não se devia a um viés de seleção. Diferentemente de estudos anteriores, em que a pesquisa sobre a associação de marcadores genéticos e a dependência de cocaína foi poucas vezes feita em subgrupos de pacientes, os sujeitos neste estudo foram divididos de acordo com a via preferencial de administração de cocaína (Farrer et al. 2009). Esta medida diminui a heterogeneidade fenotípica que frequentemente prejudica a detecção de efeitos em estudo de associação genética. Um outro confundidor, presente em estudos nesta área, é a comorbidade da dependência de cocaína com outras dependências químicas, marcadamente a heroína e o álcool (Merikangas & Kalaydjian 2007). A dependência de álcool foi excluída e a dependência de heroína é rara no Brasil sendo que menos do que 1% da amostra estudada aqui fez uso de heroína ao longo da vida. O fato que a amostra pesquisada é homogênea no que diz respeito ao uso de cocaína reforça a especificidade de qualquer achado de associação encontrado como sendo associado ao uso de cocaína.

Um dos marcadores investigados, o rs1803274 não foi associado com a dependência de cocaína mas foi associado como o subgrupo que fazia uso da cocaína na sua forma inalada. Já foi demonstrado que o rs1803274 está associado a condições médicas e comportamentais mas não encontramos na literatura, até o presente momento, nenhum relato em que ele tenha sido pesquisado em amostras de dependentes químicos ou comorbidades psiquiátricas associadas com problemas relacionados ao uso de drogas (Howard et al. 2010). O fato de que tenha se achado uma associação somente quando a amostra completa foi dividida em subgrupos não é única. Farrer et al., 2009, encontraram uma associação entre a dependência de cocaína e um marcador genético quando eles segmentaram sua amostra em indivíduos que apresentaram sintomas psicóticos durante episódios de intoxicação aguda de cocaína e aqueles que não apresentaram tais sintomas (Farrer et al. 2009). Os indivíduos dependentes de cocaína representam um grupo heterogêneo não só do ponto de vista do acervo genético, mas também sobre uma perspectiva clínica assim, faz sentido agrupá-los em fenótipos que tenham um valor intrínseco para hipóteses sobre fatores de risco. Guindalini et al., 2006b, demonstraram que usuários duplos, de cocaína inalada e crack, tinham características clínicas distintas quando comparados com usuários estritos de crack ou de cocaína inalada (Guindalini et al. 2006b). Do ponto de vista populacional, as frequências alélicas do rs 1803274 neste estudo são muito semelhantes aos valores encontrados para a população caucasiana presente no Hapmap porém, as frequências do genótipo A/A quando casos e controles são tomados em conjunto são maiores, 3,3% neste estudo do que o valor no Hapmap, de 1.7% na população de caucasianos (CEU). No que diz respeito aos outros dois marcadores usados, há poucos relatos do seu uso em estudos de associação. Howard et al., 2010, testaram 12 SNPs no gene BCHE e observaram uma associação do marcador rs4680663 com a atividade das colinesterases em trabalhadores rurais expostos a organofosforados (Howard et al. 2010). Até o momento, não foi encontrado um estudo que fizesse uso do SNP rs4263329 como marcador em estudos de associação.

Semelhante a qualquer estudo de associação, as limitações metodológicas são várias. Primeiro, o tamanho da amostra usada aqui embora seja considerada grande porque se trata de uma população que faz uso de uma substância ilícita, ela é

pequena para estudos de associação genética. Segundo, o marcador visto como estando associado com os usuários exclusivos de crack foi correlacionado com alterações funcionais enzimáticas, por exemplo, atividade de colinesterases em outros estudos (Howard et al. 2010). Porém, não foi feita nenhuma medida enzimática nos sujeitos deste estudo de modo que qualquer correlação funcional entre o marcador e o fenótipo clínico deve ser feita com cautela. Ainda, na mesma linha de raciocínio, não foi feita nenhuma medida toxicológica a cerca do uso de substâncias lícitas ou ilícitas nos sujeitos deste estudo. Os relatos subjetivos de uso de substâncias por pacientes dependentes de cocaína sabidamente são pouco confiáveis das verdadeiras quantidades de drogas usadas e o mesmo pode ser dito a respeito dos controles (Magura & Kang 1996). Finalmente, é possível que o SNP rs1803274 não seja o marcador funcionalmente implicado com a vulnerabilidade para o uso de cocaína na forma de crack mas ele esteja em desequilíbrio de ligação com marcadores próximos ao seu loco. Estudos semelhantes em outras populações de usuários ou o sequenciamento desta região nesta mesma amostra serão necessários para que se determine a verdadeira contribuição genética deste marcador para a associação vista aqui.

Um dos aforismas dentro da epidemiologia genética é que as doenças complexas são o produto de polimorfismos comuns do ponto de vista populacional, mas com pouco tamanho de efeito sobre o fenótipo estudado. Alternativamente, as doenças mendelianas seriam o produto de poucas variantes com efeito grande sobre o fenótipo. No que diz respeito ao marcador rs1803274, ele é um polimorfismo comum e que tem sido associado com alterações da atividade da colinesterase em amostra oriundas da comunidade (Howard et al. 2010). Bartels et al., 1993, demonstraram que o genótipo A/A para este marcador leva a uma mutação pontual no nucleotídeo 1615, levando a mudança do codon 539 de GCA (ala) para ACA (thr) (Bartels et al. 1992) (Figura 2). Ser portador do alelo A leva a uma redução de 30% na atividade da butirilcolinesterase sérica. Uma atividade reduzida da butirilcolinesterase pode levar a uma aumento dos níveis de cocaína alcançando as áreas cerebrais relacionados ao reforço de comportamentos adictivos e, desta maneira, tal sequência de fatos aumentaria a propensão ao desenvolvimento e manutenção da dependência, particularmente nos usuários de crack portadores do da variante de risco.

Assumindo-se que os usuários de cocaína na população brasileira tem igual acesso à cocaína na forma inalada como na forma de crack a partir do traficante, a presença do genótipo de risco para o SNP rs1803274 pode, em parte, explicar o uso preferencial de crack por alguns destes usuários. As mudanças enzimáticas muito provavelmente interagem com outros fatores predisponentes, por exemplo, traços de personalidade como a busca de sensações, e explicariam parte da vulnerabilidade genética para esta via de administração.

6.2. Objetivo específico 2

Nesta seção da tese foi testado o quanto um modelo de interação genética da atividade dopaminérgica, , por via do polimorfismo funcional (Val158Met) do gene COMT e, por via dos polimorfismos do tipo VNTR (3'UTR e Intron8) do gene DAT1, seria capaz de diferir pacientes dependentes de cocaína de controles. A interação entre um modelo dominante de herança para o polimorfismo Val158Met da COMT e um modelo dominante para o polimorfismo do tipo VNTR 3'UTR da DAT1 não foi estatisticamente significativo. A interação do mesmo modelo dominante para o polimorfismo da COMT e um modelo recessivo para o polimorfismo do tipo VNTR Intron8 também não foi estatisticamente significativo.

Variantes para os genes da COMT e da DAT1 foram objeto de estudo em amostras independentes de usuários de cocaína. Lohoff et al., 2010, pesquisaram os mesmos marcadores do tipo SNP utilizados nesta tese para o gene COMT (rs737865, rs4680 (Val158Met), rs165599) numa amostra de 330 pacientes dependentes de cocaína de origem afro-americana (Lohoff et al. 2010). As frequências alélicas e genótípicas para o polimorfismo Val158Met diferiram significativamente sendo que entre pacientes com dependência de cocaína a frequência do alelo Met foi de 35% e dos controles normais foi de 27%, com uma razão de chances de 1,44 (IC: 1,12 - 1,86; p=0,004). Isto difere da amostra desta tese em que as porcentagens do alelo Met, tanto para casos como para controles, são próximas a 40%. Uma razão possível para explicar o contraste nos resultados entre os dois estudos e o achado positivo em questão viria do fato de que os descendentes

afro-americanos poderiam conter uma diversidade em termos de genética populacional muito mais complexa podendo gerar falso-positivos por conta da estratificação populacional.

Mais recentemente, Ittuit et al., 2011, fazendo uso de um fenótipo relacionado a dependência de cocaína, qual seja, a presença de sintomas psicóticos, encontrou uma associação de haplótipos para o gene da COMT, um deles incluindo o polimorfismo Val158Met em amostras de usuários de cocaína de descendência branca e negra para este subfenótipo (Ittuit et al. 2011). Neste segundo estudo, as frequências alélicas para o marcador Val158Met na população branca aproximam-se aos valores encontrados na amostra desta tese. Porém, é difícil fazer mais comparações por se tratar de um subfenótipo dentro da amostra clínica de usuários de cocaína que não foi caracterizada na amostra desta tese. Há apenas um estudo independente para o marcador VNTR Intron8 do gene DAT1, numa amostra de 169 usuários de cocaína, em que foi vista uma associação para este polimorfismo, porém foi o genótipo 5R/5R que foi encontrado com maior frequência no grupo dos pacientes diferentemente do achado mais frequente do genótipo 6R/6R na amostra da tese (Fernandez-Castillo et al. 2010). O marcador do tipo 3'UTR VNTR para o DAT1 não foi associado ao fenótipo da dependência de cocaína em estudos independentes e o resultado nesta tese, usando uma amostra menor, não difere da amostra usada no estudo de Guindalini et al. 2006 (Fernandez-Castillo et al. 2010; Guindalini et al. 2006a; Lohoff et al. 2010). Até o presente momento, não há estudos em que se tenha investigado a associação dos genes COMT e DAT1 e a dependência de cocaína sendo assim impossível uma comparação dos resultados aqui obtidos com dados da literatura.

O estudo atual tem limitações metodológicas importantes. Há uma disparidade entre gêneros tanto na amostra de casos (4% de mulheres) como da proporção de homens para mulheres entre casos (1:0,04) e controles (1:0,5). Na maioria das análises feitas, o sexo foi ajustado no modelo de regressão, porém o fato das amostras de casos e controles serem muito díspares acrescentou um viés de seleção que pode ter contribuído para a dificuldade do encontro de achados positivos. Há um corpo crescente de dados na literatura demonstrando disparidades entre gêneros no que diz respeito ao curso e vulnerabilidade das dependências químicas

entre homens e mulheres, fator que pode ter contribuído para aumentar a heterogeneidade da amostra utilizada aqui (Greenfield et al. 2010; Guindalini et al. 2005b). No que diz respeito ao poder estatístico para detectar uma interação de tamanho de efeito de 1,8 entre dois genes, usando diferentes modelos genéticos de interação, ele foi de 67%, ou seja, baixo. A hipótese nesta seção da tese era de que a interação entre dois marcadores funcionais de um substrato neurobiológico implicado na adicção teria um tamanho de efeito superior ao que é normalmente visto para marcadores tomados isoladamente e que isto reduziria o efeito do tamanho limitado da amostra sobre o poder estatístico. Isto foi a justificativa para que se fosse adiante no teste de hipótese, a despeito do baixo poder estatístico 'a priori', assumindo que seria encontrado um tamanho de efeito acima do valor estipulado, de 1.8 para a interação genética, como parâmetro de cálculo do poder da amostra. A estratificação populacional poderia interferir nos achados de estudos de associação genética populacional mas, ela não foi feita nesta seção. A estratificação desta amostra foi extensamente avaliada na tese de doutorado de Guindalini, 2005, onde a autora demonstrou que há sim uma estratificação populacional detectada por algoritmos distintos (Guindalini 2005). O melhor modelo classificou a amostra como um todo, casos e controles, como sendo constituída de três subpopulações: 1) constituída em sua maioria de indivíduos de origem africana (61,4%), 2) constituída na sua maioria de indivíduos de origem européia (81%) e, 3) constituída por valores intermediários das contribuições de ambas as origens (53,6% e 27,3% de contribuições européia e africana, respectivamente). Porém, verificou-se que para os 24 marcadores de ancestralidade utilizados nesta classificação, os pacientes e os casos da amostra presente tinham as mesmas proporções étnicas. Na prática, os resultados dos estudos de associação feitos com polimorfismos nas publicações subsequentes, incluindo os polimorfismos para DAT1, não evidenciaram um efeito da estratificação populacional dos resultados.

Nos estudos de associação, procura-se fazer inferências do que ocorre no universo fisiológico para sustentar a testagem de hipóteses. Nesta seção da tese, a parametrização do efeito hipotético dos genótipos, através dos modelos de herança genética são inferências do papel exercido pelas variantes genéticas na atividade enzimática da COMT bem como da atividade da DAT1. A premissa aqui é que há

uma linearidade dos efeitos dos alelos para o modelo aditivo e efeitos dicotômicos para os modelos dominante e recessivo dos genótipos. A outra premissa é que no modelo de interação o efeito dos dois marcadores se daria de modo linear. A adoção de outros modelos de interação talvez pudesse ter acrescentando a possibilidade de efeitos da interação genética que a adoção de um modelo linear não permitiu. De fato, no estudo de Yacubian et al., 2007, a interação entre os polimorfismos para os genes COMT e DAT1 foi do tipo multiplicativa não-linear, onde os genótipos do tipo met/val tanto 10R como 9R demonstraram as maiores ativações nas regiões dopaminérgicas subcorticais e os genótipos met/met 10R e val/val 9R as menores ativações (Yacubian et al. 2007).

Uma limitação do ponto de vista da abordagem do modelo genético para o estudo do risco da dependência química é que os marcadores escolhidos talvez não sejam aqueles que de fato encontram-se associados com a doença. Partindo-se da premissa que alterações na atividade da COMT e da DAT1 de fato contribuem para a vulnerabilidade da dependência de cocaína, os marcadores Val158Met para o gene COMT e os dois VNTRs estudados para o gene DAT1 podem não ser os polimorfismos causais de tais alterações sendo que os resultados positivos sejam decorrência de um desequilíbrio de ligação entre os verdadeiros marcadores causais e os marcadores Val158Met para COMT e os dois VNTRs estudados para DAT1.

A incorporação da avaliação de medidas de atividade dopaminérgica em regiões distintas do cérebro e sua possível correlação com variantes genéticas é um assunto instigante e novo. Infelizmente, não há estudos dentro das dependências químicas com o desenho adotado nesta tese para o presente objetivo específico. Porém, um estudo avaliou, na mesma amostra de pacientes com transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (TDAH), os papéis dos polimorfismos estudados nesta seção num fenótipo intermediário, o "delay discounting" (Paloyelis et al. 2010). Esta é uma medida que tem sido usada com frequência para medir a impulsividade em transtornos de conduta, dependências químicas e TDAH (Reynolds 2006). O "delay discounting" representa o quanto as consequências de um ato passam a ter uma eficiência reduzida no controle de comportamentos na medida em que há uma latência da sua ocorrência. Na prática, considera-se que valores altos de "delay discounting" são indicativos de alta impulsividade. Os autores demonstraram que o

"delay discounting" estava associado com os dois VNTRs de interesse para o DAT1 e também estava associado com o alelo Val158Met da COMT (Paloyelis 2010). Apesar dos autores discutirem sobre o papel diferencial das variantes dos genes, a COMT tendo um predomínio sobre a atividade de dopamina cortical e o gene DAT1 tendo mais evidência em regiões subcorticais, eles não fazem a interação dos genes para o desfecho do estudo, o "delay discounting". Provavelmente, isto não foi feito pela falta de poder da amostra neste estudo, constituída de 36 pacientes. Este talvez seja um dos fatores, qual seja, amostras pequenas para testes de interação, utilizando-se modelos lineares, que explique a ausência destes testes em estudos sobre a atividade dopaminérgica e transtornos associados a problemas de impulsividade. Um aspecto controvertido é dos achados díspares de associação para os marcadores do gene DAT1 em transtornos psiquiátricos e ou provas de função com auxílio de imagem cerebral em voluntários normais. Shunay et al, 2010, sugerem que os resultados díspares para os estudos do papel das variantes do gene DAT1 se devem a particularidades genéticas deste gene. Os autores postulam que o DAT1 tem inúmeros sítios de regulação que lhe conferem uma maleabilidade de expressão e regulação gênica maior que outras monoaminas transportadores, o que explicaria os resultados controversos (Shumay et al. 2010). Mais do que isto, o mesmo grupo demonstrou, em provas de função, com cocaína radioativamente marcada, para testar a taxa de ocupação do DAT em regiões cerebrais de voluntários normais, que há interações importantes entre os dois VNTRs da DAT1 estudados aqui (Shumay et al. 2010). O conjunto dos estudos em que há achados de respostas de atividade cerebral diferenciada de acordo com variantes polimórficas do gene COMT e estudos semelhantes com os VNTRs da DAT1 oferecem subsídios para modelos explicativos mais sofisticados da regulação de mecanismos de recompensa, tal como a hipótese da atividade fásica e tônica de neurônios dopaminérgicos no núcleo estriado (Sesack & Grace 2010). Em suma, há evidências recentes que revigoram o ensejo de que se aprofundem as pesquisas do papel destas variantes em patologias psiquiátricas onde há fortes indícios de comprometimento dos sistemas dopaminérgicos cerebrais.

6.3. Objetivo específico 3

Nesta seção da tese, foi investigado o quanto polimorfismos em genes candidatos podem contribuir, através de interações complexas, com o risco para a dependência de cocaína. Feitas as análises estatísticas convencionais para cada marcador estudado isoladamente, procedeu-se com a análise com variantes gênicas múltiplas por meio de um método, o MDR. As análises univariadas indicaram que alguns marcadores estavam associados ao fenótipo da dependência de cocaína, porém, feita a correção para as testagens múltiplas, nenhum marcador manteve a significância estatística. Quanto à análise multivariada, o programa MDR não foi capaz de detectar um modelo de interação que fosse melhor que a predição oferecida por um único marcador e, mesmo assim, a predição não se mostrou melhor que o acaso.

Os resultados das análises univariadas reproduzem os achados já publicados anteriormente com esta mesma amostra, porém num tamanho amostral menor. É de se ressaltar que, como foi feito aqui, se o objetivo desta seção fosse o de encontrar uma associação do tipo gene candidato para algum dos 12 genes testados individualmente como parte de um mesmo estudo, isto não teria significância estatística depois da correção para múltiplas testagens. Pode ser um rigor metodológico excessivo, porém, em estudos de associação genética, marcadores que são reproduzidos em amostras independentes, tem valores de significância da ordem de 10^{-14} , como é o caso dos polimorfismos para gene do receptor nicotínico em fumantes (Li & Burmeister 2009). O foco desta seção é discutir o resultado da análise multivariada.

A pesquisa da interação entre genes, ainda mais quando isto vai além da interação entre dois loci, é assunto recente e pouco investigado dentro das dependências químicas (Bierut 2011). Dentro da área da dependência de cocaína há apenas os estudos já citados na seção 2 e que tratam da interação de loci no mesmo gene (CNR1)(Benyamina et al. 2011b).

As limitações deste estudo, não se restringem a, mas são da ordem dos seguintes temas: método de análise e fenótipo. O programa MDR faz parte do acervo

de modelos de análise chamados de “data mining”. Um dos riscos do uso do MDR é, justamente, uma das suas essências, a redução da dimensão das variáveis investigadas, ou seja, a variabilidade biológica contida na informação genética é reduzida para duas categorias, alto e baixo risco. A vantagem, em que questão, é poder lidar com uma dimensão, do ponto de vista computacional e de entendimento racional, muito grande de uma forma simplificada. O custo, como já dito, é a perda da variabilidade contida na informação genotípica individual. Outra desvantagem decorrente do método do MDR é que cada sujeito precisa apresentar genótipos para todos os marcadores sendo analisados no modelo. Isto reduz muitas vezes o número de sujeitos disponíveis para a elaboração dos modelos de interação. Um dos recursos usado pelo próprio programa é inferir, ou melhor, atribuir (*input*) valores, por ele mesmo estipulados, para as células vazias. Como os testes de genotipagem tem erros próximos a 5% para cada marcador e, este erro é randômico, ao se analisar um número grande de marcadores, aumenta-se, no total, o número de células vazias. O recurso do *input* é válido mas, pode acrescentar mais ruído na análise, obscurecendo o valor dos resultados. Não obstante estas limitações, o programa MDR tem sido utilizado e aprimorado em várias áreas da medicina (Botterma et al. 2010; Chung et al. 2007; Grady et al. 2011; Gui et al. 2011b).

7. Considerações Finais

7.1. Objetivo específico 1

A descoberta e replicação dos achados de marcadores genéticos pode vir a ser útil em estudos farmacogenômicos, particularmente em ensaios clínicos para a dependência de cocaína. De fato, duas abordagens promissoras no tratamento da dependência de cocaína, estão fundamentadas na redução das concentrações de cocaína circulante. Brimjoin et al., 2008, demonstraram que uma Bche humana modificada com uma atividade catalítica aumentada foi capaz de reduzir tanto a toxicidade da cocaína como os seus efeitos reforçadores num paradigma experimental de auto-administração da droga (Brimijoin et al. 2008). Além do mais, dois ensaios clínicos demonstraram que a detecção de anti-corpo contra a cocaína em indivíduos previamente vacinados com uma vacina para este fim tiveram taxas reduzidas de amostras de urinas positivas para cocaína em usuários crônicos (Gao et al. 2008; Zheng et al. 2008). Um dos objetivos na área do tratamento das dependências de substâncias é aprimorar o ajuste entre os recursos terapêuticos eficazes, e já existentes, e as características individuais de modo a otimizar as taxas de resposta. Se existir no futuro um tratamento amplamente disponível e dirigido às características farmacocinéticas da cocaína é razoável propor que existirão taxas de respostas diferenciadas nos usuários portadores de polimorfismos para a Bche ou mesmo outras colinesterases.

Num sentido mais amplo, o organismo biológico está preparado para lidar com toxinas que entram em contato com o indivíduo e a Bche é mais um exemplo de enzimas numerosas que participam deste complexo (Geyer et al. 2010; Raveh et al. 1993). A cocaína é um ester etílico que esta presente na sua forma natural em folhas mascadas por populações residentes nos Andes. Estas folhas são mascadas com um composto alcalino e, inicialmente, seu uso era feito de modo ritualístico e mais modernamente seu uso justifica-se por ser um energético útil para driblar o esforço respiratório nas altitudes altas dos Andes (Feiling 2009). Uma possibilidade é que homens e animais não desenvolviam reações tóxicas quando do contato com a cocaína porque eles foram naturalmente selecionados pela presença de polimorfismos no seu repertório xenobionte que os tornava menos susceptíveis aos efeitos tóxicos da cocaína. Uma vez que a cocaína foi purificada e seu acesso foi

facilitado por rotas de comercialização a populações com perfis xenobiontes distintos, alguns sujeitos que não tinham os mecanismos protetivos naturais de depuração passaram desta maneira a sofrer os efeitos tóxicos e também os efeitos reforçadores da cocaína como substância adictiva.

Há um número crescente de contribuições na literatura a cerca da susceptibilidade genética para a dependência da cocaína. Porém, somente uma parcela pequena da herdabilidade é explicada por estes achados (Bierut, 2011). No estudo presente, foram investigados três SNPs no gene da BCHE. Embora não se tenha encontrado uma associação entre estes marcadores a dependência de cocaína por si só, foi encontrada uma associação expressiva entre um genótipo funcional conhecido, a variante K para o gene BCHE e um grupo de usuários que faz uso preferencial da cocaína na forma fumada. Mais estudos com uma cobertura mais abrangente do gene para a BCHE e, eventualmente para outros genes associados com a metabolização da cocaína, serão necessários para corroborar, estender ou invalidar os achados do presente estudo.

7.2. Objetivo específico 2

Os estudos recentes que demonstraram que a regulação do gene DAT1 é mais complexa do que se achava até agora e mais, das interações entre variantes do próprio gene, lançarão novo impulso para a exploração do papel destas variantes no estudo na dependência de cocaína (Shumay et al. 2010; Shumay et al. 2011). Diante dos achados desta tese, particularmente da ausência de interação entre os genes COMT e DAT1, estudos futuros devem se armar de amostras que tenham poder estatístico adequado. Parece clara também a utilidade da estratificação clínica da amostra como feito nos estudos sobre variantes genéticas e dependência de cocaína do grupo do Departamento de Psiquiatria da Yale, liderada pelo Dr. Gelernter, em que são vários os achados positivos num subgrupo que manifesta sintomas psicóticos (Farrer et al. 2009; Gelernter et al. 2005). A melhor caracterização fenotípica dos usuários de cocaína em estudos futuros será um item central na elaboração de novos projetos ainda mais que há escalas variadas e já traduzidas com esta finalidade.

7.3. Objetivo específico 3

Nesta seção da tese, avaliou-se o quanto um programa computacional de interação do efeito de vários genes poderia gerar modelos com poder preditivo mais elevado do que o efeito de marcadores em genes vistos isoladamente. Mais do que isto, procurou-se, com o uso de marcadores que já tinham se mostrado associados ao fenótipo da dependência de cocaína, um modelo que integrasse as informações de sistemas biológicos distintos.

O MDR é um dos métodos disponíveis para a análise de dados genéticos de alta complexidade e há outros modelos em uso para tal finalidade que podem ser empregados conjuntamente em futuras análises de interação gene-gene (Achkar & Fiocchi 2009; Dervieux et al. 2009; VanderWeele & Laird 2011). Diante do fato de que estudos do tipo GWA serão mais frequentes e, da possibilidade de sequenciamento do genoma completo de cada indivíduo, serão mandatórias as abordagens analíticas como a empregada por meio do método do MDR. É fato que grande parte da herdabilidade das doenças ou fenótipos complexos não pode ser explicada a partir do tamanho do efeito dos loci descobertos até agora. Possivelmente, faz parte da herdabilidade para a dependência de cocaína um número grande de genes de pequeno efeito que não foram detectados até agora. Além do mais, como foi objeto desta tese, procurar além dos efeitos genéticos singulares e da herança do tipo aditiva vai possivelmente desvendar vias biológicas ainda não exploradas na etiologia das doenças.

Finalmente, a busca por epistasia deve ser acrescida da interação gene-ambiente. Esta é uma postura compartilhada por pesquisadores na área das dependências químicas que defendem a incorporação de parâmetros genéticos e/ou ambientais na análise de interação entre loci de modo a aumentar o grau de variância explicado por fatores genéticos bem como constituir mais um método para a descoberta de marcadores de risco (Bierut 2011; Grucza et al. 2010).

A amostra do ProGene, embora única em vários aspectos, padece de uma caracterização fenotípica mais detalhada e isto pode ter comprometido os achados nesta tese. Uma saída possível é fazer uso de conglomerados de sintomas clínicos e

analisar estratificadamente a amostra em busca de associações com marcadores. Yu et al., 2008, usaram da análise de conglomerados dos sintomas dos sujeitos do estudo numa tentativa de homogeneizar a amostra, ou seja, para reduzir o efeito da heterogeneidade do fenótipo, a dependência de cocaína (Yu et al. 2008). De fato, o achado positivo só surgiu num subtipo da amostra, os dependentes de cocaína que apresentavam sintomas psicóticos (presença de paranóia e/ou alucinações). Este é mais um exemplo do que é a estratégia de reduzir a heterogeneidade das amostras com vistas a aumentar a chance de detecção e também do tamanho do efeito de uma possível detecção de associação genética. Ainda nesta linha, os estudos mais promissores com epistasia são encontrados quando os investigadores fizeram uso de endofenótipos (Kendler & Neale 2010). Brevemente, endofenótipos são fenótipos que traduzem algum processo biológico interno ao indivíduo e que possam ser objetivamente medidos. Fazem parte de atributos de um endofenótipo ele ser herdado, co-segregado com uma doença psiquiátrica embora ele possa estar presente quando a doença não se manifesta, ou seja, ser estado independente. Dentro da área das dependências químicas, um endofenótipo usado no estudo do alcoolismo e fatores de risco genético são as alterações oscilatórias eletrofisiológicas medidas no EEG durante provas cognitivas ou de estimulação (Andrew & Fein 2010).

8. Conclusões

Os marcadores (rs1803274, rs4263329, rs4680662) do gene BCHE não estão associados com a dependência de cocaína numa amostra de usuários de crack e cocaína.

O genótipo A/A para o rs1803274 do gene BCHE encontra-se associado com o uso preferencial de cocaína na forma fumada, o crack.

O teste de interação através da regressão logística entre variantes genéticas funcionais do gene DAT1 e do gene COMT não se mostraram estatisticamente significativos.

O método do MDR não encontrou um modelo de interação para 40 polimorfismos em 12 genes candidatos para a dependência de cocaína.

9. Anexos

ANEXO A. Procedência dos pacientes dependentes de cocaína e controles e técnica de extração de DNA

Pacientes. Os casos de abuso/dependência de cocaína analisados neste trabalho provêm do banco de DNA do ProGene do Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Originalmente esses pacientes participaram de um estudo avaliando o perfil de usuários graves de cocaína na cidade de São Paulo (Dunn e Laranjeira, 2000). 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).

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 São Bernardo do Campo, Hospital Geral de Taipas, Sanatório Charcot, Hospital Psiquiátrico da Água Funda, Comunidade Terapêutica Bezerra de Menezes e a Unidade de Pesquisa em Álcool e Drogas (UNIAD), 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 destes 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 identificaram-se todos os serviços com registro de internações com qualquer diagnóstico da Classificação Internacional de Doenças, nona edição (CID 9, então vigente) relacionada a uso de substância química. De um universo de 36 instituições de saúde detectadas, selecionaram-se aquelas que tivessem apresentado 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 e Hospital Psiquiátrico da Água Funda. Do conjunto de serviços não conveniados ao SUS foram escolhidos dois com mais de 50 internações ou atendimentos em 12 meses: a Comunidade Terapêutica Bezerra de Menezes, em São Bernardo do Campo e a UNIAD-EPM-UNIFESP. O projeto foi então submetido e aprovado pelo Comitê de Ética Médica da Escola Paulista de Medicina-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 em suas enfermarias ou ambulatório.

Todos os pacientes submetidos a tratamento nestas instituições, com mais de 17 anos, de ambos os sexos, moradores na região metropolitana da capital e em condições físicas ou mentais de participarem de uma entrevista foram incluídos no estudo. Foram excluídos pacientes com história exclusiva de dependência ao álcool ou drogas de administração por via oral. Cada paciente assinou um termo de consentimento informando após esclarecimentos sobre os objetivos do projeto. Todos os pacientes selecionados satisfizeram os critérios de diagnóstico de dependência de cocaína a partir das diretrizes da CID10, complementados por informações colhidas a partir de um questionário desenvolvido e validado em uma população de dependentes químicos em São Paulo (Dunn e Laranjeira, 2000). Este questionário foi respondido por cada paciente a partir de uma entrevista conduzida individual e reservadamente no local do tratamento psiquiátrico, pela equipe de trabalho do projeto anteriormente treinada e sob supervisão do pesquisador responsável por esta seção do trabalho. De cada participante coletou-se, após a entrevista, 35 ml de sangue, por punção venocubital, com material estéril, descartável (Tubos de Vacutainer). Destes 35 ml de sangue, 27 ml (sem anticoagulante) foram destinados a exames sorológicos pertinentes aos outros estudos associados e 8 ml, contendo EDTA (anti-coagulante) foram preservados para a extração de DNA.

Os pacientes constituintes da amostra em estudo responderam a um questionário clínico desenvolvido e validado em uma população de dependentes químicos em São Paulo (Dunn e Laranjeira, 2000) e as informações sobre dados sociodemográficos, uso de drogas lícitas, uso de drogas ilícitas, iniciação no uso da

cocaína, transições na via de administração e atividades criminais desses indivíduos foram descritas numa das teses de doutoramento já citadas (Guindalini, 2005). Resumidamente, a amostra é constituída na sua maioria por indivíduos do sexo masculino (95%), na sua maioria solteiros (60%), tendo cursado o primeiro grau ou menos (62%) e eram predominantemente caucianos (70%). No que tange à droga de escolha, 70% fazem uso tanto de cocaína inalada como na forma fumada, o crack. Em relação à criminalidade, 53% do total da amostra relata ter sido detida pelo menos uma vez durante a vida.

Controles. Os controles utilizados nesse estudo também fazem parte do banco de DNA do ProGene. 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 da equipe, investigando doenças contagiosas e uso de substâncias químicas (fármacos e outras substâncias). Todos os sujeitos com relato de história pregressa de uso abusivo ou contato recente com qualquer droga de potencial abuso são impedidos de realizar a doação. Durante o ato de coleta de sangue, uma breve entrevista com cada doador foi realizada, conduzida pelo autor ou por uma colaboradora, investigando algum diagnóstico psiquiátrico ao longo da vida. Doadores com sinais de alguma condição psiquiátrica atual ou com história de internação psiquiátrica em algum momento da vida foram excluídos do estudo. Este projeto foi formalmente submetido à direção do Banco de Sangue, que consentiu com sua realização em suas dependências.

Extração do DNA

De cada participante foram coletados aproximadamente 10 ml sangue venoso periférico. O DNA genômico foi extraído a partir do sangue total utilizando-se os métodos Fenol/Clorofórmio ou “salting out”, descrito por Miller et al. 1988. 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).

Anexo B. Ofício de aprovação do estudo pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da FMUSP .



Recebido: A-10/109, às 16h30.
Departamento de Pesquisas HC FMUSP

APROVAÇÃO

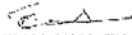
A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 15/04/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0981/08**, intitulado: "**INVESTIGAÇÃO DE GENES CANDIDATOS PARA A DEPENDÊNCIA À COCAÍNA**" apresentado pelo Departamento de **PSIQUIATRIA**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Prof. Dr. Homero Pinto Vallada Filho**

Pesquisador (a) Executante: **Dr. André Brookling Negrão**

CAPPesq, 15 de Abril de 2009


Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

ANEXO C

Tabela 1 – Frequências alélicas e genotípicas, modelos de herança e suas razões de chance nos controles e nos pacientes com dependência de cocaína

Gene	Polimorfismo	Genótipos Alelos	Controles	Pacientes	<i>p</i>	Modelo	OR (95% IC)	<i>p</i>
<i>BCHE</i>	rs1803274	G/G	473	454	0,28	Aditivo	0,89 (0,73-1,08)	0,27
		G/A	214	199		Dominante	0,92 (0,74-1,15)	0,50
		A/A	29	17		Recessivo	1,62 (0,88-2,97)	0,11
		G : A	0,83 : 0,17	0,81 : 0,19		0,25		
<i>BCHE</i>	rs4263329	A/A	535	493	0,05	Aditivo	1,02 (0,82-1,27)	0,80
		A/G	162	178		Dominante	1,11 (0,87-1,41)	0,37
		G/G	19	8		Recessivo	2,28 (0,99-5,25)	0,05
		A : G	0,86 : 0,14	0,86 : 0,14		0,79		
<i>BCHE</i>	rs4680662	A/A	81	76	0,93	Aditivo	0,99 (0,84-1,16)	0,94
		A/G	314	314		Dominante	1,01 (0,81-1,25)	0,92
		G/G	300	293		Recessivo	1,05 (0,75-1,46)	0,75
		G : A	0,66 : 0,34	0,66 : 0,34		0,92		
<i>CaMKIV</i>	rs1457115	C/C	204	204	0,81	Aditivo	0,95 (0,81-1,10)	0,51
		T/C	354	338		Dominante	0,94 (0,74-1,18)	0,60
		T/T	146	132		Recessivo	1,07 (0,82-1,39)	0,59
		C : T	0,54 : 0,46	0,55 : 0,45		0,51		
<i>CaMKIV</i>	rs9285875	C/C	430	391	0,17	Aditivo	1,17 (0,98-1,40)	0,07
		T/C	224	231		Dominante	1,18 (0,94-1,46)	0,13
		T/T	34	46		Recessivo	0,70 (0,44-1,10)	0,13
		C : T	0,76 : 0,24	0,79 : 0,21		0,06		

Valores significativos de *p* para os modelos de dominância estão em negrito.

Tabela 1 (cont.) – Frequências alélicas e genotípicas, modelos de herança e suas razões de chance nos controles e nos pacientes com dependência de cocaína

Gene	Polimorfismo	Genótipos Alelos	Controles	Pacientes	<i>p</i>	Modelo	OR (95% IC)	<i>p</i>
<i>COMT</i>	rs165599	A/A	226	205	0,53	Aditivo	1,08 (0,93-1,25)	0,29
		A/G	339	320		Dominante	1,08 (0,86-1,35)	0,49
		G/G	140	150		Recessivo	0,86 (0,66-1,12)	0,28
		G : A	0,46 : 0,64,	0,44 : 0,66	0,28			
<i>COMT</i>	rs4680	A/A	111	110	0,52	Aditivo	0,95 (0,82-1,11)	0,59
		G/A	360	325		Dominante	0,89 (0,72-1,11)	0,33
		G/G	245	252		Recessivo	0,96 (0,72-1,28)	0,79
		G : A	0,60 : 0,40	0,59 : 0,41	0,61			
<i>COMT</i>	rs737865	C/C	44	36	0,11	Aditivo	1,09 (0,92-1,30)	0,29
		C/T	245	273		Dominante	1,19 (0,96-1,47)	0,10
		T/T	245	377		Recessivo	1,19 (0,75-1,87)	0,44
		C : T	0,25 : 0,75	0,23 : 0,77	0,31			
<i>DATI</i>	rs11564773	A/A	556	560	0,10	Aditivo	0,78 (0,61-1,01)	0,06
		A/G	139	117		Dominante	0,80 (0,61-1,05)	0,11
		G/G	9	3		Recessivo	2,92 (0,78-10,84)	0,10
		A : G	0,95 : 0,05	0,95 : 0,05	0,47			
<i>DATI</i>	rs1042098	C/C	98	81	0,37	Aditivo	1,04 (0,89-1,21)	0,61
		T/C	280	271		Dominante	1,12 (0,90-1,40)	0,29
		T/T	314	260		Recessivo	1,08 (0,78-1,48)	0,62
		T : C	0,53 : 0,47	0,52 : 0,48,	0,61			

Valores significativos de *p* para os modelos de dominância estão em negrito.

Tabela 1 (cont) – Frequências alélicas e genotípicas, modelos de herança e razões de chance nos controles e nos pacientes com dependência de cocaína

Gene	Polimorfismo	Genótipos Alelos	Controles	Pacientes	<i>p</i>	Modelo	OR (95% IC)	<i>p</i>
DAT1	rs1564752	A/A	643	624	0,35	Aditivo	0,87 (0,60-1,26)	0,47
		A/T	61	55		Dominante	0,89 (0,61-1,31)	0,58
		T/T	2	0		Recessivo	0,00 (0,00-0,00)	0,99
		A : T	0,62 : 0,38	0,61 : 0,39	0,60			
DAT1	rs2042449	C/C	404	397	0,39	Aditivo	0,97 (0,81-1,16)	0,76
		C/T	230	198		Dominante	0,91 (0,73-1,14)	0,43
		T/T	38	43		Recessivo	0,82 (0,52-1,30)	0,41
		C : T	0,68 : 0,32	0,68 : 0,32	0,82			
DAT1	rs27048	A/A	273	264	0,67	Aditivo	0,94 (0,81-1,09)	0,45
		A/G	329	313		Dominante	0,95 (0,76-1,18)	0,67
		G/G	113	95		Recessivo	1,14 (0,84-1,53)	0,38
		A : G	0,92 : 0,08	0,91 : 0,09	0,29			
DAT1	rs2963238	A/A	195	191	0,89	Aditivo	0,96 (0,83-1,12)	0,63
		A/C	361	340		Dominante	0,95 (0,75-1,20)	0,68
		C/C	159	145		Recessivo	1,04 (0,81-1,35)	0,72
		A : C	0,91 : 0,09	0,88 : 0,12	0,06			
DAT1	rs3756450	C/C	30	27	0,94	Aditivo	0,96 (0,80-1,16)	0,74
		C/T	242	218		Dominante	0,96 (0,77-1,19)	0,73
		T/T	437	409		Recessivo	1,02 (0,60-1,74)	0,92
		C : T	0,35 : 0,65	0,34 : 0,66	0,60			

Valores significativos de *p* para os modelos de dominância estão em negrito.

Tabela 1 – (cont) Frequências alélicas e genóticas, modelos de herança e razões de chance nos controles e nos pacientes com dependência de cocaína

Gene	Polimorfismo	Genótipos Alelos	Controles	Pacientes	<i>p</i>	Modelo	OR (95% IC)	<i>p</i>
DAT1	rs460000	A/A	36	53	0,01	Aditivo	0,99 (0,83-1,18)	0,96
		A/C	312	247		Dominante	0,87 (0,70-1,08)	0,23
		C/C	344	338		Recessivo	0,60 (0,39-0,93)	0,02
		C : A	0,77 : 0,23	0,77 : 0,23	0,76			
DAT1	rs6347	A/A	329	331	0,51	Aditivo	0,98 (0,84-1,14)	0,82
		A/G	307	277		Dominante	0,92 (0,75-1,14)	0,49
		G/G/	73	78		Recessivo	0,89 (0,63-1,25)	0,51
		A : G	0,27 : 0,73	0,27 : 0,73	0,98			
DAT1	rs6876225	C/C	584	583	0,40	Aditivo	0,85 (0,64-1,13)	0,28
		C/A	115	95		Dominante	0,83 (0,62-1,12)	0,23
		A/A	2	3		Recessivo	0,64 (0,10-3,88)	0,63
		C : A	0,79 : 0,21	0,79 : 0,21	0,90			
DBH	rs1611115	C/C	416	416	0,56	Aditivo	0,91 (0,76-1,08)	0,30
		C/T	247	221		Dominante	0,89 (0,71-1,10)	0,29
		T/T	45	39		Recessivo	1,10 (0,71-1,72)	0,64
		C : T	0,77 : 0,23	0,76 : 0,24	0,29			
DBH	rs77905	A/A	157	153	0,88	Aditivo	1,03 (0,89-1,20)	0,62
		G/A	351	328		Dominante	1,04 (0,82-1,32)	0,70
		G/G	198	179		Recessivo	0,94 (0,73-1,22)	0,67
		A : G	0,48 : 0,52	0,47 : 0,53	0,62			

Valores significativos de *p* para os modelos de dominância estão em negrito.

Tabela 1 – (cont) Frequências alélicas e genotípicas, modelos de herança e razões de chance nos controles e nos pacientes com dependência de cocaína

Gene	Polimorfismo	Genótipos Alelos	Controles	Pacientes	<i>p</i>	Modelo	OR (95% IC)	<i>p</i>
DRD2	rs1079594	G/G	13	15	0,60	Aditivo	1,11 (0,90-1,36)	0,32
		T/G	1880	186				
		T/T	514	461				
		G : T	0,16 : 0,84	0,15 : 0,85	0,32	Dominante	1,11 (0,88-1,40)	0,35
DRD2	rs1799732	A/A	28	28	0,71	Aditivo	1,03 (0,79-1,35)	0,79
		A/G	202	207				
		G/G	479	446				
		A : G	0,19 : 0,81	0,18 : 0,82	0,45	Dominante	1,07 (0,62-1,84)	0,79
DRD3	rs1372472	C/C	156	149	0,85	Aditivo	0,96 (0,82-1,11)	0,60
		C/T	321	312				
		T/T	194	200				
		T : X	0,53 : 0,47	0,52 : 0,48	0,28	Dominante	0,93 (0,74-1,18)	0,59
GABRA2	rs1372472	A/A	400	342	0,16	Aditivo	1,14 (0,97-1,35)	0,09
		A/T	239	252				
		T/T	61	63				
		T : A	0,28 : 0,78	0,25 : 0,75	0,08	Dominante	1,22 (0,99-1,52)	0,06
GABRA2	rs189957	A/A	206	168	0,07	Aditivo	1,18 (1,01-1,37)	0,02
		A/G	345	318				
		G/G	150	172				
		G : A	0,50 : 0,50	0,46 : 0,56	0,08	Dominante	1,21 (0,95-1,54)	0,11
						Recessivo	0,76 (0,59-0,98)	0,04

Valores significativos de *p* para os modelos de dominância estão em negrito.

Tabela 1 – (cont) Frequências alélicas e genótípicas, modelos de herança e razões de chance nos controles e nos pacientes com dependência de cocaína

Gene	Polimorfismo	Genótipos Alelos	Controles	Pacientes	<i>p</i>	Modelo	OR (95% IC)	<i>p</i>
GABRA2	rs279871	A/A	254	215	0,03	Aditivo	1,21 (1,04-1,42)	0,01
		A/G	323	313		Dominante	1,23 (0,98-1,54)	0,06
		G/G	99	128		Recessivo	0,70 (0,53-0,94)	0,01
		G : A	0,43 : 0,57	0,38 : 0,62	0,008			
GABRA2	rs894269	C/C	520	533	0,01	Aditivo	0,71 (0,57-0,89)	0,003
		T/C	155	118		Dominante	0,70 (0,54-0,90)	0,007
		T/T	24	11		Recessivo	2,10 (1,02-4,33)	0,043
		C : T	0,89 : 0,11	0,85 : 0,15	0,002			
GABRA2	rs9291283	A/A	36	36	0,80	Aditivo	1,05 (0,87-1,26)	0,55
		G/A	283	249		Dominante	1,04 (0,84-1,30)	0,66
		G/G	356	303		Recessivo	0,86 (0,53-1,39)	0,54
		A : G	0,27 : 0,73	0,26 : 0,74	0,60			
GSK	rs558934	A/A	346	331	0,79	Aditivo	1,02 (0,87-1,19)	0,78
		A/C	303	282		Dominante	0,99 (0,80-1,22)	0,98
		C/C	69	73		Recessivo	0,89 (0,63-1,26)	0,52
		C : A	0,31 : 0,69	0,30 : 0,70	0,80			
GSK	rs5761116	A/A	512	504	0,37	Aditivo	0,88 (0,71-1,10)	0,28
		A/C	171	158		Dominante	0,90 (0,71-1,15)	0,43
		C/C	16	9		Recessivo	1,72 (0,75-3,92)	0,19
		A : C	0,86 : 0,14	0,85 : 0,15	0,28			

Valores significativos de *p* para os modelos de dominância estão em negrito.

Tabela 1 – (cont) Frequências alélicas e genotípicas, modelos de herança e razões de chance nos controles e nos pacientes com dependência de cocaína

Gene	Polimorfismo	Genótipos Alelos	Controles	Pacientes	<i>p</i>	Modelo	OR (95% IC)	<i>p</i>
<i>GSK</i>	rs576895	A/A	276	255	0,56	Aditivo	1,01 (0,87-1,19)	0,93
		A/C	321	328		Dominante	1,07 (0,86-1,32)	0,55
		C/C	121	108		Recessivo	1,09 (0,82-1,45)	0,53
		A : C	0,39 : 0,61	0,39 : 0,61	0,88			
<i>GSTPI</i>	rs9478594	A/A	282	294	0,36	Aditivo	0,89 (0,76-1,04)	0,15
		A/G	336	310		Dominante	0,86 (0,70-1,07)	0,19
		G/G	92	77		Recessivo	1,16 (0,84-1,61)	0,34
		A : G	0,65 : 0,35	0,63 : 0,37	0,16			
<i>PER1</i>	rs2253820	G/G	282	329	0,008	Aditivo	0,79 (0,67-0,93)	0,005
		G/A	342	285		Dominante	0,71 (0,57-0,88)	0,002
		A/A	78	64		Recessivo	1,19 (0,84-1,70)	0,54
		G : A	0,64 : 0,36	0,69 : 0,31	0,005			
<i>PER1</i>	rs30277172	T/T	503	506	0,57	Aditivo	0,89 (0,71-1,10)	0,30
		T/A	174	154		Dominante	0,87 (0,68-1,11)	0,29
		A/A	14	12		Recessivo	1,13 (0,52-2,24)	0,74
		T : A	0,85 : 0,15	0,86 : 0,14	0,30			
<i>PER1</i>	rs2304911	T/T	524	532	0,08	Aditivo	0,78 (0,61-0,98)	0,03
		T/C	161	122		Dominante	0,75 (0,58-0,97)	0,02
		C/C	11	9		Recessivo	1,16 (0,48-2,83)	0,73
		T : C	0,86 : 0,14	0,89 : 0,11	0,03			

Valores significativos de *p* para os modelos de dominância estão em negrito.

Tabela 1 – (cont) Frequências alélicas e genotípicas, modelos de herança e razões de chance nos controles e nos pacientes com dependência de cocaína

Gene	Polimorfismo	Genótipos Alelos	Controles	Pacientes	<i>p</i>	Modelo	OR (95% IC)	<i>p</i>
PER1	rs885747	C/C	250	228	0,43	Aditivo	1,08 (0,93-1,26)	0,28
		C/T	342	317		Dominante	1,06 (0,85-1,33)	0,57
		T/T	117	129		Recessivo	0,83 (0,63-1,10)	0,20
		T : C	0,40 : 0,60	0,42 : 0,58	0,31			
PER2	ID2222180	A/A	630	608	0,61	Aditivo	0,90 (0,64-1,28)	0,58
		A/C	65	60		Dominante	0,93 (0,64-1,33)	0,69
		C/C	3	1		Recessivo	2,88 (0,29-27,78)	0,36
		A : C	0,94 : 0,06	0,94 : 0,06	0,57			
PER2	ID2222181	A/A	546	510	0,18	Aditivo	1,08 (0,86-1,35)	0,49
		A/C	144	162		Dominante	1,15 (0,89-1,47)	0,26
		C/C	15	9		Recessivo	1,62 (0,70-3,73)	0,25
		C : A	0,12 : 0,88	0,13 : 0,87	0,49			
PER2	rs2304672	C/C	612	579	0,46	Aditivo	1,07 (0,82-1,40)	0,58
		C/G	91	101		Dominante	1,13 (0,84-1,52)	0,41
		G/G	9	6		Recessivo	1,45 (0,51-4,09)	0,48
		G : C	0,07 : 0,93	0,08 : 0,92	0,56			
PER2	rs2304674	T/T	337	309	0,16	Aditivo	0,99 (0,85-1,17)	0,98
		T/C	293	311		Dominante	1,09 (0,88-1,34)	0,42
		C/C	76	58		Recessivo	1,29 (0,90-1,84)	0,16
		T : C	0,68 : 0,32	0,68 : 0,32	0,98			

Valores significativos de *p* para os modelos de dominância estão em negrito.

10. Referências bibliográficas

Achkar,J.P., Fiocchi,C., 2009. Gene-gene interactions in inflammatory bowel disease: biological and clinical implications. *Am. J. Gastroenterol.*, 104, 1734-1736.

Ahmed,S.H., 2011. The science of making drug-addicted animals. *Neuroscience*.

Agrawal,A., Edenberg,H.J., Foroud,T., Bierut,L.J., Dunne,G., Hinrichs,A.L., Nurnberger,J.I., Crowe,R., Kuperman,S., Schuckit,M.A., Begleiter,H., Porjesz,B., Dick,D.M., 2006. Association of GABRA2 with drug dependence in the collaborative study of the genetics of alcoholism sample. *Behav. Genet.*, 36, 640-650.

Agrawal,A., Lynskey,M.T., 2008. Are there genetic influences on addiction: evidence from family, adoption and twin studies. *Addiction*, 103, 1069-1081.

Agrawal,A., Lynskey,M.T., 2009. Candidate genes for cannabis use disorders: findings, challenges and directions. *Addiction*, 104, 518-532.

Allderdice,P.W., Gardner,H.A., Galutira,D., Lockridge,O., LaDu,B.N., McAlpine,P.J., 1991. The cloned butyrylcholinesterase (BCHE) gene maps to a single chromosome site, 3q26. *Genomics*, 11, 452-454.

Andrew,C., Fein,G., 2010. Induced theta oscillations as biomarkers for alcoholism. *Clin. Neurophysiol.*, 121, 350-358.

Anthony,J.C., Warner,L.A., Kessler,R.C., 1994. Comparative Epidemiology of Dependence on Tobacco, Alcohol, Controlled Substances, and Inhalants: Basic Findings From the National Comorbidity Survey. *Experimental and Clinical Psychopharmacology*, 2, 244-268.

Anthony,J.C., Petronis,K.R., 1995. Early-onset drug use and risk of later drug problems. *Drug Alcohol Depend.*, 40, 9-15.

Arpagaus,M., Kott,M., Vatsis,K.P., Bartels,C.F., La Du,B.N., Lockridge,O., 1990. Structure of the gene for human butyrylcholinesterase. Evidence for a single copy. *Biochemistry*, 29, 124-131.

Balding,D.J., 2006. A tutorial on statistical methods for population association studies. *Nat. Rev. Genet.*, 7, 781-791.

Ballon,N., Leroy,S., Roy,C., Bourdel,M.C., Olie,J.P., Charles-Nicolas,A., Krebs,M.O., Poirier,M.F., 2007. Polymorphisms TaqI A of the DRD2, Ball of the DRD3, exon III repeat of the DRD4, and 3' UTR VNTR of the DAT: association with childhood ADHD in male African-Caribbean cocaine dependents? *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.*, 144B, 1034-1041.

Barrett,J.C., Fry,B., Maller,J., Daly,M.J., 2005. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics.*, 21, 263-265.

Bartels,C.F., Jensen,F.S., Lockridge,O., van der Spek,A.F., Rubinstein,H.M., Lubrano,T., La Du,B.N., 1992. DNA mutation associated with the human

butyrylcholinesterase K-variant and its linkage to the atypical variant mutation and other polymorphic sites. *Am. J. Hum. Genet.*, 50, 1086-1103.

Benyamina,A., Kebir,O., Blecha,L., Reynaud,M., Krebs,M.O., 2011a. CNR1 gene polymorphisms in addictive disorders: a systematic review and a meta-analysis. *Addict. Biol.*, 16, 1-6.

Benyamina,A., Kebir,O., Blecha,L., Reynaud,M., Krebs,M.O., 2011b. CNR1 gene polymorphisms in addictive disorders: a systematic review and a meta-analysis. *Addict. Biol.*, 16, 1-6.

Bergen,S.E., Gardner,C.O., Kendler,K.S., 2007. Age-related changes in heritability of behavioral phenotypes over adolescence and young adulthood: a meta-analysis. *Twin. Res. Hum. Genet.*, 10, 423-433.

Bierut,L.J., 2011. Genetic vulnerability and susceptibility to substance dependence. *Neuron*, 69, 618-627.

Bierut,L.J., Agrawal,A., Bucholz,K.K., Doheny,K.F., Laurie,C., Pugh,E., Fisher,S., Fox,L., Howells,W., Bertelsen,S., Hinrichs,A.L., Almasy,L., Breslau,N., Culverhouse,R.C., Dick,D.M., Edenberg,H.J., Foroud,T., Gruzca,R.A., Hatsukami,D., Hesselbrock,V., Johnson,E.O., Kramer,J., Krueger,R.F., Kuperman,S., Lynskey,M., Mann,K., Neuman,R.J., Nothen,M.M., Nurnberger,J.I., Jr., Porjesz,B., Ridinger,M., Saccone,N.L., Saccone,S.F., Schuckit,M.A., Tischfield,J.A., Wang,J.C., Rietschel,M., Goate,A.M., Rice,J.P., 2010. A genome-wide association study of alcohol dependence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 107, 5082-5087.

Bierut,L.J., Dinwiddie,S.H., Begleiter,H., Crowe,R.R., Hesselbrock,V., Nurnberger,J.I., Jr., Porjesz,B., Schuckit,M.A., Reich,T., 1998. Familial transmission of substance dependence: alcohol, marijuana, cocaine, and habitual smoking: a report from the Collaborative Study on the Genetics of Alcoholism. *Arch. Gen. Psychiatry*, 55, 982-988.

Bierut,L.J., Strickland,J.R., Thompson,J.R., Afful,S.E., Cottler,L.B., 2008. Drug use and dependence in cocaine dependent subjects, community-based individuals, and their siblings. *Drug Alcohol Depend.*, 95, 14-22.

Bilbao,A., Parkitna,J.R., Engblom,D., Perreau-Lenz,S., Sanchis-Segura,C., Schneider,M., Konopka,W., Westphal,M., Breen,G., Desrivieres,S., Klugmann,M., Guindalini,C., Vallada,H., Laranjeira,R., de Fonseca,F.R., Schumann,G., Schutz,G., Spanagel,R., 2008. Loss of the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase type IV in dopaminergic neurons enhances behavioral effects of cocaine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 105, 17549-17554.

Blaho,K., Logan,B., Winbery,S., Park,L., Schwilke,E., 2000. Blood cocaine and metabolite concentrations, clinical findings, and outcome of patients presenting to an ED. *Am. J. Emerg. Med.*, 18, 593-598.

- Bottema,R.W., Kerkhof,M., Reijmerink,N.E., Thijs,C., Smit,H.A., van Schayck,C.P., Brunekreef,B., van Oosterhout,A.J., Postma,D.S., Koppelman,G.H., 2010. Gene-gene interaction in regulatory T-cell function in atopy and asthma development in childhood. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 126, 338-46, 346.
- Brimijoin,S., Gao,Y., Anker,J.J., Gliddon,L.A., LaFleur,D., Shah,R., Zhao,Q., Singh,M., Carroll,M.E., 2008. A cocaine hydrolase engineered from human butyrylcholinesterase selectively blocks cocaine toxicity and reinstatement of drug seeking in rats. *Neuropsychopharmacology.*, 33, 2715-2725.
- Brzezinski,M.R., Abraham,T.L., Stone,C.L., Dean,R.A., Bosron,W.F., 1994. Purification and characterization of a human liver cocaine carboxylesterase that catalyzes the production of benzoylecgonine and the formation of cocaethylene from alcohol and cocaine. *Biochem. Pharmacol.*, 48, 1747-1755.
- Caldu,X., Vendrell,P., Bartres-Faz,D., Clemente,I., Bargallo,N., Jurado,M.A., Serra-Grabulosa,J.M., Junque,C., 2007. Impact of the COMT Val108/158 Met and DAT genotypes on prefrontal function in healthy subjects. *Neuroimage.*, 37, 1437-1444.
- Cantin,L., Lenoir,M., Augier,E., Vanhille,N., Dubreucq,S., Serre,F., Vouillac,C., Ahmed,S.H., 2010. Cocaine is low on the value ladder of rats: possible evidence for resilience to addiction. *PLoS. One.*, 5, e11592.
- Carmona,G.N., Jufer,R.A., Goldberg,S.R., Gorelick,D.A., Greig,N.H., Yu,Q.S., Cone,E.J., Schindler,C.W., 2000. Butyrylcholinesterase accelerates cocaine metabolism: in vitro and in vivo effects in nonhuman primates and humans. *Drug Metab Dispos.*, 28, 367-371.
- Carmona,G.N., Schindler,C.W., Shoaib,M., Jufer,R., Cone,E.J., Goldberg,S.R., Greig,N.H., Yu,Q.S., Gorelick,D.A., 1998. Attenuation of cocaine-induced locomotor activity by butyrylcholinesterase. *Exp. Clin. Psychopharmacol.*, 6, 274-279.
- Caspi,A., Sugden,K., Moffitt,T.E., Taylor,A., Craig,I.W., Harrington,H., McClay,J., Mill,J., Martin,J., Braithwaite,A., Poulton,R., 2003. Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science*, 301, 386-389.
- Cevoli,S., Mochi,M., Scapoli,C., Marzocchi,N., Pierangeli,G., Pini,L.A., Cortelli,P., Montagna,P., 2006. A genetic association study of dopamine metabolism-related genes and chronic headache with drug abuse *Eur. J. Neurol.*, 13, 1009-1013.
- Chen,C.Y., Anthony,J.C., 2004. Epidemiological estimates of risk in the process of becoming dependent upon cocaine: cocaine hydrochloride powder versus crack cocaine. *Psychopharmacology (Berl)*, 172, 78-86.
- Chen,C.Y., Storr,C.L., Anthony,J.C., 2009. Early-onset drug use and risk for drug dependence problems. *Addict. Behav.*, 34, 319-322.
- Chung,Y., Lee,S.Y., Elston,R.C., Park,T., 2007. Odds ratio based multifactor-dimensionality reduction method for detecting gene-gene interactions. *Bioinformatics.*, 23, 71-76.

- Compton,W.M., Thomas,Y.F., Conway,K.P., Colliver,J.D., 2005. Developments in the epidemiology of drug use and drug use disorders. *Am. J. Psychiatry*, 162, 1494-1502.
- Cordeiro,Q., Souza,B.R., Correa,H., Guindalini,C., Hutz,M.H., Vallada,H., Romano-Silva,M.A., 2009. A review of psychiatric genetics research in the Brazilian population. *Rev. Bras. Psiquiatr.*, 31, 154-162.
- Cordell,H.J., 2002. Epistasis: what it means, what it doesn't mean, and statistical methods to detect it in humans. *Hum. Mol. Genet.*, 11, 2463-2468.
- Cordell,H.J., 2009. Detecting gene-gene interactions that underlie human diseases. *Nat. Rev. Genet.*, 10, 392-404.
- Cordell,H.J., Clayton,D.G., 2005. Genetic association studies. *Lancet*, 366, 1121-1131.
- Covault,J., Gelernter,J., Hesselbrock,V., Nellisery,M., Kranzler,H.R., 2004. Allelic and haplotypic association of GABRA2 with alcohol dependence. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.*, 129B, 104-109.
- Covault,J., Gelernter,J., Jensen,K., Anton,R., Kranzler,H.R., 2008. Markers in the 5'-region of GABRG1 associate to alcohol dependence and are in linkage disequilibrium with markers in the adjacent GABRA2 gene. *Neuropsychopharmacology*, 33, 837-848.
- Crews,F., He,J., Hodge,C., 2007. Adolescent cortical development: a critical period of vulnerability for addiction. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 86, 189-199.
- Cunha,N.S., 2007. Estudo De Genes De Susceptibilidade à Dependência De Cocaína: o Papel Da MAO-A, COMT e 5HTT. Mestrado em Medicina Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
- Dackis,C.A., O'Brien,C.P., 2001. Cocaine dependence: a disease of the brain's reward centers. *J. Subst. Abuse Treat.*, 21, 111-117.
- Darvesh,S., Hopkins,D.A., Geula,C., 2003. Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nat. Rev. Neurosci.*, 4, 131-138.
- Dervieux,T., Wessels,J.A., van der Straaten,T., Penrod,N., Moore,J.H., Guchelaar,H.J., Kremer,J.M., 2009. Gene-gene interactions in folate and adenosine biosynthesis pathways affect methotrexate efficacy and tolerability in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenet. Genomics*.
- Dias,A.C., Ribeiro,M., Dunn,J., Sesso,R., Laranjeira,R., 2008. Follow-up study of crack cocaine users: situation of the patients after 2, 5, and 12 years. *Subst. Abus.*, 29, 71-79.
- Dixon,C.I., Morris,H.V., Breen,G., Desrivieres,S., Jugurnauth,S., Steiner,R.C., Vallada,H., Guindalini,C., Laranjeira,R., Messas,G., Rosahl,T.W., Atack,J.R., Peden,D.R., Belelli,D., Lambert,J.J., King,S.L., Schumann,G., Stephens,D.N., 2010. Cocaine effects on mouse incentive-learning and human addiction are linked to

alpha2 subunit-containing GABAA receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 107, 2289-2294.

Dreher, J.C., Kohn, P., Kolachana, B., Weinberger, D.R., Berman, K.F., 2009. Variation in dopamine genes influences responsivity of the human reward system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 106, 617-622.

Duailibi, L.B., Ribeiro, M., Laranjeira, R., 2008. Profile of cocaine and crack users in Brazil. *Cad. Saude Publica*, 24 Suppl 4, s545-s557.

Ducci, F., Goldman, D., 2008. Genetic approaches to addiction: genes and alcohol. *Addiction*, 103, 1414-1428.

Duncan, L.E., Keller, M.C., 2011. A critical review of the first 10 years of candidate gene-by-environment interaction research in psychiatry. *Am. J. Psychiatry*, 168, 1041-1049.

Dunn, J., Laranjeira, R., 1999. Cocaine--profiles, drug histories, and patterns of use of patients from Brazil. *Subst. Use. Misuse.*, 34, 1527-1548.

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

Edenberg, H.J., 2007. The genetics of alcohol metabolism: role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase variants. *Alcohol Res. Health*, 30, 5-13.

Edenberg, H.J., Dick, D.M., Xuei, X., Tian, H., Almasy, L., Bauer, L.O., Crowe, R.R., Goate, A., Hesselbrock, V., Jones, K., Kwon, J., Li, T.K., Nurnberger, J.I., Jr., O'Connor, S.J., Reich, T., Rice, J., Schuckit, M.A., Porjesz, B., Foroud, T., Begleiter, H., 2004. Variations in GABRA2, encoding the alpha 2 subunit of the GABA(A) receptor, are associated with alcohol dependence and with brain oscillations. *Am. J. Hum. Genet.*, 74, 705-714.

Eichler, E.E., Flint, J., Gibson, G., Kong, A., Leal, S.M., Moore, J.H., Nadeau, J.H., 2010. Missing heritability and strategies for finding the underlying causes of complex disease. *Nat. Rev. Genet.*, 11, 446-450.

Enoch, M.A., Hodgkinson, C.A., Yuan, Q., Albaugh, B., Virkkunen, M., Goldman, D., 2009. GABRG1 and GABRA2 as independent predictors for alcoholism in two populations. *Neuropsychopharmacology*, 34, 1245-1254.

Farrer, L.A., Kranzler, H.R., Yu, Y., Weiss, R.D., Brady, K.T., Anton, R., Cubells, J.F., Gelernter, J., 2009. Association of variants in MANEA with cocaine-related behaviors. *Arch. Gen. Psychiatry*, 66, 267-274.

Feiling, T., 2009. *The Candy Machine: How Cocaine Took Over the World*. Penguin Books, London.

- Fernandez-Castillo,N., Ribases,M., Roncero,C., Casas,M., Gonzalvo,B., Cormand,B., 2010. Association study between the DAT1, DBH and DRD2 genes and cocaine dependence in a Spanish sample. *Psychiatr. Genet.*, 20, 317-320.
- Fernandez-Serrano,M.J., Perales,J.C., Moreno-Lopez,L., Perez-Garcia,M., Verdejo-Garcia,A., 2012. Neuropsychological profiling of impulsivity and compulsivity in cocaine dependent individuals. *Psychopharmacology (Berl)*, 219, 673-683.
- Ferreira Filho,O.F., Turchi,M.D., Laranjeira,R., Castelo,A., 2003. [Epidemiological profile of cocaine users on treatment in psychiatrics hospitals, Brazil]. *Rev. Saude Publica*, 37, 751-759.
- Ford,J.D., Gelernter,J., DeVoe,J.S., Zhang,W., Weiss,R.D., Brady,K., Farrer,L., Kranzler,H.R., 2009. Association of psychiatric and substance use disorder comorbidity with cocaine dependence severity and treatment utilization in cocaine-dependent individuals. *Drug Alcohol Depend.*, 99, 193-203.
- Fowler,J.S., Volkow,N.D., Kassed,C.A., Chang,L., 2007. Imaging the addicted human brain. *Sci. Pract. Perspect.*, 3, 4-16.
- Galduroz,J.C., Noto,A.R., Nappo,S.A., Carlini,E.A., 2005. [Use of psychotropic drugs in Brazil: household survey in the 107 biggest Brazilian cities--2001]. *Rev. Lat. Am. Enfermagem.*, 13 Spec No, 888-895.
- Galduroz,J.C., Noto,A.R., Nappo,S.A., Carlini,E.L., 2003. First household survey on drug abuse in Sao Paulo, Brazil, 1999: principal findings. *Sao Paulo Med. J.*, 121, 231-237.
- Gallegos,R.A., Lee,R.S., Criado,J.R., Henriksen,S.J., Steffensen,S.C., 1999. Adaptive responses of gamma-aminobutyric acid neurons in the ventral tegmental area to chronic ethanol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 291, 1045-1053.
- Gao,Y., LaFleur,D., Shah,R., Zhao,Q., Singh,M., Brimijoin,S., 2008. An albumin-butyrylcholinesterase for cocaine toxicity and addiction: catalytic and pharmacokinetic properties. *Chem. Biol. Interact.*, 175, 83-87.
- Gauderman,W.J., 2002. Sample size calculations for matched case-control studies of gene-environment interaction. *Statistics in Medicine*, 21, 35-50.
- Gauderman,W.J., Morrison,J.. QUANTO 1.1: A computer program for power and sample size calculations for genetic-epidemiology studies, <http://hydra.usc.edu/gxe>. 2006.
- Gelernter,J., Panhuysen,C., Weiss,R., Brady,K., Hesselbrock,V., Rounsaville,B., Poling,J., Wilcox,M., Farrer,L., Kranzler,H.R., 2005. Genomewide linkage scan for cocaine dependence and related traits: significant linkages for a cocaine-related trait and cocaine-induced paranoia. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.*, 136B, 45-52.

- Genro, J.P., Polanczyk, G.V., Zeni, C., Oliveira, A.S., Roman, T., Rohde, L.A., Hutz, M.H., 2008. A common haplotype at the dopamine transporter gene 5' region is associated with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.*, 147B, 1568-1575.
- Geyer, B.C., Kannan, L., Garnaud, P.E., Broomfield, C.A., Cadieux, C.L., Cherni, I., Hodgins, S.M., Kasten, S.A., Kelley, K., Kilbourne, J., Oliver, Z.P., Otto, T.C., Puffenberger, I., Reeves, T.E., Robbins, N., Woods, R.R., Soreq, H., Lenz, D.E., Cerasoli, D.M., Mor, T.S., 2010. Plant-derived human butyrylcholinesterase, but not an organophosphorous-compound hydrolyzing variant thereof, protects rodents against nerve agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 107, 20251-20256.
- Goldman, D., Oroszi, G., Ducci, F., 2005. The genetics of addictions: uncovering the genes. *Nat. Rev. Genet.*, 6, 521-532.
- Goodall, R., 2004. Cholinesterase: phenotyping and genotyping. *Ann. Clin. Biochem.*, 41, 98-110.
- Gossop, M., Griffiths, P., Powis, B., Strang, J., 1994. Cocaine: patterns of use, route of administration, and severity of dependence. *Br. J. Psychiatry*, 164, 660-664.
- Grady, B.J., Torstenson, E.S., Ritchie, M.D., 2011. The effects of linkage disequilibrium in large scale SNP datasets for MDR. *BioData. Min*, 4, 11.
- Grant, B.F., Dawson, D.A., 1998. Age of onset of drug use and its association with DSM-IV drug abuse and dependence: results from the National Longitudinal Alcohol Epidemiologic Survey. *J. Subst. Abuse*, 10, 163-173.
- Grant, B.F., Goldstein, R.B., Chou, S.P., Huang, B., Stinson, F.S., Dawson, D.A., Saha, T.D., Smith, S.M., Pulay, A.J., Pickering, R.P., Ruan, W.J., Compton, W.M., 2009. Sociodemographic and psychopathologic predictors of first incidence of DSM-IV substance use, mood and anxiety disorders: results from the Wave 2 National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions. *Mol. Psychiatry*, 14, 1051-1066.
- Greenfield, S.F., Pettinati, H.M., O'Malley, S., Randall, P.K., Randall, C.L., 2010. Gender differences in alcohol treatment: an analysis of outcome from the COMBINE study. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 34, 1803-1812.
- Gruza, R.A., Johnson, E.O., Krueger, R.F., Breslau, N., Saccone, N.L., Chen, L.S., Derringer, J., Agrawal, A., Lynskey, M., Bierut, L.J., 2010. Incorporating age at onset of smoking into genetic models for nicotine dependence: evidence for interaction with multiple genes. *Addict. Biol.*, 15, 346-357.
- Gui, J., Andrew, A.S., Andrews, P., Nelson, H.M., Kelsey, K.T., Karagas, M.R., Moore, J.H., 2011a. A robust multifactor dimensionality reduction method for detecting gene-gene interactions with application to the genetic analysis of bladder cancer susceptibility. *Ann. Hum. Genet.*, 75, 20-28.

- Gui,J., Moore,J.H., Kelsey,K.T., Marsit,C.J., Karagas,M.R., Andrew,A.S., 2011b. A novel survival multifactor dimensionality reduction method for detecting gene-gene interactions with application to bladder cancer prognosis. *Hum. Genet.*, 129, 101-110.
- Guindalini,C., 2005. O Efeito Da Estratificação Populacional e Outras Variáveis De Confusão Em Estudos Genéticos De Associação . Tese (Doutorado) Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
- Guindalini,C., Howard,M., Haddley,K., Laranjeira,R., Collier,D., Ammar,N., Craig,I., O'Gara,C., Bubb,V.J., Greenwood,T., Kelsoe,J., Asherson,P., Murray,R.M., Castelo,A., Quinn,J.P., Vallada,H., Breen,G., 2006a. A dopamine transporter gene functional variant associated with cocaine abuse in a Brazilian sample. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 103, 4552-4557.
- Guindalini,C., Scivoletto,S., Ferreira,R.G., Breen,G., Zilberman,M., Peluso,M.A., Zatz,M., 2005a. Association of genetic variants in alcohol dehydrogenase 4 with alcohol dependence in Brazilian patients. *Am. J. Psychiatry*, 162, 1005-1007.
- Guindalini,C., Scivoletto,S., Ferreira,R.G., Nishimura,A., Zilberman,M.L., Peluso,M.M., Zatz,M., 2005b. Association of MAO A polymorphism and alcoholism in Brazilian females. *Psychiatr. Genet.*, 15, 141-144.
- Guindalini,C., Vallada,H., Breen,G., Laranjeira,R., 2006b. Concurrent crack and powder cocaine users from Sao Paulo: do they represent a different group? *BMC. Public Health*, 6, 10.
- Gynther,L.M., Carey,G., Gottesman,I.I., Vogler,G.P., 1995. A twin study of non-alcohol substance abuse. *Psychiatry Res.*, 56, 213-220.
- Haertzen,C.A., Kocher,T.R., Miyasato,K., 1983. Reinforcements from the first drug experience can predict later drug habits and/or addiction: results with coffee, cigarettes, alcohol, barbiturates, minor and major tranquilizers, stimulants, marijuana, hallucinogens, heroin, opiates and cocaine. *Drug Alcohol Depend.*, 11, 147-165.
- Hahn,L.W., Ritchie,M.D., Moore,J.H., 2003. Multifactor dimensionality reduction software for detecting gene-gene and gene-environment interactions. *Bioinformatics.*, 19, 376-382.
- Heinz,A., Goldman,D., Jones,D.W., Palmour,R., Hommer,D., Gorey,J.G., Lee,K.S., Linnoila,M., Weinberger,D.R., 2000. Genotype influences in vivo dopamine transporter availability in human striatum. *Neuropsychopharmacology*, 22, 133-139.
- Hoehe,M.R., Rinn,T., Flachmeier,C., Heere,P., Kunert,H.J., Timmermann,B., Kopke,K., Ehrenreich,H., 2000. Comparative sequencing of the human CB1 cannabinoid receptor gene coding exon: no structural mutations in individuals exhibiting extreme responses to cannabis. *Psychiatr. Genet.*, 10, 173-177.
- Howard,T.D., Hsu,F.C., Grzywacz,J.G., Chen,H., Quandt,S.A., Vallejos,Q.M., Whalley,L.E., Cui,W., Padilla,S., Arcury,T.A., 2010. Evaluation of candidate genes

for cholinesterase activity in farmworkers exposed to organophosphorus pesticides: association of single nucleotide polymorphisms in BCHE. *Environ. Health Perspect.*, 118, 1395-1399.

Ittiwut,R., Listman,J.B., Ittiwut,C., Cubells,J.F., Weiss,R.D., Brady,K., Oslin,D., Farrer,L.A., Kranzler,H.R., Gelernter,J., 2011. Association between polymorphisms in catechol-O-methyltransferase (COMT) and cocaine-induced paranoia in European-American and African-American populations. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.*, 156B, 651-660.

Kalaydjian,A., Swendsen,J., Chiu,W.T., Dierker,L., Degenhardt,L., Glantz,M., Merikangas,K.R., Sampson,N., Kessler,R., 2009. Sociodemographic predictors of transitions across stages of alcohol use, disorders, and remission in the National Comorbidity Survey Replication. *Compr. Psychiatry*, 50, 299-306.

Kalivas,P.W., McFarland,K., 2003. Brain circuitry and the reinstatement of cocaine-seeking behavior. *Psychopharmacology (Berl)*, 168, 44-56.

Kamendulis,L.M., Brzezinski,M.R., Pindel,E.V., Bosron,W.F., Dean,R.A., 1996. Metabolism of cocaine and heroin is catalyzed by the same human liver carboxylesterases. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 279, 713-717.

Kendler,K.S., Jacobson,K.C., Prescott,C.A., Neale,M.C., 2003. Specificity of genetic and environmental risk factors for use and abuse/dependence of cannabis, cocaine, hallucinogens, sedatives, stimulants, and opiates in male twins. *Am. J. Psychiatry*, 160, 687-695.

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

Kendler,K.S., Myers,J., Prescott,C.A., 2007. Specificity of genetic and environmental risk factors for symptoms of cannabis, cocaine, alcohol, caffeine, and nicotine dependence. *Arch. Gen. Psychiatry*, 64, 1313-1320.

Kendler,K.S., Neale,M.C., 2010. Endophenotype: a conceptual analysis. *Mol. Psychiatry*, 15, 789-797.

Kendler,K.S., Schmitt,E., Aggen,S.H., Prescott,C.A., 2008. Genetic and environmental influences on alcohol, caffeine, cannabis, and nicotine use from early adolescence to middle adulthood. *Arch. Gen. Psychiatry*, 65, 674-682.

Kinsey,B.M., Kosten,T.R., Orson,F.M., 2010. Anti-cocaine vaccine development. *Expert. Rev. Vaccines.*, 9, 1109-1114.

Kolbrich,E.A., Barnes,A.J., Gorelick,D.A., Boyd,S.J., Cone,E.J., Huestis,M.A., 2006. Major and minor metabolites of cocaine in human plasma following controlled subcutaneous cocaine administration. *J. Anal. Toxicol.*, 30, 501-510.

- Koob,G., Kreek,M.J., 2007. Stress, dysregulation of drug reward pathways, and the transition to drug dependence. *Am. J. Psychiatry*, 164, 1149-1159.
- Koob,G.F., LeMoal,M., 2006a. *Neurobiology of Addiction*. 1 edn. Academic Press, London.
- Koob,G.F., LeMoal,M., 2006b. Psychostimulants. In: G.F.Koob & M.Le Moal (Eds.), *Neurobiology of Addiction* by George F. Koob and Michel Le Moal, Academic Press, London, pp. 69-120.
- Koob,G.F., Sanna,P.P., Bloom,F.E., 1998. Neuroscience of addiction. *Neuron*, 21, 467-476.
- Kooperberg,C., Bis,J.C., Marciante,K.D., Heckbert,S.R., Lumley,T., Psaty,B.M., 2007. Logic regression for analysis of the association between genetic variation in the renin-angiotensin system and myocardial infarction or stroke. *Am. J. Epidemiol.*, 165, 334-343.
- Kweon,Y.S., Lee,H.K., Lee,C.T., Pae,C.U., 2005. Association study of catechol-O-methyltransferase gene polymorphism in Korean male alcoholics. *Psychiatr. Genet.*, 15, 151-154.
- Lachman,H.M., 2008. Does COMT val158met affect behavioral phenotypes: yes, no, maybe?. *Neuropsychopharmacology*, 33, 3027-3029.
- Lenoir,M., Serre,F., Cantin,L., Ahmed,S.H., 2007. Intense sweetness surpasses cocaine reward. *PLoS. One.*, 2, e698.
- Li,M.D., Burmeister,M., 2009. New insights into the genetics of addiction. *Nat. Rev. Genet.*, 10, 225-231.
- Loewenstein-Lichtenstein,Y., Schwarz,M., Glick,D., Norgaard-Pedersen,B., Zakut,H., Soreq,H., 1995. Genetic predisposition to adverse consequences of anti-cholinesterases in 'atypical' BCHE carriers. *Nat. Med.*, 1, 1082-1085.
- Lohoff,F.W., Bloch,P.J., Hodge,R., Nall,A.H., Ferraro,T.N., Kampman,K.M., Dackis,C.A., O'Brien,C.P., Pettinati,H.M., Oslin,D.W., 2010. Association analysis between polymorphisms in the dopamine D2 receptor (DRD2) and dopamine transporter (DAT1) genes with cocaine dependence. *Neurosci. Lett.*, 473, 87-91.
- Magura,S., Kang,S.Y., 1996. Validity of self-reported drug use in high risk populations: a meta-analytical review. *Subst. Use. Misuse.*, 31, 1131-1153.
- Malecki,M.T., Klupa,T., 2005. Type 2 diabetes mellitus: from genes to disease. *Pharmacol. Rep.*, 57 Suppl, 20-32.
- Martins,V.C.; 2011. Redistribuição da cocaína e sua influência na neuroquímica post mortem. Doutorado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

- McGuire, M.C., Nogueira, C.P., Bartels, C.F., Lightstone, H., Hajra, A., van der Spek, A.F., Lockridge, O., La Du, B.N., 1989. Identification of the structural mutation responsible for the dibucaine-resistant (atypical) variant form of human serum cholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 86, 953-957.
- Meller, W.H., Rinehart, R., Cadoret, R.J., Troughton, E., 1988. Specific familial transmission in substance abuse. *Int. J. Addict.*, 23, 1029-1039.
- Merikangas, K.R., Conway, K.P., Swendsen, J., Febo, V., Dierker, L., Brunetto, W., Stolar, M., Canino, G., 2009. Substance use and behaviour disorders in Puerto Rican youth: a migrant family study. *J. Epidemiol. Community Health*, 63, 310-316.
- Merikangas, K.R., Kalaydjian, A., 2007. Magnitude and impact of comorbidity of mental disorders from epidemiologic surveys. *Curr. Opin. Psychiatry*, 20, 353-358.
- Merikangas, K.R., Mehta, R.L., Molnar, B.E., Walters, E.E., Swendsen, J.D., Aguilar-Gaziola, S., Bijl, R., Borges, G., Caraveo-Anduaga, J.J., DeWit, D.J., Kolody, B., Vega, W.A., Wittchen, H.U., Kessler, R.C., 1998a. Comorbidity of substance use disorders with mood and anxiety disorders: results of the International Consortium in Psychiatric Epidemiology. *Addict. Behav.*, 23, 893-907.
- Merikangas, K.R., Stolar, M., Stevens, D.E., Goulet, J., Preisig, M.A., Fenton, B., Zhang, H., O'Malley, S.S., Rounsaville, B.J., 1998b. Familial transmission of substance use disorders. *Arch. Gen. Psychiatry*, 55, 973-979.
- Messas, G., Meira-Lima, I., Turchi, M., Franco, O., Guindalini, C., Castelo, A., Laranjeira, R., Vallada, H., 2005. Association study of dopamine D2 and D3 receptor gene polymorphisms with cocaine dependence. *Psychiatr. Genet.*, 15, 171-174.
- Mikami, L.R., Wieseler, S., Souza, R.L., Schopfer, L.M., Nachon, F., Lockridge, O., Chautard-Freire-Maia, E.A., 2008. Five new naturally occurring mutations of the BCHE gene and frequencies of 12 butyrylcholinesterase alleles in a Brazilian population. *Pharmacogenet. Genomics.*, 18, 213-218.
- Moore, J.H., 2010. Detecting, characterizing, and interpreting nonlinear gene-gene interactions using multifactor dimensionality reduction. *Adv. Genet.*, 72, 101-116.
- Moore, J.H., Williams, S.M., 2009. Epistasis and its implications for personal genetics. *Am. J. Hum. Genet.*, 85, 309-320.
- Motsinger, A.A., Ritchie, M.D., 2006. Multifactor dimensionality reduction: an analysis strategy for modelling and detecting gene-gene interactions in human genetics and pharmacogenomics studies. *Hum. Genomics*, 2, 318-328.
- Munafo, M.R., Matheson, I.J., Flint, J., 2007. Association of the DRD2 gene Taq1A polymorphism and alcoholism: a meta-analysis of case-control studies and evidence of publication bias. *Mol. Psychiatry*, 12, 454-461.

- Negrão,A.B., Vallada,H., 2012. Genética e Epigenética da Dependência de Crack. In: M.Ribeiro & R.Laranjeira (Eds.), O Tratamento Do Usuário De Crack, Artmed, Porto Alegre, pp. 170-179.
- O'Connor,E.C., Chapman,K., Butler,P., Mead,A.N., 2011. The predictive validity of the rat self-administration model for abuse liability. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 35, 912-938.
- Paloyelis,Y., Asherson,P., Mehta,M.A., Faraone,S.V., Kuntsi,J., 2010. DAT1 and COMT effects on delay discounting and trait impulsivity in male adolescents with attention deficit/hyperactivity disorder and healthy controls. *Neuropsychopharmacology*, 35, 2414-2426.
- Pechansky,F., von,D.L., Kessler,F., Hirakata,V., Metzger,D., Woody,G.E., 2003. Preliminary estimates of human immunodeficiency virus prevalence and incidence among cocaine abusers of Porto Alegre, Brazil. *J. Urban. Health*, 80, 115-126.
- Phillips,P.C., 2008. Epistasis--the essential role of gene interactions in the structure and evolution of genetic systems. *Nat. Rev. Genet.*, 9, 855-867.
- Pitkanen,T., Lyyra,A.L., Pulkkinen,L., 2005. Age of onset of drinking and the use of alcohol in adulthood: a follow-up study from age 8-42 for females and males. *Addiction*, 100, 652-661.
- Prata,D.P., Mechelli,A., Fu,C.H., Picchioni,M., Touloupoulou,T., Bramon,E., Walshe,M., Murray,R.M., Collier,D.A., McGuire,P., 2009. Epistasis between the DAT 3' UTR VNTR and the COMT Val158Met SNP on cortical function in healthy subjects and patients with schizophrenia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 106, 13600-13605.
- Prescott,C.A., Sullivan,P.F., Kuo,P.H., Webb,B.T., Vittum,J., Patterson,D.G., Thiselton,D.L., Myers,J.M., Devitt,M., Halberstadt,L.J., Robinson,V.P., Neale,M.C., van den Oord,E.J., Walsh,D., Riley,B.P., Kendler,K.S., 2006. Genomewide linkage study in the Irish affected sib pair study of alcohol dependence: evidence for a susceptibility region for symptoms of alcohol dependence on chromosome 4. *Mol. Psychiatry*, 11, 603-611.
- Raveh,L., Grunwald,J., Marcus,D., Papier,Y., Cohen,E., Ashani,Y., 1993. Human butyrylcholinesterase as a general prophylactic antidote for nerve agent toxicity. In vitro and in vivo quantitative characterization. *Biochem. Pharmacol.*, 45, 2465-2474.
- Raygani,A.V., Zahrai,M., Soltanzadeh,A., Doosti,M., Javadi,E., Pourmotabbed,T., 2004. Analysis of association between butyrylcholinesterase K variant and apolipoprotein E genotypes in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.*, 371, 142-146.
- Reboussin,B.A., Anthony,J.C., 2006. Is there epidemiological evidence to support the idea that a cocaine dependence syndrome emerges soon after onset of cocaine use? *Neuropsychopharmacology*, 31, 2055-2064.

Reich,T., Edenberg,H.J., Goate,A., Williams,J.T., Rice,J.P., Van,E.P., Foroud,T., Hesselbrock,V., Schuckit,M.A., Bucholz,K., Porjesz,B., Li,T.K., Conneally,P.M., Nurnberger,J.I., Jr., Tischfield,J.A., Crowe,R.R., Cloninger,C.R., Wu,W., Shears,S., Carr,K., Crose,C., Willig,C., Begleiter,H., 1998. Genome-wide search for genes affecting the risk for alcohol dependence. *Am. J. Med. Genet.*, 81, 207-215.

Reynolds,B., 2006. A review of delay-discounting research with humans: relations to drug use and gambling. *Behav. Pharmacol.*, 17, 651-667.

Rhee,S.H., Waldman,I.D., 2002. Genetic and environmental influences on antisocial behavior: a meta-analysis of twin and adoption studies. *Psychol. Bull.*, 128, 490-529.

Ribeiro,M., Dunn,J., Laranjeira,R., Sesso,R., 2004. High mortality among young crack cocaine users in Brazil: a 5-year follow-up study. *Addiction*, 99, 1133-1135.

Ritchie,M.D., 2011. Using Biological Knowledge to Uncover the Mystery in the Search for Epistasis in Genome-Wide Association Studies. *Annals of Human Genetics*, 75, 172-182.

Saccone,N.L., Culverhouse,R.C., Schwantes-An,T.H., Cannon,D.S., Chen,X., Cichon,S., Giegling,I., Han,S., Han,Y., Keskitalo-Vuokko,K., Kong,X., Landi,M.T., Ma,J.Z., Short,S.E., Stephens,S.H., Stevens,V.L., Sun,L., Wang,Y., Wenzlaff,A.S., Aggen,S.H., Breslau,N., Broderick,P., Chatterjee,N., Chen,J., Heath,A.C., Heliövaara,M., Hoft,N.R., Hunter,D.J., Jensen,M.K., Martin,N.G., Montgomery,G.W., Niu,T., Payne,T.J., Peltonen,L., Pergadia,M.L., Rice,J.P., Sherva,R., Spitz,M.R., Sun,J., Wang,J.C., Weiss,R.B., Wheeler,W., Witt,S.H., Yang,B.Z., Caporaso,N.E., Ehringer,M.A., Eisen,T., Gapstur,S.M., Gelernter,J., Houlston,R., Kaprio,J., Kendler,K.S., Kraft,P., Leppert,M.F., Li,M.D., Madden,P.A., Nothen,M.M., Pillai,S., Rietschel,M., Rujescu,D., Schwartz,A., Amos,C.I., Bierut,L.J., 2010. Multiple independent loci at chromosome 15q25.1 affect smoking quantity: a meta-analysis and comparison with lung cancer and COPD. *PLoS. Genet.*, 6.

Schwarz,M., Glick,D., Loewenstein,Y., Soreq,H., 1995. Engineering of human cholinesterases explains and predicts diverse consequences of administration of various drugs and poisons. *Pharmacol. Ther.*, 67, 283-322.

Sesack,S.R., Grace,A.A., 2010. Cortico-Basal Ganglia reward network: microcircuitry. *Neuropsychopharmacology*, 35, 27-47.

Shumay,E., Chen,J., Fowler,J.S., Volkow,N.D., 2011. Genotype and ancestry modulate brain's DAT availability in healthy humans. *PLoS. One.*, 6, e22754.

Shumay,E., Fowler,J.S., Volkow,N.D., 2010. Genomic features of the human dopamine transporter gene and its potential epigenetic States: implications for phenotypic diversity. *PLoS. One.*, 5, e11067.

Silveira,C.M., Viana,M.C., Siu,E.R., de Andrade,A.G., Anthony,J.C., Andrade,L.H., 2011. Sociodemographic correlates of transitions from alcohol use to disorders and

remission in the Sao Paulo megacity mental health survey, Brazil. *Alcohol Alcohol*, 46, 324-332.

Stapleton, J.A., Sutherland, G., O'Gara, C., 2007. Association between dopamine transporter genotypes and smoking cessation: a meta-analysis. *Addict. Biol.*, 12, 221-226.

Steffensen, S.C., Svingos, A.L., Pickel, V.M., Henriksen, S.J., 1998. Electrophysiological characterization of GABAergic neurons in the ventral tegmental area. *J. Neurosci.*, 18, 8003-8015.

Swendsen, J., Conway, K.P., Degenhardt, L., Glantz, M., Jin, R., Merikangas, K.R., Sampson, N., Kessler, R.C., 2010. Mental disorders as risk factors for substance use, abuse and dependence: results from the 10-year follow-up of the National Comorbidity Survey. *Addiction*, 105, 1117-1128.

Swendsen, J., LeMoal, M., 2011. Individual vulnerability to addiction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1216, 73-85.

Szapocznik, J., Prado, G., Burlew, A.K., Williams, R.A., Santisteban, D.A., 2007. Drug abuse in African American and Hispanic adolescents: culture, development, and behavior. *Annu. Rev. Clin. Psychol.*, 3, 77-105.

Tabor, H.K., Risch, N.J., Myers, R.M., 2002. Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. *Nat. Rev. Genet.*, 3, 391-397.

Thorgeirsson, T.E., Gudbjartsson, D.F., Surakka, I., Vink, J.M., Amin, N., Geller, F., Sulem, P., Rafnar, T., Esko, T., Walter, S., Gieger, C., Rawal, R., Mangino, M., Prokopenko, I., Magi, R., Keskitalo, K., Gudjonsdottir, I.H., Gretarsdottir, S., Stefansson, H., Thompson, J.R., Aulchenko, Y.S., Nelis, M., Aben, K.K., den, H.M., Dirksen, A., Ashraf, H., Soranzo, N., Valdes, A.M., Steves, C., Uitterlinden, A.G., Hofman, A., Tonjes, A., Kovacs, P., Hottenga, J.J., Willemsen, G., Vogelzangs, N., Doring, A., Dahmen, N., Nitz, B., Pergadia, M.L., Saez, B., De, D., V, Lezcano, V., Garcia-Prats, M.D., Ripatti, S., Perola, M., Kettunen, J., Hartikainen, A.L., Pouta, A., Laitinen, J., Isohanni, M., Huei-Yi, S., Allen, M., Krestyaninova, M., Hall, A.S., Jones, G.T., van Rij, A.M., Mueller, T., Dieplinger, B., Haltmayer, M., Jonsson, S., Matthiasson, S.E., Oskarsson, H., Tyrfingsson, T., Kiemeny, L.A., Mayordomo, J.I., Lindholt, J.S., Pedersen, J.H., Franklin, W.A., Wolf, H., Montgomery, G.W., Heath, A.C., Martin, N.G., Madden, P.A., Giegling, I., Rujescu, D., Jarvelin, M.R., Salomaa, V., Stumvoll, M., Spector, T.D., Wichmann, H.E., Metspalu, A., Samani, N.J., Penninx, B.W., Oostra, B.A., Boomsma, D.I., Tiemeier, H., van Duijn, C.M., Kaprio, J., Gulcher, J.R., McCarthy, M.I., Peltonen, L., Thorsteinsdottir, U., Stefansson, K., 2010. Sequence variants at CHRNA3-CHRNA6 and CYP2A6 affect smoking behavior. *Nat. Genet.*, 42, 448-453.

Tiihonen, J., Hallikainen, T., Lachman, H., Saito, T., Volavka, J., Kauhanen, J., Salonen, J.T., Ryyanen, O.P., Koulu, M., Karvonen, M.K., Pohjalainen, T., Syvalahti, E., Hietala, J., 1999. Association between the functional variant of the catechol-O-methyltransferase (COMT) gene and type 1 alcoholism. *Mol. Psychiatry*, 4, 286-289.

Toga, A.W., Thompson, P.M., Sowell, E.R., 2006. Mapping brain maturation. *Trends Neurosci.*, 29, 148-159.

Tsuang, M.T., Lyons, M.J., Meyer, J.M., Doyle, T., Eisen, S.A., Goldberg, J., True, W., Lin, N., Toomey, R., Eaves, L., 1998. Co-occurrence of abuse of different drugs in men: the role of drug-specific and shared vulnerabilities. *Arch. Gen. Psychiatry*, 55, 967-972.

Tysk, C., Lindberg, E., Jarnerot, G., Floderus-Myrhed, B., 1988. Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut*, 29, 990-996.

Vaisi-Raygani, A., Rahimi, Z., Tavilani, H., Pourmotabbed, T., 2010. Butyrylcholinesterase K variant and the APOE-epsilon 4 allele work in synergy to increase the risk of coronary artery disease especially in diabetic patients. *Mol. Biol. Rep.*, 37, 2083-2091.

Valle, A.M., Radic, Z., Rana, B.K., Mahboubi, V., Wessel, J., Shih, P.A., Rao, F., O'Connor, D.T., Taylor, P., 2011. Naturally occurring variations in the human cholinesterase genes: heritability and association with cardiovascular and metabolic traits. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 338, 125-133.

Vandenbergh, D.J., O'Connor, R.J., Grant, M.D., Jefferson, A.L., Vogler, G.P., Strasser, A.A., Kozlowski, L.T., 2007. Dopamine receptor genes (DRD2, DRD3 and DRD4) and gene-gene interactions associated with smoking-related behaviors. *Addict. Biol.*, 12, 106-116.

VanderWeele, T.J., Laird, N.M., 2011. Tests for Compositional Epistasis under Single Interaction-Parameter Models. *Annals of Human Genetics*, 75, 146-156.

Volkow, N.D., Fowler, J.S., Wang, G.J., Baler, R., Telang, F., 2009. Imaging dopamine's role in drug abuse and addiction. *Neuropharmacology*, 56 Suppl 1, 3-8.

Volkow, N.D., Wang, G.J., Fischman, M.W., Foltin, R., Fowler, J.S., Franceschi, D., Franceschi, M., Logan, J., Gatley, S.J., Wong, C., Ding, Y.S., Hitzemann, R., Pappas, N., 2000. Effects of route of administration on cocaine induced dopamine transporter blockade in the human brain. *Life Sci.*, 67, 1507-1515.

Volkow, N.D., Wang, G.J., Fowler, J.S., Tomasi, D., Telang, F., 2011. Addiction: beyond dopamine reward circuitry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 108, 15037-15042.

vonDiemen, L., DeBoni, R., Kessler, F., Benzano, D., Pechansky, F., 2009. Risk behaviors for HCV- and HIV-seroprevalence among female crack users in Porto Alegre, Brazil. *Arch. Womens Ment. Health*.

Wagner, F.A., Anthony, J.C., 2002. Into the world of illegal drug use: exposure opportunity and other mechanisms linking the use of alcohol, tobacco, marijuana, and cocaine. *Am. J. Epidemiol.*, 155, 918-925.

- Washton,A.M., 1989. Cocaine Addiction: Treatment, Recovery, and Relapse Prevention. 1 edn. W.W.Norton & Company, New York.
- Wellcome Trust Case Control Consortium, 2007. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*, 447, 661-678.
- WHO, 2007. Trends in World Drug Markets. Viena, UNODCCP, 17-11-2009b.
- Winters,K.C., Fawkes,T., Fahnhorst,T., Botzet,A., August,G., 2007. A synthesis review of exemplary drug abuse prevention programs in the United States. *J. Subst. Abuse Treat.*, 32, 371-380.
- Wise,R.A., Rompre,P.P., 1989. Brain dopamine and reward. *Annu. Rev. Psychol.*, 40, 191-225.
- Yacubian,J., Sommer,T., Schroeder,K., Glascher,J., Kalisch,R., Leuenberger,B., Braus,D.F., Buchel,C., 2007. Gene-gene interaction associated with neural reward sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 104, 8125-8130.
- Yang,P., Ho,J.W., Zomaya,A.Y., Zhou,B.B., 2010. A genetic ensemble approach for gene-gene interaction identification. *BMC. Bioinformatics.*, 11, 524.
- Young,S.E., Rhee,S.H., Stallings,M.C., Corley,R.P., Hewitt,J.K., 2006. Genetic and environmental vulnerabilities underlying adolescent substance use and problem use: general or specific? *Behav. Genet.*, 36, 603-615.
- Yu,Y., Kranzler,H.R., Panhuysen,C., Weiss,R.D., Poling,J., Farrer,L.A., Gelernter,J., 2008. Substance dependence low-density whole genome association study in two distinct American populations. *Hum. Genet.*, 123, 495-506.
- Zhang,P.W., Ishiguro,H., Ohtsuki,T., Hess,J., Carillo,F., Walther,D., Onaivi,E.S., Arinami,T., Uhl,G.R., 2004. Human cannabinoid receptor 1: 5' exons, candidate regulatory regions, polymorphisms, haplotypes and association with polysubstance abuse. *Mol. Psychiatry*, 9, 916-931.
- Zheng,F., Yang,W., Ko,M.C., Liu,J., Cho,H., Gao,D., Tong,M., Tai,H.H., Woods,J.H., Zhan,C.G., 2008. Most efficient cocaine hydrolase designed by virtual screening of transition states. *J. Am. Chem. Soc.*, 130, 12148-12155.
- Zuo,L., Kranzler,H.R., Luo,X., Covault,J., Gelernter,J., 2007. CNR1 variation modulates risk for drug and alcohol dependence. *Biol. Psychiatry*, 62, 616-626.
- Zuo,L., Kranzler,H.R., Luo,X., Yang,B.Z., Weiss,R., Brady,K., Poling,J., Farrer,L., Gelernter,J., 2009. Interaction between two independent CNR1 variants increases risk for cocaine dependence in European Americans: a replication study in family-based sample and population-based sample. *Neuropsychopharmacology*, 34, 1504-1513.

11. Apêndice

APÊNDICE 1. Facsimile da submissão e protocolo de aceite da submissão de ms e texto do manuscrito

Correio :: Acknowledgement of Receipt

<https://webmail.usp.br/horde/dimp/message.php?folder=INBOX&uid=1327>

Assunto: Acknowledgement of Receipt

Data: 27 Dec 2011 04:45:03 -0500 [07:45:03 BRST]

De: Journal of Molecular Neuroscience <lorievic.hayag@springer.com>

Para: André Brooking Negrão <abnegrao@usp.br>

Dear Dr. André Brooking Negrão:

Thank you for submitting your manuscript, "Association of BCHE genetic variants with cocaine dependence and related phenotypes", to Journal of Molecular Neuroscience.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the following web site:

<http://jomn.edmgr.com/>

Your username is: abnegrao

Your password is: negrão764

with kind regards,

The Editorial Office
Journal of Molecular Neuroscience

APÊNDICE 2

Journal of Molecular Neuroscience
Association of BCHE genetic variants with cocaine dependence and related phenotypes
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Association of BCHE genetic variants with cocaine dependence and related phenotypes
Article Type:	Original Research
Keywords:	cocaine; butyrylcholinesterase; polymorphisms; crack; individual vulnerability; SNP; BCHE; K-variant; substance dependence
Corresponding Author:	André Brooking Negrão, M.D. University of São Paulo São Paulo, SP BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	University of São Paulo
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	André Brooking Negrão, M.D.
First Author Secondary Information:	
All Authors:	André Brooking Negrão, M.D. Alexandre C Pereira, M.D., Ph.D. Camila Guindalini, Ph.D. Guilherme Messas, M.D., Ph.D. Ronaldo Laranjeira, M.D., Ph.D. Homero Vallada, M.D., Ph.D.
All Authors Secondary Information:	
Abstract:	The search for genetic vulnerability factors in cocaine dependence has focused the on the role of the neuroplasticity associated with addiction but the individual ability to metabolize cocaine can also contribute to the susceptibility of dependence. Butyrylcholinesterase (BChE) metabolizes cocaine and genetic variants of the BCHE gene cause changes in its catalytic activity. Therefore, carriers of genetic polymorphisms may show diverse addictive behaviors due to varying cocaine plasma concentrations. Since users have equal access to both crack and powder cocaine but show a preference for a specific route of administration, polymorphisms may also influence the preference. We hypothesize that genetic variations in the BCHE gene can be risk factors for cocaine dependence and also, for the preferred route of cocaine administration. 698 cocaine dependence patients and 738 controls were genotyped for three single nucleotide polymorphisms (SNP) in the BCHE gene (rs1803274, rs4263329, rs4680662). A nominal association was found for rs4263329 between cases and controls and an association was found between the functional SNP rs1803274 in exclusively crack cocaine users compared to powder cocaine users (p=0.027; OR=4.36; CI 95%=1.18 - 16.04). Genotypes from the other markers and allele frequencies did not differ between cases and controls, neither did they differ between cocaine subgroups. The present finding indicates that the AA genotype in rs1803274 can be a risk factor for the more addictive crack cocaine use. Independent studies are required to confirm the role of BCHE genetic markers in cocaine dependence.

Association of BCHE genetic variants with cocaine dependence and related phenotypes

*Negrão¹, Andre B.; Pereira², Alexandre C.; Guindalini, Camila^{3,4}; Messas, Guilherme⁵, Laranjeira, Ronaldo⁶, Vallada, Homero¹

¹ Program of Genetics and Pharmacogenetics, Department and Institute of Psychiatry, University of São Paulo Medical School, São Paulo, Brazil

² Laboratory of Genetic and Molecular Cardiology/LIM-13, Heart Institute (InCor), University of São Paulo Medical School, São Paulo, Brazil

³Department of Psychobiology - Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil

⁴Laboratório de Neurociências Clínicas-Departamento de Psiquiatria - Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil

⁵Public Health School, University of São Paulo, Brazil

⁶Alcohol and Drug Research Unit, Psychiatry Department, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil

*André Brooking Negrão
Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, s/n,
CEP 05430-010 São Paulo-SP, Brazil
Phone +55(11) 3069-6977
Cell Phone: +55(11) 8456-0779
e-mail: abnegrao@usp.br

ABSTRACT

The search for genetic vulnerability factors in cocaine dependence has focused on the role of the neuroplasticity associated with addiction but the individual ability to metabolize cocaine can also contribute to the susceptibility of dependence. Butyrylcholinesterase (BChE) metabolizes cocaine and genetic variants of the BCHE gene cause changes in its catalytic activity. Therefore, carriers of genetic polymorphisms may show diverse addictive behaviors due to varying cocaine plasma concentrations. Since users have equal access to both crack and powder cocaine but

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

show a preference for a specific route of administration, polymorphisms may also influence the preference. We hypothesize that genetic variations in the BCHE gene can be risk factors for cocaine dependence and also, for the preferred route of cocaine administration. 698 cocaine dependence patients and 738 controls were genotyped for three single nucleotide polymorphisms (SNP) in the BCHE gene (rs1803274, rs4263329, rs4680662). A nominal association was found for rs4263329 between cases and controls and an association was found between the functional SNP rs1803274 in exclusively crack cocaine users compared to powder cocaine users ($p=0.027$; $OR=4.36$; $CI\ 95\%=1.18 - 16.04$). Genotypes from the other markers and allele frequencies did not differ between cases and controls, neither did they differ between cocaine subgroups. The present finding indicates that the AA genotype in rs1803274 can be a risk factor for the more addictive crack cocaine use. Independent studies are required to confirm the role of BCHE genetic markers in cocaine dependence.

Keywords: cocaine; butyrylcholinesterase; polymorphisms; crack; individual vulnerability; SNP; BCHE; K-variant; substance dependence

INTRODUCTION

Cocaine addiction is a complex behaviour that arises from the interaction of genetic and environmental risk factors. Twin studies indicate that the heritability of cocaine addiction is around 60% and fits a complex polygenic model (Kendler, 2000).

Cocaine potently binds the dopamine transporter and this blockade of dopamine reuptake is perhaps the key factor leading to cocaine addiction (Dackis, 2001). In fact, several studies demonstrated that genetic markers in dopaminergic brain systems are associated with cocaine dependence (Guindalini, 2006a; Fernandez-Castillo, 2010; Lohoff, 2010). Nevertheless, many of those markers are associated with other psychiatric disorders or substance dependences other than cocaine related problems so they may not be specific genetic markers for cocaine dependence (Stapleton, 2007; Munafo, 2007; Genro, 2008). There is support from twin studies that there is both a general and a drug-specific heritability for substance dependence thus, indicating the contribution of specific genetic markers to the susceptibility to distinct drug dependence (Tsuang, 1998; Kendler, 2007). In fact, several polymorphisms were found to be associated with cocaine dependence phenotype in one of the largest cocaine dependence sample currently under investigation, including markers related to the dopaminergic reward system as well as other biochemical pathways (Guindalini, 2006a; Bilbao, 2008; Dixon, 2010).

Cocaine users can also be distinguished according to the preferred route of cocaine administration: crack, powder cocaine, injected cocaine or a combination of any of these (Guindalini, 2006b). Those subgroups are associated with specific characteristics: progression of use, difference in degrees of abuse liability, propensity of dependence and treatment response (Gossop, 1994; Chen, 2004). It is argued that crack cocaine has

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

a greater reinforcing activity than snorted cocaine due to the shorter peak effect period and increased concentrations reaching the central nervous system (Volkow, 2000). Nevertheless, patients with cocaine dependence have a preferred route of administration despite the fact of being exposed to and having tried both forms (Guindalini, 2006b). Therefore, the preferred route of administration can represent a distinct phenotype among cocaine users and should be taken into account while investigating the individual genetic susceptibility of cocaine use and abuse. Finally, another limitation from previous studies on the genetic susceptibility to cocaine dependence, as well as other complex disorders is that the polymorphisms in genes already described explain only a fraction of the heritability variance to cocaine dependence. Therefore, studies are needed to investigate more genetic markers associated with the susceptibility to cocaine dependence, particularly those that may be specific to this disorder (Bierut, 2011).

Pharmacogenomic effects, particularly, genetic factors that interfere with cocaine plasma concentration could play a role in cocaine susceptibility and have not been studied so far. Once absorbed, cocaine is rapidly transformed in two main metabolites, benzoilecgonine and methyl ester ecgonine, both pharmacologically inactive (Blaho, 2000). The hydrolysis that leads to the formation of methyl ester ecgonine is catalyzed by BChE which is an enzyme involved in the metabolism of drugs like cocaine and others such as heroin, several local anaesthetics and, short-acting muscle relaxants (Kamendulis, 1996). BChE is synthesized primarily in the liver and is distributed in the intestinal mucosa, blood plasma and the white matter of the central nervous system (Goodall, 2004). The enzyme is coded by the butyrylcholinesterase gene (BCHE) which is located on chromosome 3q26 (Allderdice, 1991). The genomic region for BCHE spans about 70 kb and has four exons and three large introns (Arpagaus, 1990). Over 65 mutations of the BCHE have been identified, but not all of them have been fully studied

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

(Mikami, 2008). In general, these mutations produce enzymes with lower levels of catalytic activity compared to the wild-type (McGuire, 1989). BChE has also been tested as a novel therapeutic agent for cocaine dependence. Brimijoin et al, 2008 demonstrated that a quadruple mutant hydrolase derived from human BChE suppressed cocaine toxicity and abolished drug-primed reinstatement in rats (Brimijoin, 2008). Our working hypothesis is that polymorphisms in the BCHE gene can lead to different enzyme profiles generating individuals with increased/decreased susceptibility to engage in addictive behaviors due to varying concentrations of cocaine reaching the reward system in the brain.

In this study we investigated if genetic variations in the BCHE gene can be risk factors for cocaine dependence in a sample of Brazilian patients whose primary drug of abuse was cocaine. Additionally, we also investigated if those same genetic markers were associated with the preferred route of cocaine administration, snorted cocaine, crack use or both.

MATERIAL AND METHODS

The patient sample consisted of 698 cocaine-dependent patients [mean age 26.8 ± 7.2 years and 96% males (n=669)] recruited and evaluated as inpatient and outpatients from seven units for drug dependence treatment in São Paulo, Brazil. They fulfilled ICD-10 criteria for cocaine dependence and were subjected to a screening interview designed specifically for the Brazilian population upon study entry that included sociodemographic and drug use related questions (Dunn, 2000).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Seven hundred and thirty eight unrelated controls [mean age 31.3±9.8 years and 68% males (n=501)] were recruited from the Blood Donation Center of the Fundação Pró-Sangue/University of São Paulo Medical School. Exclusion criteria were a past history of drug abuse or recent use of abusive substance, a history of psychiatric inpatient treatment or a current psychiatric condition. Ethnicity was determined by self-report.

In order to conduct a comparative analysis according to the route of cocaine administration the patient sample was divided in the subgroups: 1) Powder Cocaine Users, individuals who used powder cocaine, commonly snorted; 2) Crack Cocaine Users, individuals who used the freebase processed cocaine hydrochloride commonly known as "crack" which is smoked in small pipes and, 3) Dual users, individuals who reported using both forms of cocaine. A detailed description of the above subgroups can be found in Guindalini et al, 2006 (Guindalini, 2006b).

All participants provided written informed consent. Ethical approval for the study was obtained from the Ethics Committee at the Hospital das Clínicas, University of São Paulo Medical School (CAPPesq).

Genotyping

Genomic DNA was extracted through standard methods from blood samples collected in tubes containing ethylenediamineteraacetic acid. One of the SNPs, rs1803274 was selected because it is a common variant, known as K-variant, that leads to a functional decrease in the enzyme activity (McGuire, 1989). The other two SNPs (rs4263329, rs4680662) were selected based on linkage disequilibrium (LD) structure of the gene, SNP allele frequency and, available HapMap data. Genotyping was made

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

under contract by Prevention Genetics (Marshfield, USA, <http://www.preventiongenetics.com/>). Hardy –Weinberg equilibrium (HWE) was assessed for all genotypes using the Haploview software (Barrett, 2005). QUANTO software was used to estimate the statistical power of the sample assuming an odds ratio (OR) of 1.5, a disease prevalence of 0.03, a calculated average Minor Allele Frequency of 0.27 and a significance level of 0.05 (Gauderman, 2002; Gauderman, 2006).

A general test of association (the two degree-of-freedom test of genotypic association) and three individual contrasts defined by a priori genetic models (additive, dominant, and recessive) were computed. Explanatory variables in the dominant and recessive models were binary. Logistic regression was used to adjust for age and sex. Linkage disequilibrium and haplotype frequencies were estimated using the Haploview software (version 4.2). Haplotype blocks were identified using the solid spine of LD method in Haploview. Correction for multiple testing was performed using permutation correction by the Haploview program. For the single marker analysis, 10,000 permutations were carried out to estimate the significance of the best results, correcting for the three loci tested. Chi-square tests, ORs and confidence intervals (CI) were estimated using SPSS v17.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

RESULTS

A summary of sociodemographic and clinical characteristics are depicted in Table 01. Patients and controls differ significantly as to gender and age. Most patients used cannabis, were smokers, roughly half of them ingested more than 50 units of alcohol per week and were in prison at least once in their life. The predominant preferred forms of administration were powder cocaine for 23% of the participants, crack cocaine for 9%

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

while the majority, 68%, reported using both routes concurrently. None of the allele distributions deviated significantly from those expected by Hardy–Weinberg equilibrium for cases or controls (Table 02). Adopting a recessive model of transmission, the GG genotype in rs4263329 was less frequently seen in cases ($f(GG)=1,2\%$) than in controls ($f(GG)=2,6\%$), OR 2.3 (95% CI 0.99-5.32) (Table 02). After adjustment for age and gender, this association was no longer significant ($p > 0.1$).

Genotypes from the other two markers and allele frequencies for the three markers did not differ between cases and controls (Table 02). LD measures and haplotype blocks across the BCHE gene did not produce any evidence for association with disease (data not shown). Results of the general tests of association for the preferred route of cocaine administration can be seen in Table 3. The marker rs1803274 was the only one associated with distinct genotypes among the three groups of cocaine users. The recessive model (genotype AA) accounted best for the significant difference between crack users and powder cocaine users ($p=0.027$; OR=4.36; CI 95%=1.18 – 16.04) and between crack users and dual cocaine users ($p=0.001$; OR=5.83; CI95%=2.10 – 16.16). Significant levels were maintained after age and gender adjustment (data not shown).

DISCUSSION

The distribution of three SNPs in the BCHE gene in a Brazilian sample of 698 cocaine dependence patients and 738 controls were compared. One marker, rs4263329 showed nominal evidence of association between patients and controls and was correlated with a protective effect. We also found a significant association between rs1803274 and crack cocaine as the preferred route of administration among cocaine

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

dependence patients. To our knowledge, this is the first report of associations of this kind.

To date, the present sample is one of the largest sample of crack/cocaine patients described in the literature to be under investigation for genetic susceptibility for cocaine dependence (Ballon, 2007). Confounding factors such as age and sex were controlled in order to ascertain that the association was not due to bias. As opposed to other studies investigating the association of genetic markers and cocaine dependence where subgrouping the sample was infrequently addressed, subjects in this study were assorted by being either crack, snorted cocaine or, both users (Gelernter, 2005; Guindalini, 2006b). This measure decreases sample heterogeneity that frequently hinders the power in genetic association studies. Another confounding factor in previous studies is the association of other drug dependence, mostly alcohol and heroin dependence. Alcohol dependence was excluded and heroin dependence is rare in Brazil and less than 1% of our sample used heroin. The fact that this is a homogenous sample when it comes to cocaine use strengthens the specificity of any genetic association found as related to the condition of cocaine use per se. From a statistical stand, our sample had a power of 88% of detecting true associations.

One of the markers investigated in our study, the rs1803274 was not associated with cocaine dependence per se but was associated with the subgroup that smoked cocaine as their preferred route of administrating the drug. This marker was previously shown to be associated with behavioral and medical conditions but we could not find any study where substance dependence or other psychiatric comorbidities associated with drug related problems were investigated (Raygani, 2004; Vaisi-Raygani, 2010). The fact that we found an association only when the whole sample was broken into subgroups is not unique. Farrer et al, 2009 found an association with a genetic marker in cocaine

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

dependence when they subgrouped their sample into those who had experienced psychotic symptoms during episodes of cocaine intoxication and those who had not (Farrer, 2009). Because cocaine dependent subjects constitute a heterogeneous group not only from a genetic background but also from a clinical perspective it is useful to study them in meaningful subgroups. Guindalini et al, 2006, demonstrated that dual users, the users of both snorted and crack cocaine had distinct clinical features compared to crack or cocaine strict users (Guindalini, 2006b). Allele frequencies for rs1803274 are almost equal to the values in Hapmap for the CEU population and we found a greater frequency of the AA genotype when cases and controls were taken together, 3.3% compared to 1.7% in the CEU population. The other two markers investigated were infrequently used in association studies. Howard et al, 2010, tested 12 SNPs in the BCHE gene and did not find the SNPs rs4680663 to be associated with cholinesterase activity in farmers exposed to orgophosphorates (Howard, 2010). We could not find any study using SNPs rs4263329 as a marker in association studies.

As with any genetic association study, some limitations must be addressed. Firstly, although we found a nominal association with marker rs4263329, it does not hold true after adjusting for gender and age, therefore these results are not statistically significant but they are interesting and warrant further studies in additional comparable populations. Secondly, our sample size, although large for an illegal substance clinical sample, it may be small for a genetic association study looking for a susceptibility gene with a small magnitude effect. Thirdly, the marker reported here to be associated with crack cocaine exclusive users was correlated with functional enzymatic alterations in other studies but we did not obtain any cholinesterase measures to make a firm functional correlation between carrying the marker and its function in patients and controls (Mikami, 2008; Howard, 2010). In the same token, we did not have objective

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

cocaine use parameters such as toxicological measurements of cocaine in hair or urine. The subjective ratings reported by cocaine subjects are known to be not reliable markers of true amounts and frequency of illegal substance use and that holds true for non dependent subject, such as our controls (Magura, 1996). If a bias existed, that is, controls underreporting cocaine use and dependence that would have decreased the strength of the association found in this study. Finally, it is possible that the SNP in BCHE that is associated with a vulnerability status in crack users may not be the actual causative SNPs; instead, other nearby SNPs in LD—or a combination of SNPs (e.g., a haplotype)—are likely to be responsible. Further studies in additional populations or sequencing this region in this very same sample are required to determine the true genetic contributors in this genomic region.

Common variants have been associated with altered cholinesterase activity in samples drawn from the community (Howard, 2010). SNP rs1803274 is a common variant and the A allele leads to a point mutation at nucleotide 1615 that changes codon 539 from GCA (ala) to ACA (thr) (Bartels, 1992). Carriers of the A allele have a 30% reduction of serum butyrylcholinesterase activity. A decreased butyrylcholinesterase activity can lead to an increased cocaine level reaching the reinforcing brain areas therefore augmenting its propensity to lead to dependence. Most cocaine users in Brazil have equal access to crack or powder cocaine from the drug dealer and the AA genotype can, in part, explain the preferred use of crack cocaine. The enzymatic changes, most probably interact with other predisposing factors already identified to be associated with crack dependence and explain part of the genetic vulnerability to this route of administration.

The discovery of susceptibility genetic markers can aid in future pharmacogenomic studies, particularly in cocaine addiction. In fact, two promising pharmacological

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

approaches to treat cocaine dependence rely on decreasing cocaine concentration. Brimjoin et al, 2008, demonstrated that a human modified BChE with increased catalytic action was able to reduce cocaine toxicity and reduce its reinforcing properties in an animal paradigm of cocaine self-administration (Brimjoin, 2008). Additionally, two clinical trials showed the detected anti-body against a cocaine related vaccine was associated with lower rates of positive cocaine urine samples (Kinsey, 2010). One of the main goals in the substance dependence treatment field is to better adjust the available and effective treatments to individual characteristics in order to optimize response rates. If a designed treatment, as those that aim at pharmacokinetic characteristics in cocaine using subjects will become widely available in the future it seems reasonable to test for differential response rates in those subjects carrying BCHE and other cholinesterase polymorphisms.

In a broader sense, the biological system is prepared to handle toxins that come into contact with the individual and BChE is one example of numerous enzymes serving as a scavengers of many of these toxins (Schwarz, 1995). Cocaine is an ethy ester present in its natural form and has been used for centuries by the Native Americans in the Andes. Cocaine leaves are chewed with an alcali, originally in a ritualistic manner and further on as an energy booster to circumvent the high altitudes in the Andes. One possibility is that humans and animals did not develop toxic reactions to cocaine because they were naturally selected to have polymorphisms in their xenobiotic profile that render them less susceptible to the toxic effects of cocaine. Once cocaine was purified and was marketed to a broader population with different xenobiotic profiles, some subjects lacking the natural protection of efficient clearance were thus, susceptible to the toxic and reinforcing properties of cocaine.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Apparently, investigators have already discovered genetic contributions to the susceptibility of cocaine dependence. However, only a small portion of the heritability is explained by those findings (Bierut, 2011). We have evaluated 03 SNPs in the BCHE gene potentially involved in cocaine metabolism. Although we did not find an association between those markers and cocaine dependence per se a strong association was observed with a known functional genotype, the K-variant and a group of cocaine users that preferred the smoked route for drug administration. Additional and independent studies with a broad coverage of the BCHE gene in cocaine dependence samples are required to confirm these initial results.

24 REFERENCES

29 Allderdice P. W., Gardner H. A., Galutira D., Lockridge O., LaDu B. N., and McAlpine P. J. (1991) The cloned butyrylcholinesterase (BCHE) gene maps to a single chromosome site, 3q26. *Genomics*. 2, 452-454.

34 Arpagaus M., Kott M., Vatsis K. P., Bartels C. F., La Du B. N., and Lockridge O. (1990) Structure of the gene for human butyrylcholinesterase. Evidence for a single copy. *Biochemistry*. 1, 124-131.

39 Ballon N., Leroy S., Roy C. and others (2007) Polymorphisms TaqI A of the DRD2, BalI of the DRD3, exon III repeat of the DRD4, and 3' UTR VNTR of the DAT: association with childhood ADHD in male African-Caribbean cocaine dependents? *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 8, 1034-1041.

44 Barrett J. C., Fry B., Maller J., and Daly M. J. (2005) Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 2, 263-265.

48 Bartels C. F., Jensen F. S., Lockridge O. and others (1992) DNA mutation associated with the human butyrylcholinesterase K-variant and its linkage to the atypical variant mutation and other polymorphic sites. *Am. J. Hum. Genet.* 5, 1086-1103.

52 Bierut L. J. (2011) Genetic vulnerability and susceptibility to substance dependence. *Neuron*. 4, 618-627.

56 Bilbao A., Parkitna J. R., Engblom D. and others (2008) Loss of the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase type IV in dopaminergic neurons enhances behavioral effects of cocaine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 45, 17549-17554.

1 Blaho K., Logan B., Winbery S., Park L., and Schwilke E. (2000) Blood cocaine and
2 metabolite concentrations, clinical findings, and outcome of patients presenting to an
3 ED. *Am. J. Emerg. Med.* 5, 593-598.

4 Brimijoin S., Gao Y., Anker J. J. and others (2008) A cocaine hydrolase engineered
5 from human butyrylcholinesterase selectively blocks cocaine toxicity and reinstatement
6 of drug seeking in rats. *Neuropsychopharmacology.* 11, 2715-2725.
7
8

9 Chen C. Y. and Anthony J. C. (2004) Epidemiological estimates of risk in the
10 process of becoming dependent upon cocaine: cocaine hydrochloride powder versus
11 crack cocaine. *Psychopharmacology (Berl).* 1, 78-86.
12

13 Dackis C. A. and O'Brien C. P. (2001) Cocaine dependence: a disease of the brain's
14 reward centers. *J. Subst. Abuse Treat.* 3, 111-117.
15

16 Dixon C. I., Morris H. V., Breen G. and others (2010) Cocaine effects on mouse
17 incentive-learning and human addiction are linked to alpha2 subunit-containing
18 GABAA receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 5, 2289-2294.
19
20

21 Dunn J. and Laranjeira R. (2000) The development of a structured interview to
22 evaluate cocaine use and risk behaviour. *Revista Brasileira de Psiquiatria.* 11-16.
23
24

25 Farrer L. A., Kranzler H. R., Yu Y. and others (2009) Association of variants in
26 MANEA with cocaine-related behaviors. *Arch. Gen. Psychiatry.* 3, 267-274.
27
28

29 Fernandez-Castillo N., Ribases M., Roncero C., Casas M., Gonzalvo B., and
30 Cormand B. (2010) Association study between the DAT1, DBH and DRD2 genes and
31 cocaine dependence in a Spanish sample. *Psychiatr. Genet.* 6, 317-320.
32
33

34 Gauderman W. J. (2002) Sample size calculations for matched case-control studies
35 of gene-environment interaction. *Statistics in Medicine.* 1, 35-50.
36

37 Gauderman W. J. and Morrison J. (2006) QUANTO 1.1: A computer program for
38 power and sample size calculations for genetic-epidemiology studies,
39 <http://hydra.usc.edu/gxe>.
40
41

42 Gelernter J., Panhuysen C., Weiss R. and others (2005) Genomewide linkage scan
43 for cocaine dependence and related traits: significant linkages for a cocaine-related trait
44 and cocaine-induced paranoia. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 1, 45-52.
45
46

47 Genro J. P., Polanczyk G. V., Zeni C. and others (2008) A common haplotype at the
48 dopamine transporter gene 5' region is associated with attention-deficit/hyperactivity
49 disorder. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 8, 1568-1575.
50

51 Goodall R. (2004) Cholinesterase: phenotyping and genotyping. *Ann. Clin. Biochem.*
52 *Pt 2,* 98-110.
53
54

55 Gossop M., Griffiths P., Powis B., and Strang J. (1994) Cocaine: patterns of use,
56 route of administration, and severity of dependence. *Br. J. Psychiatry.* 5, 660-664.
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 Guindalini C., Howard M., Haddley K. and others (2006a) A dopamine transporter
2 gene functional variant associated with cocaine abuse in a Brazilian sample. *Proc. Natl.*
3 *Acad. Sci. U. S. A.* 12, 4552-4557.

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

7
8
9
10 Howard T. D., Hsu F. C., Grzywacz J. G. and others (2010) Evaluation of candidate
11 genes for cholinesterase activity in farmworkers exposed to organophosphorus
12 pesticides: association of single nucleotide polymorphisms in BCHE. *Environ. Health*
13 *Perspect.* 10, 1395-1399.

14
15 Kamendulis L. M., Brzezinski M. R., Pindel E. V., Bosron W. F., and Dean R. A.
16 (1996) Metabolism of cocaine and heroin is catalyzed by the same human liver
17 carboxylesterases. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2, 713-717.

18
19
20 Kendler K. S., Karkowski L. M., Neale M. C., and Prescott C. A. (2000) Illicit
21 psychoactive substance use, heavy use, abuse, and dependence in a US population-
22 based sample of male twins. *Arch. Gen. Psychiatry.* 3, 261-269.

23
24
25 Kendler K. S., Myers J., and Prescott C. A. (2007) Specificity of genetic and
26 environmental risk factors for symptoms of cannabis, cocaine, alcohol, caffeine, and
27 nicotine dependence. *Arch. Gen. Psychiatry.* 11, 1313-1320.

28
29
30 Kinsey B. M., Kosten T. R., and Orson F. M. (2010) Anti-cocaine vaccine
31 development. *Expert. Rev. Vaccines.* 9, 1109-1114.

32
33 Lohoff F. W., Bloch P. J., Hodge R. and others (2010) Association analysis between
34 polymorphisms in the dopamine D2 receptor (DRD2) and dopamine transporter (DAT1)
35 genes with cocaine dependence. *Neurosci. Lett.* 2, 87-91.

36
37
38 Magura S. and Kang S. Y. (1996) Validity of self-reported drug use in high risk
39 populations: a meta-analytical review. *Subst. Use. Misuse.* 9, 1131-1153.

40
41
42 McGuire M. C., Nogueira C. P., Bartels C. F. and others (1989) Identification of the
43 structural mutation responsible for the dibucaine-resistant (atypical) variant form of
44 human serum cholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 3, 953-957.

45
46
47 Mikami L. R., Wieseler S., Souza R. L. and others (2008) Five new naturally
48 occurring mutations of the BCHE gene and frequencies of 12 butyrylcholinesterase
49 alleles in a Brazilian population. *Pharmacogenet. Genomics.* 3, 213-218.

50
51
52 Munafo M. R., Matheson I. J., and Flint J. (2007) Association of the DRD2 gene
53 Taq1A polymorphism and alcoholism: a meta-analysis of case-control studies and
54 evidence of publication bias. *Mol. Psychiatry.* 5, 454-461.

55
56
57 Raygani A. V., Zahrai M., Soltanzadeh A., Doosti M., Javadi E., and Pourmotabbed
58 T. (2004) Analysis of association between butyrylcholinesterase K variant and
59 apolipoprotein E genotypes in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 2-3, 142-146.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Schwarz M., Glick D., Loewenstein Y., and Soreq H. (1995) Engineering of human cholinesterases explains and predicts diverse consequences of administration of various drugs and poisons. *Pharmacol. Ther.* 2, 283-322.

Stapleton J. A., Sutherland G., and O'Gara C. (2007) Association between dopamine transporter genotypes and smoking cessation: a meta-analysis. *Addict. Biol.* 2, 221-226.

Tsuang M. T., Lyons M. J., Meyer J. M. and others (1998) Co-occurrence of abuse of different drugs in men: the role of drug-specific and shared vulnerabilities. *Arch. Gen. Psychiatry.* 11, 967-972.

Vaisi-Raygani A., Rahimi Z., Tavilani H., and Pourmotabbed T. (2010) Butyrylcholinesterase K variant and the APOE-epsilon 4 allele work in synergy to increase the risk of coronary artery disease especially in diabetic patients. *Mol. Biol. Rep.* 4, 2083-2091.

Volkow N. D., Wang G. J., Fischman M. W. and others (2000) Effects of route of administration on cocaine induced dopamine transporter blockade in the human brain. *Life Sci.* 12, 1507-1515.

Table 1 - Characteristics of 698 cocaine dependence patients 738 and control subjects

	Patients	Controls
n	698	738
Age±S.D.	26.8±7.2	31.3±9.8
Age Range	17-56	18-72
Gender		
<i>Male</i>	669 (96%)	501 (68%)
<i>Female</i>	29 (4%)	237 (32%)
Form of Administration		
<i>Powder Cocaine Users</i>	(23%) 160	
<i>Crack Cocaine Users</i>	(9%) 61	
<i>Dual Users</i>	(68%) 477	
Smoking		
<i>Yes</i>	585 (84%)	
<i>No</i>	111 (16%)	
Alcohol		
<i>< 50 units/week</i>	417 (63%)	
<i>> 50 units/week</i>	247 (37%)	
Cannabis		
<i>Never used</i>	23 (3%)	
<i>Ever used</i>	666 (97%)	
Criminal History		
<i>Yes</i>	373 (54%)	
<i>No</i>	324 (46%)	

Criminal history means ever being in prison in their life.

Table 2 - Genotype and allele frequencies of BCHE three markers in cocaine dependence patients and controls and Hardy-Weinberg Equilibrium test (values in parenthesis represent relative frequencies)

	Genotypes			<i>n</i>	Alleles		HWE (<i>p</i>)
	AA	AG	GG		G	A	
rs1803274							
Patients	18 (2,7)	201 (29,7)	457 (67,6)	676	0.82	0.18	1.0
Controls	30 (4,2)	215 (29,8)	477 (66,1)	722			
rs4263329*							
Patients	497 (72.6)	180 (26.3)	8 (1.2)	685	0.14	0.86	1.0
Controls	538 (74.5)	165 (22.9)	19 (2.6)	722			
rs4680662							
Patients	75 (10.9)	317 (46.0)	297 (43.1)	689	0.66	0.34	0.71
Controls	81 (11.6)	316 (45.1)	303 (43.3)	700			

*rs 4263329 GG genotype, $p=0.052$, OR 2.3 (95% CI 0.99 - 5.32).

Table 3 - Genotype frequencies of BCHE three markers in cocaine dependence patients separated by preferred route of administration (*p values refer to the general test of association, values in parenthesis represent relative frequencies)

	Genotypes			n	χ^2	p
	AA	AG	GG			
rs 1803274						
Powder cocaine users	4 (2,6)	45 (29,0)	106 (68,4)	155		
Crack users	6 (10,6)	14 (24,1)	38 (65,5)	58		
Dual users	8 (1,7)	142 (30,7)	313 (67,6)	463		
TOTAL	(2,7)	(29,7)	(67,6)	676	15,20	0,004*
rs 4680662						
Powder cocaine users	16 (10,1)	77 (48,7)	65 (41,1)	158		
Crack users	4 (6,6)	29 (47,5)	28 (45,9)	61		
Dual users	55 (11,7)	211 (44,9)	204 (43,4)	470		
TOTAL	(10,9)	(46,0)	(43,1)	689	2,10	0,718
rs 4263329						
Powder cocaine users	107 (68,2)	46 (29,3)	4 (2,5)	157		
Crack users	46 (76,7)	13 (21,7)	1 (1,7)	60		
Dual users	344 (73,5)	121 (25,9)	3 (0,6)	468		
TOTAL	(72,6)	(26,3)	(1,2)	685	5,48	0,241

APÊNDICE 3. Produção acadêmica e participação em eventos científicos durante o período do doutorado (2008-2012)

1. Prêmio

Travel Award (2009), The International Society of Psychiatric Genetics

2. Manuscrito Submetido

Negrão, A. B., Pereira, A., Guindalini, C., Messas, G., Laranjeira, R., Vallada, H. Association of BCHE genetic variants with cocaine dependence and related phenotypes. *J Molecular Neuroscience* (fator de impacto: 2,9)

3. Capítulos publicados em livros

Negrão, A.B., Vallada, H. 2012. "Genética e Epigenética da Dependência de Crack." In M. Ribeiro and R. Laranjeira, eds. *O tratamento do usuário de crack*. Porto Alegre: Artmed, pp. 170-9.

Negrão, A.B., Cordeiro, Q., Vallada, H. 2011. "Genética da dependência química." In A. Diehl, D. C. Cordeiro, and R. Laranjeira, eds. *Dependência química: prevenção, tratamento e políticas públicas*. Porto Alegre: Artmed, pp. 59-66.

Negrão, A.B., Alvarenga, P.G., Andrade, A.G. 2008. "Transtornos Relacionados ao uso de drogas e substâncias psicoativas." In P. G. Alvarenga and A. G. Andrade, eds. *Fundamentos em Psiquiatria*. Barueri: Editora Manole, pp. 227-46.

4. Apresentação de trabalhos em congressos

Negrão, A. B., Pereira, A., Guindalini, C., Laranjeira, R., Messas, G., Vallada, H. Gene-gene interaction in different biological pathways in a sample of crack/cocaina

brazilian patients In: XIX World Congress of Psychiatric Genetics: Genes to Biology 2011, Washington. Abstracts.

Negrão, A. B., Pereira, A., Laranjeira, R., Krieger, J.E., Vallada, H. Association Analysis Between Polymorphisms in Monoamine Oxidase A (MAOA) and Dopamine Receptor D2 (DRD2) Genes and Cocaine Dependence In: XVII World Congress of Psychiatric Genetics: Surfing the Wave of Discovery, 2009, San Diego. Abstracts. , 2009. p.255 -

Negrão, A. B., Pereira, A., Laranjeira, R., Krieger, J.E., Vallada, H. Association Analysis Between Polymorphisms in the Butirylcholinesterase Gene and Cocaine Dependence In: XVII World Congress of Psychiatric Genetics: Surfing the Wave of Discovery, 2009, San Diego. Abstracts. , 2009. p.256 -

5. Participação em congressos

XIX World Congress of Psychiatric Genetics: Genes to Biology, Washington, DC, 2011
Mini-Convention on Genetics of Substance Abuse, NIDA/NIAA, Washington, DC, 2011
XVII World Congress of Psychiatric Genetics: Surfing the Wave of Discovery, San Diego, CA, 2009

6. Aula ministrada

Estudos de associação caso-controle – Conceito e Demonstração da Técnica para Genes candidatos para a Dependência de Cocaína, Curso de Educação continuada em Psiquiatria do Ceapesq, Módulo 2: Genética dos Transtornos Psiquiátricos (IPq-HCFMUSP), 25/04/2009.