

## Correlación genotipo-fenotipo cardiovascular de la dopamina $\beta$ -hidroxilasa ( $D\beta H$ )

Carlos A Isaza M<sup>1,2\*</sup>, Sandra Y Valencia C<sup>1,3</sup>, Carlos M Ríos G<sup>4</sup>, Andrea López B<sup>1</sup>, Beatriz Giraldo O<sup>1,3</sup>, Alejandra Quiceno G<sup>1</sup>.

1 Programa de Medicina, Fundación Universitaria Autónoma de las Américas.

2 Grupo de Investigación en Farmacogenética, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Tecnológica de Pereira.

3 Grupo de Investigación en Salud y Comunidad, Fundación Universitaria Autónoma de las Américas.

4: Residente de Medicina Interna de la Universidad Tecnológica de Pereira.

\* Correo electrónico: caisaza@utp.edu.co

Fecha de Recepción: 15/07/2015

Fecha de Solicitud de Correcciones: 20/09/2015

Fecha de Aceptación: 30/10/2015

### Resumen

**Introducción.** Al convertir dopamina en norepinefrina la dopamina  $\beta$ -hidroxilasa ( $D\beta H$ ) regula el tono dopaminérgico y adrenérgico. Los alelos rs1989787, rs1611115 y rs1108580 del gen  $D\beta H$  se asocian con actividad deficiente de la enzima y por eso evaluamos sus influencias sobre variables cardiovasculares clínicas, bioquímicas y farmacológicas. **Métodos:** A 44 voluntarios sanos con los haplotipos triple homocigoto nativo (CC/CC/AA), triple heterocigoto (CT/CT/AG), doble homocigoto mutado (TT/CC/GG) y homocigoto mutado para el rs1611115 (CC/TT/AA) les medimos presión arterial sistólica (PAS), presión arterial diastólica (PAD) y frecuencia cardíaca (FC) en posición decúbito, sentado, de pie, bajo estímulo de frío, con la maniobra de Valsalva y post ingestión de clonidina; adicionalmente medimos actividad enzimática por espectrofotometría y concentraciones séricas de dopamina y norepinefrina por ELISA. **Resultados:** Edad promedio 21,6 $\pm$ 3,5 años, 54,5% mujeres. No hubo diferencias de PAS, PAD y FC obtenidas bajo diferentes condiciones; sólo encontramos cambios significativos en los descensos de la PAS y la PAD postingestión de clonidina. No hubo relación de las variables clínicas, bioquímicas y farmacológicas mencionadas con los alelos rs1989787 y rs1108580, pero los portadores del alelo mutado T del rs1611115 sí tenían frecuencias cardíacas estadísticamente inferiores a los portadores del alelo nativo C. La actividad enzimática y las concentraciones de dopamina y norepinefrina no se correlacionaron con las variables cardiovasculares, pero se encontró correlación directa entre la actividad de la enzima y las concentraciones de norepinefrina. **Conclusión:** El polimorfismo -970C>T del gen  $D\beta H$  es el único asociado con menores frecuencias cardíacas en portadores del alelo mutado T.

**Palabras clave:** dopamina  $\beta$ -hidroxilasa, farmacogenética, polimorfismo genético.

### Cardiovascular correlation genotype-phenotype of dopamine $\beta$ -hydroxylase ( $D\beta H$ )

#### Abstract

**Introduction.** To the converting dopamine in norepinephrine the enzyme dopamine  $\beta$ -hydroxylase ( $D\beta H$ ) regulates dopaminergic and adrenergic tone. The alleles rs1989787, rs1611115 and rs1108580 of the gene  $D\beta H$  are associated with deficient activity of the enzyme and thus the influence of these SNPs in clinical, biochemical and pharmacological variables related with the cardiovascular system was evaluated. **Methods:** 44 healthy volunteers with homozygous triple native (CC/CC/AA), triple heterozygous (CT/CT/AG), double mutated homozygous (TT/CC/GG) and mutated homozygous haplotypes for the rs1611115 (CC/TT/AA) were subjected to measurements of systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP) and heart rate (HR) in the positions prone, sitting, standing, under cold stimulus, with the Valsalva maneuver and after clonidine ingestion; additionally the enzymatic activity of the  $D\beta H$  and the concentrations of dopamine and norepinephrine were determined by spectrophotometry and ELISA, respectively. **Results:** The average age of the group was 21.6 $\pm$ 3.5 years, and 54.5% were women. There were no differences in SBP, DBP and HR obtained under different conditions; we only found significant changes in SBP and DBP decrease after clonidine ingestion. There were no associations between clinical, biochemical and pharmacological variables with the rs1989787 and rs1108580 alleles, however, carriers of the mutant allele T of the rs1611115 had heart rates statistically lower than the native C allele carriers. Neither enzymatic activity nor dopamine and norepinephrine levels were correlated with cardiovascular variables, but a direct correlation between enzyme activity and norepinephrine concentrations was found. **Conclusion:** The -970C>T polymorphism of  $D\beta H$  gene is the only one associated with lower heart rates in carriers of the mutated allele T.

**Key words:** dopamine  $\beta$ -hydroxylase, pharmacogenetics, genetic polymorphisms

### Introducción

La enzima dopamina  $\beta$ -hidroxilasa ( $D\beta H$ ) está presente en las vesículas sinápticas del sistema nervioso central (SNC), de la médula adrenal y de las neuronas simpáticas posganglionares, donde cataliza la conversión de dopamina (DA) en norepinefrina (NE) (1). Esta función de la enzima es clave en el adecuado balance de los circuitos dopaminérgico y adrenérgico, tanto en el Sistema Nervioso Central (SNC) como en la porción Simpática del Sistema Nervioso Autónomo (SNA) (2).

En el año 1986 Robertson D *et al* (3) describieron un raro síndrome de deficiencia congénita de dopamina  $\beta$ -hidroxilasa, caracterizado por disminución del tono adrenérgico y deficiente regulación cardiovascular (bradicardia y marcada hipotensión ortostática), respuestas atípicas a medicamentos que actúan a través del SNA (no baja la presión arterial con clonidina y propranolol), con concentraciones plasmáticas elevadas de dopamina e indetectables de norepinefrina (Dopamine Beta-Hydroxylase Deficiency - GeneReviews™ - NCBI Bookshelf.mht). La base genética de dicha deficiencia enzimática no ha sido dilucidada por completo y, debido al pequeño número de individuos diagnosticados con este desorden, no ha sido posible establecer correlaciones entre fenotipos específicos y mutaciones del gen  $D\beta H$ .

El gen que codifica la enzima  $D\beta H$  fue clonado y mapeado en el cromosoma 9q34, tiene un tamaño aproximado de 23 Kb y se compone de 12 exones que codifican para una proteína de 603 aminoácidos (NCBI, secuencia de referencia GenBank NC\_000009.11). Dicho gen tiene polimorfismos que producen enzima con actividad defectuosa, razón por la cual en todos los grupos étnicos estudiados se encuentran individuos con actividad de la enzima normal, intermedia o baja. Algunos estudios asocian ciertos alelos del gen  $D\beta H$  con desórdenes mentales (esquizofrenia, depresión, déficit de atención e hiperactividad) (4-8), enfermedad de Alzheimer (9), enfermedad de Parkinson (10), migraña (11), conducta agresiva y

susceptibilidad a la drogadicción (12-15). Por otro lado, dado el papel clave del sistema monoaminérgico en el funcionamiento del SNA, también se ha explorado la asociación de polimorfismos del gen *DβH* con variables cardiovasculares (presión arterial, frecuencia cardíaca, gasto cardíaco, etc) y factores de riesgo cardiovascular (16-19). Por último, puesto que la deficiencia de la enzima provoca pérdida del balance entre DA y NE, también se ha reportado respuesta alterada a fármacos relacionados con las vías biosintéticas y los mecanismos de acción de catecolaminas (20-24).

Aunque la prevalencia alélica gen *DβH* varía ampliamente entre las etnias, confiriéndole a cada variante distinta importancia en cada población, los alelos mejor estudiados y con mayor evidencia de sus asociaciones con reducción de la actividad enzimática son: 1) rs1989787 (-2073C>T), situado en la región del promotor, altera la transcripción; 2) rs1611115 (-970C>T), situado en la región del promotor, altera la transcripción y es el polimorfismo que más afecta la actividad de la enzima; 3) rs1108580 (444A>G), situado en el exón 2; 4) rs6271 (1603C>T), situado en el exón 11 (18,25-27).

Dado el papel clave de la dopamina β-hidroxilasa en el tono adrenérgico del sistema cardiovascular, esta enzima es el foco de atención de estudios encaminados a clarificar la fisiopatología de trastornos como la hipertensión, la cardiopatía isquémica y la insuficiencia cardíaca, pues se sabe que la excesiva actividad simpatoadrenal está implicada en la patogénesis de dichas enfermedades (27,28). En un estudio realizado por nuestro grupo (29) determinamos las frecuencias de estos cuatro alelos del gen *DβH* en una muestra de 143 adultos colombianos, de rasgos fenotípicos mestizos, de ambos sexos y clínicamente sanos. El rs 6271 resultó monomórfico entre nosotros, así que las prevalencias alélicas, genotípicas y haplotípicas reportadas se refieren a los polimorfismos rs1989787, rs1611115 y rs1108580. Los resultados del mencionado estudio los utilizamos como insumo para reclutar los voluntarios de esta investigación, pertenecientes a los grupos haplotípicos triple homocigoto nativo (CC/CC/AA), triple heterocigoto (CT/CT/AG), doble homocigoto mutado (TT/CC/GG) y homocigoto mutado para el rs1611115 (CC/TT/AA).

En este estudio nos propusimos evaluar en qué magnitud los polimorfismos mencionados del gen *DβH* se expresan fenotípicamente en una serie de variables clínicas, bioquímicas y de respuesta a fármacos, todas ellas relacionadas con la actividad simpática del sistema cardiovascular.

## Materiales y métodos

**Voluntarios y diseño.** De acuerdo con los resultados del anterior estudio de genotipificación *DβH*, en el que determinamos las frecuencias de los alelos -2073C>T (rs1989787), -970C>T (rs1611115) y 444A>G (rs1108580) en una muestra de mestizos colombianos (29), enrolamos en esta investigación personas con los siguientes haplotipos de los tres polimorfismos estudiados: i) triple homocigoto nativo (CC/CC/AA, n=14); ii) triple heterocigoto (CT/CT/AG, n=15); iii) doble homocigoto mutado (TT/CC/GG, n=7, ya que no encontramos individuos homocigotos mutados para los tres polimorfismos); iv) homocigoto mutado únicamente para el rs1611115 (CC/TT/AA, n=8). Una vez explicado el protocolo y firmado el consentimiento informado, a cada voluntario se le practicaron las siguientes pruebas: i) frecuencia cardíaca y presión arterial en posición decúbito (5 minutos), sentado y de pie (cada 2 minutos por 6 minutos); ii) frecuencia cardíaca y presión arterial durante la maniobra de Valsalva (30); iii) efecto presor al frío (frecuencia cardíaca y presión arterial en reposo e inmediatamente después de la inmersión de las manos en agua helada durante 1 minuto (31)); iv) frecuencia cardíaca y presión arterial 1½ a 2 horas después del consumo de una dosis de 150 ug de

clonidina (tiempo del efecto pico del fármaco: 1-3 horas); v) niveles plasmáticos de dopamina y de norepinefrina en estado basal; vi) actividad plasmática de la enzima *DβH* en estado basal. El estudio fue doble ciego, en cuanto que ni los sujetos de investigación ni quienes participaron en la realización de las pruebas clínicas o de laboratorio conocían los genotipos de los voluntarios. Todos los participantes estaban clínicamente sanos y no tenían antecedentes de enfermedad cardiovascular, en particular de hipertensión, bradicardia severa o arritmias. Se excluyeron personas menores de edad, con historia de alergia a clonidina, que consumieran medicamentos y mujeres embarazadas.

**Concentraciones de dopamina y norepinefrina.** La determinación de los niveles plasmáticos de DA y NE se hizo mediante pruebas de ELISA, en un laboratorio clínico debidamente acreditado.

**Determinación de la actividad de la enzima dopamina β-hidroxilasa.** A cada voluntario se le tomó una muestra de 4 mL de sangre en tubo con citrato como anticoagulante. El plasma se obtuvo por centrifugación a 5000 X g por 10 min y se almacenó a -20°C hasta el momento del análisis. La actividad de la enzima se estableció por modificación del método de Nagatsu *et al* (32), basado en la capacidad de la *DβH* para catalizar la conversión de tiramina a octopamina, la cual luego es oxidada a p-hidroxibenzaldehído y medida por espectrofotometría. Las concentraciones de los reactivos fueron las propuestas por Bonifácio *et al* (33), excepto para NEM. La mezcla de reacción inicial contenía 6 ml (200 mM) de acetato de sodio a pH 5, 1,5 ml (10 mM) de fumarato de sodio a pH 5, 1,5 ml (10 mM) de ascorbato, 1,5 ml (1 mM) de pargilina, 4,5 ml (0,3 mM) de NEM, 15 unidades de catalasa y 6 ml de agua desionizada; para la preparación de la muestra problema se añadieron 25 µl de plasma humano. Se continuó añadiendo 100 µl de tiramina (25 mM) a todos los tubos y se mezcló agitando en el vórtex. Luego de incubar por 60 min a 37°C en un baño con agitación se detuvo la reacción con 200 µl de ácido preclórico al 20%, se agitó en vórtex y se centrifugó durante 1 min a 3500 rpm (microcentrífuga Fisher Brand), a temperatura ambiente para precipitar proteínas. El sobrenadante se pasó a las columnas de intercambio iónico Oasis HBL, previamente preparadas (se acondiciona el cartucho con 4 ml de metanol seguidos de 5 ml de agua ultrapura, todo ello con un caudal de unos 3 ml/min, y se centrifugó a 300 rpm por 30 s (en centrifuga Beckman DYNAT III), quedando así la octopamina en la columna, la cual luego se eluyó mediante la adición de 2 porciones de 1 mL de NH<sub>4</sub>OH 4 N. Al eluato se le añadieron 200 µl de NaIO<sub>4</sub> al 2% para que se produjera la oxidación de la octopamina a p-hidroxibenzaldehído. Después de 6 min se añadieron 200 µl de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> y se agitó en vortex. La actividad de la enzima *DβH* se reporta como µmoles de octopamina formados por minuto a partir de una solución de tiramina, por litro de plasma a 37°C (µmol.min<sup>-1</sup>.L<sup>-1</sup>), utilizando el método descrito por Mustapic *et al* (34).

**Aspectos legales.** Esta investigación fue aprobada desde el punto de vista técnico-científico y bioético por las respectivas instancias académicas de la Fundación Universitaria Autónoma de las Américas y de la Universidad Tecnológica de Pereira. El consentimiento informado se diligenció de acuerdo con el artículo 11, literal b, de la Resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia, en la categoría de investigación con riesgo mínimo.

**Manejo estadístico.** Las variables cualitativas se presentan como porcentajes y las cuantitativas como media±DE. Se empleó la prueba de Chi cuadrado para comparar variables cualitativas y las variables cuantitativas se compararon mediante pruebas paramétricas o no paramétricas, según correspondiera; también se hicieron correlaciones bivariadas. Valores de P<0.05 se consideraron significativos. Los datos se procesaron y analizaron en el software SPSS for Window, v 19.0.

## Resultados

Participaron 44 voluntarios, de los cuales 24 (54,5%) eran mujeres; la edad promedio del grupo fue de 21,6±3,5 años, sin diferencia entre los géneros.

En el cuadro 1 se presentan los datos de presión arterial sistólica (PAS), presión arterial diastólica (PAD) y frecuencia cardíaca (FC) obtenidos en diferentes condiciones clínicas; las maniobras de Valsalva fueron negativas. Sólo encontramos cambios estadísticamente significativos en los descensos de la PAS y la PAD post-clonidina.

**Cuadro 1.** Variables cardiovasculares obtenidas bajo diferentes condiciones clínicas.

Variable cardiovascular	Presión arterial sistólica (mmHg)	Presión arterial diastólica (mmHg)	Frecuencia cardíaca (latidos/min)
Decúbito	107±9	65±7	72±9
Sentado	105±10	64±7	73±9
De pie	105±9	65±6	74±9
Con estímulo de frío	109±13	67±9	74±10
Post- clonidina	96±12	58±8	73±8

Al cruzar los valores de las variables cardiovasculares, de las concentraciones de dopamina y norepinefrina, y de la actividad de la enzima DβH, con cada uno de los tres polimorfismos que conforman los cuatro haplotipos estudiados, no encontramos diferencias asociadas con los alelos rs1989787 y rs1108580, pero sí hallamos que los individuos portadores del alelo mutado T del rs1611115 tenían frecuencias cardíacas estadísticamente inferiores a los portadores del alelo nativo C (Cuadro 2). Estas diferencias se conservan al comparar los haplotipos que contienen el alelo T del rs1611115 (CT/CT/AG + C/T/A) con los no portadores de dicho alelo (C/C/A + T/C/G) (datos no mostrados).

No hallamos correlaciones entre la actividad de la enzima DβH y las concentraciones de dopamina o norepinefrina con las variables cardiovasculares, pero sí existe correlación directa entre las concentraciones de norepinefrina y la actividad de la enzima (Pearson=0,4; P=0,04).

**Cuadro 2.** Variables cardiovasculares, concentraciones séricas de norepinefrina (NE) y dopamina (DA) y actividad de la enzima DβH de portadores del alelo mutado T del rs1611115 del gen de la DβH, comparados con los portadores del alelo nativo C.

	SNP rs1611115 DEL GEN DβH		p
	Alelo mutado T (heterocigoto + homocigoto) (n=23)	Alelo nativo C (homocigoto) (n=21)	
Presión arterial sistólica (mmHg)			
decúbito	107±7	107±10	0,81*
sentado	106±9	104±10	0,51*
de pie	106±9	105±10	0,68*
con estímulo frío	106±16	107±10	0,52*
post-clonidina	95±12	96±13	0,78*
Presión arterial diastólica (mmHg)			
decúbito	64±5	66±9	0,44*
sentado	65±6	66±9	0,74*
de pie	66±6	64±7	0,38*
con estímulo frío	67±10	67±8	0,83*
post-clonidina	57±7	59±9	0,48*
Frecuencia cardíaca (latidos/min)			
decúbito	69±8	75±9	0,037*
sentado	70±8	75±9	0,030*
de pie	71±8	77±9	0,022*
con estímulo frío	70±8	79±10	0,007*
post-clonidina	71±9	76±7	0,059*
Concentración de NE (pg/mL)	83±78	175±198	0,15†
Concentración de DA (pg/mL)	15±8	18±14	0,48†
Actividad enzimática (μmoles. min <sup>-1</sup> .L <sup>-1</sup> )	0,55±0,49	0,76±0,47	0,14†

\*: t de Student para muestras independientes.

†: Prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

## Discusión

Al convertir DA en NE, la enzima D $\beta$ H no solo conecta el sistema dopaminérgico con el adrenérgico, sino que garantiza el adecuado balance de los dos sistemas, jugando un papel clave en el normal funcionamiento del SNC y del SNA. Por estas razones la enzima se ha constituido en el centro de atención de numerosas condiciones relacionadas con enfermedades mentales, neurológicas y cardiovasculares, así como en un promisorio blanco de intervenciones farmacológicas, tal como ha quedado demostrado recientemente con el desarrollo de un nuevo grupo de antihipertensivos inhibidores de la D $\beta$ H (35).

Se sabe que la actividad de la enzima D $\beta$ H cambia muy poco a lo largo de la vida de cada individuo y que la influencia de factores ambientales sobre dicha actividad es pequeña, comparada con los factores genéticos, los cuales son responsables del 80 al 90% de la variabilidad inter-personal en la actividad catalítica de la enzima; este control genético sobre la enzima da como resultado que en cualquier grupo humano se puedan encontrar personas con actividad enzimática normal, intermedia o baja (9,18).

Dado que los polimorfismos del gen *D $\beta$ H* más estudiados y con mayor evidencia de su relación con la actividad de la enzima D $\beta$ H son el rs1989787 (-2073C>T), el rs1611115 (-970C>T) y el rs1108580 (444A>G) (18,25,27), decidimos evaluar la influencia de cuatro haplotipos conformados por estos tres SNPs sobre la PA y la FC tomadas bajo diferentes condiciones, la actividad de la enzima y las concentraciones basales de NE y DA. Contrario a los reportes citados, los rs 1989789 y rs 1108580 no tuvieron influencia alguna en las variables estudiadas, razón por la cual nos enfocamos únicamente en el polimorfismo rs1611115, justamente la mutación descrita como la que más disminuye la actividad de la enzima D $\beta$ H (36).

En el síndrome de deficiencia de la enzima D $\beta$ H se reportan concentraciones plasmáticas altas de dopamina (>100 pg/ml) y bajas de norepinefrina (<25 pg/ml), todo lo cual se refleja en baja PA y FC en posición de pie, caída de la PA y elevación de la FC durante la maniobra de Valsalva, caída o no cambios de la FC bajo estímulo de frío y poca respuesta hipotensora a la clonidina (3,37). Otros autores también han hallado asociación entre la actividad de la enzima y el genotipo *D $\beta$ H* (especialmente el -970C>T) aunque no siempre dicha asociación se expresa fenotípicamente (38,39). En nuestro estudio la única asociación hallada fue la del rs 1611115 con los portadores de la variante mutada T (CT+TT), quienes tienen frecuencias cardíacas significativamente inferiores a sus controles homocigotos nativos (CC), no solo en reposo (decúbito y sentado), sino de pie y bajo estímulo de frío; este hallazgo sugiere que, en comparación con la presión arterial, la frecuencia cardíaca es más sensible a los cambios de las concentraciones de NE. Además, pese a que las diferencias no alcanzan significancia estadística, queremos señalar que las concentraciones de norepinefrina (CC=175±200 pg/ml; CT=93±83 pg/ml; TT=34±18 pg/ml) y la actividad de la enzima D $\beta$ H (CC=0,76±0,46 micromoles.min<sup>-1</sup>.L<sup>-1</sup>; CT=0,65±0,49 micromoles.min<sup>-1</sup>.L<sup>-1</sup>; TT=0,16±0,09 micromoles.min<sup>-1</sup>.L<sup>-1</sup>) son nominalmente inferiores entre quienes portan uno o los dos alelos mutados T, comparados con los nativos; estos hallazgos están en línea con numerosos reportes de estudios similares. Asimismo, la correlación directa y significativa entre la actividad de la enzima y norepinefrina era de esperarse, pues a menor actividad de la enzima menor el producto de la reacción, aunque las concentraciones halladas de dopamina no encajan en este análisis (Cuadro 2).

La principal limitación de esta investigación es el tamaño relativamente pequeño de la muestra, lo cual le resta potencia al estudio y podría explicar la falta de significancia estadística de algunos resultados. Debemos advertir también que otros marcadores genéticos y otras

variables fisiológicas no estudiadas deben estar influyendo en los resultados obtenidos. Por último, dado que no se hicieron estudios de ancestría, no es posible excluir el sesgo de estratificación poblacional, sobretodo en un grupo de origen tri-étnico, como el mestizo colombiano.

## Agradecimientos

A la Fundación Universitaria Autónoma de las Américas y a la Universidad Tecnológica de Pereira, por haber financiado esta investigación. A los estudiantes de la Fundación Universitaria Autónoma de las Américas que participaron como voluntarios.

## Conflictos de interés

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

## Referencias

1. Kapoor A, Shandilya M, Kundu S. Structural insight of dopamine  $\beta$ -hydroxylase, a drug target for complex traits, and functional significance of exonic single nucleotide polymorphisms. *PLoS One*. 2011; 6(10):e26509. doi:10.1371/journal.pone.0026509.
2. Dudas B, Baker M, Rotoli G, Grignol G, Bohn MC, Merchenthaler I. Distribution and morphology of the catecholaminergic neural elements in the human hypothalamus. *Neuroscience*. 2010; 171(1):187-95. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.08.050.
3. Robertson D, Goldberg MR, Onrot J, Hollister AS, Wiley R, Thompson JG, et al. Isolated failure of autonomic noradrenergic neurotransmission. Evidence for impaired beta-hydroxylation of dopamine. *N Engl J Med*. 1986;314:1494-7.
4. Segurado R, Bellgrove MA, Manconi F, Gill M, Hawi Z. Epistasis between neurochemical gene polymorphisms and risk for ADHD. *Eur J Hum Genet*. 2011; 19:577-82. doi:10.1038/ejhg.2010.250.
5. Cubells JE, Sun X, Li W, Bonsall RW, McGrath JA, Avramopoulos D, et al. Linkage analysis of plasma dopamine  $\beta$ -hydroxylase activity in families of patients with schizophrenia. *Hum Genet*. 2011; 130:635-43. doi: 10.1007/s00439-011-0989-6.
6. Preuss UW, Wurst FM, Ridinger M, Rujescu D, Fehr C, Koller G, et al. Association of functional DBH genetic variants with alcohol dependence risk and related depression and suicide attempt phenotypes: Results from a large multicenter association study. *Drug Alcohol Depend*. 2013;133(2):459-67. doi:10.1016/j.drugalcdep.2013.07.002.
7. Andreou D, Söderman E, Axelsson T, Sedvall GC, Terenius L, Agartz I, et al. Polymorphisms in genes implicated in dopamine, serotonin and noradrenalin metabolism suggest association with cerebrospinal fluid monoamine metabolite concentrations in psychosis. *Behav Brain Funct*. 2014;10:26. doi:10.1186/1744-9081-10-26.
8. Zhou Y, Wang J, He Y, Zhou J, Xi Q, Song X, et al. Association between dopamine beta-hydroxylase 19-bp insertion/deletion polymorphism and major depressive disorder. *J Mol Neurosci*. 2015;55(2):367-71. doi:10.1007/s12031-014-0339-y.
9. Combarros O, Warden DR, Hammond N, Cortina-Borja M, Belbin O, Lehmann MG, et al. The dopamine beta-hydroxylase -1021C/T polymorphism is associated with the risk of Alzheimer's disease in the Epistasis Project. *BMC Med Genet*. 2010; 11:162. doi:10.1186/1471-2350-11-162.
10. Trillo L, Das D, Hsieh W, Medina B, Moghadam S, Lin B, et al. Ascending monoaminergic systems alterations in Alzheimer's disease. Translating basic science into clinical care. *Neurosci Biobehav Rev*. 2013;37(8):1363-79. doi:10.1016/j.neubiorev.2013.05.008.
11. Ghosh J, Pradhan S, Mittal B. Identification of a Novel ANKK1 and Other Dopaminergic (DRD2 and DBH) Gene Variants in Migraine Susceptibility. *Neuromolecular Med*. 2013;15(1):61-73. doi:10.1007/s12017-012-8195-9.

12. Xie X, Xu L, Liu H, Chen W, Zhuang D, Zhang J, et al. Positive association between -1021TT genotype of dopamine beta hydroxylase gene and progressive behavior of injection heroin users. *Neurosci Lett.* 2013;541:258-62. doi:10.1016/j.neulet.2013.02.049.
13. Ella E, Sato N, Nishizawa D, Kageyama S, Yamada H, Kurabe N, et al. Association between dopamine beta hydroxylase rs5320 polymorphism and smoking behaviour in elderly Japanese. *J Hum Genet.* 2012; 57(6):385-90. doi:10.1038/jhg.2012.40.
14. Preuss UW, Wurst FM, Ridinger M, Rujescu D, Fehr C, Koller G, et al. Association of functional DBH genetic variants with alcohol dependence risk and related depression and suicide attempt phenotypes: Results from a large multicenter association study. *Drug Alcohol Depend.* 2013;133(2):459-67. doi:10.1016/j.drugalcdep.2013.07.002.
15. Levran O, Randesi M, da Rosa JC, Ott J, Rotrosen J, Adelson M, et al. Overlapping dopaminergic pathway genetic susceptibility to heroin and cocaine addictions in african americans. *Ann Hum Genet.* 2015;79(3):188-98. doi:10.1111/ahg.12104.
16. Yeh TK, Yeh TC, Weng CF, Shih BF, Tsao HJ, Hsiao CH, et al. Association of polymorphisms in genes involved in the dopaminergic pathway with blood pressure and uric acid levels in Chinese females. *J Neural Transm.*2010;117(12):1371-6. doi:10.1007/s00702-010-0492-6.
17. Friese RS, Schmid-Schönbein GW, O'Connor DT. Systematic polymorphism discovery after genome-wide identification of potential susceptibility loci in a hereditary rodent model of human hypertension. *Blood Press.* 2011; 20:222-31. doi:10.3109/08037051.2011.566012.
18. Chen Y, Wen G, Rao F, Zhang K, Wang L, Rodriguez-Flores JL. Human dopamine beta-hydroxylase (DBH) regulatory polymorphism that influences enzymatic activity, autonomic function, and blood pressure. *J Hypertens.* 2010; 28(1):76-86. doi:10.1097/HJH.0b013e328332bc87.
19. Chen Y, Zhang K, Wen G, Rao F, Sanchez AP, Wang L, et al. Human dopamine  $\beta$ -hydroxylase promoter variant alters transcription in chromaffin cells, enzyme secretion, and blood pressure. *Am J Hypertens.* 2011; 24(1):24-32. doi:10.1038/ajh.2010.186.
20. Mutschler J, Abbruzzese E, Witt SH, Dirican G, Nieratschker V, Frank J, et al. Functional polymorphism of the dopamine  $\beta$ -hydroxylase gene is associated with increased risk of disulfiram-induced adverse effects in alcohol-dependent patients. *J Clin Psychopharmacol.* 2012; 32(4):578-80. doi: 10.1097/JCP.0b013e31825ddb6e.
21. Kosten TR, Wu G, Huang W, Harding MJ, Hamon SC, Lappalainen J, Nielsen DA. Pharmacogenetic randomized trial for cocaine abuse: disulfiram and dopamine  $\beta$ -hydroxylase. *Biol Psychiatry.* 2013; 73(3):219-24. doi:10.1016/j.biopsych.2012.07.011.
22. Helmstaedter C, Mihov Y, Toliat MR, Thiele H, Nuernberg P, Schoch S, et al. Genetic variation in dopaminergic activity is associated with the risk for psychiatric side effects of levetiracetam. *Epilepsia.* 2013; 54(1):36-44. doi: 10.1111/j.1528-1167.2012.03603.x.
23. Liu S, Green CE, Lane SD, Kosten TR, Moeller FG, Nielsen DA, et al. The influence of dopamine  $\beta$ -hydroxylase gene polymorphism rs1611115 on levodopa/carbidopa treatment for cocaine dependence: a preliminary study. *Pharmacogenet Genomics.* 2014; 24(7):370-3. doi: 10.1097/FPC.0000000000000055.
24. Schottenfeld RS, Chawarski MC, Cubells JF, George TP, Lappalainen J, Kosten TR. Randomized clinical trial of disulfiram for cocaine dependence or abuse during buprenorphine treatment. *Drug Alcohol Depend.* 2014; 136:36-42. doi:10.1016/j.drugalcdep.2013.12.007.
25. Tang YL, Epstein MP, Anderson GM, Zabetian CP, Cubells JF. Genotypic and haplotypic associations of the DBH gene with plasma dopamine beta-hydroxylase activity in African Americans. *Eur J Hum Genet.* 2007; 15:878-83.
26. Tang Y, Anderson GM, Zabetian CP, Kohnke MD, Cubells JF. Haplotype-controlled analysis of the association of a non-synonymous single nucleotide polymorphism at DBH (+ 1603C --> T) with plasma dopamine beta-hydroxylase activity. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2005; 139B (1):88-90.
27. Bhaduri N, Mukhopadhyay K. Correlation of plasma dopamine beta-hydroxylase activity with polymorphisms in DBH gene: a study on Eastern Indian population. *Cell Mol Neurobiol.* 2008; 28:343-50. doi: 10.1007/s10571-007-9256-8.
28. Michel T, Hoffman BB. Treatment of Myocardial Ischemia and Hypertension. En: Brunton LL, Chabner BA, Knollman BC (editors). *Goodman and Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics.* 12 ed. McGraw Hill; 2011. p 745-88.
29. Isaza C, Henao J, Valencia S, Beltrán L, Sepúlveda AM. Caracterización del gen de la dopamina beta-hidroxilasa en población mestiza colombiana. *Investigaciones Andinas* 2013; 27:760-769.
30. Brunner-La Rocca HP, Weilenmann D, Rickli H, Follath F, Kiowski W. Is blood pressure response to the Valsalva maneuver related to neurohormones, exercise capacity, and clinical findings in heart failure? *Chest.* 1999; 116(4):861-7.
31. Monahan KD, Feehan RP, Sinoway LI, Gao Z. Contribution of sympathetic activation to coronary vasodilatation during the cold pressor test in healthy men: effect of ageing. *J Physiol.* 2013; 591(Pt 11):2937-47. doi: 10.1113/jphysiol.2013.251298.
32. Nagatsu T, Udenfriend S. Photometric assay of dopamine-hydroxylase activity in human blood. *Clin Chem* 1972; 18:980-3.
33. Bonifácio MJ, Sousa F, Neves M, Palma N, Igreja B, Pires NM, et al. Characterization of the interaction of the novel antihypertensive etamicastat with human dopamine- $\beta$ -hydroxylase: Comparison with nepicastat. *Eur J Pharmacol.* 2015 Mar 15; 751:50-8. doi:10.1016/j.ejphar.2015.01.034.
34. Mustapic M, Presecki P, Pivac N, Mimica N, Hof PR, Simic G, et al. Genotype-independent decrease in plasma dopamine beta-hydroxylase activity in Alzheimer's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2013 Jul; 44:94-9. doi: 10.1016/j.pnpbp.2013.02.002.
35. Bonifácio MJ, Sousa F, Neves M, Palma N, Igreja B, Pires NM, et al. Characterization of the interaction of the novel antihypertensive etamicastat with human dopamine- $\beta$ -hydroxylase: Comparison with nepicastat. *Eur J Pharmacol.* 2015; 751:50-8. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.01.034.
36. Zabetian CP, Anderson GM, Buxbaum SG, Elston RC, Ichinose H, Nagatsu T, et al. A quantitative-trait analysis of human plasma-dopamine beta-hydroxylase activity: evidence for a major functional polymorphism at the DBH locus. *Am J Hum Genet.* 2001; 68(2):515-22.
37. Robertson D, Haile V, Perry SE, Robertson RM, Phillips JA 3rd, Biaggioni I. Dopamine beta-hydroxylase deficiency. A genetic disorder of cardiovascular regulation. *Hypertension* 1991; 18:1-8.
38. Garland EM, Black BK, Harris PA, Robertson D. Dopamine-beta-hydroxylase in postural tachycardia syndrome. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007; 293(1):H684-90.
39. Lu N, Chen J, Yuan Y, Cong X, Yang Y, Meng L, et al. The C-1021T polymorphism of dopamine  $\beta$ -hydroxylase is not associated with orthostatic hypotension in a Chinese population. *J Hum Hypertens.* 2015; 29(3):173-8. doi: 10.1038/jhh.2014.54.