

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

RENATA BASSO CUPERTINO

**ESTUDO DE GENES DOPAMINÉRGICOS E SUAS INTERAÇÕES
EPISTÁTICAS NA DEPENDÊNCIA DE *CRACK***

Porto Alegre

Janeiro/2014

RENATA BASSO CUPERTINO

**ESTUDO DE GENES DOPAMINÉRGICOS E SUAS INTERAÇÕES
EPISTÁTICAS NA DEPENDÊNCIA DE *CRACK***

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharela em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Claiton Henrique Dotto Bau
Co-orientador: Me. Diego Luiz Rovaris

Porto Alegre
Janeiro/2014

*"Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa,
nunca tem medo e nunca se arrepende."*

Leonardo da Vinci

Agradecimentos

É difícil encontrar palavras para agradecer a todos que me ajudaram ou influenciaram de alguma forma na conclusão dessa etapa e que, espero, sigam comigo nessa próxima etapa. Primeiramente agradeço ao meu orientador, **Professor Claiton Bau**, pela oportunidade, confiança, disponibilidade e inspiração e ao meu co-orientador **Diego Rovaris** por todo o apoio, ideias, paciência e amizade.

Ao **Guilherme** e ao **Diego** por me acolherem na salinha e pela grande ajuda! À **Jaqueline** e à **Bruna** pela amizade, pelas risadas, pelo apoio, pelas conversas, pelos cafés no campus e pelos filmes. À **Nina** pela amizade e ideias. Ao **Lucas** pela amizade, pelas conversas e pelo companheirismo. À **Evelise** pela amizade e pela ajuda. Agradeço à **Angelita** e a **Djenifer**, minhas colegas ICs, que me ajudaram muito e, claro, pela amizade.

À **Maria Eugênia** e a **Juliana** pela amizade mantida desde o colégio, pelas risadas, pelo carinho, pelo companheirismo. À **Nariéle** e à **Maysa** pela amizade, pela confiança, pela paciência e pelo apoio. Ao **Andrews** pela amizade, pelo apoio, me ouvindo sempre nos momentos de estresse e ansiedade, e pelas risadas.

A todos do Policlínica Militar, onde fiz meu estágio obrigatório e tive a oportunidade de aprender muito e conheci ótimas pessoas. A todos da minha turma da Biomedicina, que de alguma forma influenciaram no meu caminho até aqui.

E o mais difícil, à família principalmente, aos meus pais, **Kátia** e **Luiz Ricardo**, e aos meus irmãos, **Júlia** e **Pedro**, pois sem eles não chegaria aqui, agradeço pelo exemplo de força e honestidade, pelo apoio sempre. Obrigada a todos!

Índice

Abreviaturas	6
Resumo.....	7
1. Introdução	8
1.1 Considerações Iniciais	8
1.2 Dopamina e seus Receptores	9
1.2.1 Receptor de Dopamina do Tipo 2 (DRD2)	10
1.2.2 Receptor de Dopamina do tipo 4 (DRD4)	12
1.2.3 Formação de Heterômeros DRD2-DRD4.....	13
1.3 Transportador de Dopamina (DAT)	14
1.4 Catecol-O-Metiltransferase (COMT).....	17
2. Objetivos.....	20
2.1 Objetivos Gerais	20
2.2 Objetivos Específicos.....	20
3. Artigo Científico	22
4. Conclusões e Perspectivas	37
5. Referências Adicionais.....	39

Abreviaturas

AMP – Adenosina Monofosfato

cAMP – AMP cíclico

COMT - Catecol-O-Metiltransferase

CPF – Cortex pré-frontal

DAT – Transportador de Dopamina

DL – Desequilíbrio de Ligação

DRD2 – Receptor de Dopamina do tipo 2

DRD4 – Receptor de Dopamina do tipo 4

NAcc – Núcleo accumbens

OD – *Odds Ratio* (razão de chance)

SNC – Sistema Nervoso Central

TDAH – Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade

TUS – Transtorno por Uso de Substâncias

UTR – *Untranslated Region*

VNTR – Número Variável de Repetições em Tandem

Resumo

Vias dopaminérgicas são relacionadas a aprendizagem por reforço/recompensa e, por isso, são frequentemente alvos de estudos envolvendo abuso e dependência de drogas. Diversos genes dopaminérgicos tem sido estudados como possíveis fatores associados com transtornos psiquiátricos, como o Transtorno por Uso de Substância (TUS), por exemplo os genes de receptores dopaminérgicos ou proteínas envolvidas no controle dos níveis de dopamina no Sistema Nervoso Central (SNC). No presente estudo, nós avaliamos o efeito de polimorfismos em alguns dos principais genes dopaminérgicos envolvidos na regulação dos níveis de dopamina e sua função no córtex pré-frontal. A amostra foi composta por 142 mulheres usuárias de *crack* em processo de desintoxicação. As amostras do grupo controle foram obtidas no banco de sangue do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, incluindo 314 mulheres. Regressão Logística Binomial, Equações de Estimativa Generalizada e Modelo Linear Generalizado foram utilizadas na análise dos dados.

Não foram encontrados resultados significativos de efeitos principais ou de interações entre os polimorfismos avaliados sobre a susceptibilidade à dependência de *crack*. Em relação ao *craving* e a gravidade também não foram observados efeitos significativos desses polimorfismos. Esses dados devem ser considerados como preliminares, em função do tamanho amostral ser relativamente pequeno.

1. Introdução

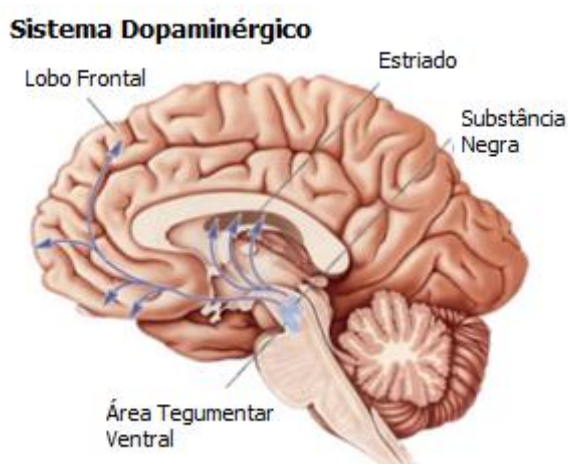
1.1 Considerações Iniciais

A dependência de drogas é um sério problema socioeconômico que atinge o mundo inteiro, e está relacionado a altos índices de morbidade e mortalidade. No Brasil, aproximadamente 22% da população acima de 18 anos já utilizaram drogas psicoativas além do álcool e cigarro uma vez na vida [1]. O Transtorno por Uso de Substâncias (TUS), proposto pelo Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-IV) da Associação Americana de Psiquiatria (2004), engloba abuso e dependência de diferentes substâncias, dentre elas a cocaína, anfetaminas, canabinoides, alucinógenos. O TUS é uma condição complexa e multifatorial, sendo influenciada por fatores genéticos, biológicos e ambientais, com uma herdabilidade estimada entre 40-70% [8]. Fatores ambientais podem ser exemplificados como as influências sociais, adversidades na infância e condições socioeconômicas [17].

A cocaína e o *crack* são consumidos por 0,3% da população mundial, dos quais a maior parte encontra-se nas Américas (70%), estes números vem aumentando ao longo dos últimos anos [41]. Entre os países emergentes, o Brasil é o maior mercado na América do Sul. No Brasil, cerca de 2% dos estudantes já usaram cocaína pelo menos uma vez na vida, e 0,2%, o *crack* [41]. Levantamentos domiciliares nacionais realizados em 2001 e 2005 pelo Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas (CEBRID) demonstraram que o consumo de *crack* dobrou e que a região sul foi a mais atingida [41].

O *crack*, conhecido como “cocaína fumada”, é a cocaína processada sob a forma de pedra e com a adição de água e bicarbonato de sódio, o que o torna uma droga muito mais barata, contribuindo para sua popularização, sobretudo em países subdesenvolvidos. Ambos, cocaína e *crack*, possuem um efeito estimulante sobre o sistema nervoso central (SNC), caracterizado neuroquimicamente pelo aumento nos níveis de dopamina em circuitos mesocorticolímbicos [18]. Os efeitos estimulantes da dopamina se dão por meio da inibição do transportador de dopamina (DAT) [35] agindo como um

inibidor competitivo, se ligando ao sítio ativo da proteína e bloqueando assim sua atividade [19]. Esses circuitos dopaminérgicos são relacionados a aprendizagem por reforço/recompensa, e, por isso, são frequentemente alvos de estudos relacionados ao abuso e dependência a drogas. O sistema dopaminérgico mesocorticolímbico é originado a partir de neurônios do mesencéfalo, especificamente da área tegumentar ventral, e se projetam para núcleo accumbens (NAcc), amígdala, núcleo pálido ventral, hipocampo e córtex pré-frontal (CPF) [7].



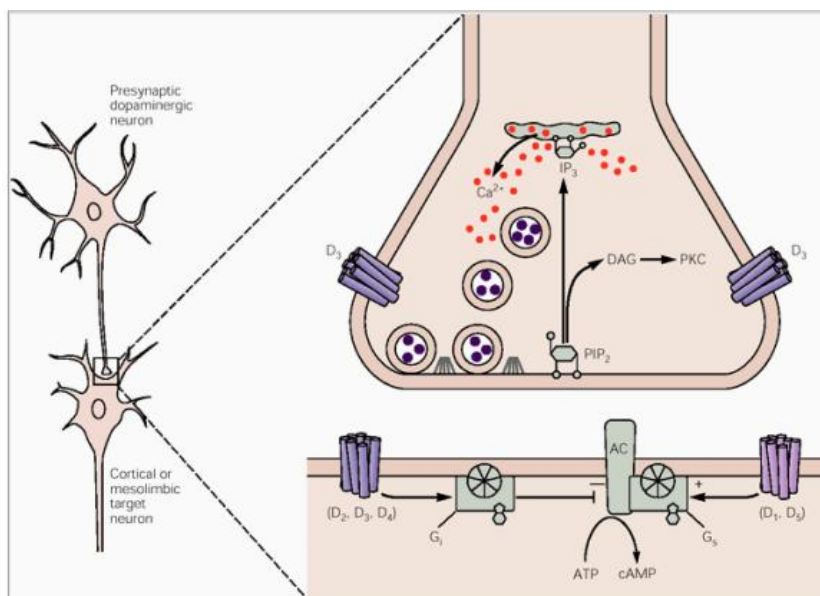
Sistema Dopaminérgico Mesocorticolímbico. Adaptado de Bear, 2006

1.2 Dopamina e seus Receptores

A dopamina é um neurotransmissor da classe das catecolaminas, derivada portando dos mesmos precursores da noradrenalina e adrenalina, amplamente distribuída pelo sistema nervoso, sobretudo no estriado, substância negra e regiões corticais. Além de um papel essencial na coordenação dos movimentos corporais, a dopamina também está envolvida no principal sistema de motivação e reforço/recompensa, no circuito abordado anteriormente. A ação dopaminérgica na fenda sináptica é determinada principalmente pela recaptação do neurotransmissor pelo DAT e da sua degradação pela enzima Catecol-O-Metiltransferase (COMT) [49].

São conhecidos 5 tipos de receptores de dopamina: D1, D2, D3, D4 e D5. Destes, os subtipos D1 e D5 (*D1-like*) são excitatórios, acoplados a proteína G_s , responsável pela ativação da adenilato ciclase (AC), enzima que converte adenosina trifosfato (ATP) em adenosina monofosfato cíclica (cAMP). Esses receptores são expressos principalmente em neurônios do

córtex cerebral e hipocampo. Enquanto os receptores dos subtipos D2, D3 e D4 (*D2-like*) são acoplados a proteína G_i , que inibe a AC e são expressos abundantemente nos núcleos caudados, no putâmen e no núcleo accumbens, estando ainda presentes na amígdala, hipocampo e partes do córtex [35].



Resposta dos receptores dopaminérgicos. Os receptores pós-sinápticos *D2-like* inibem a AC a partir da proteína G_i . O autorreceptor inibitório pré-sináptico, representado como D3, regula a quantidade de dopamina liberada em resposta ao potencial de ação por meio de segundos mensageiros: Diacilglicerol (DAG), inositol trifosfato (IP₃), fosfoinosídeo difosfato (PIP₂) e proteína cinase C (PKC). Os receptores *D1-like* estimulam AC a partir da proteína G_s . Fonte: Kandel, 2000.

1.2.1 Receptor de Dopamina do Tipo 2 (DRD2)

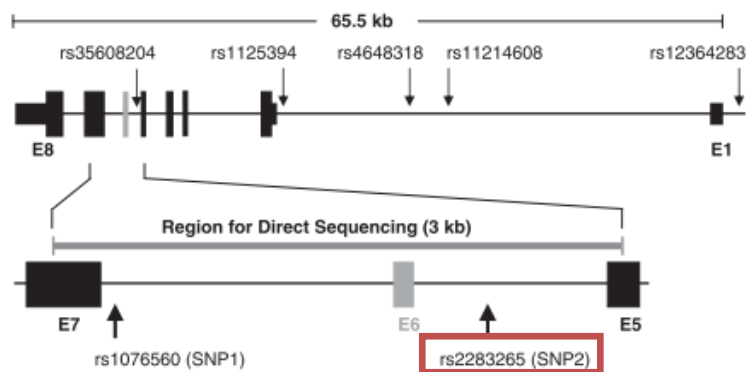
O receptor de dopamina do tipo 2 (DRD2) é encontrado em neurônios GABAérgicos e interneurônios colinérgicos no estriado e NAcc [3], localizados principalmente no terminal pós-sináptico. Eles são alvos de várias drogas terapêuticas utilizadas no tratamento de patologias relacionadas ao estriado, como a Síndrome de Tourette, a Doença de Parkinson e a esquizofrenia [3]. Estudos com camundongos *knockout* para o gene *DRD2*, demonstraram prejuízos motores, respostas alteradas em relação ao abuso de drogas, tumores na pituitária e modificações nas características eletrofisiológicas dos neurônios que normalmente expressam

esses receptores [62]. O envolvimento do *DRD2* com dependência e processos cognitivos já é bem documentado [9, 45, 60, 62].

Já foi relatada a participação desses receptores na recaída da dependência e no comportamento de *drug-seeking* [53], caracterizado pela busca pela droga de forma compulsiva e potencialmente prejudicial. Foi relatada uma diminuição da disponibilidade de DRD2 em dependentes de álcool, heroína, cocaína e metanfetamina, indicando um “estado dopaminérgico hipofuncional” [20]. Em dependentes de cocaína essa condição persiste mesmo após a desintoxicação, o que não foi observado em alcoolistas [59]. Algumas variantes no gene *DRD2* foram associadas com esquizofrenia e abuso de drogas [54, 61].

O *DRD2* é expresso em duas isoformas distintas: curto (D2S) e longo (D2L), localizadas principalmente nos terminais pré-sinápticos e pós-sinápticos, respectivamente [36]. As duas isoformas possuem semelhante sensibilidade ao ligante, porém diferente afinidade de acoplamento pela proteína G, apesar disso seus papéis podem ser considerados equivalentes [57]. O DRD2, em ambas isoformas, é essencial na modulação dopaminérgica da transmissão estriatal GABAérgica e glutamatérgica [62]. Estudos com camundongos *knockout* para o D2L, mas não para o D2S, demonstraram que o D2S funciona principalmente como um autorreceptor, inibindo funções mediadas por DRD1, enquanto os D2L podem agir sinergicamente com DRD1 [57].

O gene *DRD2* encontra-se no cromossomo 11 (11q23) e um *splicing* alternativo do exon 6 origina as duas isoformas citadas anteriormente. Um estudo genético demonstrou uma associação dos SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) rs2283265 e rs1076560 (em desequilíbrio de ligação, $D' = 1.0$) com abuso de cocaína em caucasianos, mas não em afro-americanos [45]. O rs2283265 é clinicamente associado também com a esquizofrenia, diminuição da performance cognitiva e recaída na dependência [22, 25, 62]. O SNP rs2283265 (G>T) pode causar um desbalanço na expressão das isoformas do receptor, onde o alelo T favorece a inclusão do exon 6, provocando um aumento da expressão de D2L. Esse alelo foi associado a prejuízos na memória de trabalho e no controle de atenção e ao abuso de cocaína [45, 62].



Gene *DRD2*. Destaque para o polimorfismo rs2282265. Adaptado de Moyer, 2011.

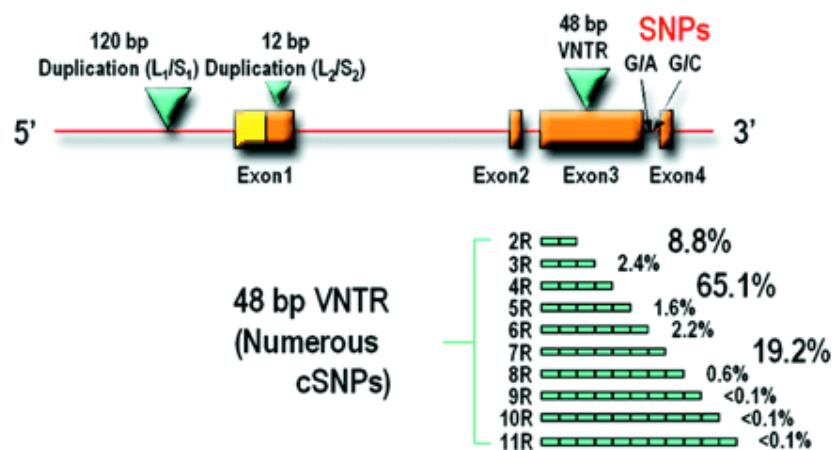
1.2.2 Receptor de Dopamina do tipo 4 (*DRD4*)

O receptor de dopamina do tipo 4 (*DRD4*) é muito semelhante ao do tipo 2, entretanto o *DRD2* apresenta uma região linfófica no sítio de ligação. O *DRD4* é expresso abundantemente em áreas associadas a emoção, respostas de reforço e motivação, incluindo o hipotálamo, a amígdala e o CPF [48], é encontrado em interneurônios GABAérgicos e neurônios glutamatérgicos piramidais, incluindo suas projeções estriatais. Já foram descritas evidências de associações de variações alélicas do gene *DRD4* com traços específicos de personalidade, como busca por novidade, impulsividade e compulsão, comportamentos frequentemente relacionados a susceptibilidade ao abuso de drogas e desenvolvimento de dependência [37].

O gene *DRD4*, localizado no cromossomo 11 (11p15.5), é bastante polimórfico, sendo o polimorfismo mais estudado um número variável de repetições em tandem (VNTR) de 48pb no exon 3, com 2 a 11 repetições. As variantes mais comuns são 2 (8%), 4 (64%) e 7 (21%) repetições (2R, 4R e 7R, respectivamente) [14], sendo a última frequentemente associada a transtornos psiquiátricos. Evidências sugerem que a variante 7R está relacionada a uma transcrição e tradução menos eficiente [52], um dobramento e rearranjo conformacional instável [58] e uma sinalização intracelular mais fraca [4]. Foi observado também em indivíduos com o alelo

7R, um maior número de sintomas de *craving* no alcoolismo e maior tendência ao uso de substâncias ilícitas [10].

DRD4



Gene *DRD4*. Fonte: Yuan-Chun Ding, 2002

1.2.3 Formação de Heterômeros DRD2-DRD4

Heterômeros são complexos macromoleculares compostos de pelo menos duas moléculas funcionais com propriedades diferentes do que aquelas dos seus componentes individuais [21]. Receptores heterômeros são expressos em alguns tecidos durante determinadas situações, contribuindo para a regulação de processos fisiológicos [21]. Diversos receptores são capazes de formar heterômeros, como os receptores opioides μ e δ (μ OR- δ OR) [27], receptor opioide e receptor glutamatérgico metabotrópico 5 (MOR-mGluR5) [2]. Dentre os receptores dopaminérgicos, DRD1 e DRD2 [50], DRD2 e DRD3 [51] e DRD2 e DRD4 [12, 28] são capazes de formar heterômeros. Já foi descrito também uma interação do DRD2 com o receptor de adenosina A_{2A} [23].

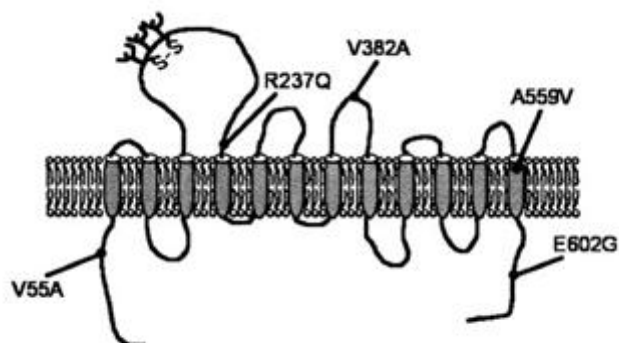
Boroto-Escuela e colaboradores [12] demonstraram a partir de métodos de imunoprecipitação que os receptores D2L são capazes de formar heterômeros com as três variantes mais comuns do *DRD4* (2R, 4R e 7R), no entanto com menor eficiência com *DRD4* 7R. O D2L apresentou uma afinidade aumentada aos seus agonistas após a ativação do *DRD4* 2R e 4R, indicando um reforço alostérico a partir da interação entre os dois receptores. O grande número de repetições do DRD4 7R, resulta em um

tamanho das regiões desordenadas no *loop* 3 intracelular do que nas outras variantes, o que favorece a formação de homômeros e reduz a capacidade de heteromerização. González e colaboradores [28] demonstraram a formação de heterômeros entre D2S e as variantes 2R e 4R do DRD4, mas não com o 7R. Também foi relatada a propriedade bioquímica do heterômero D2S-DRD4, em que a ativação do D2S potencializa a resposta do DRD4.

Com base nesses estudos recentes, nosso grupo [43, 44] avaliou se os efeitos do alelo de risco 7R do *DRD4* poderiam ser alterados na presença do alelo T do *DRD2* (rs2283265), o qual favorece a ocorrência da isoforma D2L pela inclusão do exon 6, conforme já abordado. Mota e colaboradores (2013) demonstraram que a presença concomitante de ambos os alelos de risco (*DRD4* 7R e *DRD2*-rs2283265 T) pode conferir proteção contra o alcoolismo [44] e o transtorno de conduta [43]. Considerando a menor eficiência de heteromerização do receptor DRD4 7R na presença do D2L, é possível que os alelos 2R e 4R possam conferir maior risco devido a uma maior ativação.

1.3 Transportador de Dopamina (DAT)

O transportador de dopamina (DAT) é uma proteína da membrana plasmática da família de transportadores dependentes de sódio e cloro [6]. O DAT regula a neurotransmissão dopaminérgica cessando a sinalização a nível sináptico pela recaptção da dopamina no terminal pré-sináptico. A expressão do DAT é reduzida em pacientes com Parkinson, Síndrome de Lerssh-Nyhan e elevada em casos de Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH), Síndrome de Tourette e transtorno depressivo maior [42]. O efeito de euforia causado pela cocaína e outras drogas estimulantes deve-se ao aumento da atividade dopaminérgica, inibindo a recaptção do neurotransmissor pelo DAT [35].

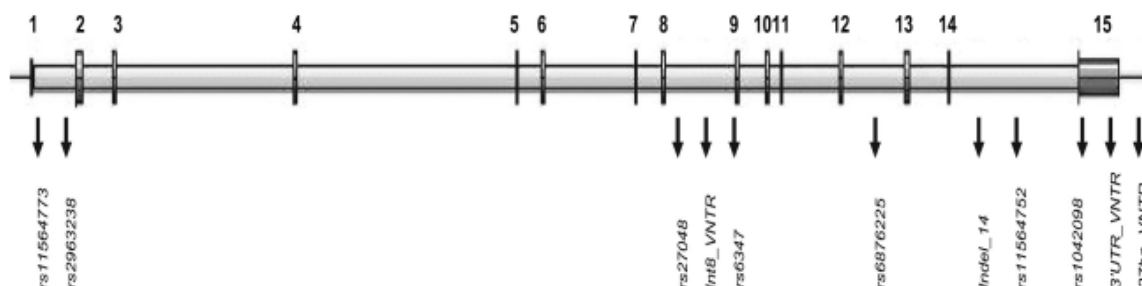


Representação da proteína DAT, com seus 12 loops transmembrana, destaque para as variações de aminoácidos mais frequentemente encontradas. Fonte: Hahn and Blakely, 2002.

O transportador de dopamina é codificado pelo gene *DAT1*, também conhecido como *SLC6A3*, encontrado no cromossomo 5 (5p15.3). O gene *DAT1* é expresso de maneira muito específica, exclusivamente no SNC, principalmente nos neurônios dopaminérgicos mesencefálicos da substância negra e da área tegumentar ventral [6]. Essa alta especificidade é regulada por uma combinação de fatores regulatórios únicos positivos e negativos. Sequências proximais do gene *DAT1* podem estar envolvidas na sua regulação transcricional e traducional [29]. O *DAT1* já foi associado com TDAH, paranoia induzida pela cocaína, alcoolismo, gravidade da abstinência alcoólica, esquizofrenia e doença de Parkinson [29]. Estudos com camundongos com DAT insensível a cocaína mostraram aversão ou indiferença a cocaína [46].

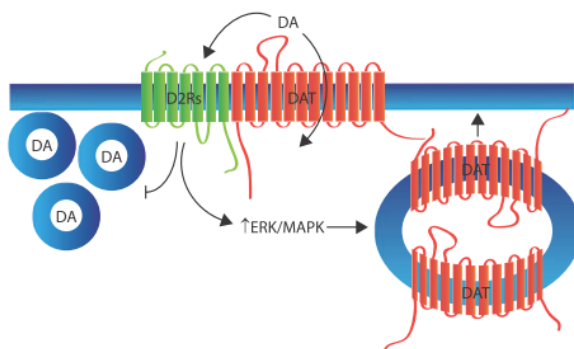
Um dos polimorfismos mais estudados no gene *DAT1* consiste em um VNTR localizado na região 3' não traduzida (3'-UTR) (rs28363170) com 3 a 13 repetições de 40pb, sendo mais frequentemente observadas 9 e 10 repetições (9R e 10R, respectivamente). Estudos já relataram o envolvimento deste polimorfismo com alterações na disponibilidade do transportador, no entanto estes resultados são discordantes em relação às principais variantes (9R ou 10R) envolvidas com sua menor ou maior expressão. Outro polimorfismo muito estudado nesse gene encontra-se no Intron 8 (rs3836790), consiste em um VNTR com 5 ou 6 repetições de 10pb (5R e 6R, respectivamente), em desequilíbrio de ligação (DL) com o rs6347

no exon 9 (A>G). Este polimorfismo afeta a expressão do DAT *in vitro*, a partir da sinalização celular, em resposta a agentes que estimulam cAMP e Ca^{2+} , como a cocaína [47]. O VNTR do intron 8 já foi associado com abuso de cocaína, tendo o alelo 6R como fator de risco [30].



Gene DAT1/ SLC6A3 Fonte: Guindalini *et al*, 2006.

Formas de regulação da disponibilidade do DAT incluem fosforilação e interações diretas com outras proteínas intracelulares, como α -sinucleína, PICK1 e Hic-5 [13, 38, 56]. Lee e colaboradores [39] demonstraram que o DAT também pode ser regulado pelo DRD2, no entanto esta interação foi avaliada apenas com a isoforma D2S, a qual predomina pré-sinápticamente. O recrutamento de DAT para a superfície das células, essencial para sua funcionalidade, é facilitado pelo acoplamento ao DRD2, aumentando a recaptação de dopamina. Esse efeito é independente da ativação do DRD2 [39]. Prejuízos na ocorrência desta interação já foram relacionados a esquizofrenia, onde estes pacientes apresentaram uma redução de 60% na coimunoprecipitação em relação aos controles, em amostras do estriado [19]. O DRD2 também participa indiretamente da regulação do DAT, ativando as quinases de sinalização extracelular (EPK) 1 e 2. Essa ativação leva ao aumento na capacidade de transporte do DAT [11].



Regulação do DAT pelo DRD2. Representação do receptor DRD2 regulando a função de DAT direta (interação proteína-proteína) ou indiretamente (via sinalizadores celulares, como ERK e MARK). Fonte: Eriksen *et al*, 2010.

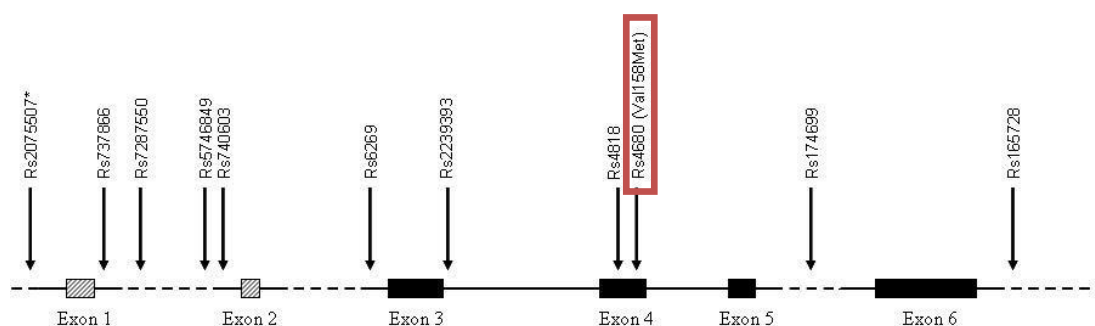
Recentemente, Sullivan e colaboradores [55] identificaram uma interação significativa entre o rs2283265 do gene *DRD2* e o VNTR no intron 8 do gene *DAT1*, envolvido na regulação da expressão, no contexto de abuso de cocaína. Foi observada uma grande variação de *odds ratio* do *DRD2* rs2283265 em função das variantes do *DAT1*, onde a variante 6R (*DAT1*) parece potencializar o risco do alelo T (*DRD2*), enquanto a variante 5R exerce um efeito protetor, atenuando esse risco. Desta forma, sugere-se que os alelos de risco combinados (6R e T) podem aumentar a disponibilidade de dopamina, resultando em um excesso do neurotransmissor e toxicidade, constituindo um risco maior para abuso de cocaína e progressão do uso.

1.4 Catecol-O-Metiltransferase (COMT)

A enzima catecol-O-metiltransferase (COMT) inativa os neurotransmissores catecolaminérgicos. Ela é responsável pela degradação de aproximadamente 60% da dopamina no CPF [16]. Dessa forma, a COMT pode estar relacionada a transtornos psiquiátricos e comportamentais associados a desregulação da transmissão dopaminérgica [32, 33]. Esta enzima tem expressão extraneuronal (astrocitos, paredes dos capilares e espinhos dendríticos pós-sinápticos).

O gene *COMT* apresenta dimorfismo sexual indicando que seu efeito no sistema dopaminérgico pode ser diferente entre os sexos feminino e masculino. Em camundongos, foi observado que nas fêmeas a *COMT* parece ter menos influência nos níveis dopaminérgicos do que nos machos [26]. Outro estudo avaliou a atividade da enzima em tecido do CPF *postmortem* e relatou que as mulheres apresentam uma atividade enzimática da *COMT* significativamente menor do que homens [15]. Estudos demonstraram que indivíduos com o genótipo Val/Val (rs4680) possuem maiores escores na escala de *Sensation Seeking* (avalia preferências de estimulação sensorial), busca de novidades e evitação de dano, sendo a maioria desses resultados mostrados apenas em mulheres [40].

O gene *COMT* encontra-se no cromossomo 22 (22q11.1), vários polimorfismos foram associados a transtornos psiquiátricos, incluindo esquizofrenia, transtornos de ansiedade, resposta ao estresse, dependência a nicotina e paranoia provocada pela cocaína [34]. Foi demonstrado em camundongos *knockout* para o gene *COMT* uma atenuação dos comportamentos induzidos pela cocaína, entretanto apenas em animais machos [33].



Gene *COMT*. Representação do gene *COMT* com a localização de seus principais polimorfismos. Fonte: Rakvåg *et al*, 2008.

O gene *COMT* possui um polimorfismo funcional muito estudado que consiste na troca dos aminoácidos valina (Val) pela metionina (Met) no códon 158 (Val158Met), onde a variante Met confere uma enzima até quatro vezes menos ativa e tem sido associada a melhores funções cognitivas [32]. Vários estudos avaliaram a possível associação do alelo Val com dependência de nicotina e recaída, no entanto os resultados foram discordantes. Portadores do alelo Val também foram associados a uma pior

performance de memória de trabalho e atenção sustentada [5]. Foram relatadas evidências sugerindo uma associação dos homozigotos para o alelo Val a uma maior sensibilidade aos efeitos cognitivos e prejuízos na função pré frontal durante a abstinência de nicotina [5]. A variante Met foi associada a maior susceptibilidade ao estresse e ansiedade [40]. Já foi observada também uma interação epistática entre os genes *COMT* e *DRD4* correlacionada ao funcionamento do córtex pré-frontal, em uma avaliação do controle da resposta cognitiva [31].

2.Objetivos

2.1 Objetivos Gerais

Considerando o envolvimento de genes do sistema dopaminérgico no processo de abuso e dependência de drogas e as recentes observações a respeito da interação entre os genes dos receptores dopaminérgicos *DRD2* e *DRD4* e entre os genes *DRD2* e do transportador de dopamina (*DAT1*), nosso objetivo foi testar um possível efeito de interação entre polimorfismos nestes genes sobre a dependência de *crack*. Com base na importância da *COMT* no processo de regulação dos níveis dopaminérgicos no córtex pré-frontal e os recentes estudos demonstrando a associação de polimorfismos do gene *COMT* com traços de personalidade, sobretudo em mulheres, avaliamos seu possível efeito sobre a dependência de *crack*.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar o efeito dos polimorfismos rs2283265 do *DRD2* (G>T), o VNTR do *DRD4*, o VNTR do íntron 8 e da região 3'-UTR do *DAT1*; e o rs4680 da *COMT* e suas interações sobre a susceptibilidade a dependência de *crack*.

Avaliar o efeito dos polimorfismos rs2283265 do *DRD2* (G>T), o VNTR do *DRD4*, o VNTR do íntron 8 e da região 3'-UTR do *DAT1*; e o rs4680 da *COMT* e suas interações sobre a gravidade dos sintomas de abstinência avaliados pela escala ASI-6 (*Addiction Severity Index - 6th Edition*) e pelo CSSA (*Cocaine Selective Severity Assessment*).

3. Artigo Científico

Artigo a ser submetido na revista: *Neuroscience letters*

Dopaminergic polymorphisms and epistatic interactions on crack cocaine addiction

Renata B. Cupertino¹, Diego L. Rovaris¹, Nina R. Mota¹, Lucas A. Azeredo¹,
Eduardo S. Vitola², Eugenio H. Grevet², Rodrigo Grassi-Oliveira³, Claiton H.
D. Bau^{1,2}

¹ Department of Genetics, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

² Department of Psychiatry, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

³ Centre for Traumatic Stress Studies and Research (NEPTE), Biomedical Research Institute (IPB), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Corresponding Author

Dr. Claiton H. D. Bau, Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UFRGS, CEP: 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil.

Caixa Postal: 15053.

Email: claiton.bau@ufrgs.br.

Telephone: (5551) 3308-6718; Fax: (5551) 3308-7311.

Abstract

Several dopaminergic genes have been investigated in relation to drug abuse and addiction since this neurotransmitter system has an important role in reward. Here, we evaluated the effect of polymorphisms in the commonly studied dopaminergic genes *DRD2*, *DRD4*, *COMT* and *DAT1*, which are important to regulate dopaminergic levels in prefrontal cortex. The sample included 142 crack cocaine addicted women in detoxification process and 314 blood donor control subjects. We found a significant effect of VNTR in *DAT1* intron 8 and interaction effect of *DAT1* and *DRD2* on crack cocaine susceptibility. However these associations were no longer significant after the Bonferroni correction. Therefore, our results do not report an association between polymorphisms in *DRD2*, *DRD4*, *COMT* and *DAT1* genes and crack cocaine addiction. Nonetheless, these results should be considered for inclusion in future meta-analyses where sample size and statistical power are increased.

Key-words: crack cocaine, addiction, dopamine, genetic, interaction

Introduction

There is a strong genetic component underlying the risk for developing Substance Use Disorders (SUDs), with overall heritability estimates about 30-60% but 65-69% specifically to cocaine dependence [2, 10, 11]. To date, there are only a few studies with crack cocaine and cocaine abuse, most candidate gene and genome wide association (GWAS) studies results come from the analyses of nicotine and alcohol dependence. Positive findings suggested a possible role of dopaminergic genes on SUD susceptibility [1, 3, 9].

The dopaminergic mesolimbic pathway has an important role in reward, therefore numerous studies have focused on its role in addiction. Accordingly, several dopaminergic genes have been investigated in relation to drug abuse and addiction, as genes coding the dopamine receptor type 2 and type 4 (*DRD2* and *DRD4*, respectively), the dopamine transporter

(*DAT1*) and the gene coding the enzyme catechol-O-methyltransferase (*COMT*).

Concerning cocaine abuse there is evidence for associations involving intronic polymorphisms in the dopamine transporter (*DAT1*) [6] and in the dopamine D2 receptor (*DRD2*) genes [17]. In addition, an association was reported between the *COMT* Val158Met polymorphism and cocaine dependence [13] and cocaine-induced paranoia [8].

Considering the important role of dopamine system in addiction, this study aims to investigate a possible association among these dopaminergic genes with crack cocaine addiction and withdrawal symptoms. We evaluated the main effect and possible evidence-based interactions previously reported [7, 15, 16, 18] between *DRD2*-rs2283265 and *DRD4*-VNTR in exon 3; *DRD2*-rs2283265 and *DAT1*-VNTR in intron 8 and in 3'-UTR; and *DRD4* and *COMT*-rs4680 affecting crack cocaine addiction susceptibility, severity and withdrawal symptoms.

Material and Methods

Sample

The sample include a total of 142 crack cocaine-addicted women who completed 3 weeks of follow-up during early abstinence, in a abstinence-controlled situation. Withdrawal symptoms were assessed through the Cocaine Selective Severity Assessment (CSSA) scale, evaluated four days after their admission and two times per the following weeks. The severity was assessed by Addiction Severity Index 6th Edition (ASI-6). The inclusion criteria were as follows: women aged 18 to 45 years old; diagnosis of Substance Use Disorder - Physiological Dependence of Crack Cocaine Type; a minimum of four years of formal education and an absence of comorbid psychotic syndromes. Patients were excluded if they met any of the following exclusion criteria: presence of previously undetected psychotic symptoms; diagnosis of a neurologic, infectious, or metabolic disease; severe cognitive impairment resulting in alteration of the state of consciousness and psychomotor agitation; Mini-Mental State Examination (MMSE) score < 18; and use of benzodiazepines. Psychiatric diagnoses were provided by the

Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders (SCID I) and MMSE was used to screen severe cognitive impairment that could impact the understanding of the research instruments [4].

The control sample is composed of 314 Brazilian women blood donors of European descent assessed in a blood bank in Hospital de Clínicas de Porto Alegre. All subjects included in this study signed an informed consent form approved by the Institutional Review Boards of the participating institutions.

SNP selection and genotyping

The polymorphisms were selected according to evidences described in the literature concerning previous studies with substance use disorders, specially cocaine addiction. The *DRD4* gene is located on chromosome 11p15.5, it has a 48pb variable number tandem repeats (VNTR) in the third exon with 2-11 repeats, which the most common are 2, 4 and 7 repeats (2R, 4R and 7R, respectively).

The SNP rs2283265 in *DRD2* gene (chromosome 11q23) affects the alternative splicing resulting in two different receptor isoforms [19].

The *DAT1/SLC6A3* gene (chromosome 5p15.3) has a well-studied VNTR in the 3'-UTR with 3-13 40pb repeats, where the most common are 9 and 10 repeats (9R and 10R). Furthermore, another frequently studied VNTR is in intron 8, where the most frequent alleles are the 5 or 6 10pb repeats (5R or 6R).

The *COMT* gene (chromosome 22q11.1) has a well-studied functional polymorphism Val158Met (rs4680), where the enzyme coding by Met variant is less active.

DNA was extracted from peripheral blood by salting out method [12]. *COMT* rs4680 and *DRD2* rs2283265 were genotyped using TaqMan[®] allelic discrimination system (Applied Biosystems) in a Real-Time PCR-based method. VNTRs in *DRD4* and *DAT1* were amplified by PCR and separated on an agarose gel.

Statistical Analyses

Binary logistic regressions were used to test the influence of these polymorphisms on crack cocaine addiction susceptibility. Generalized linear models (log-gamma regression and generalized estimating equations) were used to analyze the role of these polymorphisms on crack cocaine severity and withdrawal symptoms.

Since twenty-five models were tested, we considered as significant P-values less than 0.002 ($\alpha_{\text{Bonf}} = 0.05/25$). Age, schooling and intelligence quotient did not reach the confounding threshold criteria (association with outcome and genetic factors with a P-value less than 0.2 [14]).

Results

Genotypic and socio-demographic characteristics of the sample are given in **Table 1**. Genotype distributions of *DRD2*, *DRD4*, *COMT* and *DAT1* were in concordance with Hardy–Weinberg equilibrium. Subjects with rare *DRD4* alleles (3R, 5R, 6R, 8R) were excluded from all analyses.

The logistic regression (**table 2**) showed a significant effect of VNTR in *DAT1* intron 8 in crack cocaine dependence susceptibility. The presence of *DAT1* 5R allele was associated with risk to crack cocaine dependence (OR = 1.869; 95% CI: 1.245-2.806; P = 0.03). This effect appears to be stronger in the absence of *DRD2* rs2283265-T allele (OR = 1.904; 95% CI: 1.146-3.164; P = 0.013). A significant interaction was found also between VNTR in *DAT1* 3'-UTR and *DRD2* rs2283265. The presence of *DAT1* 9R in the absence of *DRD2* rs2283265-T allele was associated with protection against crack cocaine addiction (OR = 0.580; 95% CI: 0.346-0.974; P = 0.040). However, these associations were no longer significant after Bonferroni correction (P > 0.002).

We did not find significant main effects or interaction effects (P > 0.002) of these polymorphisms on addiction severity (evaluated by ASI-6) on drugs subscale (**table 3**) and neither on alcohol subscale (**supplementary table 1**) and withdrawal symptoms (evaluated by CSSA) showed on **table 4**.

Discussion

To date, there is only a few genetic studies with crack cocaine and cocaine addiction. Our study is the first to evaluate the role of several dopaminergic genes and test their possible interaction effects on susceptibility and withdrawal symptoms on crack cocaine dependence. Despite the important role of dopamine in addiction, we did not find significant associations between dopaminergic genes and susceptibility to crack cocaine dependence or withdrawal symptoms.

The analyses presented here were very conservative in the sense that only previously reported significant main effects or gene-gene interactions were tested. In this sense, the interaction effect between *DRD2* rs2283265 and *DRD4* VNTR 3' had been described in alcoholics [16] and children with conduct disorder [15]. The interaction between *COMT* rs4680 and *DRD4* VNTR 3' may influence prefrontal cortex function (response control) as demonstrated by Heinzl et al [7]. The interaction between *DRD2* rs2283265 and VNTR in *DAT1* 3'UTR was reported to influence the risk on lethal cocaine abuse [18]. All these mechanisms could in principle have counterparts in crack cocaine addiction, and for this reason were tested.

While these results suggest that these polymorphisms in dopaminergic genes do not play a role in crack cocaine dependence, some limitations to this study must be considered carefully before excluding their potential effects. First, our sample is composed only by women, limiting the extrapolation of these findings to men, furthermore several previously reports were comprised majority [18] or only by men [16]. Another limitation of this study was the sample size, which had limited statistical power to detect risk alleles that contribute small effects to overall disorder. We need to further consider some specific aspects of the crack cocaine phenotype. This is certainly a group with very high rates of comorbidities, which leads to significant genetic heterogeneity. Another issue is the considerable influence of environmental factors. Most patients included in this study are of very low socioeconomic level. Unfortunately, the presence of these confounders may further decrease the statistical power of the study. Power is indeed a relevant factor to consider. For example, despite we did not observe a significant interaction between *COMT* rs4680 and *DRD4* VNTR 3', our findings are in

the same direction reported by Heinzl *et al* [7] on the epistatic interaction affecting prefrontal cortex function (response control). It is possible that a higher sample size or a future meta-analysis could confirm the original findings. On the other hand, selection of polymorphisms may also be an issue. For example, although most studies have focused on the intron 8 and 3' UTR VNTRs in *DAT1*, there is evidence that the 5' region may contain SNPs with a significant effect that could even confound previous findings in other regions of the gene [5]. Despite these limitations, we think that pursuing the investigation of the role of dopaminergic polymorphisms in crack cocaine is very relevant. The identification of significant relevant effects might provide pathophysiologic clues that could guide the development of new prevention or treatment approaches.

Our results do not report an association between polymorphisms in *DRD2*, *DRD4*, *COMT* and *DAT1* genes and crack cocaine addiction. Nonetheless, these results should be considered for inclusion in future meta-analyses where sample size and statistical power are increased.

References

- [1] A. Agrawal, K.J. Verweij, N.A. Gillespie, A.C. Heath, C.N. Lessov-Schlaggar, N.G. Martin, E.C. Nelson, W.S. Slutske, J.B. Whitfield, M.T. Lynskey, The genetics of addiction-a translational perspective, *Transl Psychiatry* 2 (2012) e140.
- [2] L.J. Bierut, Genetic vulnerability and susceptibility to substance dependence, *Neuron* 69 (2011) 618-627.
- [3] J.R. Duncan, Current perspectives on the neurobiology of drug addiction: a focus on genetics and factors regulating gene expression, *ISRN Neurol* 2012 (2012) 972607.
- [4] M.F. Folstein, S.E. Folstein, P.R. McHugh, "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician, *J Psychiatr Res* 12 (1975) 189-198.
- [5] J.P. Genro, C. Zeni, G.V. Polanczyk, T. Roman, L.A. Rohde, M.H. Hutz, A promoter polymorphism (-839 C > T) at the dopamine transporter gene is associated with attention deficit/hyperactivity disorder in Brazilian children, *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 144B (2007) 215-219.
- [6] C. Guindalini, M. Howard, K. Haddley, R. Laranjeira, D. Collier, N. Ammar, I. Craig, C. O'Gara, V.J. Bubb, T. Greenwood, J. Kelsoe, P. Asherson, R.M. Murray, A. Castelo, J.P. Quinn, H. Vallada, G. Breen, A dopamine transporter gene functional variant associated with cocaine abuse in a Brazilian sample, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (2006) 4552-4557.
- [7] S. Heinzl, T. Dresler, C.G. Baehne, M. Heine, A. Boreatti-Hümmer, C.P. Jacob, T.J. Renner, A. Reif, K.-P. Lesch, A.J. Fallgatter, COMT \times DRD4 epistasis impacts prefrontal cortex function underlying response control, *Cerebral Cortex* 23 (2013) 1453-1462.

- [8] R. Ittiwut, J.B. Listman, C. Ittiwut, J.F. Cubells, R.D. Weiss, K. Brady, D. Oslin, L.A. Farrer, H.R. Kranzler, J. Gelernter, Association between polymorphisms in catechol-O-methyltransferase (COMT) and cocaine-induced paranoia in European-American and African-American populations, *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* 156 (2011) 651-660.
- [9] H.C. Karoly, N. Harlaar, K.E. Hutchison, Substance use disorders: a theory-driven approach to the integration of genetics and neuroimaging, *Ann N Y Acad Sci* 1282 (2013) 71-91.
- [10] K.S. Kendler, L.M. Karkowski, M.C. Neale, C.A. Prescott, Illicit psychoactive substance use, heavy use, abuse, and dependence in a US population-based sample of male twins, *Arch Gen Psychiatry* 57 (2000) 261-269.
- [11] K.S. Kendler, C.A. Prescott, Cocaine use, abuse and dependence in a population-based sample of female twins, *Br J Psychiatry* 173 (1998) 345-350.
- [12] D.K. Lahiri, J.I. Nurnberger, Jr., A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies, *Nucleic Acids Res* 19 (1991) 5444.
- [13] F.W. Lohoff, A.E. Weller, P.J. Bloch, A.H. Nall, T.N. Ferraro, K.M. Kampman, H.M. Pettinati, D.W. Oslin, C.A. Dackis, C.P. O'Brien, W.H. Berrettini, Association between the catechol-O-methyltransferase Val158Met polymorphism and cocaine dependence, *Neuropsychopharmacology* 33 (2008) 3078-3084.
- [14] G. Maldonado, S. Greenland, Simulation study of confounder-selection strategies, *Am J Epidemiol* 138 (1993) 923-936.
- [15] N.R. Mota, C.H. Bau, T. Banaschewski, J.K. Buitelaar, R.P. Ebstein, B. Franke, M. Gill, J. Kuntsi, I. Manor, A. Miranda, Association between DRD2/DRD4 interaction and conduct disorder: A potential

developmental pathway to alcohol dependence, *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* (2013).

- [16] N.R. Mota, D.L. Rovaris, G.P. Bertuzzi, V. Contini, E.S. Vitola, E.H. Grevet, T. Roman, S.M. Callegari-Jacques, M.H. Hutz, C.H. Bau, DRD2/DRD4 heteromerization may influence genetic susceptibility to alcohol dependence, *Mol Psychiatry* 18 (2013) 401-402.
- [17] R.A. Moyer, D. Wang, A.C. Papp, R.M. Smith, L. Duque, D.C. Mash, W. Sadee, Intronic polymorphisms affecting alternative splicing of human dopamine D2 receptor are associated with cocaine abuse, *Neuropsychopharmacology* 36 (2011) 753-762.
- [18] D. Sullivan, J.K. Pinsonneault, A.C. Papp, H. Zhu, S. Lemeshow, D.C. Mash, W. Sadee, Dopamine transporter DAT and receptor DRD2 variants affect risk of lethal cocaine abuse: a gene-gene-environment interaction, *Transl Psychiatry* 3 (2013) e222.
- [19] A. Usiello, J.H. Baik, F. Rouge-Pont, R. Picetti, A. Dierich, M. LeMeur, P.V. Piazza, E. Borrelli, Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors, *Nature* 408 (2000) 199-203.

Tables

Table 1 – Characteristics of participants

	Crack user (n = 142)	Control (n= 314)	P-value
	<i>Mean (SD)</i>	<i>Mean (SD)</i>	
Age (years)	28.9 (7.6)	29.1 (7.6)	0.716
Schooling (years)	7.7 (3.1)	13.7 (3.0)	0.001
Genotype frequencies			
	<i>N (%)</i>	<i>N (%)</i>	
<i>DRD4</i> VNTR exon3*			
2/2	1 (0.7)	2 (0.6)	
2/4	16 (11.1)	44 (13.9)	
2/7	6 (4.2)	9 (3.8)	0.957/
4/4	63 (43.8)	118 (37.2)	0.472**
4/7	36 (25.0)	84 (26.5)	
7/7	6 (4.2)	13 (4.1)	
<i>DRD2</i> rs2283265			
G/G	90 (62.5)	220 (69.4)	0.402/
T/G	44 (30.6)	80 (25.2)	0.275**
T/T	8 (5.6)	11 (3.5)	
<i>COMT</i> rs4680			
Val/Val	42 (29.2)	106 (33.4)	0.64/
Met/Val	62 (43.2)	148 (46.7)	0.516**
Met/Met	27 (18.8)	60 (18.9)	
<i>DAT1</i> VNTR intron 8*			
5/5	21 (14.6)	15 (4.7)	0.097/
5/6	54 (37.5)	101 (31.9)	0.800**
6/6	64 (44.4)	185 (58.4)	
<i>DAT1</i> VNTR 3'UTR*			
9/9	13 (9.0)	27 (8.5)	0.793/
9/10	38 (26.4)	112 (35.3)	0.893**
10/10	77 (53.5)	158 (49.8)	

* Subjects with rare alleles were excluded from all analyses

** P-value for Hardy-Weinberg equilibrium (crack users and controls, respectively)

Table 2 - Binary logistic regression analysis of influence of *DRD4*, *DRD2*, *DAT* and *COMT* polymorphisms on crack addiction susceptibility.

Genotype	B	SE	Wald	df	OR (CI 95%)	P-Value
Main effect of <i>DRD4</i> VNTR exon3 in the total sample						
2/2+2/4+4/4	0	-			1	-
7 carriers	-0.105	0.221	0.228	1	0.900 (0.584-1.387)	0.633
Main effect of <i>DRD2</i> rs2283265 in the total sample						
GG	0	-			1	-
T carriers	0.334	0.214	2.435	1	1.397 (0.918-2.125)	0.119
Main effect of <i>COMT</i> rs4680 in the total sample						
Val/Val	0	-			1	-
Met carriers	0.077	0.222	0.120	1	1.080 (0.699-1.669)	0.729
Main effect of <i>DAT1</i> VNTR intron8 in the total sample						
6/6	0	-			1	-
5 carriers	0.625	0.207	9.098	1	1.869 (1.245-2.806)	0.003
Main effect of <i>DAT1</i> VNTR 3'UTR						
10/10	0	-			1	-
9 carriers	-0.284	0.215	1.747	1	0.753 (0.494-1.147)	0.186
<i>DRD4</i> VNTR exon3 and <i>DRD2</i> rs2283265 interaction						
Presence of VNTR exon3-7 allele in rs2283265-T carriers	-0.135	0.467	0.084	1	0.873 (0.350-2.180)	0.772
Presence of VNTR exon3-7 allele in rs2283265-T noncarriers	-0.090	0.277	0.106	1	0.914 (0.531-1.573)	0.745
Presence of rs2283265-T allele in VNTR exon3-7 noncarriers	0.394	0.292	1.814	1	1.482 (0.836-2.628)	0.178
<i>DRD4</i> VNTR exon3 and <i>COMT</i> rs4680 interaction						
Presence of VNTR exon3-7 allele in rs4680-Met carriers	0.138	0.490	0.080	1	1.148 (0.440-2.998)	0.778
Presence of VNTR exon3-7 allele in rs4680-Met noncarriers	-0.205	0.402	0.261	1	0.814 (0.370-1.790)	0.609
Presence of rs4680-Met allele in VNTR exon3-7 noncarriers	-0.009	0.295	0.001	1	0.991 (0.556-1.766)	0.975
<i>DRD2</i> rs2283265 and <i>DAT1</i> VNTR intron8 interaction						
Presence of rs2283265-T allele in VNTR intron8-5 carriers	-0.14	0.442	0.001	1	0.987 (0.415-2.348)	0.976
Presence of rs2283265-T allele in VNTR intron8-5 noncarriers	0.382	0.302	1.598	1	1.465 (0.810-2.649)	0.206
Presence of VNTR intron8-5 allele in rs2283265-T noncarriers	0.644	0.259	6.186	1	1.904 (1.146-3.164)	0.013
<i>DRD2</i> rs2283265 and <i>DAT1</i> VNTR 3'UTR interaction						
Presence of rs2283265-T allele in VNTR 3'UTR-9 carriers	0.602	0.353	2.903	1	1.825 (0.914-3.647)	0.088
Presence of rs2283265-T allele in VNTR 3'UTR-9 noncarriers	0.125	0.286	0.191	1	1.133 (0.647-1.983)	0.662
Presence of VNTR 3'UTR-9 allele in rs2283265-T noncarriers	-0.544	0.264	4.236	1	0.580 (0.346-0.974)	0.040

Table 3 - Generalized linear model to evaluate the influence of *DRD4* VNTR 3', *DRD2* rs2283265, *DAT* VNTR 3'-UTR, *DAT* VNTR intron 8 and *COMT* rs4680 SNPs on addiction severity by Addiction Severity Index 6th Edition (ASI-6) evaluations on drugs.

Model	Terms	Wald Chi-square	df	P-value
1	<i>DRD4</i> VNTR exon3	3.085	1	0.079
	<i>DRD2</i> rs2283265	3.600	1	0.058
	VNTR exon3 by rs2283265	0.761	1	0.383
2	<i>DRD4</i> VNTR exon3	0.804	1	0.370
	<i>COMT</i> rs4680	1.731	1	0.370
	VNTR exon3 by rs4680	1.503	1	0.220
3	<i>DRD2</i> rs2283265	2.608	1	0.106
	<i>DAT1</i> VNTR intron8	1.292	1	0.256
	rs2283265 by VNTR intron8	0.141	1	0.707
4	<i>DRD2</i> rs2283265	0.769	1	0.381
	<i>DAT1</i> VNTR 3'-UTR	3.169	1	0.075
	rs2283265 by VNTR 3'-UTR	0.453	1	0.501

df = degrees of freedom.

Table 4 - Generalized estimating equation models to evaluate the influence of *DRD4* VNTR 3', *DRD2* rs2283265, *DAT* VNTR 3'-UTR, *DAT* VNTR intron 8 and *COMT* rs4680 SNPs on withdrawal symptoms by Cocaine Selective Severity Assessment (CSSA) evaluations over time.

Model	Terms	Wald Chi-square	df	P-value
1	<i>DRD4</i> VNTR exon3	0.203	1	0.652
	<i>DRD2</i> rs2283265	0.759	1	0.384
	Time	13.216	3	0.004
	VNTR exon3 by rs2283265	0.099	1	0.753
	VNTR exon3 by time	0.086	3	0.993
	rs2283265 by time	0.902	3	0.825
	VNTR exon3 by rs2283265 by time	4.360	3	0.225
2	<i>DRD4</i> VNTR exon3	0.472	1	0.492
	<i>COMT</i> rs4680	0.000	1	0.995
	Time	7.946	3	0.047
	VNTR exon3 by rs4680	0.124	1	0.724
	VNTR exon3 by time	2.935	3	0.402
	rs4680 by time	6.163	3	0.104
	VNTR exon3 by rs4680 by time	0.619	3	0.892
3	<i>DRD2</i> rs2283265	0.665	1	0.415
	<i>DAT</i> VNTR intron8	0.247	1	0.619
	Time	12.872	3	0.005
	rs2283265 by VNTR intron8	0.002	1	0.962
	rs2283265 by time	1.468	3	0.690
	VNTR intron8 by time	1.180	3	0.758
	rs2283265 by VNTR intron8 by time	3.080	3	0.379
4	<i>DRD2</i> rs2283265	2.184	1	0.139
	<i>DAT1</i> VNTR 3'-UTR	0.072	1	0.789
	Time	12.069	3	0.007
	rs2283265-VNTR 3'-UTR	0.599	1	0.439
	rs2283265 by time	1.250	3	0.741
	VNTR 3'-UTR by time	4.775	3	0.189
	rs2283265 by VNTR 3' by UTR-time	2.205	3	0.531

df = degrees of freedom

Supplementary Table 1:**Table 1** - Generalized linear model to evaluate the influence of *DRD4* VNTR 3', *DRD2* rs2283265, *DAT* VNTR 3'-UTR, *DAT* VNTR intron 8 and *COMT* rs4680 SNPs on addiction severity by Addiction Severity Index 6th Edition (ASI-6) evaluations on alcohol.

Model	Terms	Wald Chi-square	df	P-value
1	<i>DRD4</i> VNTR exon3	0.565	1	0.452
	<i>DRD2</i> rs2283265	1.414	1	0.234
	VNTR exon3 by rs2283265	0.027	1	0.869
2	<i>DRD4</i> VNTR exon3	2.096	1	0.148
	<i>COMT</i> rs4680	0.194	1	0.660
	VNTR exon3 by rs4680	0.091	1	0.762
3	<i>DRD2</i> rs2283265	0.981	1	0.322
	<i>DAT1</i> VNTR intron8	0.184	1	0.668
	rs2283265 by VNTR intron8	1.117	1	0.291
4	<i>DRD2</i> rs2283265	0.436	1	0.509
	<i>DAT1</i> VNTR 3'-UTR	0.356	1	0.551
	rs2283265 by VNTR 3'-UTR	1.441	1	0.230

df = degrees of freedom.

4. Conclusões e Perspectivas

A dependência de drogas é influenciada por fatores intrínsecos (genética, sexo, idade, idade do primeiro uso, uso de outra droga, doenças mentais) e extrínsecos (disponibilidade da droga, influências sociais, traumas na infância, características socioeconômicas) [17]. Diversos estudos já relataram a importância da dopamina no abuso e desenvolvimento de dependência, assim como a associação de genes dopaminérgicos. Entretanto, na nossa amostra não foi encontrado nenhum efeito significativo dos genes avaliados sobre a susceptibilidade nem sobre a gravidade dos sintomas de abstinência.

Uma análise preliminar poderia sugerir um efeito principal do VNTR no intron 8 do gene *DAT1* sobre a susceptibilidade a dependência de *crack* em que a variante de 5 repetições (5R) conferiria risco. Esse risco parece ser intensificado na ausência do alelo T do *DRD2*-rs2283265. Contudo esses resultados são contrários a relatos anteriores da literatura onde a variante 6R foi associada ao abuso de cocaína [30]. Essa discrepância pode ser devido a diferenças de frequências já relatadas em diferentes grupos étnicos, onde afro-americanos possuem maior frequência do alelo 5R. Visto que a amostra de dependentes de cocaína inclui aproximadamente 70% indivíduos classificados como "não-brancos" e a amostra utilizada como controle era composta apenas por caucasianos esses resultados pode representar apenas um viés de seleção. Além disso, após a correção de Bonferroni para múltiplos testes esses dados deixaram de ser significativos.

Dessa forma, nenhum gene avaliado ou interação apresentou nenhum efeito significativo sobre a susceptibilidade a dependência de *crack* e sobre a gravidade da dependência e sintomas de abstinência.

Portanto, sugere-se a ausência de efeito dos polimorfismos avaliados nos genes *DRD2* (rs2283165), *DRD4* (VNTR 3'), *DAT1* (VNTR no intron 8 e no 3'-UTR) e *COMT* (rs4680) sobre os fenótipos estudados. Todavia, é preciso considerar as limitações desse estudo: primeiramente, a nossa amostra de dependentes de *crack* é composta apenas por mulheres, enquanto as evidências anteriores foram demonstradas em amostras

exclusivamente [44] ou majoritariamente [55] compostas por homens; além da questão de um dimorfismo sexual já bem descrito no caso do gene *COMT*. O tamanho amostral também deve ser considerado, limitando o poder estatístico. Além disso, a seleção dos polimorfismos também deve ser ponderada, tendo em vista a complexidade de alguns genes. Por exemplo, a maioria dos estudos em relação ao *DAT1* avaliam os VNTRs no intron 8 e 3'-UTR, entretanto há evidências que apontam na região 5' do gene SNPs com efeitos significativos sobre fenótipos psiquiátricos [24] que podem estar levando a resultados conflitantes em outras regiões do gene. Ainda, é necessário considerar alguns aspectos peculiares da dependência de *crack*. Primeiramente, indivíduos dependentes apresentam uma alta taxa de comorbidades, constituindo, portanto, um grupo com grande heterogeneidade. Outro aspecto a ser ponderado é a possível influência de fatores ambientais, como traumas e classe socioeconômica. Infelizmente, uma análise considerando tais confundidores é possível apenas com um maior tamanho amostral, de outra forma o poder estatístico seria muito baixo.

Por conseguinte, as perspectivas do estudo buscam amenizar essas limitações. A amostra continua sendo coletada, visando reavaliar os efeitos desses polimorfismos em uma amostra maior. Nossos resultados serão reavaliados em uma amostra composta por homens e mulheres e com uma amostra controle incluindo indivíduos classificados como "não-brancos", de modo que possamos utilizar o sexo e a etnia como confundidores em nossas análises, evitando possíveis vieses. Pretendemos ainda avaliar outros genes envolvidos na regulação dopaminérgica, como o gene que codifica a enzima monoamino oxidase A (MAOA), o qual possui evidências de associação com transtornos psiquiátricos, especialmente com o TUS. Apesar de todas as limitações, os presentes resultados podem ser disponibilizados para inclusão em futuras meta-análises.

5. Referências Adicionais

- [1] Portal Brasil. Vol. 2013, 2011.
- [2] E. Akgün, M.I. Javed, M.M. Lunzer, B.A. Smeester, A.J. Beitz, P.S. Portoghese, Ligands that interact with putative MOR-mGluR5 heteromer in mice with inflammatory pain produce potent antinociception, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (2013) 11595-11599.
- [3] A.A. Alcantara, V. Chen, B.E. Herring, J.M. Mendenhall, M.L. Berlanga, Localization of dopamine D2 receptors on cholinergic interneurons of the dorsal striatum and nucleus accumbens of the rat, *Brain Res* 986 (2003) 22-29.
- [4] V. Asghari, S. Sanyal, S. Buchwaldt, A. Paterson, V. Jovanovic, H.H. Van Tol, Modulation of intracellular cyclic AMP levels by different human dopamine D4 receptor variants, *J Neurochem* 65 (1995) 1157-1165.
- [5] R.L. Ashare, J.N. Valdez, K. Ruparel, B. Albelda, R.D. Hopson, J.R. Keefe, J. Loughhead, C. Lerman, Association of abstinence-induced alterations in working memory function and COMT genotype in smokers, *Psychopharmacology (Berl)* (2013).
- [6] M.J. Bannon, S.K. Michelhaugh, J. Wang, P. Sacchetti, The human dopamine transporter gene: gene organization, transcriptional regulation, and potential involvement in neuropsychiatric disorders, *Eur Neuropsychopharmacol* 11 (2001) 449-455.
- [7] M.F. Bear, B.W. Connors, M.A. Paradiso, *Neuroscience*, Wolters Kluwer Health, 2007.
- [8] L.J. Bierut, Genetic vulnerability and susceptibility to substance dependence, *Neuron* 69 (2011) 618-627.
- [9] G. Blasi, L. Lo Bianco, P. Taurisano, B. Gelao, R. Romano, L. Fazio, A. Papazacharias, A. Di Giorgio, G. Caforio, A. Rampino, R. Masellis, A. Papp, G. Ursini, L. Sinibaldi, T. Papolizio, W. Sadee, A. Bertolino, Functional variation of the dopamine D2 receptor gene is associated with emotional control as well as brain activity and connectivity during emotion processing in humans, *J Neurosci* 29 (2009) 14812-14819.
- [10] L. Bobadilla, J. Vaske, K. Asberg, Dopamine receptor (D4) polymorphism is related to comorbidity between marijuana abuse and depression, *Addict Behav* 38 (2013) 2555-2562.
- [11] E.A. Bolan, B. Kivell, V. Jaligam, M. Oz, L.D. Jayanthi, Y. Han, N. Sen, E. Urizar, I. Gomes, L.A. Devi, S. Ramamoorthy, J.A. Javitch, A. Zapata, T.S. Shippenberg, D2 receptors regulate dopamine transporter function via an extracellular signal-regulated kinases 1 and

2-dependent and phosphoinositide 3 kinase-independent mechanism, *Mol Pharmacol* 71 (2007) 1222-1232.

- [12] D.O. Borroto-Escuela, A. Ravani, A.O. Tarakanov, I. Brito, M. Narvaez, W. Romero-Fernandez, F. Corrales, L.F. Agnati, S. Tanganelli, L. Ferraro, K. Fuxe, Dopamine D2 receptor signaling dynamics of dopamine D2-neurotensin 1 receptor heteromers, *Biochem Biophys Res Commun* 435 (2013) 140-146.
- [13] A.M. Carneiro, S.L. Ingram, J.M. Beaulieu, A. Sweeney, S.G. Amara, S.M. Thomas, M.G. Caron, G.E. Torres, The multiple LIM domain-containing adaptor protein Hic-5 synaptically colocalizes and interacts with the dopamine transporter, *J Neurosci* 22 (2002) 7045-7054.
- [14] F.M. Chang, J.R. Kidd, K.J. Livak, A.J. Pakstis, K.K. Kidd, The worldwide distribution of allele frequencies at the human dopamine D4 receptor locus, *Hum Genet* 98 (1996) 91-101.
- [15] J. Chen, B.K. Lipska, N. Halim, Q.D. Ma, M. Matsumoto, S. Melhem, B.S. Kolachana, T.M. Hyde, M.M. Herman, J. Apud, M.F. Egan, J.E. Kleinman, D.R. Weinberger, Functional analysis of genetic variation in catechol-O-methyltransferase (COMT): effects on mRNA, protein, and enzyme activity in postmortem human brain, *Am J Hum Genet* 75 (2004) 807-821.
- [16] C.M. Diaz-Asper, D.R. Weinberger, T.E. Goldberg, Catechol-O-methyltransferase polymorphisms and some implications for cognitive therapeutics, *NeuroRx* 3 (2006) 97-105.
- [17] F. Ducci, D. Goldman, The genetic basis of addictive disorders, *Psychiatr Clin North Am* 35 (2012) 495-519.
- [18] J.R. Duncan, Current perspectives on the neurobiology of drug addiction: a focus on genetics and factors regulating gene expression, *ISRN Neurol* 2012 (2012) 972607.
- [19] J. Eriksen, T.N. Jorgensen, U. Gether, Regulation of dopamine transporter function by protein-protein interactions: new discoveries and methodological challenges, *J Neurochem* 113 (2010) 27-41.
- [20] C. Fehr, I. Yakushev, N. Hohmann, H.G. Buchholz, C. Landvogt, H. Deckers, A. Eberhardt, M. Klager, M.N. Smolka, A. Scheurich, T. Dielentheis, L.G. Schmidt, F. Rosch, P. Bartenstein, G. Grunder, M. Schreckenberger, Association of low striatal dopamine d2 receptor availability with nicotine dependence similar to that seen with other drugs of abuse, *Am J Psychiatry* 165 (2008) 507-514.
- [21] S. Ferre, R. Baler, M. Bouvier, M.G. Caron, L.A. Devi, T. Durroux, K. Fuxe, S.R. George, J.A. Javitch, M.J. Lohse, K. Mackie, G. Milligan, K.D. Pflieger, J.P. Pin, N.D. Volkow, M. Waldhoer, A.S. Woods, R. Franco, Building a new conceptual framework for receptor heteromers, *Nat Chem Biol* 5 (2009) 131-134.

- [22] M.J. Frank, K. Hutchison, Genetic contributions to avoidance-based decisions: striatal D2 receptor polymorphisms, *Neuroscience* 164 (2009) 131-140.
- [23] K. Fuxe, S. Ferre, M. Canals, M. Torvinen, A. Terasmaa, D. Marcellino, S.R. Goldberg, W. Staines, K.X. Jacobsen, C. Lluís, A.S. Woods, L.F. Agnati, R. Franco, Adenosine A2A and dopamine D2 heteromeric receptor complexes and their function, *J Mol Neurosci* 26 (2005) 209-220.
- [24] J.P. Genro, C. Zeni, G.V. Polanczyk, T. Roman, L.A. Rohde, M.H. Hutz, A promoter polymorphism (-839 C > T) at the dopamine transporter gene is associated with attention deficit/hyperactivity disorder in Brazilian children, *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 144B (2007) 215-219.
- [25] S.J. Glatt, S.V. Faraone, J.A. Lasky-Su, T. Kanazawa, H.G. Hwu, M.T. Tsuang, Family-based association testing strongly implicates DRD2 as a risk gene for schizophrenia in Han Chinese from Taiwan, *Mol Psychiatry* 14 (2009) 885-893.
- [26] J.A. Gogos, M. Morgan, V. Luine, M. Santha, S. Ogawa, D. Pfaff, M. Karayiorgou, Catechol-O-methyltransferase-deficient mice exhibit sexually dimorphic changes in catecholamine levels and behavior, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998) 9991-9996.
- [27] I. Gomes, W. Fujita, A. Gupta, A.S. Saldanha, A. Negri, C.E. Pinello, E. Roberts, M. Filizola, P. Hodder, L.A. Devi, Identification of a mu-delta opioid receptor heteromer-biased agonist with antinociceptive activity, *Proc Natl Acad Sci U S A* 110 (2013) 12072-12077.
- [28] S. Gonzalez, C. Rangel-Barajas, M. Peper, R. Lorenzo, E. Moreno, F. Ciruela, J. Borycz, J. Ortiz, C. Lluís, R. Franco, P.J. McCormick, N.D. Volkow, M. Rubinstein, B. Floran, S. Ferre, Dopamine D4 receptor, but not the ADHD-associated D4.7 variant, forms functional heteromers with the dopamine D2S receptor in the brain, *Mol Psychiatry* 17 (2012) 650-662.
- [29] T.A. Greenwood, J.R. Kelsoe, Promoter and intronic variants affect the transcriptional regulation of the human dopamine transporter gene, *Genomics* 82 (2003) 511-520.
- [30] C. Guindalini, M. Howard, K. Haddley, R. Laranjeira, D. Collier, N. Ammar, I. Craig, C. O'Gara, V.J. Bubb, T. Greenwood, J. Kelsoe, P. Asherson, R.M. Murray, A. Castelo, J.P. Quinn, H. Vallada, G. Breen, A dopamine transporter gene functional variant associated with cocaine abuse in a Brazilian sample, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (2006) 4552-4557.
- [31] S. Heinzl, T. Dresler, C.G. Baehne, M. Heine, A. Boreatti-Hümmer, C.P. Jacob, T.J. Renner, A. Reif, K.-P. Lesch, A.J. Fallgatter, COMT \times

- DRD4 epistasis impacts prefrontal cortex function underlying response control, *Cerebral Cortex* 23 (2013) 1453-1462.
- [32] L. Hosak, Role of the COMT gene Val158Met polymorphism in mental disorders: a review, *Eur Psychiatry* 22 (2007) 276-281.
- [33] M. Huotari, M. Santha, L.R. Lucas, M. Karayiorgou, J.A. Gogos, P.T. Mannisto, Effect of dopamine uptake inhibition on brain catecholamine levels and locomotion in catechol-O-methyltransferase-disrupted mice, *J Pharmacol Exp Ther* 303 (2002) 1309-1316.
- [34] R. Ittiwut, J.B. Listman, C. Ittiwut, J.F. Cubells, R.D. Weiss, K. Brady, D. Oslin, L.A. Farrer, H.R. Kranzler, J. Gelernter, Association between polymorphisms in catechol-O-methyltransferase (COMT) and cocaine-induced paranoia in European-American and African-American populations, *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* 156 (2011) 651-660.
- [35] E.R. Kandel, J.H. Schwartz, T.M. Jessell, *Principles of neural science*, Vol. 4, McGraw-Hill New York, 2000.
- [36] Z.U. Khan, L. Mrzljak, A. Gutierrez, A. de la Calle, P.S. Goldman-Rakic, Prominence of the dopamine D2 short isoform in dopaminergic pathways, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998) 7731-7736.
- [37] G.J. LaHoste, J.M. Swanson, S.B. Wigal, C. Glabe, T. Wigal, N. King, J.L. Kennedy, Dopamine D4 receptor gene polymorphism is associated with attention deficit hyperactivity disorder, *Mol Psychiatry* 1 (1996) 121-124.
- [38] F.J. Lee, F. Liu, Z.B. Pristupa, H.B. Niznik, Direct binding and functional coupling of alpha-synuclein to the dopamine transporters accelerate dopamine-induced apoptosis, *FASEB J* 15 (2001) 916-926.
- [39] F.J. Lee, L. Pei, A. Moszczynska, B. Vukusic, P.J. Fletcher, F. Liu, Dopamine transporter cell surface localization facilitated by a direct interaction with the dopamine D2 receptor, *EMBO J* 26 (2007) 2127-2136.
- [40] K. Lehto, K. Akkermann, J. Parik, T. Veidebaum, J. Harro, Effect of COMT Val158Met polymorphism on personality traits and educational attainment in a longitudinal population representative study, *Eur Psychiatry* (2013).
- [41] A.C.P.R. Marques, M. Ribeiro, R.R. Laranjeira, N.d.C. Andrada, Abuse and addiction: crack, *Rev Assoc Med Bras* 58 (2012) 141-153.
- [42] G.M. Miller, B.K. Madras, Polymorphisms in the 3'-untranslated region of human and monkey dopamine transporter genes affect reporter gene expression, *Mol Psychiatry* 7 (2002) 44-55.

- [43] N.R. Mota, C.H. Bau, T. Banaschewski, J.K. Buitelaar, R.P. Ebstein, B. Franke, M. Gill, J. Kuntsi, I. Manor, A. Miranda, Association between DRD2/DRD4 interaction and conduct disorder: A potential developmental pathway to alcohol dependence, *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* (2013).
- [44] N.R. Mota, D.L. Rovaris, G.P. Bertuzzi, V. Contini, E.S. Vitola, E.H. Grevet, T. Roman, S.M. Callegari-Jacques, M.H. Hutz, C.H. Bau, DRD2/DRD4 heteromerization may influence genetic susceptibility to alcohol dependence, *Mol Psychiatry* 18 (2013) 401-402.
- [45] R.A. Moyer, D. Wang, A.C. Papp, R.M. Smith, L. Duque, D.C. Mash, W. Sadee, Intronic polymorphisms affecting alternative splicing of human dopamine D2 receptor are associated with cocaine abuse, *Neuropsychopharmacology* 36 (2011) 753-762.
- [46] B. O'Neill, M.R. Tilley, H.H. Gu, Cocaine produces conditioned place aversion in mice with a cocaine-insensitive dopamine transporter, *Genes Brain Behav* 12 (2013) 34-38.
- [47] J.K. Pinsonneault, D.D. Han, K.E. Burdick, M. Kataki, A. Bertolino, A.K. Malhotra, H.H. Gu, W. Sadee, Dopamine transporter gene variant affecting expression in human brain is associated with bipolar disorder, *Neuropsychopharmacology* 36 (2011) 1644-1655.
- [48] R.J. Primus, A. Thurkauf, J. Xu, E. Yevich, S. McInerney, K. Shaw, J.F. Tallman, D.W. Gallagher, II. Localization and characterization of dopamine D4 binding sites in rat and human brain by use of the novel, D4 receptor-selective ligand [3H]NGD 94-1, *J Pharmacol Exp Ther* 282 (1997) 1020-1027.
- [49] D. Purves, G. Augustine, D. Fitzpatrick, W. Hall, A. LaMantia, J. McNamara, L. White, *Neuroscience*, 2008. Sinauer Associates.
- [50] A.J. Rashid, B.F. O'Dowd, V. Verma, S.R. George, Neuronal Gq/11-coupled dopamine receptors: an uncharted role for dopamine, *Trends Pharmacol Sci* 28 (2007) 551-555.
- [51] M. Scarselli, F. Novi, E. Schallmach, R. Lin, A. Baragli, A. Colzi, N. Griffon, G.U. Corsini, P. Sokoloff, R. Levenson, Z. Vogel, R. Maggio, D2/D3 dopamine receptor heterodimers exhibit unique functional properties, *J Biol Chem* 276 (2001) 30308-30314.
- [52] O. Schoots, H.H. Van Tol, The human dopamine D4 receptor repeat sequences modulate expression, *Pharmacogenomics J* 3 (2003) 343-348.
- [53] D.W. Self, E.J. Nestler, Relapse to drug-seeking: neural and molecular mechanisms, *Drug Alcohol Depend* 51 (1998) 49-60.

- [54] J. Shi, E.S. Gershon, C. Liu, Genetic associations with schizophrenia: meta-analyses of 12 candidate genes, *Schizophr Res* 104 (2008) 96-107.
- [55] D. Sullivan, J.K. Pinsonneault, A.C. Papp, H. Zhu, S. Lemeshow, D.C. Mash, W. Sadee, Dopamine transporter DAT and receptor DRD2 variants affect risk of lethal cocaine abuse: a gene-gene-environment interaction, *Transl Psychiatry* 3 (2013) e222.
- [56] G.E. Torres, W.-D. Yao, A.R. Mohn, H. Quan, K.-M. Kim, A.I. Levey, J. Staudinger, M.G. Caron, Functional interaction between monoamine plasma membrane transporters and the synaptic PDZ domain-containing protein PICK1, *Neuron* 30 (2001) 121-134.
- [57] A. Usiello, J.H. Baik, F. Rouge-Pont, R. Picetti, A. Dierich, M. LeMeur, P.V. Piazza, E. Borrelli, Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors, *Nature* 408 (2000) 199-203.
- [58] K. Van Craenenbroeck, S.D. Clark, M.J. Cox, J.N. Oak, F. Liu, H.H. Van Tol, Folding efficiency is rate-limiting in dopamine D4 receptor biogenesis, *J Biol Chem* 280 (2005) 19350-19357.
- [59] N.D. Volkow, J.S. Fowler, G.J. Wang, R. Hitzemann, J. Logan, D.J. Schlyer, S.L. Dewey, A.P. Wolf, Decreased dopamine D2 receptor availability is associated with reduced frontal metabolism in cocaine abusers, *Synapse* 14 (1993) 169-177.
- [60] N.D. Volkow, G.J. Wang, L. Maynard, J.S. Fowler, B. Jayne, F. Telang, J. Logan, Y.S. Ding, S.J. Gatley, R. Hitzemann, C. Wong, N. Pappas, Effects of alcohol detoxification on dopamine D2 receptors in alcoholics: a preliminary study, *Psychiatry Res* 116 (2002) 163-172.
- [61] F. Wang, A. Simen, A. Arias, Q.-W. Lu, H. Zhang, A large-scale meta-analysis of the association between the ANKK1/DRD2 Taq1A polymorphism and alcohol dependence, *Human genetics* 132 (2013) 347-358.
- [62] Y. Zhang, A. Bertolino, L. Fazio, G. Blasi, A. Rampino, R. Romano, M.L. Lee, T. Xiao, A. Papp, D. Wang, W. Sadee, Polymorphisms in human dopamine D2 receptor gene affect gene expression, splicing, and neuronal activity during working memory, *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (2007) 20552-20557.