QUIRINO CORDEIRO JÚNIOR

**Estudo de associação entre genes do sistema
dopaminérgico e esquizofrenia**

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

Área de concentração: Psiquiatria

Orientador: Prof. Dr. Homero Pinto Vallada Filho

São Paulo

2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Cordeiro Júnior, Quirino

Estudo de associação entre genes do sistema dopaminérgico e esquizofrenia /
Quirino Cordeiro Júnior. -- São Paulo, 2007.

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

Área de concentração: Psiquiatria.

Orientador: Homero Pinto Vallada Filho.

Descritores: 1.Esquizofrenia 2.Transtornos psicóticos 3.Estudos de casos e
controles 4.Receptores dopaminérgicos do tipo D2 5.Receptores de dopamina D3
6.Proteínas da membrana plasmática de transporte de dopamina 7.Catecol O-
metiltransferase 8.Alelos

USP/FM/SBD-279/07

DEDICATÓRIA

À minha esposa e companheira, Alexandra Martini de Oliveira, pela força em todos os momentos difíceis, e pelo compartilhamento de todos os momentos de felicidade e alegria nessa última década.

À minha mãe, Sophia Wercy Soares Cordeiro, e a meu pai, Quirino Cordeiro, exemplos de coragem e luta.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Homero Vallada, com quem tenho tido o prazer de trabalhar desde o final de meu segundo ano de residência em Psiquiatria, pelas oportunidades que tem oferecido para minha formação acadêmica. Agradeço pelo apoio e incentivo e pela iniciação à pesquisa.

Aos pesquisadores Karen Miguita, Stevin Zung e Jacqueline Siqueira-Roberto, com quem tenho trabalhado mais de perto nesses últimos anos, compartilhando minha formação acadêmica.

Ao Prof. Hélio Elkis, coordenador do PROJESQ, grupo de pesquisa no qual tive a grata oportunidade de estagiar durante dois anos de meu treinamento como residente, e onde aguicei minha curiosidade pelo estudo da fisiopatologia da esquizofrenia.

Ao Prof. Dr. Geraldo Busatto, pela ajuda nos momentos críticos desta tese.

À Dra. Camila Guindalini por toda generosidade com que me ajudou no SGDP/King's College, onde estagiei durante meu Doutorado, e pelo auxílio nas colaborações que estamos iniciando no momento.

Ao Prof. Dr. David Collier, que me acolheu em seu grupo no SGDP/IoP.

Ao Dr. Hyong Jin Cho pela acolhida e ajuda no período em que fiquei em Londres.

À Dra. Helena Brentani Samaia, com quem eu trabalhei na coleta das amostras dos pacientes desta tese.

Ao Dr. Guilherme Peres Messas, que também trabalhou na coleta das amostras de controles usadas nesta tese.

A todos os pesquisadores com quem trabalhei e aprendi ao longo desses anos de iniciação científica no PROGENE: Leandro Michelon, Ricardo Junqueira, Daniela Jardim, Daniela Lobo Sabbatini, Eliza Hiromi Ikenaga, Elisabete Miracca, Vivian Bertola.

A Jony Arrais, pelo auxílio com as análises estatísticas.

À “European Molecular Biology Organization” (EMBO), que me concedeu bolsa de “Fellowship”, financiando meu estágio no Social Genetics and Developmental Psychiatry, Institute of Psychiatry, King’s College, University of London (SGDP/IoP), durante este Doutorado.

À Coordenacao de Aperfeicoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro que recebi, sendo bolsista dessa instituição no período de meu Doutorado.

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

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

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

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

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	
LISTA DE TABELAS.....	
LISTA DE FIGURAS	
RESUMO	
SUMMARY.....	
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Esquizofrenia.....	2
1.2 Genética da Esquizofrenia.....	5
1.2.1 Estudos genético-epidemiológicos.....	5
1.2.1.1 Estudos em famílias.....	5
1.2.1.2 Estudos em gêmeos.....	7
1.2.1.3 Estudos em adotivos.....	8
1.2.1.4 Estudos de transmissão genética.....	10
1.2.2 Estudos genético-moleculares	12
1.2.2.1 Tipos de estudos genético-moleculares	13
1.2.2.1.1 Estudos de ligação (<i>linkage</i>).....	13
1.2.2.1.2 Estudos de associação	13
1.3 Sistema Dopaminérgico e Esquizofrenia.....	15
1.3.1 Estudos de associação entre genes do sistema dopaminérgico e esquizofrenia.....	22
1.3.1.1 Polimorfismos do gene do Receptor Dopaminérgico subtipo 2 (<i>DRD2</i>)	22
1.3.1.1.1 Polimorfismo <i>TaqI</i> A do <i>DRD2</i> – rs1800497.....	22
1.3.1.1.2 Polimorfismo -141C Ins/Del do <i>DRD2</i> – rs1799732.....	25
1.3.1.2 Polimorfismo do receptor dopaminérgico subtipo 3 (<i>DRD3</i>).....	26
1.3.1.2.1 Polimorfismo Ser9Gly do <i>DRD3</i> – rs6280.....	26
1.3.1.3 Polimorfismos do gene da proteína transportadora de dopamina (<i>DAT1: Solute Carrier Family 6,</i> <i>member 3: SLC6A3</i>).....	29
1.3.1.3.1 Polimorfismo VNTR da região 3' não- codificadora do <i>SLC6A3</i>	29
1.3.1.3.2 Polimorfismo A1343G do gene do <i>SLC6A3</i> – rs6347	31
1.3.1.4 Polimorfismo do gene da catecol-O- metiltransferase (<i>COMT</i>)	32
1.3.1.4.1 Polimorfismo A/G da região não- codificadora do <i>COMT</i> – rs165599.....	32
2. JUSTIFICATIVA.....	35
2.1 Justificativa Geral	36
2.2 Justificativa Específica.....	37
3. OBJETIVOS.....	38
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	40

4.1 Seleção da Amostra	41
4.1.1 Aspectos éticos.....	41
4.1.2 Casos.....	41
4.1.3 Controles.....	42
4.2 Análise Laboratorial.....	43
4.2.1 Extração do ácido desoxirribonucleico (DNA)	43
4.2.2 Detecção de fragmentos polimórficos de DNA.....	44
4.2.2.1 Genotipagens dos polimorfismos realizadas no PROGENE.....	44
4.2.2.1.1 Genotipagem do polimorfismo <i>TaqI</i> A do <i>DRD2</i>	44
4.2.2.1.2 Genotipagem do polimorfismo Ser9Gly do gene <i>DRD3</i>	46
4.2.2.1.3 Genotipagem do polimorfismo do tipo VNTR na região 3' UTR do SLC6A3.....	48
4.2.2.1.4 Genotipagem do polimorfismo A1343G do SLC6A3	50
4.2.2.2 Confirmação das seqüências dos oligonucleotídeos utilizados nas genotipagens.....	52
4.2.2.3 Genotipagens dos polimorfismos realizadas no Laboratório da Empresa Prevention Genetics	53
4.3 Análise Estatística	54
4.3.1 Considerações gerais.....	54
4.3.2 Estudo caso-controle.....	56
4.3.3 Equilíbrio de Hardy-Weinberg	58
4.3.4 Desequilíbrio de ligação (DL)	61
4.3.5 Análise de haplótipos	62
4.3.6 Poder da Amostra	63
4.3.7 Análise de variáveis	63
5. RESULTADOS.....	65
5.1 Dados demográficos	66
6.1.1 Gênero	66
6.1.2 Idade.....	66
5.2 Subtipos de esquizofrenia (DSM-IV)	67
5.3 Cálculo do poder da amostra.....	67
5.4 Equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	68
5.5 Distribuição alélica e genotípica dos polimorfismos estudados	69
5.5.1 Polimorfismo <i>TaqI</i> A do <i>DRD2</i>	70
5.5.2 Polimorfismo -141C (INS/DEL) do <i>DRD2</i>	75
5.5.3 Polimorfismo SER9GLY do <i>DRD3</i>	81
5.5.4 Polimorfismo VNTR da região 3'UTR do SLC6A3	86
5.5.4.1 Comparações entre casos e controles (VNTR do SLC6A3).....	87
5.5.4.2 Comparação por gênero masculino entre casos e controles (VNTR do SLC6A3).....	89
5.5.4.3 Comparação por gênero masculino entre casos e controles (VNTR do SLC6A3).....	91

5.5.4.4 Análises por subtipo da esquizofrenia (paranóide) entre casos e controles (VNTR do SLC6A3).....	93
5.5.4.5 Análises por subtipo da esquizofrenia (desorganizado) entre casos e controles (VNTR do SLC6A3).....	95
5.5.4.6 Análise utilizando-se modelo de regressão logística entre casos e controles (VNTR do SLC6A3).....	97
5.5.4.7 Análise utilizando-se avaliação de homozigosidade entre casos e controles (VNTR do SLC6A3).....	98
5.5.5 Polimorfismo A1343G do SLC6A3	99
5.5.6 Polimorfismo A/G da região 3' UTR do <i>COMT</i>	105
5.6 Análise de desequilíbrio de ligação (DL)	110
5.7 Análise de haplótipos	110
6. DISCUSSÃO.....	111
6.1 <i>TaqIA-DRD2</i>	113
6.2 -141C Ins/Del- <i>DRD2</i>	115
6.3 Ser9Gly- <i>DRD3</i>	117
6.4 VNTR-SLC6A3	119
6.5 A1343G-SLC6A3.....	120
6.6 A/G da região UTR do <i>COMT</i>	121
6.7 Análise de Homozigosidade	123
6.8 Comparação entre Grupos	123
6.8.1 Gênero	123
6.8.2 Subtipos de Esquizofrenia.....	125
6.9 Análises de DL e Haplótipos	125
6.10 Resultados Falso-Negativos e Falso-Positivos.....	126
6.11 Considerações Gerais	130
6.12 Perspectivas Futuras.....	130
7. CONCLUSÕES.....	132
8. ANEXOS	134
9. REFERÊNCIAS	147

LISTAS

LISTA DE ABREVIATURAS

- A: adenina
- ANKK1: *ankyrin repeat and kinase domain containing 1*
- ANKK1: gene da *ankyrin repeat and kinase domain containing 1*
- ApoE: gene da apolipoproteína E
- ATP: adenosina 5'-trifosfato
- BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*
- C: citosina
- °C: grau Celsius
- CAPPesq/HC-FMUSP: Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
- CaTS: *Center for Statistical Genetics – The University of Michigan*
- COMT: catecol-O-metiltransferase
- *COMT*: catecol-O-metiltransferase
- DAT1: proteína transportadora de dopamina
- *DAT1*: gene da proteína transportadora de dopamina
- Del: *deletion*
- *d.f.*: *degree of freedom*
- DL: desequilíbrio de ligação (*linkage disequilibrium*)
- DNA: ácido desoxirribonucléico
- DRD1: receptor dopaminérgico subtipo 1
- DRD2: receptor dopaminérgico subtipo 2
- *DRD2*: gene do receptor dopaminérgico subtipo 2
- DRD3: receptor dopaminérgico subtipo 3
- *DRD3*: gene do receptor dopaminérgico subtipo 3
- DRD4: receptor dopaminérgico subtipo 4
- DRD5: receptor dopaminérgico subtipo 5
- DSM: *Diagnostic and Statistical Manual*
- DZ: dizigóticos
- EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético
- G: guanina
- Gly: glicina
- Glu: glutamina
- H0: hipótese nula
- H1: hipótese alternativa
- I.C.: intervalo de confiança
- Ins: *insertion*
- kb: *kilobase-pair*
- KCl: cloreto de potássio
- LDL: *low density lipoproteins*
- Lys: lisina
- MAO: monoamina-oxidase
- MB-COMT: catecol-O-metiltransferase ligada à membrana
- MgCl₂: cloreto de magnésio
- ml: mililitros
- mM: micro molar

- mRNA: ácido ribonucleico-mensageiro
- MZ: monozigóticos
- NaCl: cloreto de sódio
- ng: nanograma
- OPCRIT: *Operational Criteria*
- OR: *odds ratio*
- p: braço curto do cromossomo
- pb: pares de bases
- PCR: *polymerase chain reaction*
- PCSK9: *proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 serine protease*
- PET: *positron emission tomography*
- pH: potencial hidrogeniônico
- pmol: picomol
- PROGENE: Programa de Genética e Farmacogenética do Instituto de Psiquiatria do HC-FMUSP
- PSE: *Present State Examination*
- q: braço longo do cromossomo
- RFLP: *restriction fragment length polymorphism*
- RDC: *Research Diagnostic Criteria*
- rs: *refSNP identification*
- s: *short*
- S-COMT: catecol-O-metiltransferase forma solúvel
- Ser: serina
- SLC6A3: *Solute Carrier Family 6, member 3*: SLC6A3; gene da proteína transportadora de dopamina
- SNP: *single nucleotide polymorphism*
- SPECT: *single photon emission computerized tomography*
- SPSS: *Statistical Package for the Social Sciences*
- T: timina
- Tris-HCl: hidroximetil aminometano hidrocloreto
- U: unidade
- UTR: *untranslated*; não-codificadora
- VNTR: variable number of tandem repeats
- μM: micromol

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Relação dos oligonucleotídeos utilizados para a análise dos polimorfismos.....	52
Tabela 2 -	Valores do equilíbrio de Hardy-Weinberg para casos e controles.....	68
Tabela 3 -	Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo <i>TaqIA</i> do gene do receptor de dopamina subtipo D2 (<i>DRD2</i>) entre os grupos casos e controles.....	70
Tabela 4 -	Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo <i>TaqIA</i> do gene do receptor de dopamina subtipo D2 (<i>DRD2</i>) entre os grupos casos e controles classificados por gênero	71
Tabela 5 -	Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo <i>TaqIA</i> do gene do receptor de dopamina subtipo D2 (<i>DRD2</i>), de acordo com o subtipo da esquizofrenia (subtipo paranóide).....	72
Tabela 6 -	Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo <i>TaqIA</i> do gene do receptor de dopamina subtipo D2 (<i>DRD2</i>), de acordo com o subtipo da esquizofrenia (subtipo desorganizado)	73
Tabela 7 -	Análise com regressão logística não condicional para as variáveis independentes de gênero e subtipo de esquizofrenia (análise simultânea)	74
Tabela 8 -	Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo <i>TaqIA</i> do gene do receptor de dopamina subtipo D2 (<i>DRD2</i>) para investigação de homozigosidade	74
Tabela 9 -	Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo -141C (Ins/Del) do gene do receptor de dopamina subtipo D2 (<i>DRD2</i>) entre os grupos casos e controles	75
Tabela 10 -	Investigação de razão de chances (OR) para o genótipo de risco do polimorfismo -141C (Ins/Del) do gene do receptor de dopamina subtipo D2 (<i>DRD2</i>) entre os grupos casos e controles.....	76
Tabela 11 -	Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo -141C (Ins/Del) do gene do receptor de dopamina subtipo D2 (<i>DRD2</i>) entre os grupos casos e controles classificados por gênero	77

Tabela 12 - Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo - 141C (Ins/Del) do gene do receptor de dopamina subtipo D2 (<i>DRD2</i>), de acordo com o subtipo da esquizofrenia (subtipo paranóide).....	78
Tabela 13 - Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo - 141C (Ins/Del) do gene do receptor de dopamina subtipo D2 (<i>DRD2</i>), de acordo com o subtipo da esquizofrenia (subtipo desorganizado)	79
Tabela 14 - Análise com regressão logística não condicional para as variáveis independentes de gênero e subtipo de esquizofrenia (análise simultânea)	79
Tabela 15 - Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo - 141C (Ins/Del) do gene do receptor de dopamina subtipo D2 (<i>DRD2</i>) para investigação de homozigosidade.....	80
Tabela 16 - Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo Ser9Gly do gene do receptor de dopamina subtipo D3 (<i>DRD3</i>) entre os grupos casos e controles.....	81
Tabela 17 - Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo Ser9Gly do gene do receptor de dopamina subtipo D3 (<i>DRD3</i>) entre os grupos casos e controles por gênero	82
Tabela 18 - Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo Ser9Gly do gene do receptor de dopamina subtipo D3 (<i>DRD3</i>), de acordo com o subtipo da SCZ (Subtipo Paranóide).....	83
Tabela 19 - Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo Ser9Gly do gene do receptor de dopamina subtipo D3 (<i>DRD3</i>), de acordo com o subtipo da esquizofrenia (subtipo desorganizado)	84
Tabela 20 - Análise com regressão logística não condicional para as variáveis independentes de gênero e subtipo de esquizofrenia (análise simultânea)	84
Tabela 21 - Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo Ser9Gly do <i>DRD3</i> para investigação de homozigosidade.....	85
Tabela 22 - Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo VNTR do gene da proteína transportadora de dopamina (SLC6A3) entre os grupos casos e controles	88
Tabela 23 - Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo VNTR do gene da proteína transportadora de dopamina (SLC6A3) entre os grupos casos e controles por gênero.....	90

Tabela 23 (Continuação)	Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo VNTR do gene da proteína transportadora de dopamina (SLC6A3) entre os grupos casos e controles classificados por gênero	92
Tabela 24 -	Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo VNTR do gene da proteína transportadora de dopamina (SLC6A3), de acordo com o subtipo da esquizofrenia (subtipo paranóide).....	94
Tabela 25 -	Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo VNTR do gene da proteína transportadora de dopamina (SLC6A3), de acordo com o subtipo da esquizofrenia (subtipo desorganizado)	96
Tabela 26 -	Análise com regressão logística não condicional para variáveis gênero e subtipo de esquizofrenia (simultaneamente).....	97
Tabela 27 -	Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo VNTR do gene da proteína transportadora de dopamina (SLC6A3) para investigação de homozigossidade.....	98
Tabela 28 -	Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo A1343G do gene da proteína transportadora de dopamina (SLC6A3) entre os grupos casos e controles	100
Tabela 29 -	Investigação de razão de chances (OR) para o genótipo de risco do polimorfismo A1343G do gene da proteína transportadora de dopamina (SLC6A3) entre os grupos casos e controles.....	100
Tabela 30-	Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo A1343G do SLC6A3 entre os grupos casos e controles por gênero	101
Tabela 31 -	Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo A1343G do gene da proteína transportadora de dopamina (SLC6A3), de acordo com o subtipo da esquizofrenia (subtipo paranóide)	102
Tabela 32 -	Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo A1343G do gene da proteína transportadora de dopamina (SLC6A3), de acordo com o subtipo da esquizofrenia (subtipo desorganizado).....	103
Tabela 33 -	Análise com regressão logística não condicional para as variáveis independentes de gênero e subtipo de esquizofrenia (análise simultânea)	104

Tabela 34 - Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo A1343G do gene da proteína transportadora de dopamina (SLC6A3) para investigação de homozigosidade	104
Tabela 35 - Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo A/G da região 3' não codificadora do gene da catecol-O-metiltransferase (COMT) entre os grupos casos e controles.....	105
Tabela 36 - Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo A/G da região 3' não codificadora do gene da catecol-O-metiltransferase (COMT) entre os grupos casos e controles classificados por gênero	106
Tabela 37 - Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo A/G da região 3' não codificadora do gene da catecol-O-metiltransferase (COMT), de acordo com o subtipo da esquizofrenia (subtipo paranóide)	107
Tabela 38 - Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo A/G da região 3' não codificadora do gene da catecol-O-metiltransferase (COMT), de acordo com o subtipo da esquizofrenia (subtipo desorganizado).....	108
Tabela 39 - Análise com regressão logística não condicional para as variáveis independentes de gênero e subtipo de esquizofrenia (análise simultânea)	109
Tabela 40 - Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo A/G da região 3' não codificadora do gene da catecol-O-metiltransferase (COMT) para investigação de homozigosidade	109

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação estrutural do SLC6A3, mostrando os polimorfismos rs6347 no exon 9 e VNTR localizado na região 3' não codificadora	32
Figura 2 -	Representação do <i>COMT</i> . MB-COMT: COMT ligada à membrana; S-COMT: COMT na forma solúvel	34
Figura 3 -	Representação esquemática do polimorfismo do <i>DRD2</i> após amplificação e digestão com a enzima <i>TaqI</i> A. Alelo 1: 310pb; Alelo 2: 130pb + 180pb.....	45
Figura 4 -	Foto do gel de agarose com a genotipagem do polimorfismo <i>TaqI</i> A do <i>DRD2</i>	45
Figura 5 -	Representação esquemática do polimorfismo Ser9Gly do gene do <i>DRD3</i> . Alelo 1: 206pb + 111pb + 98pb + 47pb; Alelo 2: 304pb + 111pb + 47pb	47
Figura 6 -	Foto do gel de agarose com a genotipagem do polimorfismo Ser9Gly do <i>DRD3</i>	47
Figura 7 -	Representação esquemática do polimorfismo VNTR do SLC6A3	49
Figura 8 -	Foto do gel de agarose com a genotipagem do polimorfismo VNTR do SLC6A3	50
Figura 9 -	Representação esquemática do polimorfismo A1343G do SLC6A3. Alelo 1: 209pb; Alelo 2: 110pb + 99pb	51
Figura 10 -	Foto do gel de agarose com a genotipagem do polimorfismo A1343G do SLC6A3.....	51

RESUMO

Cordeiro Jr Q. *Estudo de associação entre genes do sistema dopaminérgico de esquizofrenia* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 175p.

A esquizofrenia é um transtorno mental caracterizado por sintomas psicóticos (delírios, alucinações), distúrbios do pensamento, do afeto e da volição, apresentando, na maioria dos casos, curso crônico. A prevalência do transtorno ao longo da vida gira ao redor de 1%. Evidências de estudos genético-epidemiológicos com famílias, gêmeos e adotivos têm demonstrado a existência de um componente genético como fator de risco para o transtorno. Desde o final da década de 80, estudos genético-moleculares têm investigado genes de vulnerabilidade para o desenvolvimento do quadro. Os genes que codificam as diferentes partes do sistema dopaminérgico passaram a despertar interesse para os estudos moleculares em pacientes com esquizofrenia, devido ao fato de antagonistas dopaminérgicos melhorarem sintomas desse transtorno, e agonistas dopaminérgicos piorarem tais sintomas. Na presente tese, um total de 245 pacientes com esquizofrenia, de acordo com os critérios diagnósticos do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-IV), e 834 controles foi selecionado com o objetivo de investigar a diferença na distribuição de alelos e genótipos de seis polimorfismos de quatro diferentes genes do sistema dopaminérgico nesses dois grupos. Subtipo de esquizofrenia e gênero também foram investigados no estudo de associação. Não houve diferença estatisticamente significativa no que diz

respeito à distribuição de gênero e média de idade entre os grupos de pacientes e controles. Os grupos de pacientes e controles estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg para todos os polimorfismos investigados. Os resultados das análises de diferença na distribuição dos alelos e genótipos dos polimorfismos investigados entre os grupos de pacientes e controles, usando-se o teste de qui-quadrado, foram: 1- polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição (*restriction fragment length polymorphism*: RFLP) *TaqI* A, que está localizado a 10.000 pares de bases do gene do receptor dopaminérgico subtipo 2 (*DRD2*) - rs1800497: genotípica: $\chi^2=3,59$, 2d.f., $p=0,16$; alélica: $\chi^2=3,49$, 1d.f., $p=0,06$, OR=1,22 ($0,98<OR<1,52$); 2- presença (*Insertion*: Ins) ou ausência (*Deletion*: Del) de citosina (C) na posição 141 da região promotora do *DRD2* (-141C Ins/Del do *DRD2*) - rs1799732: genotípica: $\chi^2=12,74$, 2d.f., $p=0,001$; alélica: $\chi^2=9,78$, 1d.f., $p=0,001$, OR=1,64 ($1,19<OR<2,28$); 3- substituição de adenina (A) por guanina (G) no gene do receptor dopaminérgico tipo 3 (*DRD3*) que resulta em uma substituição de aminoácidos - serina por glicina - na posição 9 da proteína (Ser-9-Gly) - rs6280: genotípica: $\chi^2=0,06$, 2d.f., $p=0,97$; alélica: $\chi^2=0,06$, 1d.f., $p=0,80$, OR=1,03 ($0,83<OR<1,26$); 4- número variável de repetições seqüenciais (*variable number of tandem repeats*: VNTR), que varia entre 3 e 11 repetições de uma seqüência de 40 pares de bases na região 3' não-codificadora do gene da proteína transportadora de dopamina (SLC6A3): genotípica: $\chi^2=6,70$, 10d.f., $p=0,75$; alélica: $\chi^2=3,96$, 6d.f., $p=0,68$; 5- substituição de adenina (A) por guanina (G) na posição 1343 (A1343G) do SLC6A3 - rs6347: genotípica: $\chi^2=6,56$, 2d.f., $p=0,03$; alélica: $\chi^2=5,97$, 1d.f.,

$p=0,01$, $OR=1,33$ ($1,05<OR<1,69$); 6- substituição de adenina (A) por guanina (G) na região 3' não-codificadora do gene da catecol-O-metiltransferase (*COMT*) – rs165599: genotípica: $\chi^2=0,22$, 2 d.f., $p=0,89$; alélica: $\chi^2=0,22$, 1 d.f., $p=0,88$, $OR=1,02$ ($0,82<OR<1,25$). Os resultados mostraram associação dos polimorfismos -141C (Ins/Del) do *DRD2* (rs1799732) e A1343G do *SLC6A3* (rs6347) com esquizofrenia na amostra investigada. Não houve associação com gênero ou subtipo de esquizofrenia com os polimorfismos investigados.

Descritores: 1. Esquizofrenia; 2. Transtornos psicóticos; 3. Estudos de casos e controles; 4. Receptores dopaminérgicos do tipo D2; 5. Receptores de dopamina D3; 6. Proteínas da membrana plasmática de transporte de dopamina; 7. Catecol O-metiltransferase; 8. Alelos

SUMMARY

Cordeiro Jr Q. *Association study between genes of the dopaminergic system and schizophrenia* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”, 2007. 175p.

Schizophrenia is a mental disorder characterized by psychotic symptoms (delusions, hallucinations), disturbances of thought, affect, volition, and, in most cases, presenting a chronic course. The average lifetime prevalence is about 1% of the general population. Evidence from genetic epidemiological studies with families, twins and adoptives have demonstrated the existence of an important participation of a genetic component in the etiology of the disorder. Since the end of the 80's, molecular genetic studies have investigated susceptibility genes for schizophrenia. The genes implicated in the dopaminergic pathways are of interest in molecular studies with schizophrenic patients because dopaminergic antagonists improve psychotic symptoms and dopaminergic agonists worsen such symptoms. In the present work a total of 245 schizophrenic patients according to the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV) and 834 controls were selected to investigate differences in the allelic and genotypic distributions of six polymorphisms from four different genes of the dopaminergic system between patients and controls. Schizophrenia subtype and gender were also analyzed in the association study. There was no statistical difference in the distribution of gender and mean age between patients and controls groups. The groups of patients and controls were in Hardy-Weinberg equilibrium for all the polymorphisms genotyped. The results of the analyses of the allelic

and genotypic distributions of the investigated polymorphisms, using the chi-square test, were: 1- restriction fragment length polymorphism (RFLP) *TaqI* A, which is located 10kb downstream of the *DRD2* gene (*TaqI* A1/A2) of the dopaminergic receptor subtype 2 gene (*DRD2*) - rs1800497: genotypic: $\chi^2=3.59$, 2d.f., $p=0.16$; allelic: $\chi^2=3.49$, 1d.f., $p=0.06$, OR=1.22 (0.98<OR<1.52); 2- insertion (Ins) or deletion (Del) of cytosine (C) in the position 141 of the promoter region (-141C Ins/Del) of the *DRD2* - rs1799732: genotypic: $\chi^2=12.74$, 2d.f., $p=0.001$; allelic: $\chi^2=9.78$, 1d.f., $p=0.001$, OR=1.64 (1.19<OR<2.28); 3- substitution of adenine (A) for guanine (G) in the dopaminergic receptor subtype 3 gene (*DRD3*), resulting in a substitution of aminoacides - serine for glycine - in the position 9 of the protein (Ser-9-Gly) rs6280: genotypic: $\chi^2=0.06$, 2d.f., $p=0.97$; allelic: $\chi^2=0.06$, 1d.f., $p=0.80$, OR=1.03 (0.83<OR<1.26); 4- variable number of tandem repeats (VNTR) from 3 to 11 repeats of a sequence of 40 base-pairs of the 3' untranslated region of the dopamine transporter gene (*SLC6A3*): genotypic: $\chi^2=6.70$, 10d.f., $p=0.71$; allelic: $\chi^2=3.90$, 6d.f., $p=0.65$; 5- substitution of adenine (A) for guanine (G) in the position 1343 (A1343G) of the *SLC6A3* - rs6347: genotypic: $\chi^2=6.56$, 2d.f., $p=0.03$; allelic: $\chi^2=5.97$, 1d.f., $p=0.01$, OR=1.33 (1.05<OR<1.69); 6- substitution of adenine (A) for guanine (G) in the 3' untranslated region of the catechol-O-methyltransferase gene (*COMT*) - rs165599: genotypic: $\chi^2=0.22$, 2d.f., $p=0.89$; allelic: $\chi^2=0.02$, 1d.f., $p=0.88$, OR=1.02 (0.82<OR<1.25). There was an association of the polymorphisms - 141C (Ins/Del) of the *DRD2* (rs1799732) and A1343G of the *SLC6A3* (rs6347) with schizophrenia in the investigated sample. There was no

association with gender or subtype of schizophrenia with the investigated polymorphisms.

Descriptors: 1. Schizophrenia; 2. Psychotic disorders; 3. Case-control studies; 4. Receptors, dopamine D2; 5. Receptors, dopamine D3; 6. Dopamine plasma membrane transport proteins; 7. Catechol O-methyltransferase; 8. Alleles

INTRODUÇÃO

1.1 ESQUIZOFRENIA

A tentativa de formalização de um diagnóstico para o que hoje se entende como esquizofrenia começou apenas no século XIX. Em 1893, tal transtorno recebeu de Emil Kraepelin, na 4ª edição de seu “Tratado de Psiquiatria”, a denominação de *Dementia Praecox*, em uma latinização do termo criado por Morel em 1860 (Elkis, 1999). O autor reuniu os quadros de catatonia, hebefrenia e *dementia paranoides*, que foram previamente descritos por ele. Em sua caracterização nosológica, Kraepelin deu importância para os critérios clínicos relacionados à evolução do quadro apresentado pelo paciente, dentro de uma perspectiva longitudinal. Tanto assim, que o transtorno recebera a terminologia *Dementia*, com o objetivo de marcar as alterações cognitivas, afetivas e de personalidade apresentadas pelos pacientes durante o curso do transtorno. Já a designação *Praecox*, por sua vez, teve por intenção tentar estabelecer uma diferença de outro transtorno mental, que também vinha sendo estudado pelo grupo de Kraepelin à época, a demência senil (Andreasen, 2001).

Como Kraepelin baseou-se mais em critérios longitudinais para sua formulação diagnóstica, outros autores passaram a estudar possibilidades de construir critérios diagnósticos galgados na apresentação clínica do

paciente no momento de sua avaliação clínica. Nesse contexto, Eugen Bleuler, em 1911, publicou seu livro “*Dementia praecox* ou o grupo das esquizofrenias”, cunhando assim o termo esquizofrenia, sendo a maneira pela qual o transtorno vem sendo designado até o presente. Bleuler definiu sinais e sintomas para a esquizofrenia, dividindo-os entre fundamentais e acessórios, e entre primários e secundários. Assim, fundamentais seriam aqueles sinais e sintomas obrigatoriamente presentes, ao passo que os acessórios derivariam dos primeiros e apresentariam menor especificidade para o transtorno. O mais interessante para a ocasião foi a separação entre sintomas primários e secundários, já que seus critérios seguiam um paradigma psicanalítico: a ruptura da tensão associativa (daí o termo esquizofrenia, do grego, *schizo*=cindido, *phrén*=mente), ligada a uma imperfeição no nível cerebral, definiria a alteração primária na doença. De modo secundário, como uma reação do psiquismo à ruptura primária, portanto na esfera exclusivamente psíquica, se constituiria o componente secundário do transtorno. Deste modo, aparecem os clássicos seis "a"s de Bleuler: distúrbios das associações do pensamento, autismo, ambivalência, embotamento afetivo, distúrbios da atenção e avolição, como parte dos sintomas primários. Sintomas psicóticos, como delírios e alucinações ocupariam o lugar dos sintomas secundários (Bleuler, 1950; Elkis, 1999).

Ainda com o objetivo de caracterizar melhor a esquizofrenia por meio de uma avaliação transversal do paciente, Kurt Schneider procurou detectar sintomas que fossem essenciais para o diagnóstico do transtorno, classificando-os como “sintomas de primeira ordem”, e publicando-os em

sua obra “Psicopatologia Clínica”, em 1948. Tais sintomas eram formados basicamente por manifestações delirantes e alucinatórias, que, na ausência de transtornos mentais orgânicos, seriam consideradas patognomônicas de esquizofrenia. Apesar de se terem tornado clássicos na investigação diagnóstica para o transtorno, os sintomas de primeira ordem *schneiderianos* foram incapazes de cumprir seu objetivo, já que, com o passar do tempo, percebeu-se que eles também estavam presentes em outros transtornos psiquiátricos (Schneider, 1968).

Desse modo, o diagnóstico de esquizofrenia acabou sendo construído de maneira politética, valendo-se como base teórica das proposições de Kraepelin, Bleuler e Schneider. No entanto, apesar disso, havia muita discordância diagnóstica entre profissionais com diferentes formações clínicas. Nesse contexto, a partir do esforço de americanos e ingleses, que encontravam grande heterogeneidade no emprego do diagnóstico de esquizofrenia entre seus psiquiatras (Kendell *et al.*, 1971), critérios diagnósticos mais confiáveis começaram a ser construídos, como o *Present State Examination* (PSE) (Wing *et al.*, 1974) e o *Research Diagnostic Criteria* (RDC) (Spitzer *et al.*, 1978). Procurando também incorporar critérios diagnósticos mais claros e objetivos, a Associação Americana de Psiquiatria reformulou por completo, em 1980, o seu *Diagnostic and Statistical Manual* (Manual Diagnóstico e Estatístico - DSM). Apesar das críticas periodicamente publicadas sobre o DSM, ele ainda continua sendo o critério mais utilizado nos trabalhos científicos na área dos transtornos mentais,

estando hoje em sua 4ª edição (DSM-IV) (*American Psychiatric Association*, 1994).

1.2 GENÉTICA DA ESQUIZOFRENIA

A partir do século XIX, os alienistas passaram a relatar a existência de maior agregação de esquizofrenia em determinadas famílias. Porém, apenas em 1916, Ernst Rüdin, que trabalhava com Kraepelin, foi o primeiro pesquisador a confirmar essas observações dentro de uma abordagem metodológica mais criteriosa.

Nos dias atuais, os estudos que investigam o componente genético da esquizofrenia são divididos em duas abordagens principais: estudos genético-epidemiológicos e genético-moleculares. A partir das evidências advindas dos estudos genético-epidemiológicos, nos últimos anos os estudos de genética molecular têm tentado descobrir quais são os genes envolvidos nesse processo, bem como o modo de sua participação.

1.2.1 ESTUDOS GENÉTICO-EPIDEMIOLÓGICOS

1.2.1.1 Estudos de famílias

O primeiro estudo epidemiológico realizado para verificar a hipótese de a esquizofrenia apresentar um componente genético no seu desenvolvimento foi conduzido em famílias por Ernst Rüdin em 1916, na

Alemanha. A partir de então, vários trabalhos se seguiram confirmando a agregação familiar na esquizofrenia. Esses primeiros estudos, no entanto, apresentavam alguns problemas metodológicos. No início da década de 80, novas investigações começaram a utilizar critérios diagnósticos operacionais, abordagem cega para os indivíduos entrevistados e presença de grupo controle. Apesar dessas inovações metodológicas, os resultados desses últimos estudos são muito semelhantes aos dos primeiros (Gottesmann, 1991; Vallada & Samaia, 2000).

Irving Gottesmann (1991), a partir de uma revisão extensa sobre o tema, selecionou os 40 estudos de família publicados na Europa e realizados entre os anos de 1920 e 1987, e calculou o risco médio de desenvolver esquizofrenia por parentes de pacientes com o transtorno. Os resultados mostraram que o risco era maior quanto mais próximo era o grau de parentesco, sendo que em gêmeos monozigóticos (MZ) de pacientes com esquizofrenia, o risco de ocorrência do transtorno era próximo a 50%, enquanto que em netos e primos o risco aproximava-se ao da população geral, ainda que significativamente maior.

Kendler e Gardner (1997) realizaram meta-análise dos três grandes estudos de famílias publicados até então, a saber, o estudo dinamarquês, o Iowa-500 e o Roscommon, e concluíram que havia uma forte agregação de esquizofrenia em famílias, confirmando os resultados dos trabalhos anteriores.

Ademais, os estudos epidemiológicos com famílias observaram que a prevalência de outros transtornos psicóticos (transtorno esquizoafetivo,

psicoses atípicas, transtorno delirante persistente, personalidade esquizóide) também era aumentada em parentes de pacientes com esquizofrenia quando comparada com parentes de indivíduos controles (Gottesman, 1991).

Apesar da demonstração do caráter familiar ser necessária, não é suficiente para a comprovação do componente genético no desenvolvimento de determinado quadro clínico, já que algumas doenças com agregação na família ocorrem devido à mesma exposição ambiental (por exemplo, cárie dentária, verminose), e não por conta da participação de um componente genético. Desse modo, estudos com gêmeos e com filhos adotivos foram necessários para discriminar a fonte dessa agregação familiar na esquizofrenia.

1.2.1.2 Estudos em gêmeos

Esse tipo de estudo parte da premissa que gêmeos MZ e dizigóticos (DZ) sofrem influência ambiental muito semelhante. Entretanto, os gêmeos MZ são geneticamente muito parecidos (para efeitos práticos são 100% idênticos), enquanto os gêmeos DZ apresentam por volta de 50% do componente genético em comum.

Tendo-se em vista que a expectativa para a ocorrência de esquizofrenia ao longo da vida gira ao redor de 1% na população geral, multiplicando-se pela prevalência de gêmeos em populações européias e norte-americanas, que é de cerca de 2%, pode-se avaliar a dificuldade da realização de estudos em gêmeos em esquizofrenia (Gottesman, 1991).

Assim, apenas duas em 10.000 pessoas serão ao mesmo tempo esquizofrênicos e gêmeos, e não mais que um em 15.000 será um gêmeo MZ e apresentará o transtorno. Desse modo, o grande desenvolvimento dessa estratégia de estudo deveu-se à organização dos serviços de registro nacionais dos países escandinavos, sendo o primeiro desses estudos realizado na Finlândia em 1963, por Pekka Tienari (Tienari P, 1963; Prescott & Gottesman, 1993).

Embora as estimativas dos vários estudos variem, a taxa de concordância para esquizofrenia em gêmeos MZ encontra-se ao redor de 50% e para gêmeos DZ é da ordem de 15% (Kendler, 1983). Esses estudos contribuem para evidenciar a existência do componente genético da esquizofrenia (o risco de um irmão gêmeo manifestar esquizofrenia, quando o outro irmão já apresenta o transtorno, é mais de três vezes maior para um irmão gêmeo MZ do que para um DZ), porém ressaltam também a participação do componente ambiental na etiopatogenia do transtorno, pois para doenças com caráter estritamente genético, a concordância esperada para gêmeos MZ seria teoricamente de 100%, uma vez que a carga genética é praticamente idêntica em ambos (Gottesman, 1991).

1.2.1.3 Estudos em adotivos

Os estudos em adotivos também têm como objetivo principal separar os efeitos genéticos dos ambientais na etiopatogenia de um dado transtorno, pois o indivíduo adotado recebe seus genes de uma família, mas sua experiência de vida ocorre como membro de outra. Esses trabalhos têm

basicamente dois desenhos principais: 1) no primeiro, investiga-se a freqüência do transtorno entre os pais biológicos e compara-se com aquela encontrada nos pais adotivos de crianças adotivas que desenvolveram esquizofrenia; 2) no segundo, observa-se a freqüência de esquizofrenia nos filhos biológicos de portadores do transtorno que foram adotados ao nascer e compara-se com a freqüência em filhos biológicos de pais saudáveis que também foram adotados logo após o nascimento (Gottesman, 1991; Ingraham & Kety, 2000). Também esta categoria de estudos, devido à necessidade de serviços de registro nacionais bastante organizados, tem como principais países envolvidos na sua execução os escandinavos.

O primeiro estudo genético com adotivos e esquizofrenia foi conduzido por Heston (1966). Apesar de não ter utilizado critérios diagnósticos operacionais, seus achados mostraram que filhos adotivos de mães biológicas com esquizofrenia apresentavam maior risco para o desenvolvimento do transtorno do que filhos adotivos de mães biológicas sem o transtorno. Usando um desenho similar ao do estudo conduzido por Heston (1966), Lowing *et al.* (1983) e Tienari *et al.* (2003) também encontraram que o risco para o desenvolvimento de esquizofrenia nos filhos adotivos de mães com esquizofrenia era maior que o apresentado pelos filhos adotivos de mães controles saudáveis.

Resultados derivados do estudo dinamarquês com familiares de adotivos (Kety, 1987) têm sido relatados durante mais de 30 anos, usando diferentes critérios diagnósticos. Uma nova amostra, chamada "Provincial Sample", foi adicionada à amostra original dinamarquesa ("Copenhagen

Sample”) para formar uma amostra nacional (“National Sample”). Kety *et al.* (1994) apresentaram os resultados dessas três amostras usando os critérios do DSM-II, e Kendler *et al.* (1994), de maneira independente, reanalisou os dados usando os critérios do DSM-IV. Ambas as análises foram consistentes e indicaram que parentes biológicos de filhos adotivos afetados apresentavam maior risco para esquizofrenia que os parentes adotivos, sendo que estes últimos apresentavam risco para desenvolver o transtorno de maneira similar ao observado na população geral.

1.2.1.4 Estudos de transmissão genética

Uma vez constatada a existência de um componente genético como fator de risco para o desenvolvimento de determinado transtorno psiquiátrico, por meio de estudos em famílias, gêmeos e adotivos, a consequência natural é tentar compreender o modo pelo qual se dá a transmissão desse transtorno.

Os principais modelos de transmissão genética propostos são:

- A. *Locus* principal único: pressupõe a existência de um único par de alelos responsável por todo o componente genético do transtorno, e que associado a fatores ambientais, determinariam ou não o seu aparecimento;
- B. Modelo oligogênico: propõe que um pequeno número de genes de efeito moderado atue em conjunto para determinar a susceptibilidade ao transtorno;

C. Modelo poligênico: um grande número de genes e fatores ambientais com efeitos pequenos, independentes e que interagem entre si, contribui para o desenvolvimento do transtorno;

D. Modelo misto: neste modelo, tanto um gene principal como genes de papel menor exerceriam sua função na etiologia do transtorno. Haveria um gene principal operando com um gradiente de influências poligênicas menores.

De acordo com Prescott & Gottesman (1993), todo modelo que busque explicar a transmissão da esquizofrenia deverá levar em consideração os seguintes achados:

- 1) a taxa de concordância entre gêmeos MZ é de aproximadamente 50%;
- 2) o risco para parentes aumenta ou diminui dramaticamente de acordo com o grau de parentesco;
- 3) o risco dos descendentes diretos de dois pais afetados é aproximadamente 50%;
- 4) a imensa maioria dos pacientes com esquizofrenia tem pais não-afetados;
- 5) parentes de pacientes com esquizofrenia têm risco aumentado para outros transtornos relacionados ao seu espectro;
- 6) o risco para um indivíduo desenvolver esquizofrenia geralmente aumenta com a gravidade do quadro em seus parentes, bem como com o maior número de parentes afetados.

Estes dados excluem o modelo de transmissão de gene único, mendeliano, para a esquizofrenia. O modelo poligênico parece ser o que

mais atende às características de transmissão observadas nesse transtorno, no qual vários genes de pequeno efeito atuariam em conjunto, provocando a expressão de determinada característica. Dessa forma, modelos quantitativos ou multifatoriais de herança foram elaborados pressupondo a existência de um traço latente referido como “tendência”. Assim, todos os fatores genéticos e ambientais, que influenciariam o desenvolvimento do transtorno, atuariam por meio de seu efeito sobre a “tendência” do indivíduo, sendo que aqueles cuja “tendência” ultrapassasse um determinado limiar exibiriam a enfermidade, os que não ultrapassassem não a exibiriam. Assim, o padrão de herança da esquizofrenia é típico de doença complexa (como a hipertensão arterial sistêmica), no qual ocorre a participação de vários genes (modelo poligênico) interagindo com o componente ambiental (Kinney & Matthyse, 1978; Mitchell *et al.*, 1993).

1.2.2 ESTUDOS GENÉTICO-MOLECULARES

Uma vez confirmada a existência do componente genético como fator de susceptibilidade para a esquizofrenia, estudos genético-moleculares começaram a ser realizados com o objetivo de identificar os genes envolvidos nesse processo, e verificar o modo de sua participação.

1.2.2.1 Tipos de estudos genético-moleculares

1.2.2.1.1 Estudos de ligação (*linkage*)

Uma das estratégias para localizar um gene de importância para o desenvolvimento de certa doença baseia-se no conceito de ligação genética, que se refere ao fato de que duas regiões gênicas (*loci*), situadas no mesmo cromossomo, e muito próximas uma da outra, tendem a ser herdadas conjuntamente (ligadas). Nesse tipo de investigação, utilizam-se marcadores moleculares de determinadas regiões cromossômicas. Tais marcadores sinalizariam que na vizinhança dessas regiões existiriam genes relacionados ao transtorno, já que os *loci* dos marcadores utilizados e dos genes estariam ligados. Para essa modalidade de investigação, em geral, necessita-se de famílias grandes e com múltiplos afetados. O primeiro relato positivo de ligação de uma região cromossômica com marcadores moleculares em esquizofrenia ocorreu em 1988, quando Sherrington *et al.* detectaram, em famílias da Inglaterra e Islândia, significativa evidência de ligação entre uma região do braço longo do cromossomo 5 (5q) e o transtorno. Contudo, estudos posteriores não reproduziram esses achados. Os estudos de ligação têm encontrado regiões cromossômicas sugestivas de estarem relacionadas ao aumento de risco para o desenvolvimento da esquizofrenia, porém tais resultados ainda estão sujeitos à confirmação (Norton & Owen, 2004).

1.2.2.1.2 Estudos de associação

Outro tipo de investigação molecular realizada é o estudo de associação. Nessa modalidade de estudo, o pesquisador levanta a hipótese

de que um determinado gene possa estar envolvido na etiopatogenia do transtorno e, então, verifica se a frequência de uma determinada variante gênica (polimorfismo) é significativamente diferente entre uma população de afetados e outra de não-afetados. Busca-se, portanto, determinar se há associação entre a condição de afetado e o polimorfismo investigado. Esse tipo de estratégia apresenta a vantagem de possibilitar a detecção de genes que apresentam efeitos discretos ou moderados no desenvolvimento de um determinado transtorno, o que a torna interessante no estudo de transtornos poligênicos e multifatoriais, como a esquizofrenia. Além dos polimorfismos pertencentes aos genes dos sistemas de neurotransmissão dopaminérgico, serotoninérgico e noradrenérgico, nos últimos anos outros genes têm sido identificados como potenciais marcadores de susceptibilidade para esquizofrenia (Norton & Owen, 2004).

No que tange aos polimorfismos dos genes dos sistemas cerebrais de neurotransmissão, vários deles têm sido investigados desde o início dos estudos de associação. Desses sistemas, o que vem recebendo maior atenção é o dopaminérgico, pelo fato de os antipsicóticos, principalmente os de antiga geração, apresentarem como mecanismo de ação o bloqueio de receptores de dopamina.

1.3 SISTEMA DOPAMINÉRGICO E ESQUIZOFRENIA

No que diz respeito à distribuição do sistema dopaminérgico no cérebro, há quatro principais vias de neurotransmissão, a saber, mesolímbica, mesocortical, nigroestriatal e túbero-infundibular. Além das diferenças anatômicas, há também diferenças funcionais entre as diversas vias dopaminérgicas, evidenciando a heterogeneidade de populações de células nervosas cujo neurotransmissor é a dopamina. Nessas células, cinco subtipos de receptores dopaminérgicos (DRD1 a DRD5) foram identificados (Seeman *et al.*, 1993). Os genes humanos que codificam tais receptores foram localizados nas seguintes regiões cromossômicas: DRD1: 5q31.1; DRD2: 11q22.23; DRD3: 3q13.3; DRD4: 11p15.5; DRD5: 4p16.1 (a letra p indica o braço curto do cromossomo, e a letra q o braço longo). Tais receptores são divididos em duas subfamílias distintas, a DRD1-*like* (DRD1 e DRD5), que exerce sua ação intracelular ativando a adenil-ciclase, e a DRD2-*like* (DRD2, DRD3 e DRD4) que inibe a adenil-ciclase e ativa os canais de potássio. Além disso, a organização genômica dos receptores dopaminérgicos também dá suporte ao conceito de que eles derivam de duas famílias distintas. Os genes do DRD1 e DRD5 não contêm *introns* nas suas regiões codificadoras, contrastando com os genes do DRD2 (6 *introns*), DRD3 (5 *introns*) e DRD4 (3 *introns*). A presença de *introns* entre as regiões codificadoras do gene permite o aparecimento de variantes das proteínas por meio do mecanismo de *splicing*, que acontece com a união de partes diferentes de um mesmo ácido ribonucleico-mensageiro (mRNA) para

produzir proteínas diferentes. Assim, o DRD2 apresenta duas variantes, chamadas de DRD2S e DRD2L, que são gerados por *splicing* de um *exon* de 87 pares de bases (pb) localizado entre os *introns* 4 e 5. Ambas as formas, no entanto, apresentam o mesmo padrão de distribuição cerebral, revelando também uma mesma resposta farmacológica. Variantes por *splicing* do DRD3 também foram identificadas, porém não demonstraram alterações na função da proteína (Jaber *et al.*, 1997).

O sistema dopaminérgico apresenta uma proteína transportadora localizada nos neurônios pré-sinápticos, que é responsável pela recaptura desse neurotransmissor para o interior de tais neurônios (Jaber *et al.*, 1997). O gene dessa proteína está localizado na posição 5p15.3.

Quando da metabolização da dopamina, ela é ortometilada pela ação da catecol-O-metiltransferase (COMT) e/ou desaminada por ação da monoamina-oxidase (MAO). Humanos e outros mamíferos apresentam duas formas dessa enzima, denominadas MAO-A e MAO-B, que são codificadas por genes localizados no braço curto do cromossomo X, entre as regiões p11.23 e p11.4. Tais genes apresentam estruturas semelhantes, compostas por 15 *exons*, distribuídos em uma região que compreende 70 mil pb (mil pb: *kilobase-pair* - Kb) (Furlong *et al.*, 1999). A COMT promove a transferência do grupo metil do co-substrato S-adenosil-L-metionina para o grupo 3-hidróxi das catecolaminas, levando à inativação desses compostos.

A enzima COMT exerce sua função por meio de duas formas estruturais, a solúvel (S-COMT – códon 108) e a ligada à membrana (MB-

COMT – códon 158). Ambas são codificadas por um gene localizado na posição 22q11.21. Este gene é composto por seis *exons*.

Recentemente, a hipótese dopaminérgica da esquizofrenia vem passando por uma reformulação. A hipótese dopaminérgica clássica atribuía as alterações psicopatológicas da esquizofrenia a um aumento da atividade dopaminérgica cerebral. No entanto, vários autores passaram a propor que os sintomas negativos da esquizofrenia, na realidade, ocorreriam como consequência de uma diminuição da atividade dopaminérgica (Heritch *et al.*, 1990; Davis *et al.*, 1991). Desse modo, tem sido sugerido que os sintomas deficitários da esquizofrenia tenham relação com uma baixa atividade dopaminérgica nas regiões cerebrais mesocorticais, e que os sintomas positivos do transtorno ocorreriam por conta de um aumento da atividade dopaminérgica nas regiões mesolímbicas (Davis *et al.*, 1991), sendo, então, a esquizofrenia um transtorno que apresenta um desequilíbrio funcional do sistema dopaminérgico.

No entanto, evidências recentes têm sugerido que a origem da esquizofrenia não se encontra necessariamente nessa desregulação dopaminérgica, mas sim que tal fenômeno seria na verdade uma via final de outros processos fisiopatológicos. Assim, um modelo plausível para explicar o desenvolvimento da esquizofrenia coloca que tal transtorno seria consequência da interação existente entre componentes genéticos de susceptibilidade e fatores de risco ambientais precoces que acometeriam o indivíduo, levando a alterações do seu neurodesenvolvimento, o que desencadearia futuramente uma desregulação do funcionamento

dopaminérgico. Acredita-se também que existiria um componente genético de susceptibilidade para o aparecimento de tal disfunção dopaminérgica futura (Di Forti *et al.*, 2007).

A hipótese do neurodesenvolvimento na esquizofrenia explica a existência do indivíduo predisposto ao quadro, porém não dá conta de explicar como o transtorno inicia-se a partir dessa susceptibilidade. A resposta pode estar no impacto das alterações do neurodesenvolvimento no funcionamento dopaminérgico (Di Forti, 2007). Acredita-se que a desregulação dopaminérgica na esquizofrenia ocorreria por conta de um mecanismo de sensibilização, no qual a exposição repetida a determinada droga, ou neurotransmissor no caso em questão, não levaria ao aparecimento de tolerância, mas sim ao aparecimento de um fenômeno inverso com o surgimento de aumento progressivo de resposta neuroquímica e, por consequência comportamental (Laruelle *et al.*, 1996; Laruelle & Abi-Dargham, 2000).

Jensen *et al.* (2007) colocam que durante o final da adolescência em pacientes com esquizofrenia, período no qual o transtorno começa na maior parte desses indivíduos, ocorreria uma anormalidade no funcionamento do sistema dopaminérgico, com uma liberação exagerada de dopamina, e fora de sincronia com os estímulos tanto ambientais quanto internos responsáveis por tal liberação. Dando suporte a tal teoria, trabalhos realizados com tomografia por emissão de fóton único (*single photon emission computerized tomography*: SPECT) e tomografia por emissão de pósitrons (*positron emission tomography*: PET) têm demonstrado que

pacientes com esquizofrenia liberam quantidades excessivas de dopamina em resposta a testes com anfetamina, havendo ainda uma relação entre o grau dessa liberação e a presença de sintomas psicóticos (Laruelle *et al.*, 1996; Breier *et al.*, 1997).

A importância da ocorrência de fatores de risco ambientais precoces para o aparecimento do fenômeno de sensibilização dopaminérgica na esquizofrenia tem sido investigada em vários estudos. Trabalhos realizados com modelo animal têm mostrado que ratos submetidos a lesões cerebrais perinatais desenvolvem sistemas dopaminérgicos mais susceptíveis a esse tipo de desregulação dopaminérgica quando adultos. Lipska *et al.* (1993) mostraram que lesões hipocampais neonatais em ratos permanecem relativamente assintomáticas durante sua vida adulta, até eles serem submetidos ao uso de anfetamina ou a situações de estresse, quando aparece então o fenômeno de hiperresponsividade dopaminérgica. El-Khodor & Boksa (2000; 2001) têm mostrado que lesões cerebrais provocadas por anóxia, durante parto cesariano de ratos, levam a alterações na transmissão dopaminérgica mesocorticolímbica com aumento na resposta comportamental à anfetamina e ao estresse.

Kapucu *et al.* (1998), em estudo com SPECT em crianças vítimas de isquemia cerebral, mostraram diminuição de receptores DRD2. Tal fenômeno pode ser similar na situação da poda neuronal (*neural pruning*) que ocorre no final da adolescência, mesma época em que ocorre o aparecimento da esquizofrenia. Desse modo, Laruelle e Abi-Dargham (2000) postularam que durante o final da adolescência, a falha no desenvolvimento

cortical dos pacientes com esquizofrenia poderia limitar a capacidade do cérebro de lidar com situações de estresse. Assim, essa falha do funcionamento cerebral normal levaria a um processo de sensibilização endógena, sendo que o aumento da atividade dopaminérgica levaria a uma adaptação neuroplástica. Ocorreria, então, um aumento da liberação de dopamina, aumento de receptores dopaminérgicos e de sua afinidade à ligação com o neurotransmissor em áreas cerebrais relacionadas aos sintomas psicóticos (Nordstrom *et al.*, 1995; Laruelle & Abi-Dargham, 2000; Seeman, 2002). A eficácia dos antipsicóticos antagonistas da dopamina nos receptores DRD2, no tratamento das alucinações auditivas, foi investigada em tecidos obtidos em estudo *post-mortem* de pacientes esquizofrênicos (Goldsmith *et al.*, 1997). Havia uma frequência maior de receptores DRD2 nas áreas corticais auditivas, da fala e auditório-visuais. Tal fenômeno poderia ter relação tanto com o transtorno, como com o uso dos antipsicóticos, que também poderiam levar ao fenômeno de sensibilização dopaminérgica, o que explicaria o motivo de antipsicóticos perderem sua eficácia com o passar do tempo em determinados pacientes.

Do mesmo modo que há evidências de uma hiperestimulação de receptores cerebrais dopaminérgicos, principalmente DRD2, em regiões subcorticais, estando relacionada aos sintomas psicóticos, há também estudos mostrando uma diminuição da atividade cerebral dopaminérgica em regiões corticais, que estariam relacionadas aos sintomas negativos do transtorno, como isolamento social, abulia e déficits cognitivos. O estudo da expressão cerebral de receptores dopaminérgicos mostra diminuição de

DRD3 e DRD4 na região do córtex pré-frontal. Aparentemente, essa redução deve estar relacionada com a presença do transtorno e não com o uso de antipsicóticos. Tal região cerebral deve apresentar uma hipoatividade dopaminérgica, podendo estar relacionada com a presença dos sintomas deficitários da esquizofrenia. Os receptores DRD3 apresentam uma expressão cerebral quase que exclusiva em áreas límbicas associadas a funções cognitivas e motivação. Estudo com o DRD3 mostrou diminuição de sua expressão gênica em linfócitos de pacientes com esquizofrenia (Vogel *et al.*, 2004), fato que é interessante, mesmo sabendo que a expressão gênica periférica não necessariamente reflete a expressão cerebral. Os receptores dopaminérgicos DRD1 também devem estar relacionados com alterações no desempenho cognitivo de pacientes com esquizofrenia.

White *et al.* (1976) demonstraram, em estudo realizado em hemácias, aumento da atividade da COMT em pacientes com esquizofrenia. Desse momento em diante, vários trabalhos têm mostrado associação entre alterações da atividade de tal enzima e esquizofrenia, o que levaria a uma diminuição da função dopaminérgica cerebral nos pacientes com tal transtorno. Alterações da COMT afetam a função do córtex pré-frontal, bem como de áreas cerebrais associativas, modulando funções cognitivas como memória de trabalho e funções executivas, além de processos emocionais (Tunbridge *et al.*, 2006). Mais recentemente, estudos com polimorfismos genéticos funcionais da COMT têm mostrado associação entre esquizofrenia e variantes genéticas que levam a sua menor atividade enzimática (Chen *et al.*, 2004).

Por conta das alterações na função dopaminérgica que vêm sendo descritas em pacientes com esquizofrenia, polimorfismos relacionados a tal sistema de neurotransmissão podem estar relacionados como fator de risco para o aparecimento de tal transtorno.

Abaixo, encontram-se os resultados de estudos de associação entre esquizofrenia e polimorfismos do sistema dopaminérgico que serão investigados no presente trabalho.

1.3.1 ESTUDOS DE ASSOCIAÇÃO ENTRE GENES DO SISTEMA DOPAMINÉRGICO E ESQUIZOFRENIA

1.3.1.1 Polimorfismos do gene do receptor dopaminérgico subtipo 2 (*DRD2*)

1.3.1.1.1 Polimorfismo *TaqI* A do *DRD2* – rs1800497

O gene que codifica o DRD2 (*DRD2*) foi mapeado por Grandy (1989) no cromossomo 11 (posição: 11q22-23), sendo sua sequência codificadora interrompida por 6 *introns*, originando uma proteína que apresenta 7 domínios transmembrânicos (Noble, 2000). Um dos polimorfismos do *DRD2* mais estudados é o “polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição” (*restriction fragment length polymorphism*: RFLP) *TaqI* A, que está localizado a 10Kb da posição 3’ do gene (*reference single nucleotide polymorphism* – *refSNP ID* – rs: rs1800497).

O primeiro trabalho sugerindo associação entre o *DRD2* e esquizofrenia foi publicado por St Clair *et al.* (1990), identificando a região

cromossômica 11q21-22 como de interesse para a pesquisa em indivíduos com transtorno psiquiátricos (região onde se localiza o *DRD2*). Em investigação com população coreana, Lee *et al.* (1995) encontraram associação entre o alelo A1 do polimorfismo *TaqI A DRD2* e esquizofrenia. No entanto, outros estudos não confirmaram tal associação (Comings *et al.*, 1991; Nöthen *et al.*, 1993; Campion *et al.*, 1993; Sanders *et al.*, 1993; Gejman *et al.*, 1994; Dollfus *et al.*, 1996; Jonsson *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1997a; Suzuki *et al.*, 2000; Virgos *et al.*, 2001).

Em contrapartida, em investigação envolvendo abordagens metodológicas distintas, como estudo do tipo caso-controle, de ligação e de distorção de transmissão alélica (estudo com trios: pais e probando com o transtorno), Dubertret *et al.* (2001) encontraram uma relação entre esquizofrenia e o alelo A2. No entanto, no mesmo estudo, uma meta-análise utilizando os sete estudos descritos previamente, encontrou associação entre o alelo oposto (A1) e esquizofrenia. Em outro estudo, Dubertret *et al.* (2004) encontraram redução na transmissão alélica do alelo A1 para os pacientes com esquizofrenia, corroborando também o achado de Golimbet *et al.* (2003). Achado similar também foi encontrado por Blum *et al.* (1997) com comportamento esquizo/evitativo.

Golimbet *et al.* (1998), em estudo de associação, detectaram relação positiva entre a presença do genótipo A2/A2 e esquizofrenia. Em um estudo de seguimento, utilizando uma população maior, Golimbet *et al.* (2001) encontraram uma associação estatisticamente ainda mais significativa entre o genótipo A2/A2 e gravidade do quadro clínico de esquizofrenia. No

entanto, Suzuki *et al.* (2000) não detectaram essa associação ao estudar tal polimorfismo e gravidade dos sintomas.

Na região cromossômica onde está localizado o *DRD2*, foi relatado resultado positivo de ligação com esquizofrenia em recente meta-análise (Lewis *et al.*, 2003).

Assim, os resultados dos estudos conduzidos até o momento, apesar de inconclusivos, e até mesmo contraditórios em seus resultados, têm apontado o polimorfismo *TaqI A* do *DRD2* como sendo de interesse para estudos genéticos em esquizofrenia.

O polimorfismo *TaqI A* do gene do *DRD2* foi um dos primeiros a serem investigados como fator de risco para vários transtornos mentais. No entanto, de maneira interessante, um novo gene foi mapeado na região onde se localiza tal polimorfismo, que codifica a proteína *ankyrin repeat and kinase domain containing 1* (ANKK1) (Neville *et al.*, 2004). A ANKK1 é uma proteína-quinase, provavelmente exercendo sua ação ligando-se à adenosina 5'-trifosfato (ATP), catalisando a transferência de um grupo fosfato dessa molécula, liberando energia. Descobriu-se que o polimorfismo RFLP do *DRD2*, na realidade leva à troca das bases nitrogenadas citosina por timina (C/T), ocasionando a substituição Glu713Lys (substituição do aminoácido glutamina por lisina), no *exon 8* do gene da ANKK1 (*ANKK1*). Por conta disso, pode-se ter uma explicação alternativa aos resultados positivos de associação encontrados entre tal polimorfismo e alguns transtornos psiquiátricos, identificando o *ANKK1* como relacionado à etiopatogenia desses quadros. Além disso, tal polimorfismo pode na verdade

estar em desequilíbrio de ligação com outro polimorfismo do *DRD2*, que por sua vez pode estar relacionado como fator de risco para o desenvolvimento de esquizofrenia.

Neste ano, Parsons *et al.* (2007) encontraram menor frequência do alelo A1 do polimorfismo *TaqI* A na população de pacientes com esquizofrenia (0,13), quando comparada com controles (0,23).

Abaixo, encontra-se a representação esquemática do polimorfismo *TaqI* A do *DRD2* (rs1800497):

Alelo A1 (T: Lys) = 5'-gctggg'gcctgcct **T** gaccagcacttt-3'

Alelo A2 (C: Glu) = 5'-gctggg'gcctgcct **C** gaccagcacttt-3'

1.3.1.1.2 Polimorfismo -141C Ins/Del do *DRD2* – rs1799732

O polimorfismo -141C (Ins/Del) corresponde a uma variante gênica caracterizada pela presença (*Insertion*: Ins) ou ausência (*Deletion*: Del) da base nitrogenada C na posição 141 da região promotora do *DRD2*.

Tal polimorfismo é funcional, alterando a expressão gênica em trabalho *in vitro*. A deleção do nucleotídeo causado pelo alelo Del reduz a transcrição do gene em uma taxa média de 68% (Arinami *et al.*, 1997).

O primeiro trabalho realizado com o polimorfismo -141C Ins/Del do *DRD2* (rs1799732) e esquizofrenia foi realizado por Arinami *et al.* (1997), que encontrou associação do alelo -141C Ins e susceptibilidade ao desenvolvimento do transtorno. Alguns estudos que se seguiram também mostraram associação entre esquizofrenia e o alelo -141C Ins (Ohara *et al.*, 1998; Jonsson *et al.*, 1999; Schindler *et al.*, 2002). No entanto, Breen *et al.*

(1999) encontraram associação com o alelo oposto. Tais resultados opostos podem se dever ao fato da frequência alélica de tal polimorfismo variar entre diferentes grupos étnicos.

Outros estudos falharam em encontrar associação entre tal polimorfismo e esquizofrenia (Sanders et al., 1993; Gejman et al., 1994; Jonsson et al., 1996; Li et al., 1998; Stober et al., 1998; Tallerico et al., 1999; Suzuki et al., 2000; Hori et al., 2001; Kampman et al., 2003; Parsons et al., 2007).

Meta-análise publicada em 2004 por Glatt *et al.*, por sua vez, não encontrou associação entre o polimorfismo -141C (Ins/Del) e esquizofrenia.

Abaixo, encontra-se a representação esquemática do polimorfismo -141C Ins/Del do *DRD2* (rs1799732):

Alelo Del: 5'-tcctaccggtC.....Aggccgggga-3'

Alelo Ins: 5'-tcctaccggtC **C** Aggccgggga-3'

1.3.1.2 Polimorfismo do receptor dopaminérgico subtipo 3 (*DRD3*)

1.3.1.2.1 Polimorfismo Ser9Gly do *DRD3* – rs6280

Sokoloff *et al.* (1990) descobriram que o gene do *DRD3* (*DRD3*) apresenta três *introns* entre suas regiões codificadoras. Le Coniat *et al.* (1991) localizaram tal gene no cromossomo 3 (região: 3q13.3), sendo que o *DRD3* difere do *DRD2* por ser, além de um receptor pós-sináptico, também um auto-receptor. Na presente tese será estudado o polimorfismo Ser9Gly (uma mudança nucleotídica de adenina (A) por guanina (G) no *DRD3* que

resulta em uma substituição de aminoácidos - serina por glicina - na posição 9 da proteína), que está localizado no *exon* 1 do gene. Essa mudança de aminoácidos pode alterar a inserção do DRD3 na membrana neuronal, o que poderia provocar uma alteração funcional (Lannfelt *et al.*, 1992). Em trabalho *in vitro*, células expressando apenas receptores contendo o aminoácido Gly tinham maior afinidade à dopamina que aquelas células expressando o aminoácido Ser (Lundstrom & Turpin, 1996). No entanto, apesar de tais achados, não há consenso acerca da funcionalidade de tal polimorfismo.

O interesse no estudo do DRD3 passou a ocorrer pelo fato de ele estar envolvido nos mecanismos de ação dos antipsicóticos, evidenciando seu possível papel na fisiopatologia da esquizofrenia (Sokoloff *et al.*, 1990). Estudos *in vivo* em animais de laboratório têm demonstrado que o uso de antipsicóticos, tanto clássicos como de nova geração, elevam os níveis intraneuronais do (mRNA) do *DRD3* (Buckland *et al.*, 1993; Sokoloff *et al.*, 1992).

O primeiro estudo envolvendo o polimorfismo Ser9Gly do *DRD3* mostrou um excesso de homozigose (alelos iguais), tanto Ser/Ser como Gly/Gly, nos pacientes com esquizofrenia quando comparados com controles normais ($p=0,0001$), em uma população de caucasianos da França e do País de Gales (Crocq *et al.*, 1992). Estudos posteriores realizados em populações caucasianas e miscigenadas (Nimgaonkar *et al.*, 1993; Nothen *et al.*, 1993; Jonsson *et al.*, 1993; Di Bella *et al.*, 1994; Laurent *et al.*, 1994; Mant *et al.*, 1994; Gaitonde *et al.*, 1996; Nimgoankar *et al.*, 1996; Durany *et al.*, 1996; Hawi *et al.*, 1998; Cordeiro *et al.*, 2001) e asiáticas (Nanko *et al.*,

1993; Yang *et al.*, 1993; Saha *et al.*, 1994; Ohara *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1997b; Prasad *et al.*, 1999) tentaram reproduzir tal achado, porém sem sucesso.

Por outro lado, Shaikh *et al.* (1996), e Spurlock *et al.* (1998), em estudo multicêntrico europeu (*European Multicentre Association Study of Schizophrenia*), encontraram associação entre o polimorfismo genético em questão e esquizofrenia. Além disso, três estudos de meta-análise também demonstraram essa associação (Shaikh *et al.*, 1996; Williams *et al.*, 1998; Dubertret *et al.*, 1998).

Alguns estudos têm encontrado associações entre o polimorfismo Ser9Gly em algumas populações específicas de esquizofrênicos. Nimgoankar *et al.* (1993) demonstraram associação entre esquizofrenia em pacientes com história familiar desse transtorno e o genótipo Ser/Ser. Associações entre o mesmo homozigoto Ser/Ser foram feitas também com pacientes esquizofrênicos que faziam uso de drogas (Krebs *et al.*, 1998), que desenvolveram discinesia tardia (Steen *et al.*, 1997; Basile *et al.*, 1999; Segman *et al.*, 1999; Segman *et al.*, 2000), e que apresentavam acatisia quando do uso de antipsicóticos clássicos (Eichhammer *et al.*, 2000).

Recente meta-análise realizada com todos os estudos de associação conduzidos até então, realizada por Jonsson *et al.* (2003), estudou 8.761 indivíduos e encontrou excesso de homozigose entre os pacientes com esquizofrenia. Porém, no ano seguinte, o mesmo grupo refez a meta-análise acrescentando outros quatro trabalhos publicados (Anney *et al.*, 2002; Morimoto *et al.*, 2002; Ventriglia *et al.*, 2002; Kaiser *et al.*, 2002),

aumentando a amostra analisada para mais de 11.000 indivíduos, não encontrando mais o achado anterior (Jonsson *et al.*, 2004).

Após essa última meta-análise, novos estudos seguiram-se, mostrando achados inconclusivos, com resultados positivos (Talkowski *et al.*, 2006; Dominguez *et al.*, 2007) e negativos (Liou *et al.*, 2004; Hoogendoorn *et al.*, 2005; Lorenzo *et al.*, 2007).

Abaixo, encontra-se a representação esquemática do polimorfismo Ser9Gly do *DRD3* (rs6280):

Alelo A (Ser): 5'-cagctgagt **A** gccacctgaacta-3'

Alelo G (Gly): 5'-cagctgagt **G** gccacctgaacta-3'

1.3.1.3 Polimorfismos do gene da proteína transportadora de dopamina (*DAT1*: *Solute Carrier Family 6, member 3*: *SLC6A3*)

1.3.1.3.1 Polimorfismo VNTR da região 3' não-codificadora (UTR) do *SLC6A3*

Giros *et al.* (1992) mapearam o gene (*DAT1*, *SLC6A3*) da proteína transportadora de dopamina (*DAT1*) no cromossomo 5 (posição: 5p15.3) e identificaram a presença de um polimorfismo de número variável de repetições seqüenciais (*variable number of tandem repeats*: VNTR), que varia entre 3 e 11 repetições de uma seqüência de 40 pb, localizado no *exon* 15 do *DAT1* (*SLC6A3*) (Figura 1).

A *DAT1* desempenha um importante papel na regulação dos níveis sinápticos de dopamina, mediando a recaptura desse neurotransmissor para

o interior do neurônio pré-sináptico (Jaber *et al.*, 1997). Dois estudos *post-mortem* mostraram diminuição da densidade estriatal de DAT1 em cérebros de pacientes esquizofrênicos crônicos (Knable *et al.*, 1994; Laakso *et al.*, 2001). Estudo com PET encontrou menor densidade de DAT1 em regiões dos gânglios da base de pacientes esquizofrênicos crônicos, mais especificamente no terço médio do putâmen, o que pode sugerir uma diminuição na expressão do SLC6A3 nesses pacientes (Chinaglia *et al.*, 1992).

Estudos de ligação em famílias norte-americanas (Byerley *et al.* 1993a; Byerley *et al.* 1993b), italianas (Persico *et al.*, 1995), francesas (Bodeau-Pean *et al.*, 1995), alemãs (Maier *et al.*, 1996) e indianas (Semwal *et al.*, 2001) não conseguiram demonstrar relação entre esse polimorfismo VNTR e esquizofrenia. A maior parte dos estudos de associação também não tem demonstrado relação entre esse polimorfismo do SLC6A3 e esquizofrenia (Li *et al.*, 1994; Daniels *et al.*, 1995; Maier *et al.*, 1996; Inada *et al.*, 1996; Joober *et al.*, 2000; Georgieva *et al.*, 2002; Hauser *et al.*, 2002; Semwal *et al.*, 2002; Cordeiro *et al.*, 2004; Jeong *et al.*, 2004). No entanto, Persico e Macciardi (1997) relataram maior presença dos genótipos homozigotos 9/9 e 10/10 no grupo de esquizofrênicos quando comparados aos controles, bem como uma redução do genótipo heterozigoto 9/10.

Meta-análise realizada por Gamma *et al.* (2005) não mostrou associação entre tal polimorfismo VNTR do SLC6A3 e esquizofrenia.

Abaixo, encontra-se um esquema do polimorfismo VNTR da região 3' não-codificadora (UTR) do SLC6A3:

- Alelo 4: 4 repetições em tandem de uma seqüência de 48 pb
- Alelo 5: 5 repetições em tandem de uma seqüência de 48 pb
- Alelo 6: 6 repetições em tandem de uma seqüência de 48 pb
- Alelo 7: 7 repetições em tandem de uma seqüência de 48 pb
- Alelo 8: 8 repetições em tandem de uma seqüência de 48 pb
- Alelo 9: 9 repetições em tandem de uma seqüência de 48 pb
- Alelo 10: 10 repetições em tandem de uma seqüência de 48 pb
- Alelo 11: 11 repetições em tandem de uma seqüência de 48 pb

1.3.1.3.2 Polimorfismo A1343G do gene do SLC6A3 – rs6347

Estudo analisando polimorfismos do SLC6A3 identificou o SNP rs6347, no qual ocorre a substituição A1343G, localizado no *exon* 9 (Greenwood *et al.*, 2002). Tal polimorfismo é sinônimo, não havendo mudança de aminoácido na proteína (Ser/Ser). Até onde se sabe, o estudo de tal polimorfismo é inédito na investigação de susceptibilidade genética à esquizofrenia.

Abaixo, encontra-se a representação esquemática do polimorfismo A1343G do SLC6A3 (rs6347):

Alelo G (Ser) = 5'-cacgctccctctgtcctc **G** gcctgggccgtggtc-3'

Alelo A (Ser) = 5'-cacgctccctctgtcctc **A** gcctgggccgtggtc-3'

Figura 1 - Representação estrutural do SLC6A3, mostrando a localização dos polimorfismos rs6347 no *exon* 9 e VNTR na região 3' não codificadora

1.3.1.4 Polimorfismo do gene da catecol-O-metiltransferase (*COMT*)

1.3.1.4.1 Polimorfismo A/G da região UTR do *COMT* – rs165599

Uma vez liberada na fenda sináptica, a dopamina pode ter um dos seguintes destinos: (1) ligação aos seus receptores específicos, por meio dos quais exerce seus efeitos fisiológicos, (2) recaptação pelas próprias terminações nervosas sinápticas, por ação da DAT1, para sua estocagem, reutilização ou metabolização ou (3) inativação, sendo ortometiladas pela ação da COMT e/ou desaminadas pela ação da MAO (Aires, 1999). A COMT promove a transferência do grupo metil do co-substrato S-adenosil-L-

metionina, para o grupo 3-hidroxi das catecolaminas, levando à inativação desses compostos.

Tanto a forma S-COMT (códon 108), quanto a forma MB-COMT (códon 158), são codificadas por um gene localizado na região cromossômica 22q11. A forma S-COMT apresenta 221 aminoácidos, enquanto que a forma MB-COMT contém 50 aminoácidos adicionais (Mannisto *et al.*, 1999).

Vários polimorfismos do *COMT* vêm sendo investigados como fatores de risco para o desenvolvimento de esquizofrenia. O polimorfismo rs165599 (A/G), localizado na região 3' UTR do *COMT*, próximo ao *exon* 1, foi investigado pela primeira vez como fator de susceptibilidade para esquizofrenia por Shifman *et al.* (2002), mostrando associação entre o alelo G e o transtorno. Bray *et al.* (2003), em estudo *post-mortem*, mostraram que o polimorfismo rs165599 altera a expressão do *COMT*, sendo que o alelo G, que foi relacionado como fator de risco para esquizofrenia no estudo de Shifman *et al.* (2002), leva a uma diminuição dessa expressão.

No entanto, estudos que se seguiram à investigação inicial de associação do polimorfismo rs165599 e esquizofrenia têm encontrado resultados conflitantes, com achados tanto positivos (Chen *et al.*, 2004; Handoko *et al.*, 2005; Funke *et al.*, 2005; Nicodemus *et al.*, 2007), como negativos (Sand *et al.*, 2004; Molero *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2007; Nunokawa *et al.*, 2007). Vale ressaltar, no entanto, que o resultado positivo de Chen *et al.* (2004) foi com o alelo oposto (A) do polimorfismo do *COMT*, alelo este que está relacionado com alta expressão do *COMT*.

Abaixo, encontra-se a representação esquemática do polimorfismo A/G da região UTR do *COMT* (rs165599):

Alelo A = 5'-gccccatggggacgactgcc **A** gcctgggaaacgaagaggag-3'

Alelo G = 5'-gccccatggggacgactgcc **G** gcctgggaaacgaagaggag-3'

Figura 2 - Representação do *COMT*. MB-COMT: COMT ligada à membrana; S-COMT: COMT na forma solúvel

Concluindo, os estudos genético-epidemiológicos permitem afirmar a existência de uma vulnerabilidade genética para o desenvolvimento da esquizofrenia, sendo seu padrão de transmissão característico de uma doença complexa, ou seja, poligênica e multifatorial. Esses dados justificam a pertinência científica da realização de estudos genético-moleculares na área. Ademais, diferentes tipos de evidências científicas apóiam a investigação dos genes relacionados ao sistema dopaminérgico confirmam-se como candidatos para estudos de susceptibilidade para esquizofrenia. Os receptores dopaminérgicos são sítios de ação de antipsicóticos, tanto dos típicos, como de muitos atípicos. Anfetaminas e cocaína tendem a provocar exacerbação de sintomas psicóticos em indivíduos susceptíveis, por meio de sua ação bloqueando a recaptura de dopamina (Goodwin & Jamison, 1990).

A ação da levodopa tem sido implicada no aparecimento de sintomas psicóticos, pelo fato de disponibilizar dopamina na fenda sináptica (Murphy *et al.*, 1971). Estudos bioquímicos e de neuroimagem funcional demonstraram a existência de um desequilíbrio na atividade dopaminérgica cerebral em indivíduos com esquizofrenia, ocorrendo uma hiperatividade em regiões responsáveis pelo aparecimento de sintomas psicóticos, e uma hipoatividade em regiões relacionadas à presença de sintomas deficitários (Andreasen, 2001).

Além das justificativas já expostas, quando do início da realização desta tese, não havia trabalhos realizados na área de genética do sistema dopaminérgico e esquizofrenia com a população brasileira. Nesta tese, buscamos contribuir para uma melhor compreensão dos achados encontrados na literatura em estudos de associação e esquizofrenia, utilizando os polimorfismos do sistema dopaminérgico em questão, incluindo um novo polimorfismo (A1343G do SLC6A3) ainda não investigado em estudos na área de esquizofrenia.

OBJETIVOS

Esta tese tem como objetivo investigar a associação entre os seguintes polimorfismos do sistema dopaminérgico e esquizofrenia em uma população brasileira, em um estudo do tipo caso-controle:

- 1- Polimorfismo *TaqI* A do *DRD2* (rs1800497);
- 2- Polimorfismo -141C (Ins/Del) do *DRD2* (rs1799732);
- 3- Polimorfismo Ser-9-Gly do *DRD3* (rs6280);
- 4- Polimorfismo VNTR da região 3' não codificadora do *SLC6A3*;
- 5- Polimorfismo A1343G do *SLC6A3* (rs6347);
- 6- Polimorfismo A/G da região 3' não codificadora do *COMT* (165599).

HIPÓTESES

H0: Não há diferença Na distribuição dos polimorfismos estudados entre os grupos estudados (pacientes e controles). A hipótese nula a ser testada é se o risco de um indivíduo apresentar esquizofrenia é independente do polimorfismo genético que possui.

H1: Existem diferenças estatisticamente significantes na distribuição dos polimorfismos estudados entre os grupos de pacientes e controles.

MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SELEÇÃO DA AMOSTRA

4.1.1 ASPECTOS ÉTICOS

Todo indivíduo (paciente ou controle) que foi incluído neste trabalho assinou termo de consentimento pós-informado. O projeto deste Doutorado foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq/HC-FMUSP) (Anexo 2).

4.1.2 CASOS

Foram selecionados 245 pacientes com diagnóstico de esquizofrenia para o presente trabalho, de acordo com os critérios do DSM-IV (*American Psychiatric Association*, 1994) (Anexo 3). Além do diagnóstico de esquizofrenia propriamente dito, os pacientes também foram classificados, de acordo com o subtipo do transtorno, também seguindo os critérios do DSM-IV (Esquizofrenia Paranóide, Esquizofrenia Desorganizada, Esquizofrenia Catatônica, Esquizofrenia Indiferenciada e Esquizofrenia Residual) (Anexo 3). Todos os indivíduos foram provenientes das

enfermarias e ambulatórios do Instituto de Psiquiatria do HC-FMUSP. Os prontuários médicos desses pacientes eram consultados e, em caso de diagnóstico de esquizofrenia, os pacientes eram recrutados para avaliação por meio de entrevista aberta com o objetivo de completar e confirmar as informações obtidas em prontuários. Dois psiquiatras entrevistavam cada paciente e formulavam sua hipótese diagnóstica, sendo que, em caso de qualquer dúvida ou discordância quanto ao diagnóstico de esquizofrenia, o paciente não era incluído no trabalho.

4.1.3 CONTROLES

Os 834 controles utilizados fazem parte do Banco de Controles do Programa de Genética e Farmacogenética do Instituto de Psiquiatria do HC-FMUSP (PROGENE), tendo sido recrutados no Banco de Sangue do HC-FMUSP. Nesta unidade do HC-FMUSP, todos os doadores de sangue, sempre voluntários, são submetidos a um questionário aplicado por uma enfermeira, investigando, dentre outras condições clínicas, o uso de substâncias psicoativas e de medicamentos psiquiátricos. Durante a coleta, uma curta entrevista não-padronizada foi realizada por um psiquiatra, investigando algum possível transtorno mental atual ou durante a história de vida do indivíduo (Messas, 2001), priorizando a detecção de dependência química e quadros psicóticos. Esses controles têm sido utilizados em estudos do tipo associação realizados pelo PROGENE. Este projeto foi

formalmente submetido à direção do Banco de Sangue, que consentiu com a realização das entrevistas e coletas de sangue em suas dependências.

4.2 ANÁLISE LABORATORIAL

4.2.1 EXTRAÇÃO DO ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLÉICO (DNA)

Cerca de 10 mililitros de sangue venoso periférico foram coletados, por punção venocubital, em tubos com o anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Após a coleta, os tubos foram devidamente armazenados a -4°C até o momento da extração. O ácido desoxirribonucléico (DNA) genômico foi extraído utilizando-se duas técnicas laboratoriais: a) técnica de fenol-clorofórmio; b) técnica de *salting out* (Miller *et al.*, 1988) (Anexo 4). No início das extrações de DNA, a técnica de fenol-clorofórmio era a padronizada no PROGENE, porém, no decorrer dessa tese, a mesma foi substituída pela de *salting out*, para a qual o aluno recebeu treinamento. Após a extração de DNA, a concentração obtida era mensurada por leitura no espectrofotômetro Gene Quant (Pharmacia Biotech).

4.2.2 DETECÇÃO DE FRAGMENTOS POLIMÓRFICOS DE DNA

4.2.2.1 Genotipagens dos Polimorfismos Realizadas no PROGENE

4.2.2.1.1 Genotipagem do polimorfismo *TaqI* A do *DRD2*

A análise deste polimorfismo foi realizada por meio de amplificação pela técnica de reação de polimerização em cadeia (*polymerase chain reaction*: PCR) (Anexo 5), seguida de digestão do produto amplificado com enzimas de restrição.

A reação de amplificação foi realizada utilizando-se: 20 nanogramas (ng) de DNA genômico, 1,5 (micro molar) (mM) $MgCl_2$, 50mM KCl, 10mM de hidroximetil aminometano hidrocloreto (Tris-HCl) (pH=8,0), 10 picomoles (pmol) de cada oligonucleotídeo (Tabela 1) (Grandy *et. al.*, 1993), 200 microles (μ M) de cada deoxinucleotídeo trifosfato e 0,5U *Taq* DNA polimerase.

A amplificação foi realizada em termociclador Peltier Thermal Cycler – 200 (MJ Research) utilizando-se as seguintes condições: 1 ciclo de 95°C por 5 minutos para a denaturação inicial do material genômico, 40 ciclos de 95°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto para a amplificação do segmento gênico de interesse e 1 ciclo de 72°C por 10 minutos para a extensão final do fragmento. O produto resultante da amplificação foi digerido com a enzima de restrição *TaqI* A conforme instruções do fabricante. Após digestão, o produto obtido foi analisado em

gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. Os tamanhos dos fragmentos gerados foram:

- Alelo 1: 310pb
- Alelo 2: 130pb + 180pb

	11	12	22
310pb
180pb
130pb

Figura 3 - Representação esquemática do polimorfismo do *DRD2* após amplificação e digestão com a enzima *TaqI* A. Alelo 1: 310pb; Alelo 2: 130pb + 180pb

Figura 4 - Foto do gel de agarose com a genotipagem do polimorfismo *TaqI* A do *DRD2*

4.2.2.1.2 Genotipagem do polimorfismo Ser9Gly do gene *DRD3*

A análise deste polimorfismo foi realizada por meio de amplificação pela técnica de PCR, seguida de digestão do produto amplificado com enzimas de restrição.

A reação de amplificação foi realizada utilizando-se: 20ng de DNA genômico, 1,5mM MgCl₂, 50mM KCl, 10mM Tris-HCl (pH=8,0), 10 pmol de cada oligonucleotídeo (Tabela 1) (Lannfelt *et al.*, 1992), 200μM de cada deoxinucleotídeo trifosfato e 0,5U *Taq* DNA polimerase.

A amplificação foi realizada em termociclador Peltier Thermal Cycler – 200 (MJ Research) utilizando-se as seguintes condições: 1 ciclo de 95°C por 5 minutos para a denaturação inicial do material genômico, 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 56°C por 40 segundos, 72°C por 40 segundos para a amplificação do segmento gênico de interesse e 1 ciclo de 72°C por 10 minutos para a extensão final do fragmento. O produto resultante da amplificação foi digerido com a enzima de restrição *MscI* conforme instruções do fabricante. Após digestão, o produto obtido foi analisado em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. Os tamanhos dos fragmentos gerados foram:

- Alelo 1 (Gly): 206pb + 111pb + 98pb + 47pb
- Alelo 2 (Ser): 304pb + 111pb + 47pb

	11	12	22
304pb
206pb
111pb
98pb
47pb

Figura 5 - Representação esquemática do polimorfismo Ser9Gly do gene do DRD3. Alelo 1: 206pb + 111pb + 98pb + 47pb; Alelo 2: 304pb + 111pb + 47pb

Figura 6 – Foto do gel de agarose com a genotipagem do polimorfismo Ser9Gly do *DRD3*

4.2.2.1.3 Genotipagem do polimorfismo do tipo VNTR na região 3' UTR do SLC6A3

A amplificação do polimorfismo da região 3' não codificadora do SLC6A3 foi realizada pela técnica de PCR utilizando-se: 20ng de DNA genômico, 1,5mM MgCl₂, 50mM KCl, 10mM Tris-HCl (pH=8,0), 10 pmol de cada oligonucleotídeo (Tabela 1) (Gill *et al.*, 1997), 200μM de cada deoxinucleotídeo trifosfato e 0,5U *Taq* DNA polimerase.

A amplificação foi realizada em termociclador Peltier Thermal Cycler – 200 (MJ Research) utilizando-se as seguintes condições: 1 ciclo de 95°C por 3 minutos para a denaturação inicial do material genômico, 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos para os ciclos de denaturação, hibridação e extensão do segmento gênico de interesse, e mais 1 ciclo de 72°C por 7 minutos para a extensão final do fragmento. Após amplificação, os segmentos foram analisados em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. Os alelos para o polimorfismo da região 3' não codificadora foram classificados de acordo com o tamanho dos fragmentos obtidos que são correspondentes ao número de repetições:

- Alelo 4: 192pb (4 repetições)
- Alelo 5: 240pb (5 repetições)
- Alelo 6: 288pb (6 repetições)
- Alelo 7: 336pb (7 repetições)
- Alelo 8: 384pb (8 repetições)
- Alelo 9: 432pb (9 repetições)
- Alelo 10: 480pb (10 repetições)
- Alelo 11: 528pb (11 repetições)

Tamanho	9-7	9-8	9-9	9-10	10-4	10-5	10-6	10-7	10-8	10-10	11-9	11-10
520pb (11)											■	■
480pb (10)				■	■	■	■	■	■	■		■
440pb (9)	■	■	■	■							■	
400pb (8)		■							■			
360pb (7)	■							■				
320pb (6)							■					
280pb (5)						■						
240pb (4)					■							

Figura 7 - Representação esquemática do polimorfismo VNTR do SLC6A3

Figura 8 – Foto do gel de agarose com a genotipagem do polimorfismo VNTR do SLC6A3

4.2.2.1.4 Genotipagem do polimorfismo A1343G do SLC6A3

A análise deste polimorfismo foi realizada por meio de amplificação pela técnica de PCR, seguida de digestão do produto amplificado com enzimas de restrição.

A reação de amplificação foi realizada utilizando-se: 20ng de DNA genômico, 1,5mM MgCl₂, 50mM KCl, 10mM Tris-HCl (pH=8,0), 10 pmol de cada oligonucleotídeo (Tabela 1) (Baar *et al.*, 2001), 200μM de cada deoxinucleotídeo trifosfato e 0,5U *Taq* DNA polimerase.

A amplificação foi realizada em termociclador Peltier Thermal Cycler – 200 (MJ Research) utilizando-se as seguintes condições: 1 ciclo de 95°C por 5 minutos para a denaturação inicial do material genômico, 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 58°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto para a amplificação do segmento gênico de interesse e 1 ciclo de 72°C por 5 minutos para a extensão final do fragmento. O produto resultante da

amplificação foi digerido com a enzima de restrição *Ddel* conforme instruções do fabricante. Após digestão, o produto obtido foi analisado em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. Os tamanhos dos fragmentos gerados foram:

- Alelo 1 (A): 209pb
- Alelo 2 (G): 110pb + 99pb

	11	12	22
209pb
110pb
99pb

Figura 9 - Representação esquemática do polimorfismo A1343G do SLC6A3. Alelo 1: 209pb; Alelo 2: 110pb + 99pb

Figura 10 – Foto do gel de agarose com a genotipagem do polimorfismo A1343G do SLC6A3

Tabela 1 - Relação dos oligonucleotídeos (*primers*) utilizados para a análise dos polimorfismos

POLIMORFISMOS	PRIMERS
<i>TaqI</i> A do <i>DRD2</i>	Direto (<i>Forward</i>) CCGTCGACGGCTGGCCAAGTTGTCTA Reverso (<i>Reverse</i>) CCGTCGACCCTTCCTGAGTGTCATCA
Ser9Gly do <i>DRD3</i>	<i>Forward</i> GCTCTATCTCCAACCTCTCACA <i>Reverse</i> AAGTCTACTCACCTCCAGGTA
<i>VNTR</i> do <i>SLC6A3</i>	<i>Forward</i> TGTGGTGTAGGGAACGGCCTGAG <i>Reverse</i> CTTCCTGGAGGTCACGGCTCAAGG
A1343G do <i>SLC6A3</i>	<i>Forward</i> GGTGGAAGGAACCCAACTG <i>Reverse</i> CACAGCGTGGGCTCTGTG

4.2.2.2 Confirmação das seqüências dos oligonucleotídeos utilizados nas genotipagens

Todas as seqüências dos oligonucleotídeos (*primers*) (Tabela 1) utilizadas nesta tese para as genotipagens dos polimorfismos foram obtidas em manuscritos previamente publicados, sendo que sua devida localização no gene investigado foi confirmada no *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

4.2.2.3 Genotipagens dos polimorfismos realizadas no Laboratório da Empresa *Prevention Genetics*

Os polimorfismos abaixo foram genotipados na empresa *Prevention Genetics*, como parte de investigação do PROGENE de polimorfismos de genes do sistema dopaminérgico como fatores de susceptibilidade a diversos transtornos psiquiátricos como dependência à cocaína, transtorno de déficit de atenção e hiperatividade, primeiro episódio psicótico, transtorno afetivo bipolar e esquizofrenia (www.preventiongenetics.com):

1) -141C (Ins/Del) do *DRD2* (rs1799732);

2) A/G da região 3' não codificadora do *COMT* (165599).

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

4.3.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A análise estatística dos resultados das genotipagens passou pela avaliação de duas hipóteses: uma delas é a hipótese nula (H_0) e a outra delas é a hipótese alternativa (H_1). O processo de análise envolveu a rejeição da hipótese nula, o que significaria evidência em favor da hipótese da pesquisa realizada, ou a sua confirmação. Estudos do tipo associação em genética podem seguir o padrão de análise das investigações do tipo caso-controle, analisando-se a exposição a determinado fator etiológico (no caso, os polimorfismos genéticos) e seu resultado, no caso do presente trabalho, o desenvolvimento de esquizofrenia. Assim, foi realizado estudo genético molecular com o objetivo de confirmar ou descartar a associação entre a exposição genética e o aparecimento de esquizofrenia. Para todos os testes estatísticos, o intervalo de significância adotado foi de 5%. Em virtude de ter sido realizada mais de uma testagem na presente tese, é importante pensar na correção do valor de significância de p . Um dos métodos mais utilizados para correção do valor de p nos estudos de genética de associação do tipo caso-controle é o de Bonferroni. Tal método baseia-se no fato de que se uma hipótese nula é verdadeira (por exemplo, não há diferença na distribuição alélica entre grupos de pacientes e controles), uma diferença

estatisticamente significativa será observada ao acaso em 20 testes realizados, ocorrendo um falso-positivo (erro tipo I). Na presente tese, caso fosse aplicada a correção de Bonferroni, o valor de p seria de aproximadamente 0,008. No entanto, a correção de Bonferroni tem sido considerada muito conservadora, promovendo uma diminuição da ocorrência de erro tipo I, porém aumentando proporcionalmente o erro tipo II, ou seja, resultados falso-negativos. Assim, como foi realizado um número pequeno de testagens, optou-se por não se realizar correções do valor de p nas análises.

4.3.2 ESTUDO CASO-CONTROLE

Nesse tipo de investigação, há comparação entre grupos de indivíduos com determinada doença e controles saudáveis sem a doença. Tal tipo de desenho é análogo ao estudo do tipo caso-controle na epidemiologia, sendo a “exposição” definida como a presença de um determinado alelo, genótipo ou haplótipo de um polimorfismo genético estudado. Assim, pode-se tabular e comparar as frequências alélicas, genótípicas e haplotípicas entre um grupo de “casos” e um de “controles”. Com isso, pode-se calcular não só a presença da associação entre a doença e o determinado polimorfismo, mas também a magnitude da associação por meio do cálculo da razão de chances (*odds ratio*: OR) e a sua significância com intervalos de confiança.

Em um estudo do tipo caso-controle, a análise de associação alélica e genotípica refere-se à co-ocorrência de um determinado alelo ou genótipo e uma doença acima do esperado pelo acaso. É importante ressaltar que a simples associação entre duas variáveis não necessariamente é causal. No caso específico, tal tipo de associação não-causal pode se dever a dois fatores principais, a saber, desequilíbrio de ligação (DL: *linkage disequilibrium*), também chamada “associação indireta”, e estratificação populacional. A presença de DL entre *loci* genéticos muito ligados é uma causa importante de associação não-causal entre um determinado alelo e a doença investigada. O alelo estudado pode não apresentar efeito algum

sobre o aparecimento da doença, porém estar em DL com outro que desempenha esse papel. Assim sendo, a associação alélica pode aparecer não apenas com o polimorfismo genético relacionado à etiopatogenia da doença, mas também com polimorfismos localizados na sua vizinhança (Mc Guffin *et al.*, 2002).

Outra razão de associação não-causal entre um polimorfismo e determinada doença é a presença de estratificação populacional. De maneira geral, isso significa que a população investigada é composta por diferentes subgrupos, podendo existir diferenças tanto na prevalência da doença quanto do polimorfismo investigados entre tais subgrupos. Isso geraria uma associação espúria entre a doença e o polimorfismo estudado, não existindo, na realidade, uma associação causal entre eles. Tal situação poderia criar um resultado falso-positivo. Por outro lado, resultados falso-negativos também podem ocorrer nessa situação, havendo um acobertamento de uma associação real que poderia existir. Tal fenômeno ocorreria quando a direção da associação espúria estivesse no sentido contrário da associação causal verdadeira. Neste caso, existiria a tendência para a presença de subpopulações com frequências altas de alelos não relacionados à doença investigada, o que poderia mascarar a associação que realmente existisse. Em situações mais graves, poderia ocorrer até uma inversão da associação, observando-se uma associação espúria com o alelo inverso, o que recebe o nome de “paradoxo de Simpson” (Mc Guffin *et al.*, 2002).

Na presente tese, diferenças estatísticas entre indivíduos afetados e não-afetados, no que tange à distribuição das freqüências dos alelos e genótipos dos polimorfismos que apresentam apenas dois alelos foram calculadas por meio do teste de qui-quadrado de Pearson (Siegel, 1981). Para o polimorfismo VNTR do SLC6A3, que apresenta mais de dois alelos possíveis, a análise estatística foi realizada por meio do programa estatístico CLUMP, que faz análises a partir da formação de grupos com os alelos mais raros (*clump*: grupo), com o objetivo de aumentar a chance de encontrar associações que possam existir e que estejam mascaradas pela presença dos alelos raros na análise (Sham & Curtis, 1995).

Para a comparação entre médias de idade, utilizou-se o teste t de Student. Para tais análises, foi utilizado o pacote estatístico *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 10.0.1.

4.3.3 EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG

A existência do equilíbrio de Hardy-Weinberg foi demonstrada independentemente por [Godfrey Harold Hardy](#) na [Inglaterra](#) e por [Wilhelm Weinberg](#) na [Alemanha](#), em [1908](#). Tal princípio afirma que as freqüências genotípicas de um único *locus* estarão fixas e em equilíbrio em uma população numerosa, que não está em processo evolutivo franco e após pelo menos uma geração de acasalamento aleatório. Para um polimorfismo

genético bialélico, se as frequências dos alelos “A” e “a” são respectivamente “p” e “q”, então “(p+q)=1”. As frequências esperadas para cada genótipo formado a partir desses alelos (AA, Aa e aa) são “p²”, “2pq” e “q²”, nas quais “p²+2pq+q²=1”. Assim, se as frequências dos genótipos em uma determinada população estudada não mostram diferenças estatisticamente significantes desse padrão de distribuição, diz-se que estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg podem estar relacionados a vários fatores, porém no caso do presente estudo tais desvios poderiam estar mais comumente relacionados a problemas de genotipagem e de estratificação da amostra, principalmente em decorrência de estratificação étnica. Portanto, desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg na distribuição genotípica de determinado polimorfismo podem ser considerados indicativos da presença de subestrutura na amostra (Pfaff *et al.*, 2001).

Em geral, quando uma determinada população estudada apresenta desvio no equilíbrio de Hardy-Weinberg, devido a problemas de genotipagem, espera-se observar um excesso de heterozigotos, em decorrência da dificuldade da separação das bandas dos polimorfismos quando da genotipagem. Contudo, quando o desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg ocorre em decorrência de estratificação étnica, observa-se um déficit de heterozigotos, mostrando que tal população não é devidamente homogênea.

É importante que a população estudada esteja em equilíbrio de Hardy-Weinberg, pois, caso isso não ocorra, podem-se obter resultados de associações que não expressem a realidade. Por exemplo, pode-se encontrar associação entre um determinado polimorfismo e uma doença porque existe uma estratificação populacional étnica na amostra investigada. Assim, uma maior prevalência de um alelo entre os pacientes, quando comparado aos controles, pode significar apenas que nessa amostra de pacientes existe uma subpopulação etnicamente distinta daquela encontrada nos controles, e que esse alelo é naturalmente mais prevalente nessa etnia. Assim, a associação não ocorreria por conta da participação desse alelo como fator de risco para o desenvolvimento da doença, mas sim porque sua prevalência é maior em uma etnia que está mais representada na amostra de pacientes.

Na presente tese, a análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg foi feito por meio do teste qui-quadrado de Pearson, comparando-se as frequências dos genótipos obtidas das genotipagens, e as frequências genótipos esperadas obtidas pelo princípio do equilíbrio de Hardy-Weinberg. O cálculo do equilíbrio de Hardy-Weinberg para todos os polimorfismos foi realizado por meio do *HWE Program* (Ott, 1999).

4.3.4 DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO (DL)

Mesmo que dois *loci* ligados possam estar em equilíbrio de Hardy-Weinberg, alelos em cada um deles podem estar associados de forma não aleatória com alelos do outro *locus*, ou seja, podem estar sendo transmitidos juntos com uma frequência diferente daquela esperada quando eles são submetidos ao princípio da segregação independente. Alelos que estão extremamente ligados entre si, localizados em um mesmo cromossomo, tendem a não ser separados durante a meiose, aumentando a chance da ocorrência de gametas com frequências diferentes daquelas esperadas sob segregação independente. Tal fenômeno acontece devido à redução na frequência de recombinação na região entre os *locus*. Assim, quando dois marcadores genéticos são transmitidos juntos com uma frequência diferente da esperada sob segregação independente (não-aleatória), diz-se que os marcadores estão em DL.

De maneira geral, conforme maior a distância espacial entre dois alelos em um cromossomo, menor o nível de DL, sendo que a probabilidade de ocorrência de maiores valores de DL é maior com distâncias menores de 50 Kb entre eles, e em contrapartida a probabilidade de menores valores aparece com distâncias superiores a 500 Kb (Mc Guffin *et al.*, 2002). Polimorfismos localizados em *loci* distantes, normalmente independentes, podem se apresentar “ligados” após um recente processo de miscigenação entre duas ou mais populações. Apenas após várias gerações de cruzamentos aleatórios entre as populações é que polimorfismos

previamente ligados se aproximarão do equilíbrio de Hardy-Weinberg, deixando apenas *loci* bem próximos em DL (Sham, 1997).

A estimativa de D' é considerada uma boa medida de recombinação gênica. Porém, D' pode ser bastante instável na presença de frequências alélicas e tamanho amostral reduzidos (Pritchard, 2001).

Na presente tese, a análise de DL foi realizada por meio do programa *Genecounting* (<http://www.smd.qmul.ac.uk/statgen/dcurtis/software.html>).

4.3.5 ANÁLISE DE HAPLÓTIPOS

A análise de polimorfismos que estão ligados entre si, apresentando alta taxa de DL, merece atenção especial, pois é possível que a doença investigada esteja associada com o haplótipo (que é uma seqüência de alelos de um ou mais *loci* adjacentes na mesma região cromossômica). Análise de haplótipos pode ser mais informativa que a análise de um único polimorfismo. Assim, se mais de um polimorfismo que confere susceptibilidade a uma determinada doença estiver presente em um mesmo gene, a análise de haplótipo permitirá que se faça a medida do efeito combinado dos mesmos (Epstein & Satten, 2003).

A análise da distribuição da frequência de haplótipos foi realizada por meio do programa *Genecounting*.

4.3.6 PODER DA AMOSTRA

O poder de uma determinada amostra em estudos de genética está relacionado à sua capacidade de encontrar associações que porventura possam existir entre os polimorfismos e o fenótipo estudados. Para o cálculo do poder estatístico de uma amostra para estudos do tipo caso-controle, geralmente realizam-se suposições sobre as condições que se espera encontrar no experimento. O cálculo do poder estatístico da amostra desta tese foi realizado utilizando-se o Programa CaTS (*Center for Statistical Genetics – The University of Michigan*) (<http://www.sph.umich.edu/csg/abecasis/CaTS/index.html>).

4.3.7 ANÁLISE DE VARIÁVEIS

Em caso da existência de potenciais variáveis que possam explicar o desenvolvimento do transtorno que se está estudando, como gênero, por exemplo, métodos estatísticos padrão devem ser utilizados para investigá-las, como análise estratificada ou análise de regressão.

No caso da presente tese, utilizaram-se análise estratificada e regressão logística para a investigação de gênero e subtipo de esquizofrenia.

A regressão logística tem como objetivo descrever a relação entre um resultado (variável dependente) e um conjunto simultâneo de variáveis explicativas (preditoras ou independentes), que seja biologicamente plausível. Na análise estratificada tem-se o mesmo propósito, mas as relações são efetuadas uma a uma, isto é, somente é possível obter a estimativa do risco para um único fator de cada vez, controlando-se o conjunto das demais variáveis. Podem ser citadas como vantagens da análise estratificada, a sua relativa simplicidade de execução, a facilidade de entendimento e a maior proximidade que propicia entre o pesquisador e os dados. Entretanto, ao se aplicar essa técnica, o grau de dificuldade aumenta na medida em que aumenta o número de variáveis que tiverem que ser consideradas como controle. Os testes de homogeneidade entre os estratos, para se verificar a existência de interação entre as variáveis, são feitos em etapa à parte. Além disso, variáveis quantitativas não podem ser usadas em sua escala original, e o nível global de significância é difícil de ser controlado (Dean *et al.*, 1990).

No caso da presente tese, os cálculos de análise estratificada, bem como de regressão logística foram realizadas por meio do pacote estatístico SPSS versão 10.0.1.

RESULTADOS

5.1 DADOS DEMOGRÁFICOS

5.1.1 GÊNERO

Comparando-se a frequência de indivíduos do gênero feminino e masculino entre os grupos de pacientes e controles, pelo teste qui-quadrado de Pearson, não se observou diferença estatisticamente significativa [86 (35,1%) mulheres, 159 (64,9%) homens de 245 pacientes versus 314 (37,65%) mulheres, 520 (62,35%) homens de 834 controles, $\chi^2=0,53$; $p=0,46$].

5.1.2 IDADE

Comparando-se as médias de idade entre os grupos de pacientes e controles, por meio do teste t de Student, não se observou diferença estatisticamente significativa (245 pacientes com idade média de 27,9 anos $\pm$ 7,9, variando entre 19 e 64 anos, com mediana de 26 anos versus 834 controles com idade média de 32,5 anos $\pm$ 9,5, variando entre 18 e 79 anos, com mediana de 31 anos, $p=0,12$).

5.2 SUBTIPOS DE ESQUIZOFRENIA (DSM-IV)

A classificação dos 245 pacientes em subtipo de esquizofrenia, de acordo com critérios diagnósticos do DSM-IV, mostrou os seguintes resultados: esquizofrenia paranóide: 169 (68,98%); esquizofrenia desorganizada: 53 (21,63%); esquizofrenia catatônica: 2 (0,82%); esquizofrenia indiferenciada: 3 (1,22%); esquizofrenia residual: 18 (7,35%).

5.3 CÁLCULO DO PODER DA AMOSTRA

Para um estudo com nível de significância de 0,05, prevalência do transtorno investigado de 1%, frequência do alelo de risco de 30%, efeito de uma vez e meia maior para o alelo de risco na susceptibilidade para desenvolver o transtorno ($OR=1,5$), seriam necessários 200 pacientes e 400 controles para obter-se um poder amostral de 80%. Alterando-se apenas o número de pacientes e de controles para 245 834, respectivamente, que é o número de indivíduos que temos para o presente estudo, o poder da amostra é de 91%.

5.4 EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG

A análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg foi feito por meio do teste qui-quadrado de Pearson, tanto nos grupos de casos como no de controles para todos os polimorfismos investigados. Tal análise foi realizada comparando-se as freqüências dos genótipos encontradas e as freqüências genotípicas esperadas obtidas pelo princípio do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Tanto no grupo de pacientes como no grupo de controles, as freqüências dos genótipos estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg, não havendo diferença estatisticamente significativa entre as freqüências encontradas e as esperadas. Os resultados destas análises encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 - Valores de p para as análises do equilíbrio de Hardy-Weinberg nos grupos de casos e controles

Polimorfismo	Casos	Controles
<i>TaqI</i> A <i>DRD2</i> (rs1800497)	$p=0,62$	$p=0,79$
-141C Ins/Del <i>DRD2</i> (rs1799732)	$p=0,28$	$p=0,19$
Se9Gly <i>DRD3</i> (rs6280)	$p=0,30$	$p=0,06$
<i>VNTR</i> SLC6A3	$p=0,99$	$p=0,99$
A1343G SLC6A3 (rs6347)	$p=0,28$	$p=0,69$
A/G <i>COMT</i> (rs165599)	$p=0,94$	$p=0,43$

5.5 DISTRIBUIÇÃO ALÉLICA E GENOTÍPICA DOS POLIMORFISMOS ESTUDADOS

As tabelas que se seguem (das Tabelas 3 a 30) apresentam os resultados das seguintes análises: distribuições alélicas e genotípicas dos polimorfismos estudados, estratificação baseada em gênero, homozigosidade e em diagnóstico do subtipo de esquizofrenia. Os cinco grupos de subtipos de esquizofrenia, apenas dois deles representavam uma quantidade significativa de indivíduos - esquizofrenia paranóide: 169 (68,98%), e esquizofrenia desorganizada: 53 (21,63%), perfazendo um total de 90,61% dos pacientes. Desse modo, optou-se por utilizar nas análises apenas esses dois grupos de pacientes, com o objetivo de não se perder poder estatístico com a investigação em muitos grupos com poucos indivíduos em cada um deles.

Não foram realizadas as genotipagens de todos os indivíduos para alguns polimorfismos, em decorrência de falhas nas reações, tanto em nosso laboratório, quanto no laboratório da empresa *Prevention Genetics*.

5.5.1 - POLIMORFISMO *TaqI* A DO *DRD2*

A análise do polimorfismo *TaqI* A do *DRD2* não mostrou associação entre seus genótipos e alelos com esquizofrenia na amostra estudada. No entanto, observou-se uma tendência à associação alélica com o transtorno ($\chi^2=3,49$, 1 d.f., $p=0,06$, $OR=1,22$ - $0,98<OR<1,52$) (Tabela 3). A análise estratificada para gênero e diagnóstico de subtipo de esquizofrenia também não mostrou associação (Tabelas 4, 5 e 6). Quando foi conduzida análise de regressão logística, gênero e diagnóstico do subtipo de esquizofrenia não foram associados com esquizofrenia (Tabela 7). A investigação de homozigosidade também não resultou em resultado positivo no presente estudo (Tabela 8).

Tabela 3 - Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo *TaqI* A do gene do receptor de dopamina subtipo D2 (*DRD2*) entre os grupos casos e controles

Polimorfismo	Casos (%)	Controles (%)	χ^2	d.f.	P
GENÓTIPOS					
A1/A1	29 (12,35)	138 (16,55)	3,59	2	0,16
A1/A2	112 (47,65)	407 (48,8)			
A2/A2	94 (40,00)	289 (34,65)			
Total	235 (100)	834 (100)			
ALELOS					
A1	170 (36,17)	683 (40,95)	3,49	1	0,06
A2	300 (63,82)	985 (59,05)			
Total	470 (100)	1668 (100)			

p =valor aceito para descartar estatisticamente a hipótese nula; d.f.=degree of freedom (grau de liberdade); χ^2 =qui-quadrado

Tabela 4 - Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo *TaqI* A do gene do receptor de dopamina subtipo D2 (*DRD2*) entre os grupos casos e controles classificados por gênero

Masculino					
Polimorfismo	Casos (%)	Controles (%)	χ^2	d.f.	p
GENÓTIPOS					
A1/A1	19 (12,42)	86 (16,54)	2,3	2	0,32
A1/A2	73 (47,71)	254 (48,85)			
A2/A2	61 (39,87)	180 (36,16)			
Total	153 (100)	520 (100)			
ALELOS					
A1	111 (36,27)	426 (40,96)	2,17	1	0,14
A2	195 (63,73)	614 (59,04)			
Total	306 (100)	1040 (100)			
Feminino					
Polimorfismo	Casos (%)	Controles (%)	χ^2	d.f.	p
GENÓTIPOS					
A1/A1	10 (12,2)	52 (16,56)	1,36	2	0,5
A1/A2	39 (47,56)	153 (48,73)			
A2/A2	33 (40,24)	109 (34,71)			
Total	82 (100)	314 (100)			
ALELOS					
A1	59 (35,98)	257 (40,92)	1,33	1	0,24
A2	105 (64,02)	371 (59,08)			
Total	164 (100)	628 (100)			

p=valor aceito para descartar estatisticamente a hipótese nula; *d.f.*=*degree of freedom* (grau de liberdade); χ^2 =qui-quadrado

Tabela 5 - Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo *TaqI* A do gene do receptor de dopamina subtipo D2 (*DRD2*), de acordo com o subtipo da esquizofrenia (subtipo paranóide)

Polimorfismo	Casos (%)	Controles (%)	χ^2	d.f.	P
GENÓTIPOS					
A1/A1	21 (12,96)	138 (16,55)	2,04	2	0,36
A1/A2	77 (47,53)	407 (48,8)			
A2/A2	64 (39,51)	289 (34,65)			
Total	162 (100)	834 (100)			
ALELOS					
A1	119 (36,73)	683 (40,95)	2,01	1	0,15
A2	205 (63,27)	985 (59,05)			
Total	324 (100)	1668 (100)			

p=valor aceito para descartar estatisticamente a hipótese nula; *d.f.*=*degree of freedom* (grau de liberdade); χ^2 =qui-quadrado

Tabela 6 - Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo *TaqI* A do gene do receptor de dopamina subtipo D2 (*DRD2*), de acordo com o subtipo da esquizofrenia (subtipo desorganizado)

Polimorfismo	Casos (%)	Controles (%)	χ^2	d.f.	P
GENÓTIPOS					
A1/A1	7 (14,0)	138 (16,55)	0,23	2	0,89
A1/A2	25 (50,0)	407 (48,8)			
A2/A2	18 (36)	289 (34,65)			
Total	50 (100)	834 (100)			
ALELOS					
A1	39 (39,0)	683 (40,95)	0,15	1	0,7
A2	61 (61,0)	985 (59,05)			
Total	100 (100)	1668 (100)			

p=valor aceito para descartar estatisticamente a hipótese nula; *d.f.*=*degree of freedom* (grau de liberdade); χ^2 =qui-quadrado

Tabela 7 - Análise com regressão logística não condicional para as variáveis independentes de gênero e subtipo de esquizofrenia (análise simultânea)

Variáveis	Odds Ratio	Intervalo com 95% de confiança
Gênero	1,19	0,79-1,75
Subtipo de esquizofrenia	1,05	0,85-1-29

Tabela 8 - Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo *TaqI* A do gene do receptor de dopamina subtipo D2 (*DRD2*) para investigação de homozigossidade

Polimorfismo	Casos (%)	Controles (%)	χ^2	d.f.	P
GENÓTIPOS					
A1/A1+A2/A2	123 (52,34)	427 (51,2)	0,10	1	0,75
A1/A2	112 (47,66)	407 (48,8)			
Total	235 (100)	834 (100)			

p=valor aceito para descartar estatisticamente a hipótese nula; *d.f.*=*degree of freedom* (grau de liberdade); χ^2 =qui-quadrado

5.5.2- POLIMORFISMO -141C (INS/DEL) DO *DRD2*

A análise do polimorfismo -141C (Ins/Del) do *DRD2* mostrou associação entre seus genótipos ($\chi^2=12,74$, 2d.f., $p=0,001$) e alelos ($\chi^2=9,78$, 1d.f., $p=0,001$, $OR=1,64$ - $1,19<OR<2,28$) com esquizofrenia na amostra estudada (Tabelas 9 e 10). Mesmo quando a diferença estatisticamente significativa desaparece com a análise estratificada para gênero e diagnóstico de subtipo de esquizofrenia, observa-se que as proporções de diferenças mantêm-se entre os grupos de casos e controles. Assim, percebe-se que a diferença estatística desaparece em decorrência da diminuição da amostra analisada (Tabelas 11, 12 e 13). Quando foi conduzida a análise de regressão logística, gênero e diagnóstico do subtipo de esquizofrenia não foram associados com esquizofrenia (Tabela 14). A investigação de homozigosidade também não resultou em resultado positivo no presente estudo (Tabela 15).

Tabela 9 - Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo -141C (Ins/Del) do gene do receptor de dopamina subtipo D2 (*DRD2*) entre os grupos casos e controles

Polimorfismo	Casos (%)	Controles (%)	χ^2	d.f.	P
GENÓTIPOS					
Ins/Ins	183 (79,91)	498 (67,94)	12,74	2	0,001
Ins/Del	38 (16,59)	206 (28,10)			
Del/Del	8 (3,49)	29 (3,96)			
Total	229 (100)	733 (100)			
ALELOS					
Ins	404 (88,21)	1202 (81,99)	9,78	1	0,001
Del	54 (11,79)	264 (18,01)			
Total	458 (100)	1466 (100)			

p =valor aceito para descartar estatisticamente a hipótese nula; d.f.=degree of freedom (grau de liberdade); χ^2 =qui-quadrado

Tabela 10 - Investigação de razão de chances (OR) para o genótipo de risco do polimorfismo -141C (Ins/Del) do gene do receptor de dopamina subtipo D2 (*DRD2*) entre os grupos casos e controles

	Casos (%)	Controles (%)	χ^2	d.f.	p	OR (I.C.)
Ins/Ins	183(79,91)	498 (67,94)	12,10	1	0,0005	1,88 (1,29- 2,73)
Ins/Del+Ins/Ins	46 (20,09)	235 (32,06)				
Total	229 (100)	733 (100)				

p=valor aceito para descartar estatisticamente a hipótese nula; *d.f.*=*degree of freedom* (grau de liberdade); χ^2 =qui-quadrado; OR=*odds ratio* (razão de chances); I.C.=intervalo de confiança

Tabela 11 - Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo -141C (Ins/Del) do gene do receptor de dopamina subtipo D2 (*DRD2*) entre os grupos casos e controles classificados por gênero

Masculino					
Polimorfismo	Casos (%)	Controles (%)	χ^2	d.f.	p
GENÓTIPOS					
Ins/Ins	117 (79,06)	329 (66,33)	8,67	2	0,01
Ins/Del	27 (18,24)	146 (29,44)			
Del/Del	4 (2,7)	21 (4,23)			
Total	148 (100)	496 (100)			
ALELOS					
Ins	261 (88,18)	804 (81,05)	8,09	1	0,004
Del	35 (11,82)	188 (18,95)			
Total	296 (100)	992 (100)			
Feminino					
Polimorfismo	Casos (%)	Controles (%)	χ^2	d.f.	p
GENÓTIPOS					
Ins/Ins	66 (81,48)	169 (71,31)	4,96	2	0,08
Ins/Del	11 (13,58)	60 (25,32)			
Del/Del	4 (4,94)	8 (3,37)			
Total	81 (100)	237 (100)			
ALELOS					
Ins	143 (88,27)	398 (83,94)	1,76	1	0,18
Del	19 (11,73)	76 (16,03)			
Total	162 (100)	474 (100)			

p=valor aceito para descartar estatisticamente a hipótese nula; *d.f.*=degree of freedom (grau de liberdade); χ^2 =qui-quadrado

Tabela 12 - Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo -141C (Ins/Del) do gene do receptor de dopamina subtipo D2 (*DRD2*), de acordo com o subtipo da esquizofrenia (subtipo paranóide)

Polimorfismo	Casos (%)	Controles (%)	χ^2	d.f.	P
GENÓTIPOS					
Ins/Ins	123 (78,35)	498 (67,94)	7,2	2	0,02
Ins/Del	28 (17,83)	206 (28,10)			
Del/Del	6 (3,82)	29 (3,96)			
Total	157 (100)	733 (100)			
ALELOS					
Ins	274 (87,26)	1202 (81,99)	5,07	1	0,02
Del	40 (12,74)	264 (18,01)			
Total	314 (100)	1466 (100)			

p=valor aceito para descartar estatisticamente a hipótese nula; *d.f.*=*degree of freedom* (grau de liberdade); χ^2 =qui-quadrado

Tabela 13 - Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo -141C (Ins/Del) do gene do receptor de dopamina subtipo D2 (*DRD2*), de acordo com o subtipo da esquizofrenia (subtipo desorganizado)

Polimorfismo	Casos (%)	Controles (%)	χ^2	d.f.	P
GENÓTIPOS					
Ins/Ins	37 (75,51)	498 (67,94)			
Ins/Del	10 (20,41)	206 (28,10)	1,37	2	0,5
Del/Del	2 (4,08)	29 (3,96)			
Total	49 (100)	733 (100)			
ALELOS					
Ins	84 (85,71)	1202 (81,99)			
Del	14 (14,29)	264 (18,01)	0,87	1	0,35
Total	98 (100)	1466 (100)			

p=valor aceito para descartar estatisticamente a hipótese nula; *d.f.*=*degree of freedom* (grau de liberdade); χ^2 =qui-quadrado

Tabela 14 - Análise com regressão logística não condicional para as variáveis independentes de gênero e subtipo de esquizofrenia (análise simultânea)

Variáveis	Odds Ratio	Intervalo com 95% de confiança
Gênero	1,11	0,81-1,52
Subtipo de esquizofrenia	1,10	0,86-1,31

Tabela 15 - Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo -141C (Ins/Del) do receptor de dopamina subtipo D2 (*DRD2*) para investigação de homozigosidade

Polimorfismo	Casos (%)	Controles (%)	χ^2	<i>d.f.</i>	<i>P</i>
GENÓTIPOS					
Ins/Ins+Del/Del	191 (83,41)	527 (71,9)	12,21	1	0,0004
Ins/Del	38 (16,59)	206 (28,1)			
Total	229 (100)	733 (100)			

p=valor aceito para descartar estatisticamente a hipótese nula; *d.f.*=*degree of freedom* (grau de liberdade); χ^2 =qui-quadrado

5.5.3 - POLIMORFISMO SER9GLY DO *DRD3*

A análise do polimorfismo Ser9Gly do *DRD3* não mostrou associação entre seus genótipos e alelos com esquizofrenia na amostra estudada (Tabela 16). A análise estratificada para gênero e diagnóstico de subtipo de esquizofrenia também não mostrou associação (Tabelas 17, 18 e 19). Quando foi conduzida análise de regressão logística, gênero e diagnóstico do subtipo de esquizofrenia não foram associados com esquizofrenia (Tabela 20). A investigação de homozigossidade também não resultou em resultado positivo no presente estudo (Tabela 21).

Tabela 16 - Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo Ser9Gly do gene do receptor de dopamina subtipo D3 (*DRD3*) entre os grupos de casos e controles

Polimorfismo	Casos (%)	Controles (%)	χ^2	d.f.	p
GENÓTIPOS					
Ser/Ser	80 (32,66)	278 (33,33)	0,06	2	0,97
Ser/Gly	113 (46,12)	384 (46,05)			
Gly/Gly	52 (21,22)	172 (20,62)			
Total	245 (100)	834 (100)			
ALELOS					
Ser	273 (55,71)	940 (56,35)	0,06	1	0,80
Gly	217 (44,29)	728 (43,65)			
Total	490 (100)	1668 (100)			

p=valor aceito para descartar estatisticamente a hipótese nula; d.f.=degree of freedom (grau de liberdade); χ^2 =qui-quadrado

Tabela 17 - Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo Ser9Gly do receptor de dopamina subtipo D3 (*DRD3*) entre os grupos de casos e controles classificados por gênero

Masculino					
Polimorfismo	Casos (%)	Controles (%)	χ^2	d.f.	p
GENÓTIPOS					
Ser/Ser	52 (32,7)	174 (33,46)	0,06	2	0,97
Ser/Gly	73 (45,91)	239 (45,96)			
Gly/Gly	34 (21,39)	107 (20,58)			
Total	159 (100)	520 (100)			
ALELOS					
Ser	177 (55,66)	587 (56,44)	0,06	1	0,80
Gly	141 (44,34)	453 (43,56)			
Total	318 (100)	1040 (100)			
Feminino					
Polimorfismo	Casos (%)	Controles (%)	χ^2	d.f.	p
GENÓTIPOS					
Ser/Ser	28 (32,56)	104 (33,12)	0,01	2	0,99
Ser/Gly	40 (46,51)	145 (46,18)			
Gly/Gly	18 (20,93)	65 (20,7)			
Total	86 (100)	314 (100)			
ALELOS					
Ser	96 (55,81)	353 (56,21)	0,01	1	0,92
Gly	76 (44,19)	275 (43,79)			
Total	172 (100)	628 (100)			

p=valor aceito para descartar estatisticamente a hipótese nula; *d.f.*=degree of freedom (grau de liberdade); χ^2 =qui-quadrado

Tabela 18 - Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo Ser9Gly do receptor de dopamina subtipo D3 (*DRD3*), de acordo com o subtipo da esquizofrenia (subtipo paranóide)

Polimorfismo	Casos (%)	Controles (%)	χ^2	d.f.	p
GENÓTIPOS					
Ser/Ser	57 (33,73)	278 (33,33)	0,01	2	0,99
Ser/Gly	77 (45,56)	384 (46,05)			
Gly/Gly	35 (20,71)	172 (20,62)			
Total	169 (100)	834 (100)			
ALELOS					
Ser	191 (56,51)	940 (56,35)	0,00	1	0,95
Gly	147 (43,49)	728 (43,65)			
Total	338 (100)	1668 (100)			

p=valor aceito para descartar estatisticamente a hipótese nula; *d.f.*=*degree of freedom* (grau de liberdade); χ^2 =qui-quadrado

Tabela 19 - Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo Ser9Gly do receptor de dopamina subtipo D3 (*DRD3*), de acordo com o subtipo da esquizofrenia (subtipo desorganizado)

Polimorfismo	Casos (%)	Controles (%)	χ^2	d.f.	p
GENÓTIPOS					
Ser/Ser	16 (30,19)	278 (33,33)	0,52	2	0,77
Ser/Gly	24 (45,28)	384 (46,05)			
Gly/Gly	13 (24,53)	172 (20,62)			
Total	53 (100)	834 (100)			
ALELOS					
Ser	56 (52,83)	940 (56,35)	0,5	1	0,47
Gly	50 (47,17)	728 (43,65)			
Total	106 (100)	1668 (100)			

p=valor aceito para descartar estatisticamente a hipótese nula; *d.f.*=*degree of freedom* (grau de liberdade); χ^2 =qui-quadrado

Tabela 20 - Análise com regressão logística não condicional para as variáveis independentes de gênero e subtipo de esquizofrenia (análise simultânea)

Variáveis	Odds Ratio	Intervalo com 95% de confiança
Gênero	1,13	0,85-1,61
Subtipo de esquizofrenia	1,08	0,87-1,34

Tabela 21 - Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo Ser9Gly do *DRD3* para investigação de homozigosidade

Polimorfismo	Casos (%)	Controles (%)	χ^2	d.f.	p
TaqI A					
GENÓTIPOS					
Ins/Ins+Del/Del	132 (53,88)	450 (53,96)	0,0	1	0,98
Ins/Del	113 (46,12)	384 (46,04)			
Total	245 (100)	834 (100)			

p=valor aceito para descartar estatisticamente a hipótese nula; *d.f.*=*degree of freedom* (grau de liberdade); χ^2 =qui-quadrado

5.5.4 POLIMORFISMO VNTR DA REGIÃO 3'UTR DO SLC6A3

No que diz respeito ao polimorfismo VNTR do SLC6A3, que apresenta mais de dois alelos possíveis, a análise estatística foi realizada por meio do programa estatístico CLUMP, que faz análises a partir da formação de grupos com os alelos mais raros, com o objetivo de aumentar a chance de encontrar associações que possam existir e que estejam mascaradas pela presença dos alelos raros na análise. No entanto, a análise do polimorfismo VNTR do SLC6A3 não mostrou associação entre seus genótipos e alelos com esquizofrenia na amostra estudada (Tabela 22). A análise estratificada para gênero e diagnóstico de subtipo de esquizofrenia também não mostrou associação (Tabelas 23, 24 e 25). Quando foi conduzida análise de regressão logística, gênero e diagnóstico do subtipo de esquizofrenia não foram associados com esquizofrenia (Tabela 26). A investigação de homozigosidade também não resultou em resultado positivo no presente estudo (Tabela 27).

5.5.4.1 Comparações entre casos e controles (VNTR do SLC6A3)

A análise de associação genotípica global não demonstrou associação do polimorfismo VNTR do SLC6A3 e esquizofrenia ($\chi^2=6,70$; 10d.f.; $p=0,75$) (Tabela 22). Quando foi realizada análise mediante agrupamento dos genótipos em três colunas, tentando-se diminuir o viés da presença dos genótipos menos freqüentes, também não se observou associação entre o polimorfismo investigado e esquizofrenia ($\chi^2=0,10$; 2d.f.; $p=0,94$). Quando realizada a análise da frequência do genótipo mais comum entre o grupo de casos (genótipo de risco) contra os demais, também não se encontrou associação ($\chi^2=0,08$; 1d.f.; $p=0,77$).

Quanto à análise alélica, também não houve associação quando realizada análise de associação global dos alelos com o transtorno ($\chi^2=3,96$; 6d.f.; $p=0,68$) (Tabela 22). A análise alélica realizada mediante o agrupamento dos grupos casos e controles baseados em três colunas também não mostrou resultado positivo ($\chi^2=0,97$; 2d.f.; $p=0,62$). A estratégia de analisar o alelo de risco contra os demais também não encontrou associação ($\chi^2=0,56$; 1d.f.; $p=0,45$).

Tabela 22 - Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo VNTR do gene da proteína transportadora de dopamina (SLC6A3) entre os grupos casos e controles

Polimorfismo	Casos (%)	Controles (%)	χ^2	d.f.	P
GENÓTIPOS					
11 10	6 (2,45)	9 (1,08)	6,70	10	0,75
11 9	1 (0,41)	8 (0,96)			
10 10	122 (49,80)	420 (50,55)			
10 9	93 (37,95)	307 (36,95)			
10 8	1 (0,41)	6 (0,72)			
10 7	—	4 (0,48)			
10 5	1 (0,41)	2 (0,24)			
10 4	2 (0,82)	3 (0,36)			
9 9	18 (7,34)	64 (7,70)			
9 8	1 (0,41)	6 (0,72)			
9 7	—	2 (0,24)			
Total	245 (100)	831 (100)			
ALELOS					
11	7 (1,43)	17 (1,02)	3,96	6	0,68
10	347 (70,82)	1171 (70,46)			
9	131 (26,73)	451 (27,14)			
8	2 (0,41)	12 (0,72)			
7	—	6 (0,36)			
5	1 (0,20)	2 (0,12)			
4	2 (0,41)	3 (0,18)			
Total	490 (100)	1662 (100)			

p=valor aceito para descartar estatisticamente a hipótese nula; *d.f.*=*degree of freedom* (grau de liberdade); χ^2 =qui-quadrado

5.5.4.2 Comparação por gênero masculino entre casos e controles (VNTR do SLC6A3)

Quando realizada comparação por gênero masculino entre casos e controles, a análise de associação genotípica global não demonstrou associação do polimorfismo VNTR do SLC6A3 e esquizofrenia ($\chi^2=7,88$; 10d.f.; $p=0,64$) (Tabela 23). Quando foi realizada análise mediante agrupamento dos genótipos em três colunas, tentando-se diminuir o viés da presença dos genótipos menos freqüentes, também não se observou associação entre o polimorfismo investigado e esquizofrenia ($\chi^2=0,40$; 2d.f.; $p=0,82$). Quando realizada a análise do da freqüência do genótipo mais comum entre o grupo de casos (genótipo de risco) contra os demais, também não se encontrou associação ($\chi^2=0,11$; 1d.f.; $p=0,74$).

Quanto à análise alélica por gênero masculino, também não houve associação quando realizada análise de associação global dos alelos com o transtorno ($\chi^2=6,18$; 6d.f.; $p=0,40$) (Tabela 23). A análise alélica realizada mediante o agrupamento dos grupos casos e controles baseados em três colunas também não mostrou resultado positivo ($\chi^2=0,32$; 2d.f.; $p=0,56$). A estratégia de analisar o alelo de risco contra os demais também não encontrou associação ($\chi^2=0,08$; 1d.f.; $p=0,78$).

Tabela 23 - Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo VNTR do gene da proteína transportadora de dopamina (SLC6A3) entre os grupos de casos e controles classificados por gênero

Masculino					
Polimorfismo	Casos (%)	Controles (%)	χ^2	d.f.	P
GENÓTIPOS					
11 10	4 (2,52)	6 (1,16)	7,88	10	0,64
11 9	1 (0,63)	5 (0,97)			
10 10	79 (49,69)	262 (50,58)			
10 9	60 (37,73)	192 (37,07)			
10 8	—	4 (0,77)			
10 7	—	2 (0,39)			
10 5	1 (0,63)	1 (0,19)			
10 4	2 (1,26)	1 (0,19)			
9 9	11 (6,91)	40 (7,72)			
9 8	1 (0,63)	4 (0,77)			
9 7	—	1 (0,19)			
Total	159 (100)	518 (100)			
ALELOS					
11	5 (1,57)	11 (1,06)	6,18	6	0,40
10	225 (70,76)	730 (70,46)			
9	84 (26,43)	282 (27,22)			
8	1 (0,31)	8 (0,77)			
7	—	3 (0,29)			
5	1 (0,31)	1 (0,09)			
4	2 (0,62)	1 (0,09)			
Total	318 (100)	1036 (100)			

p=valor aceito para descartar estatisticamente a hipótese nula; *d.f.*=degree of freedom (grau de liberdade); χ^2 =qui-quadrado

5.5.4.3 Comparação por gênero feminino entre casos e controles (VNTR do SLC6A3)

Quando realizada comparação por gênero feminino entre casos e controles, a análise de associação genotípica global não demonstrou associação do polimorfismo VNTR do SLC6A3 e esquizofrenia ($\chi^2=3,84$; 10d.f.; $p=0,95$) (Tabela 23 - continuação). Quando foi realizada análise mediante agrupamento dos genótipos em três colunas, tentando-se diminuir o viés da presença dos genótipos menos freqüentes, também não se observou associação entre o polimorfismo investigado e esquizofrenia ($\chi^2=0,16$; 2d.f.; $p=0,92$). Quando realizada a análise da freqüência do genótipo mais comum entre o grupo de casos (genótipo de risco) contra os demais, também não se encontrou associação ($\chi^2=0,08$; 1d.f.; $p=0,76$).

Quanto à análise alélica por gênero feminino, também não houve associação quando realizada análise de associação global dos alelos com o transtorno ($\chi^2=1,66$; 6d.f.; $p=0,95$) (Tabela 23 - continuação). A análise alélica realizada mediante o agrupamento dos grupos casos e controles baseados em três colunas também não mostrou resultado positivo ($\chi^2=0,02$; 1d.f.; $p=0,88$). A estratégia de analisar o alelo de risco contra os demais também não encontrou associação ($\chi^2=0,02$; 1d.f.; $p=0,88$).

Tabela 23 (Continuação) - Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo VNTR do gene da proteína transportadora de dopamina (SLC6A3) entre os grupos de casos e controles classificados por gênero

Feminino					
Polimorfismo	Casos (%)	Controles (%)	χ^2	d.f.	P
GENÓTIPOS					
11 10	2 (2,33)	4 (1,27)	3,84	10	0,95
11 9	—	3 (0,95)			
10 10	43 (50,0)	158 (50,32)			
10 9	33 (38,37)	115 (36,62)			
10 8	1 (1,16)	2 (0,64)			
10 7	—	2 (0,64)			
10 5	—	1 (0,32)			
10 4	—	2 (0,64)			
9 9	7 (8,14)	24 (7,64)			
9 8	—	2 (0,64)			
9 7	—	1 (0,32)			
Total	86	314			
ALELOS					
11	2 (1,16)	7 (1,11)	1,66	6	0,95
10	122 (70,93)	442 (70,38)			
9	47 (27,33)	169 (26,92)			
8	1 (0,58)	4 (0,64)			
7	—	3 (0,47)			
5	—	1 (0,16)			
4	—	2 (0,32)			
Total	172 (100)	628 (100)			

p=valor aceito para descartar estatisticamente a hipótese nula; *d.f.*=degree of freedom (grau de liberdade); χ^2 =qui-quadrado

5.5.4.4 Análises por subtipo da esquizofrenia (paranóide) entre casos e controles (VNTR do SLC6A3)

Quando realizada comparação pelo subtipo paranóide de esquizofrenia entre casos e controles, a análise de associação genotípica global não demonstrou associação do polimorfismo VNTR do SLC6A3 e esquizofrenia ($\chi^2=3,69$; 10d.f.; $p=0,92$) (Tabela 24). Quando foi realizada análise mediante agrupamento dos genótipos em três colunas, tentando-se diminuir o viés da presença dos genótipos menos freqüentes, também não se observou associação entre o polimorfismo investigado e esquizofrenia ($\chi^2=0,18$; 2d.f.; $p=0,91$). Quando realizada a análise da freqüência do genótipo mais comum entre o grupo de casos (genótipo de risco) contra os demais, também não se encontrou associação ($\chi^2=0,08$; 1d.f.; $p=0,78$).

Quanto à análise alélica pelo subtipo paranóide de esquizofrenia, também não houve associação quando realizada análise de associação global dos alelos com o transtorno ($\chi^2=1,59$; 6d.f.; $p=0,94$) (Tabela 24). A análise alélica realizada mediante o agrupamento dos grupos casos e controles baseados em três colunas também não mostrou resultado positivo ($\chi^2=0,07$; 2d.f.; $p=0,85$). A estratégia de analisar o alelo de risco contra os demais também não encontrou associação ($\chi^2=0,05$; 1d.f.; $p=0,82$).

Tabela 24 - Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo VNTR do gene da proteína transportadora de dopamina (SLC6A3), de acordo com o subtipo da esquizofrenia (subtipo paranóide)

Polimorfismo	Casos (%)	Controles (%)	χ^2	d.f.	p
GENÓTIPOS					
11 10	4 (2,37)	9 (1,08)	3,69	10	0,92
11 9	1 (0,59)	8 (0,96)			
10 10	85 (50,3)	420 (50,55)			
10 9	64 (37,87)	307 (36,95)			
10 8	1 (0,59)	6 (0,72)			
10 7	—	4 (0,48)			
10 5	—	2 (0,24)			
10 4	1 (0,59)	3 (0,36)			
9 9	13 (7,69)	64 (7,70)			
9 8	—	6 (0,72)			
9 7	—	2 (0,24)			
Total	169 (100)	831 (100)			
ALELOS					
11	5 (1,48)	17 (1,02)	1,59	6	0,94
10	240 (71)	1171 (70,46)			
9	91 (26,92)	451 (27,14)			
8	1 (0,3)	12 (0,72)			
7	—	6 (0,36)			
5	—	2 (0,12)			
4	1 (0,3)	3 (0,18)			
Total	338 (100)	1662 (100)			

p=valor aceito para descartar estatisticamente a hipótese nula; *d.f.*=*degree of freedom* (grau de liberdade); χ^2 =qui-quadrado

5.5.4.5 Análises por subtipo da esquizofrenia (desorganizado) entre casos e controles (VNTR do SLC6A3)

Quando realizada comparação pelo subtipo desorganizado de esquizofrenia entre casos e controles, a análise de associação genotípica global não demonstrou associação do polimorfismo VNTR do SLC6A3 e esquizofrenia ($\chi^2=4,02$; 10d.f.; $p=0,94$) (Tabela 25). Quando foi realizada análise mediante agrupamento dos genótipos em três colunas, tentando-se diminuir o viés da presença dos genótipos menos freqüentes, também não se observou associação entre o polimorfismo investigado e esquizofrenia ($\chi^2=0,18$; 2d.f.; $p=0,91$). Quando realizada a análise da freqüência do genótipo mais comum entre o grupo de casos (genótipo de risco) contra os demais, também não se encontrou associação ($\chi^2=0,08$; 1d.f.; $p=0,78$).

Quanto à análise alélica pelo subtipo paranóide de esquizofrenia, também não houve associação quando realizada análise de associação global dos alelos com o transtorno ($\chi^2=1,76$; 6d.f.; $p=0,95$) (Tabela 23). A análise alélica realizada mediante o agrupamento dos grupos casos e controles baseados em três colunas também não mostrou resultado positivo ($\chi^2=0,07$; 2d.f.; $p=0,85$). A estratégia de analisar o alelo de risco contra os demais também não encontrou associação ($\chi^2=0,05$; 1d.f.; $p=0,82$).

Tabela 25 - Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo VNTR do gene da proteína transportadora de dopamina (SLC6A3), de acordo com o subtipo da esquizofrenia (subtipo desorganizado)

Polimorfismo	Casos (%)	Controles (%)	χ^2	d.f.	p
GENÓTIPOS					
11 10	1 (1,89)	9 (1,08)	4.02	10	0,94
11 9	—	8 (0,96)			
10 10	26 (49,05)	420 (50,55)			
10 9	20 (37,73)	307 (36,95)			
10 8	—	6 (0,72)			
10 7	—	4 (0,48)			
10 5	1 (1,89)	2 (0,24)			
10 4	1 (1,89)	3 (0,36)			
9 9	4 (7,55)	64 (7,70)			
9 8	—	6 (0,72)			
9 7	—	2 (0,24)			
Total	53 (100)	831 (100)			
ALELOS					
11	1 (0,94)	17 (1,02)	1,76	6	0,95
10	75 (70,76)	1171 (70,46)			
9	28 (26,42)	451 (27,14)			
8	—	12 (0,72)			
7	—	6 (0,36)			
5	1 (0,94)	2 (0,12)			
4	1 (0,94)	3 (0,18)			
Total	106 (100)	1662 (100)			

p=valor aceito para descartar estatisticamente a hipótese nula; *d.f.*=*degree of freedom* (grau de liberdade); χ^2 =qui-quadrado

5.5.4.6 Análise utilizando-se modelo de regressão logística entre casos e controles (VNTR do SLC6A3)

Para a análise do gênero e do subtipo de esquizofrenia como variáveis independentes na análise de regressão logística, utilizou-se apenas os dois genótipos mais comuns do polimorfismo em questão (10-10 e 10-9, que perfazem um total de 87,75% da amostra) e os dois subtipos de esquizofrenia mais comuns (paranóide e desorganizado, que perfazem 90,61% dos pacientes).

Tabela 26 - Análise com regressão logística não condicional para as variáveis independentes de gênero e subtipo de esquizofrenia (análise simultânea)

Variáveis	<i>Odds Ratio</i>	Intervalo com 95% de confiança
Gênero	1,16	0,81-1,56
Subtipo de esquizofrenia	1,12	0,79-1,58

5.5.4.7 Análise utilizando-se avaliação de homozigidade entre casos e controles (VNTR do SLC6A3)

A investigação de homozigidade também não resultou em resultado positivo no presente estudo (Tabela 27).

Tabela 27 - Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo VNTR do gene do gene da proteína transportadora de dopamina (SLC6A3) para investigação de homozigidade

Polimorfismo	Casos (%)	Controles (%)	χ^2	d.f.	p
GENÓTIPOS					
Homozigotos	140 (57,14)	484 (58,24)	0,09	1	0,75
Heterozigotos	105 (42,86)	347 (41,76)			

p=valor aceito para descartar estatisticamente a hipótese nula; *d.f.*=*degree of freedom* (grau de liberdade); χ^2 =qui-quadrado

5.5.5 POLIMORFISMO A1343G DO SLC6A3

A análise do polimorfismo A1343G do SLC6A3 mostrou associação entre seus genótipos ($\chi^2=6,56$, 2 d.f., $p=0,03$) e alelos ($\chi^2=5,97$, 1 d.f., $p=0,01$, $OR=1,33$ - $1,05 < OR < 1,69$) com esquizofrenia na amostra estudada (Tabelas 28 e 29). Mesmo quando a diferença estatisticamente significativa desaparece com a análise estratificada para gênero e diagnóstico de subtipo de esquizofrenia, observa-se que as proporções de diferenças mantêm-se entre os grupos de casos e controles. Assim, percebe-se que a diferença estatística desaparece em decorrência da diminuição da amostra analisada (Tabelas 30, 31 e 32). Quando foi conduzida a análise de regressão logística, gênero e diagnóstico do subtipo de esquizofrenia não foram associados com esquizofrenia (Tabela 33). A investigação de homozigosidade também não resultou em resultado positivo na presente investigação (Tabela 34).

Tabela 28 - Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo A1343G do gene da proteína transportadora de dopamina (SLC6A3) entre os grupos casos e controles

Polimorfismo	Casos (%)	Controles (%)	χ^2	d.f.	p
GENÓTIPOS					
A/A	132 (56,17)	393 (47,12)	6,56	2	0,03
A/G	84 (35,74)	356 (42,69)			
G/G	19 (8,09)	85 (10,19)			
Total	235 (100)	834 (100)			
ALELOS					
A	348 (74,04)	1142 (68,47)	5,97	1	0,01
G	122 (25,96)	526 (31,53)			
Total	470 (100)	1668 (100)			

p=valor aceito para descartar estatisticamente a hipótese nula; *d.f.*=*degree of freedom* (grau de liberdade); χ^2 =qui-quadrado

Tabela 29 - Investigação de razão de chances (OR) para o genótipo de risco do polimorfismo A1343G do gene da proteína transportadora de dopamina (SLC6A3) entre os grupos casos e controles

	Casos (%)	Controles (%)	χ^2	d.f.	p	OR (I.C.)
A/A	132 (56,17)	393 (47,12)	6,49	1	0,01	1,46 (1,08-1,97)
A/G+G/G	103 (43,83)	441 (52,88)				
Total	235 (100)	834 (100)				

p=valor aceito para descartar estatisticamente a hipótese nula; *d.f.*=*degree of freedom* (grau de liberdade); χ^2 =qui-quadrado; OR=*odds ratio* (razão de chances); I.C.=intervalo de confiança

Tabela 30 - Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo A1343G do gene da proteína transportadora de dopamina (SLC6A3) entre os grupos de casos e controles classificados por gênero

Masculino					
Polimorfismo	Casos (%)	Controles (%)	χ^2	d.f.	P
GENÓTIPOS					
A/A	84 (55,26)	234 (44,96)	5,24	2	0,07
A/G	55 (36,19)	225 (43,36)			
G/G	13 (8,55)	61 (11,68)			
Total	152 (100)	520 (100)			
ALELOS					
A	223 (73,36)	693 (66,63)	4,97	1	0,02
G	81 (26,64)	347 (33,37)			
Total	304 (100)	1040 (100)			
Feminino					
Polimorfismo	Casos (%)	Controles (%)	χ^2	d.f.	p
GENÓTIPOS					
A/A	48 (57,83)	159 (50,56)	1,38	2	0,50
A/G	29 (34,94)	131 (41,64)			
G/G	6 (7,23)	24 (7,8)			
Total	83 (100)	314 (100)			
ALELOS					
A	125 (75,3)	449 (71,5)	0,98	1	0,32
G	41 (24,7)	179 (28,5)			
Total	166 (100)	628 (100)			

p=valor aceito para descartar estatisticamente a hipótese nula; *d.f.*=degree of freedom (grau de liberdade); χ^2 =qui-quadrado

Tabela 31 - Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo A1343G do gene da proteína transportadora de dopamina (SLC6A3), de acordo com o subtipo da esquizofrenia (subtipo paranóide)

Polimorfismo	Casos (%)	Controles (%)	χ^2	d.f.	p
GENÓTIPOS					
A/A	89 (54,94)	390 (46,76)	3,64	2	0,16
A/G	59 (36,42)	357 (42,81)			
G/G	14 (8,64)	87 (10,43)			
Total	162 (100)	834 (100)			
ALELOS					
A	237 (73,15)	1137 (68,17)	3,15	1	0,07
G	87 (26,85)	531 (31,83)			
Total	324 (100)	1668 (100)			

p=valor aceito para descartar estatisticamente a hipótese nula; *d.f.*=*degree of freedom* (grau de liberdade); χ^2 =qui-quadrado

Tabela 32 - Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo A1343G do gene do SLC6A3, de acordo com o subtipo da esquizofrenia (subtipo desorganizado)

Polimorfismo	Casos (%)	Controles (%)	χ^2	d.f.	p
GENÓTIPOS					
A/A	28 (54,9)	390 (46,76)	1,34	2	0,51
A/G	19 (37,25)	357 (42,81)			
G/G	4 (7,85)	87 (10,43)			
Total	51 (100)	834 (100)			
ALELOS					
A	75 (73,53)	1137 (68,17)	1,28	1	0,25
G	27 (26,47)	531 (31,83)			
Total	102 (100)	1668 (100)			

p=valor aceito para descartar estatisticamente a hipótese nula; *d.f.*=*degree of freedom* (grau de liberdade); χ^2 =qui-quadrado

Tabela 33 - Análise com regressão logística não condicional para as variáveis independentes de gênero e subtipo de esquizofrenia (análise simultânea)

Variáveis	<i>Odds Ratio</i>	Intervalo com 95% de confiança
Gênero	1,12	0,82-1,52
Subtipo de esquizofrenia	1,19	0,78-1,59

Tabela 34 - Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo A1343G do gene da proteína transportadora de dopamina (SLC6A3) para investigação de homoziguidade

Polimorfismo	Casos (%)	Controles (%)	χ^2	<i>d.f.</i>	<i>p</i>
GENÓTIPOS					
A/A+G/G	151 (64,26)	477 (57,19)	3,77	1	0,06
A/G	84 (35,74)	357 (42,81)			
Total	235 (100)	834 (100)			

p=valor aceito para descartar estatisticamente a hipótese nula; *d.f.*=*degree of freedom* (grau de liberdade); χ^2 =qui-quadrado

5.5.6 POLIMORFISMO A/G DA REGIÃO 3' UTR DO *COMT*

A análise do polimorfismo A/G da região 3'UTR do *COMT* não mostrou associação entre seus genótipos e alelos com esquizofrenia na amostra estudada (Tabela 35). A análise estratificada para gênero e diagnóstico de subtipo de esquizofrenia também não mostrou associação (Tabelas 36, 37 e 38). Quando foi conduzida análise de regressão logística, gênero e diagnóstico do subtipo de esquizofrenia não foram associados com esquizofrenia (Tabela 39). A investigação de homozigosidade também não mostrou resultado positivo no presente estudo (Tabela 40).

Tabela 35 - Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo A/G da região 3' não codificadora do gene da catecol-O-metiltransferase (*COMT*) entre os grupos de casos e controles

Polimorfismo	Casos (%)	Controles (%)	χ^2	d.f.	p
GENÓTIPOS					
A/A	73 (29,79)	257 (31)	0,22	2	0,89
A/G	122 (49,8)	400 (48,25)			
G/G	50 (20,41)	172 (20,75)			
Total	245 (100)	829 (100)			
ALELOS					
A	268 (54,69)	914 (55,13)	0,02	1	0,88
G	222 (45,31)	744 (44,87)			
Total	490 (100)	1658 (100)			

p=valor aceito para descartar estatisticamente a hipótese nula; *d.f.*=*degree of freedom* (grau de liberdade); χ^2 =qui-quadrado

Tabela 36 - Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo A/G da região 3' não codificadora do gene da catecol-O-metiltransferase (*COMT*) entre os grupos de casos e controles classificados por gênero

Masculino					
Polimorfismo	Casos (%)	Controles (%)	χ^2	d.f.	p
GENÓTIPOS					
A/A	49 (30,82)	161 (31,14)			
A/G	75 (47,17)	245 (47,39)	0,03	2	0,98
G/G	35 (22,01)	111 (21,47)			
Total	159 (100)	517 (100)			
ALELOS					
A	173 (54,4)	567 (54,84)			
G	145 (45,6)	467 (45,16)	0,02	1	0,88
Total	318 (100)	1034 (100)			
Feminino					
Polimorfismo	Casos (%)	Controles (%)	χ^2	d.f.	P
GENÓTIPOS					
A/A	24 (27,91)	96 (30,77)			
A/G	47 (54,65)	155 (49,68)	0,66	2	0,71
G/G	15 (17,44)	61 (19,55)			
Total	86 (100)	312 (100)			
ALELOS					
A	95 (55,23)	347 (55,61)			
G	77 (44,77)	277 (44,39)	0,00	1	0,95
Total	172 (100)	624 (100)			

p=valor aceito para descartar estatisticamente a hipótese nula; *d.f.*=*degree of freedom* (grau de liberdade); χ^2 =qui-quadrado

Tabela 37 - Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo A/G da região 3' não codificadora do gene da catecol-O-metiltransferase (*COMT*), de acordo com o subtipo da esquizofrenia (subtipo paranóide)

Polimorfismo	Casos (%)	Controles (%)	χ^2	d.f.	p
GENÓTIPOS					
A/A	49 (28,99)	257 (31)	0,27	2	0,87
A/G	84 (49,71)	399 (48,13)			
G/G	36 (21,3)	173 (20,87)			
Total	169 (100)	829 (100)			
ALELOS					
A	182 (53,85)	913 (55,07)	0,17	1	0,68
G	156 (46,15)	745 (44,93)			
Total	338 (100)	1658 (100)			

p=valor aceito para descartar estatisticamente a hipótese nula; *d.f.*=*degree of freedom* (grau de liberdade); χ^2 =qui-quadrado

Tabela 38 - Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo A/G da região 3' não codificadora do gene da catecol-O-metiltransferase (*COMT*), de acordo com o subtipo da esquizofrenia (subtipo desorganizado)

Polimorfismo	Casos (%)	Controles (%)	χ^2	d.f.	p
GENÓTIPOS					
A/A	15 (28,3)	257 (31)	0,2	2	0,9
A/G	27 (50,95)	399 (48,13)			
G/G	11 (20,75)	173 (20,87)			
Total	53 (100)	829 (100)			
ALELOS					
A	57 (53,77)	913 (55,07)	0,07	1	0,79
G	49 (46,23)	745 (44,93)			
Total	106 (100)	1658 (100)			

p=valor aceito para descartar estatisticamente a hipótese nula; *d.f.*=*degree of freedom* (grau de liberdade); χ^2 =qui-quadrado

Tabela 39 - Análise com regressão logística não condicional para as variáveis independentes de gênero e subtipo de esquizofrenia (análise simultânea)

Variáveis	<i>Odds Ratio</i>	Intervalo com 95% de confiança
Gênero	1,18	0,87-1,59
Subtipo de esquizofrenia	1,21	0,78-1,47

Tabela 40 - Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo A/G da região 3' não codificadora do gene da catecol-O-metiltransferase (*COMT*) para investigação de homozigidade

Polimorfismo	Casos (%)	Controles (%)	χ^2	<i>d.f.</i>	<i>p</i>
GENÓTIPOS					
AA/+G/G	123 (50,2)	430 (51,87)	0,21	1	0,64
A/G	122 (49,8)	399 (48,13)			
Total	245 (100)	829 (100)			

p=valor aceito para descartar estatisticamente a hipótese nula; *d.f.*=*degree of freedom* (grau de liberdade); χ^2 =qui-quadrado

5.6 ANÁLISE DE DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO (DL)

Os resultados das análises mostraram que os polimorfismos investigados não estão em desequilíbrio de ligação, não constituindo, portanto, blocos haplotípicos (*TaqI* A - ANKK1/-141C Ins/Del do *DRD2*: $D' = 0,39$; ; $p = 0,001$; VNTR/A1343G do SLC6A3: $D' = 0,27$; $p = 0,005$).

5.7 ANÁLISE DE HAPLÓTIPOS

A análise de haplótipo dos polimorfismos do *DRD2* não mostrou associação com esquizofrenia na amostra estudada. O melhor valor de p para o haplótipo formado pelos alelos A2-Ins dos polimorfismos *TaqI* A e ANKK1/-141C Ins/Del do *DRD2*, respectivamente, foi de $p = 0,15$, com o seguinte valor de significância global: $p = 0,24$; $\chi^2 = 8,34$, 3d.f.

Para o haplótipo formado pelos alelos 10-A dos polimorfismos VNTR e A1343G do SLC6A3, respectivamente, o melhor valor de p foi de $p = 0,43$, sendo que os resultados da significância global da análise foram os seguintes: $p = 0,63$; $\chi^2 = 5,37$; 3d.f.

DISCUSSÃO

O presente trabalho investigou quatro genes candidatos para esquizofrenia (seis polimorfismos) em uma amostra de 245 pacientes e 834 controles.

No que tange aos polimorfismos do *DRD2*, tanto o *TaqI* A quanto o -141C (Ins/Del), os resultados da literatura têm-se mostrado inconclusivos, sendo que alguns deles têm apresentado inclusive achados opostos, mostrando associação entre alelos distintos desses polimorfismos com esquizofrenia.

Em relação ao polimorfismo Ser9Gly do *DRD3*, a última meta-análise publicada não encontrou evidência de sua associação com esquizofrenia. No entanto, meta-análise anterior e vários estudos independentes publicados previamente tinham evidenciado associação entre os genótipos homozigotos (homozigosidade) de tal polimorfismo e esquizofrenia, mantendo assim o interesse na investigação esse polimorfismo como fator de risco para o desenvolvimento do transtorno.

Quando tomados em conjunto, os resultados dos estudos com o polimorfismo VNTR do *SLC6A3* parecem não dar suporte a uma possível associação com esquizofrenia, inclusive corroborados por meta-análise. Em relação ao polimorfismo A1343G do *SLC6A3*, o nosso resultado positivo é

uma contribuição inédita desta tese ao estudo da genética da susceptibilidade à esquizofrenia.

O polimorfismo A/G da região 3' não codificadora do *COMT* foi descoberto mais recentemente, porém já acumula vários trabalhos realizados na pesquisa da investigação de fatores de susceptibilidade para a esquizofrenia. Os resultados desses trabalhos, no entanto, ainda são inconclusivos, apresentando resultados positivos e negativos na mesma proporção.

A partir deste panorama geral dos trabalhos já publicados com os polimorfismos investigados nesta tese, discutiremos abaixo os resultados encontrados:

6.1 *TaqI* A-*DRD2*

O polimorfismo *TaqI* A do *DRD2* foi um dos primeiros a serem investigados como fator de risco para transtornos psiquiátricos. No entanto, de maneira interessante, durante o correr desta tese, um novo gene foi mapeado na região onde está localizado esse polimorfismo. Tal gene codifica a proteína ANKK1 (Neville *et al.*, 2004). A ANKK1 é uma proteína-quinase, que provavelmente exerce sua ação ligando-se à adenosina 5'-trifosfato (ATP), catalisando a transferência de um grupo fosfato dessa molécula para uma outra, liberando assim energia. Descobriu-se que o polimorfismo RFLP do *DRD2* (polimorfismo *TaqI* A) leva à substituição

Glu713Lys no *exon 8* do *ANKK1*. Por conta disso, pode-se assim ter uma explicação alternativa aos resultados positivos de associação encontrados entre tal polimorfismo e alguns transtornos psiquiátricos, podendo identificar na realidade o *ANKK1* como relacionado à etiopatogenia desses quadros. No entanto, devido à grande proximidade existente entre o *DRD2* e o *ANKK1*, é possível também que a região terminal do *DRD2* continue sendo de interesse para investigações dos transtornos psiquiátricos, incluindo a esquizofrenia, devido ao fato de nessa região poder existir polimorfismos que estejam em DL com outros polimorfismos que sejam na realidade fatores de risco para o transtorno (Dubertret *et al.*, 2004). Além disso, nessa região onde existe o polimorfismo *TaqI* A podem existir estruturas reguladoras da expressão do *DRD2* (Parsons, *et al.*, 2007). Assim sendo, tais possibilidades mantêm o interesse de estudos com esse polimorfismo para a investigação genético-molecular na esquizofrenia.

Os resultados do presente trabalho não encontraram associação entre tal polimorfismo e esquizofrenia na amostra estudada. No entanto, observa-se uma tendência de associação com o alelo A2. Alguns estudos têm mostrado aumento da densidade cerebral de receptores DRD2 em indivíduos portadores do alelo A1. Desse modo, acredita-se que os portadores do alelo A1 possam apresentar uma menor resposta dopaminérgica quando comparados àqueles que possuem o alelo A2. Assim, essa tendência à associação entre o alelo A2 e esquizofrenia em nossa amostra faz sentido dentro dessa perspectiva biológica de hiperativação dopaminérgica relacionada à esquizofrenia envolvendo os

receptores DRD2. Entretanto, estudo de Laakso *et al.* (2005) mostrou que, devido ao fato da existência de auto-receptores DRD2 nos neurônios dopaminérgicos, essa diminuição de sua densidade cerebral em indivíduos que apresentam o alelo A1 levaria a uma retroalimentação positiva do neurônio pré-sináptico, que por sua vez aumentaria a produção de dopamina, levando a um aumento da atividade dopaminérgica. No entanto, tal hipótese necessita ainda de confirmação.

Assim, com o fato do polimorfismo *TaqI* A do *DRD2* ter sido recentemente descrito como localizado no *ANKK1*, e não mais no *DRD2* como se pensava anteriormente, novas abordagens envolvendo estudos de haplótipos desse novo gene podem ajudar a elucidar as dúvidas acerca de seu papel como fator de risco para o desenvolvimento de esquizofrenia.

6.2 -141C Ins/Del-*DRD2*

O polimorfismo -141C (Ins/Del) é localizado na região promotora do *DRD2*. Tal polimorfismo é funcional, sendo que o alelo Del diminui em 68% a transcrição do gene (Arinami *et al.*, 1997).

Os trabalhos já realizados com tal polimorfismo têm mostrado não apenas resultados inconclusivos, porém também opostos, encontrando associação com alelos distintos em diferentes estudos. Meta-análise realizada com tal polimorfismo não encontrou associação com esquizofrenia (Glatt *et al.*, 2004).

Tais resultados opostos entre os alelos do polimorfismo estudado podem estar relacionados com diferenças nas suas frequências entre diferentes grupos étnicos, sendo que o mesmo fenômeno deve ocorrer com o polimorfismo *TaqI* A do *DRD2* (Parsons, *et al.*, 2007). Há outros exemplos na literatura de tais achados. Um exemplo disso ocorre com um polimorfismo do gene do transportador de serotonina em pacientes com transtorno afetivo bipolar. Tal polimorfismo apresenta uma diferença na inserção/deleção de 44 pb. Em amostras caucasianas européias e americanas, tem sido descrita associação do alelo “s” (*short*: curto) com transtorno afetivo bipolar. No entanto, estudos conduzidos em população brasileira (Mendes de Oliveira, 1998), espanhola (Gutierrez *et al.*, 1998) e colombiana (Ospina-Duque *et al.*, 2000) mostraram maior presença do alelo “s” entre os controles e não entre os pacientes, achado também reproduzido pelo nosso grupo (Meira-Lima *et al.*, 2005). Tal fenômeno pode ocorrer, pois os alelos do polimorfismo investigado podem estar em DL com alelos de outro polimorfismo nessa região cromossômica, sendo que este último polimorfismo pode sim estar associado ao transtorno investigado. Dessa maneira, em um determinado grupo étnico, um alelo “x” de um determinado polimorfismo estaria em DL com um alelo “y” de outro polimorfismo, ao passo que em outro grupo étnico o mesmo alelo “x” estaria em DL com um alelo “z” daquele polimorfismo do alelo “y” (Weiss *et al.*, 2001). Assim, é importante que sejam realizados trabalhos com polimorfismos que apresentam esse fenômeno, incluindo os estudados nesta tese, em amostras étnicas distintas, com o objetivo de elucidar melhor esse tipo de associação.

De qualquer maneira, a associação encontrada nesta tese entre o alelo Ins e esquizofrenia apresenta uma lógica interessante dentro da hipótese dopaminérgica da esquizofrenia. Como tal alelo deve estar relacionado com maior expressão do *DRD2*, uma maior densidade de receptores DRD2 poderia levar a uma maior resposta dopaminérgica nesses indivíduos, com subsequente aparecimento de sintomas psicóticos, que marca o quadro de esquizofrenia.

6.3 Ser9Gly-*DRD3*

Estudos com o polimorfismo Ser9Gly do *DRD3* vêm mostrando resultados interessantes. Meta-análise realizada com todos os estudos de associação conduzidos até então, realizada por Jönsson *et al.* (2003), demonstrou excesso de homozigose entre os pacientes com esquizofrenia. No entanto, no ano seguinte, o mesmo grupo refez a meta-análise, aumentando a amostra analisada para mais de 11.000 indivíduos, não encontrando mais o achado anterior (Jönsson *et al.*, 2004). Entretanto, vários estudos têm evidenciado associação entre homozigosidade do polimorfismo Ser9Gly e esquizofrenia, fato que não deve ser desconsiderado, apesar do resultado da última meta-análise publicada.

A homozigosidade é um fenômeno que também vem sendo associado a outras doenças, como a artrite reumatóide e a psoríase. Uma explicação para tal achado é que a presença de duas formas moleculares de um

determinado receptor neuroquímico em um indivíduo poderia resultar em um aumento na sua capacidade de resposta adaptativa a variações ambientais ocorridas durante o seu neurodesenvolvimento, ou mesmo durante sua vida adulta (Crocq *et al.*, 1992). A homozigosidade também tem sido observada preferencialmente em pacientes do sexo masculino, o que reforça a idéia da existência de fatores de susceptibilidade que são mais importantes para um gênero quando comparado ao outro (Lewis *et al.*, 1992). Na esquizofrenia, uma explicação para essa possível diferença relacionada ao sexo seria a de que os estrógenos apresentam uma ação antidopaminérgica, sendo que isso poderia retardar ou até mesmo prevenir o aparecimento do transtorno em mulheres (Mant *et al.*, 1994).

No presente estudo, não houve diferença na distribuição alélica ou genotípica entre as populações de casos e controles para o polimorfismo Ser9Gly do *DRD3*. Investigou-se também possível associação entre homozigosidade de tal polimorfismo e esquizofrenia. No entanto, também não foi encontrada essa associação na presente amostra.

Porém, por conta dos achados que vêm sendo publicados com esse polimorfismo e esquizofrenia, e pelo fato dos receptores *DRD3* que apresentam o aminoácido glicina (Gly) poderem apresentar maior afinidade à dopamina (Lundstrom & Turpin, 1996), tal polimorfismo ainda continua sendo de interesse para investigações genéticas em esquizofrenia.

6.4 VNTR-SLC6A3

Polimorfismos genéticos responsáveis por codificar variantes da DAT1 com maior ou menor atividade na sua ação apresentam interesse para a investigação como fatores de risco para a esquizofrenia. O mecanismo que explicaria uma possível associação entre um determinado fenótipo e um polimorfismo localizado dentro da região 3' UTR de um gene, como é o caso do VNTR do SLC6A3, ainda não é bem compreendido. Alguns estudos têm proposto que essa região possa estar envolvida na regulação da eficiência da transcrição do gene, na estabilidade ou na localização intracelular do mRNA (Mignone *et al.*, 2002; Asherson *et al.*, 2004), embora localizada no final oposto das seqüências promotoras do gene. Os polimorfismos VNTR localizados na região 3'UTR podem controlar especificamente a exportação nuclear do mRNA, sua poliadenilação e sua taxa de degradação (Conne *et al.*, 2000). A região 3'UTR pode, então, ser vista como uma região regulatória, sendo essencial para a expressão apropriada de muitos genes. No entanto, em estudo conduzido por Mill *et al.* (2005), não foi observado efeito do polimorfismo VNTR da região 3' UTR do SLC6A3 sobre a expressão gênica.

Os resultados da investigação com o polimorfismo VNTR do SLC6A3 nesta tese estão de acordo com a quase totalidade dos estudos publicados até o momento, que falharam ao tentar encontrar uma associação entre tal polimorfismo e esquizofrenia. No entanto, tal polimorfismo pode estar envolvido na susceptibilidade a outros transtornos psicóticos, como o

transtorno bipolar do humor (Kelsoe *et al.*, 1996; Waldman *et al.*, 1997; Greenwood *et al.*, 2001), paranóia induzida pelo uso de cocaína (Gelernter *et al.*, 1994), transtornos do espectro esquizofreniforme, como o transtorno de personalidade esquizóide (Blum *et al.*, 1997). No entanto, tal polimorfismo ainda deve ser investigado, especialmente pensando-se no estudo de grupos específicos de sintomas, como as manifestações psicóticas. Além disso, alguns SNPs desse gene também podem ser de interesse, como o A1343G, que será apresentado abaixo.

6.5 A1343G-SLC6A3

O estudo do polimorfismo A1343G do SLC6A3 é uma contribuição inédita deste trabalho para as investigações genéticas em esquizofrenia. Tal polimorfismo é sinônimo, não promovendo mudança de aminoácido na proteína (Ser/Ser), parecendo não ser funcional (Greenwood *et al.*, 2002). Apesar disso, seu estudo é importante, pois tal polimorfismo pode estar em DL com outro polimorfismo no SLC6A3, que é um gene de interesse para esquizofrenia. Além disso, trabalhos mais recentes vêm demonstrando que polimorfismos sinônimos, que aparentemente não deveriam implicar alterações na expressão gênica, podem fazê-lo. Estudo realizado com o receptor DRD2 mostrou que mutações sinônimas em seu gene podem afetar a estabilidade do mRNA e a síntese do receptor (Duan *et al.*, 2003). Assim,

tal fato também justifica a pesquisa com polimorfismos sinônimos, como no caso do polimorfismo A1343G do SLC6A3.

Neste trabalho, foi encontrada associação entre o polimorfismo investigado do SLC6A3 e esquizofrenia. Porém, estudos com outras populações devem ser realizados, bem como com outros haplótipos desse gene.

6.6 A/G DA REGIÃO UTR DO *COMT*

O *COMT* tem sido considerado de interesse para estudos de transtornos psiquiátricos, em especial para esquizofrenia. O *COMT* localiza-se na região cromossômica 22q11, que está relacionada à síndrome velocardiofacial, que é caracterizada por uma microdeleção hemizigótica nessa mesma região. Tal doença tem incidência de 1:4.000 nascidos vivos e apresenta características clínicas marcadas por sintomas somáticos (principalmente alterações congênitas cardiovasculares e anomalias craniofaciais), além de manifestações neuropsiquiátricas, como deficiência mental e sintomas psicóticos. Essa síndrome é associada com alta prevalência de esquizofrenia, sendo que o risco para o desenvolvimento de tal transtorno psiquiátrico é cerca de 25 vezes maior quando comparado com a população geral. Pacientes com esquizofrenia, em geral, apresentam também, em até 2% dos casos, microdeleções na região cromossômica 22q11. Assim sendo, deleções na região 22q11 conferem importante risco

para o aparecimento de esquizofrenia, sendo menor apenas que a presença de um irmão gêmeo com o transtorno. Desse modo, o *COMT* coloca-se como sendo de interesse para pesquisas de susceptibilidade em esquizofrenia (Jolin *et al.*, 2006).

Ademais, tal gene apresenta um polimorfismo funcional (Val108/158Met), que altera sua atividade enzimática em até quatro vezes, podendo influenciar na disponibilidade sináptica de neurotransmissores, como a dopamina. Além do mais, alguns estudos de ligação também têm mostrado resultados positivos entre esquizofrenia e a região 22q11 (Levinson, 2005).

O polimorfismo do *COMT* investigado nesta tese localiza-se na região 3' UTR do gene. Bray *et al.* (2003), em estudo *post-mortem*, mostraram que tal polimorfismo altera a expressão do *COMT*, sendo que o alelo G, relacionado como fator de risco para esquizofrenia no estudo de Shifman *et al.* (2002), está relacionado a uma diminuição dessa expressão.

No entanto, estudos que se seguiram à investigação inicial de associação do polimorfismo rs165599 e esquizofrenia têm encontrado resultados inconclusivos. Como tal polimorfismo passou a ser estudado mais recentemente, ainda não há estudos de meta-análise publicados. Os resultados do presente trabalho não mostraram associação entre tal polimorfismo do *COMT* e esquizofrenia.

6.7 ANÁLISE DE HOMOZIGOSIDADE

Homozigosidade tem sido reportada como fator de risco para várias doenças, não apenas psiquiátricas. Desse modo, em todos os polimorfismos testou-se a hipótese da existência de associação entre esquizofrenia e homozigosidade.

Encontramos associação entre homozigosidade e esquizofrenia na investigação do polimorfismo -141C (Ins/Del). No entanto, examinando a composição do grupo de homozigosidade, observamos que não há diferenças entre os grupos de casos e controles para o genótipo homozigoto Del/Del. Assim, aparentemente a associação que fora observada deveu-se apenas à alta prevalência do genótipo Ins/Ins entre os pacientes (genótipo esse associado como fator de risco para esquizofrenia em nossa amostra).

Assim sendo, não foi encontrada associação significativa entre homozigosidade e esquizofrenia para nenhum dos polimorfismos estudados na amostra investigada no presente trabalho.

6.8 COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS

6.8.1 GÊNERO

Diferenças fenotípicas na esquizofrenia têm sido observadas entre pacientes de gêneros distintos (Salem & Kring, 1998). Tais diferenças na

apresentação clínica poderiam refletir também diferenças na susceptibilidade genética ao transtorno. No entanto, ainda não há evidências suficientes para garantir a existência desse componente genético de susceptibilidade distinta entre os gêneros para o desenvolvimento de esquizofrenia. Estudo genético-epidemiológico com gêmeos, contando com grande amostra, não evidenciou a ocorrência de diferenças na transmissão genética baseada no gênero (Cannon *et al.*, 1998). No entanto, vários estudos genético-moleculares têm mostrado diferenças na associação alélica e genotípica baseada no gênero dos pacientes. Por conta disso, na presente tese, optou-se por investigar a participação do gênero como fator relacionado à susceptibilidade genética. Foi realizada análise estratificada por gênero, bem como regressão logística para todos os polimorfismos investigados.

Para os polimorfismos que apresentaram resultados positivos como fator de risco para esquizofrenia, na análise estratificada por gênero, tais associações desapareceram. Entretanto, pode-se perceber que a diferença de frequência dos alelos e genótipos mantém-se entre casos e controles, e que a ausência de associação nesse tipo de análise ocorreu, devido a uma diminuição do número de indivíduos analisados com a análise estratificada. Assim, ao utilizar a regressão logística, percebeu-se que o gênero não é fator de risco relacionado aos polimorfismos investigados na presente amostra.

6.8.2 SUBTIPOS DE ESQUIZOFRENIA

Havia no estudo cinco grupos de subtipos de esquizofrenia, porém apenas dois deles representavam uma quantidade significativa de indivíduos, a saber, esquizofrenia paranóide com 169 pacientes (68,98%), e esquizofrenia desorganizada com 53 (21,63%), perfazendo um total de 90,61% dos casos. Desse modo, optou-se por utilizar nas análises apenas esses dois grupos de pacientes, com o objetivo de não se perder poder estatístico com a investigação realizada em muitos grupos com poucos indivíduos em cada um deles.

Levando-se em conta o subtipo de esquizofrenia como variável independente, como no caso do gênero, a regressão logística mostrou que não houve associação de nenhum polimorfismo estudado com algum subtipo do transtorno.

6.9 ANÁLISES DE DL E HAPLÓTIPOS

A análise de haplótipos não mostrou associação com esquizofrenia, mesmo com a participação de polimorfismos que mostraram resultados positivos com o transtorno. Tal fato é compreensível, pois a análise de DL não mostrou que tais polimorfismos estudados compunham blocos haplotípicos. Tais resultados vão ao encontro de trabalho recentemente publicado por Parsons *et al.* (2007) com os polimorfismos *TaqI* A e -141C

(Ins/Del) do *DRD2*, que também mostrou que tais polimorfismos não formam um bloco haplotípico, não estando em DL.

6.10 RESULTADOS FALSO-NEGATIVOS E FALSO-POSITIVOS

Vários fatores podem dificultar que sejam encontrados resultados fidedignos nos estudos de associação genética do tipo caso-controle em psiquiatria. O baixo poder estatístico da amostra é um deles. Devido ao fato de muitos estudos apresentarem pequenas amostras, pode ocorrer risco de resultados falso-positivos e falso-negativos, o que pode contribuir também para a dificuldade de reprodução de achados positivos prévios ([Altshuler et al. 2000](#); [Hirschhorn et al. 2002](#)). No presente trabalho, o poder da amostra mostrou-se adequado para o tipo de estudo que pretendíamos conduzir. Estudos do tipo meta-análise podem ser úteis nas estratégias de investigação do tipo caso-controle, pois ajuda a aumentar o poder amostral. Resultados parciais desta tese contribuíram para meta-análises publicadas na área, no caso estudos com o polimorfismo Ser9Gly (Jonsson et al., 2003; Jonsson et al., 2004).

A diferença étnica entre os grupos de pacientes e casos também pode se configurar em problema para os estudos genéticos de associação do tipo caso-controle. Como já exposto anteriormente, em caso de estratificação étnica, uma associação pode ser mascarada ou aparecer de maneira

espúria. O componente genético pode influenciar a manifestação de determinado fenótipo, como ocorre, por exemplo, no caso do gene da enzima *proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 serine protease* (PCSK9), cujos alelos estão distribuídos de maneira distinta entre populações de negros e caucasianos, regulando, portanto, de maneira diferente os níveis séricos de colesterol do tipo lipoproteínas de baixa densidade (*low density lipoproteins*: LDL) nessas etnias (Cohen *et al.*, 2006). Na psiquiatria, o componente genético relacionado à etnia tem sido relacionado, por exemplo, com a doença de Alzheimer. Há relatos indicando que o gene da apolipoproteína E (*ApoE*) pode desempenhar papel distinto como fator de risco para Alzheimer entre as etnias caucasiana, hispânica e negra (Tycko *et al.*, 2004). Assim, a questão da estratificação étnica populacional em amostras brasileiras é importante ponto a ser considerado em estudos genéticos de associação do tipo caso-controle.

Diante do exposto acima, o poder para a detecção de associações entre polimorfismos genéticos e determinadas características fenotípicas pode estar reduzido em amostras com miscigenação étnica (Spielman & Ewens, 1996; McKeigue *et al.*, 2000). Com o objetivo de enfrentar essa questão, pode-se tentar identificar a origem étnica da amostra estudada e compor grupos de casos e de controles de maneira mais homogênea. No entanto, no Brasil, características físicas como pigmentação da pele, cor e textura do cabelo, formato dos lábios e do nariz são pobres preditores de ancestralidade (Parra *et al.*, 2003), o que dificulta tal tarefa. Assim, tese de doutorado recente do PROGENE investigou essa questão (Guindalini, 2005).

Foram estudados pacientes com diagnóstico de dependência à cocaína e controles do Banco de DNA do grupo com marcadores gênicos (24 marcadores populacionais: 17 SNPs e 7 microssatélites) de caracterização étnica. A conclusão da referida tese foi que as comparações realizadas entre os casos e controles revelaram uma similaridade étnica entre eles, quanto à frequência alélica dos marcadores populacionais e quanto à contribuição de cada uma das subpopulações constituintes da amostra, sendo que após a correção estatística para a presença de estratificação étnica populacional, os testes de associação com o transtorno psiquiátrico investigado não apresentaram modificações significativas. Tal fato indica que, apesar da grande miscigenação étnica da população brasileira, esse fenômeno pode não configurar fator importante responsável por viés em estudos genéticos de associação. O fato da amostra desta tese estar em equilíbrio de Hardy-Weinberg para os polimorfismos estudados indica também que a estratificação populacional pode não ser um problema tão significativo neste trabalho (Weiss *et al.*, 2001).

Outro aspecto que merece ser destacado nesta discussão é a caracterização do diagnóstico dos pacientes. É sempre importante que o diagnóstico do paciente seja feito de maneira confiável, uma vez que toda a investigação biológica subsequente necessita de uma caracterização clínica adequada, já que se está à procura de substratos biológicos de manifestações clínicas. Assim sendo, o uso de instrumentos diagnósticos estruturados e, portanto, confiáveis tem sido disseminado nos mais diferentes estudos em psiquiatria, área na qual o diagnóstico é

eminentemente clínico. No entanto, entrevistas com essas características também podem levar a problemas no estabelecimento do diagnóstico, já que se sabe que os quadros clínicos podem modificar sua apresentação ao longo do tempo, dificultando a determinação do diagnóstico em uma única entrevista, em um corte transversal. Ademais, a confiabilidade entre os diferentes instrumentos diagnósticos também pode se configurar em problema (Hiller *et al.*, 2003). Por outro lado, a avaliação clínica baseada na consulta a prontuários pode trazer dificuldades, já que perde em rigor metodológico. No entanto, são relevantes alguns dados que apontam para a consulta de prontuários e informações clínicas gerais das instituições onde os pacientes são acompanhados como sendo de interesse para pesquisas na área de psiquiatria. Ekholm *et al.* (2005), em estudo com uma população de 143 pacientes com esquizofrenia ou transtornos correlatos, encontraram concordância de 94% entre os diagnósticos feitos baseados em prontuários médicos e feitos por meio da aplicação de instrumento padronizado de avaliação, o *Operational Criteria* (OPCRIT) (McGuffin *et al.*, 1991). Sendo assim, para pacientes em acompanhamento clínico institucional de longa data, a avaliação por meio dos prontuários médicos pode ser aventada, oferecendo vantagem no que tange ao custo-benefício de sua utilização.

6.11 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Diante do exposto e discutido, fica clara a importância da realização de investigações na área de genética em psiquiatria, mesmo com polimorfismos já estudados na literatura. Assim, o presente trabalho trouxe dados para tentar contribuir com a melhor compreensão da participação dos polimorfismos investigados como fatores de risco para o desenvolvimento de esquizofrenia.

6.12 PERSPECTIVAS FUTURAS

A partir dos resultados encontrados na presente tese, pretende-se continuar a investigação com polimorfismos genéticos que se encontram em DL com aqueles marcadores que apresentaram associação com esquizofrenia na amostra estudada, por meio de estudos de associação do tipo caso-controle. Desenhos de estudos com trios também estão sendo programados, a partir de amostras que estão sendo coletadas, o que poderia diminuir a chance da ocorrência de problemas decorrentes da miscigenação étnica.

Outra abordagem interessante para auxiliar na investigação de tais polimorfismos é o *Genome Wide Scan*, por meio da técnica de *microarray* com *DNA pooling*. Tal metodologia é importante, pois sendo uma técnica de varredura genômica, pode indicar quais polimorfismos são de interesse para

a continuação da investigação em futuras abordagens com estudos do tipo caso-controle. No momento, a parte laboratorial do *pool* de DNA e do *microarray* já foi realizada pelo aluno no *Social, Genetics and Developmental Psychiatry (SGDP), Institute of Psychiatry, University of London*, sendo que a análise dos resultados do *microarray* está em andamento.

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos pelas genotipagens realizadas nesta tese, existe associação entre os polimorfismos - 141C (Ins/Del) do *DRD2* (rs1799732) e A1343G do *SLC6A3* (rs6347) com esquizofrenia na amostra investigada. No entanto, não foram encontradas associação entre os polimorfismos *TaqI* A do *DRD2* (rs1800497), Ser-9-Gly do *DRD3* (rs6280), VNTR da região 3' não codificadora do *SLC6A3*, e A/G da região 3' não codificadora do *COMT* (165599). Nesta amostra de pacientes, também não foram encontradas associações entre gênero e subtipo de esquizofrenia para os polimorfismos investigados.

ANEXOS

ANEXO 1 - Artigos publicados a partir do trabalho da presente tese

- 1- **Cordeiro Q**, Junqueira R, Vallada H. Study of Association between the ser-9-gly of the D3 dopaminergic receptor and schizophrenia. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*; 59 (2A): 219-22, 2001.

- 2- **Cordeiro Q**, Talkowski M, Wood J, Ikenaga E, Vallada H. Lack of Association between VNTR polymorphism of dopamine transporter gene (SLC6A3) and schizophrenia in a Brazilian sample. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*; 62(4): 973-6, 2004.

ANEXO 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido da presente tese

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE :.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇONº APTO:
BAIRRO:.....CIDADE
CEP:.....TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO.:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO:.....CIDADE:
CEP:.....TELEFONE: DDD (.....)

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE GENES DO

SISTEMA DOPAMINÉRGICO E ESQUIZOFRENIA

PESQUISADOR: Prof. Dr. Homero Pinto Vallada Filho

CARGO/FUNÇÃO: Professor Associado
54.439

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº

UNIDADE DO HCFMUSP: Instituto de Psiquiatria

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO ☐ RISCO MÍNIMO ☒ RISCO MÉDIO ☐
RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 12 meses

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

1. justificativa e os objetivos da pesquisa; 2. procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais; 3. desconfortos e riscos esperados; 4. benefícios que poderão ser obtidos; 5. procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo.

1. A existência do componente genético para o desenvolvimento de Esquizofrenia tem sido demonstrado nos estudos em famílias e em gêmeos. O objetivo principal do presente estudo é de identificar os genes que contribuem para o aparecimento deste transtorno. Este estudo envolve o uso de técnicas laboratoriais envolvendo identificação de variantes genéticas de genes candidatos que possam estar associados como fator de risco para o aparecimento da Esquizofrenia.
 2. As pessoas que participarem deste estudo serão avaliadas por um psiquiatra e serão submetidas à coleta de cerca de 10ml de sangue venoso periférico. O sangue será coletado por profissionais devidamente treinados do Instituto de Psiquiatria do HC-FMUSP. Todas as informações sobre a pessoa que participar do estudo serão mantidas em segredo.
 3. O risco de tal procedimento é mínimo, decorrente da picada da agulha para a retirada do sangue. Todo material utilizado será descartável.
 4. As informações obtidas neste estudo poderão nos ajudar a entender melhor a diferença de resposta a clomipramina observada no tratamento deste transtorno psiquiátrico. O estudo gerará novas informações que poderão ajudar no desenvolvimento de medicações mais eficazes para tratar este problema mental.
 5. Nenhum.
-

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

1. acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
2. liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
3. salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.
4. disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.
5. viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Prof. Dr. Homero Pinto Vallada Filho

Laboratório de Neurociências (LIM-27)

Instituto de Psiquiatria do HC da FMUSP

Endereço: Rua Dr. Ovídio Pires de Campos s/n

Caixa Postal 3671 CEP 05403-010

Tel.: (011) 3069 7129

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo,.....de.....de.....

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)

ANEXO 3 - Critérios diagnósticos para esquizofrenia de acordo com o DSM-IV (*American Psychiatric Association, 1994*)

Critérios Diagnósticos para Esquizofrenia – DSM-IV
A. Sintomas característicos: Dois (ou mais) dos seguintes, cada qual presente por uma porção significativa de tempo durante o período de 1 mês (ou menos, se tratados com sucesso):
(1) delírios (2) alucinações (3) discurso desorganizado (por ex., freqüente descarrilamento ou incoerência) (4) comportamento amplamente desorganizado ou catatônico (5) sintomas negativos, isto é, embotamento afetivo, alogia ou avolição
Nota: Apenas um sintoma do Critério A é necessário se os delírios são bizarros ou as alucinações consistem de vozes que comentam o comportamento ou os pensamentos da pessoa, ou duas ou mais vozes conversando entre si.
B. Disfunção social/ocupacional: Por uma porção significativa do tempo desde o início da perturbação, uma ou mais áreas importantes do funcionamento, tais como trabalho, relações interpessoais ou cuidados pessoais, estão acentuadamente abaixo do nível alcançado antes do início (ou, quando o início dá-se na infância ou adolescência, fracasso em atingir o nível esperado de aquisição interpessoal, acadêmica ou ocupacional).
C. Duração: Sinais contínuos da perturbação persistem por pelo menos 6 meses. Este período de 6 meses deve incluir pelo menos 1 mês de sintomas (ou menos, se tratados com sucesso) que satisfazem o critério A (isto é, sintomas da fase ativa) e pode incluir períodos de sintomas prodrômicos ou residuais. Durante esses períodos prodrômicos ou residuais, os sinais da perturbação podem ser manifestados apenas por sintomas negativos ou por dois ou mais sintomas relacionados no Critério A presentes de uma forma atenuada (por ex., crenças estranhas, experiências perceptuais incomuns).
D. Exclusão de Transtorno Esquizoafetivo e Transtorno do Humor: O Transtorno Esquizoafetivo e o Transtorno do Humor com Aspectos Psicóticos foram descartados, porque (1) nenhum Episódio Depressivo Maior, Maníaco ou Misto ocorreu concomitantemente aos sintomas da fase ativa; ou (2) se os episódios de humor ocorreram durante os sintomas da fase ativa, sua duração total foi breve relativamente à duração dos períodos ativo e residual.

E. Exclusão de substância/condição médica geral: A perturbação não se deve aos efeitos fisiológicos diretos de uma substância (por ex., uma droga de abuso, um medicamento) ou a uma condição médica geral.

F. Relação com um Transtorno Invasivo do Desenvolvimento: Se existe uma história de Transtorno Autista ou um outro Transtorno Invasivo do Desenvolvimento, o diagnóstico adicional de Esquizofrenia é feito apenas se delírios ou alucinações proeminentes também estão presentes por pelo menos 1 mês (ou menos, se tratados com sucesso).

Classificação do curso longitudinal (pode ser aplicada apenas 1 mês após o aparecimento inicial dos sintomas da fase ativa):

Episódico Com Sintomas Residuais Entre Episódios (episódios são definidos pelo ressurgimento de sintomas psicóticos proeminentes); especificar também se:

Com Sintomas Negativos Proeminentes

Episódico Sem Sintomas Residuais Entre Episódios

Contínuo (sintomas psicóticos proeminentes estão presentes durante todo o período de observação); especificar também se: Com Sintomas Negativos Proeminentes

Episódio Único em Remissão Parcial; especificar também se: Com Sintomas Negativos Proeminentes

Episódio Único em Remissão Completa

Outro Padrão ou Padrão Inespecífico

Subtipos de Esquizofrenia:

- Esquizofrenia Subtipo Paranóide (295.30)
- Esquizofrenia Subtipo Desorganizado (295.10)
- Esquizofrenia Subtipo Catatônico (295.20)
- Esquizofrenia Subtipo Indiferenciado (295.90)
- Esquizofrenia Subtipo Residual (295.60)

295.30 Subtipo Paranóide

Um subtipo de Esquizofrenia no qual são satisfeitos os seguintes critérios:

A. Preocupação com um ou mais delírios ou alucinações auditivas freqüentes.

B. Nenhum dos seguintes sintomas é proeminente: discurso desorganizado, comportamento desorganizado ou catatônico, ou afeto embotado ou inadequado.

295.10 Subtipo Desorganizado

Um subtipo de Esquizofrenia no qual são satisfeitos os seguintes critérios:

A. Todos os seguintes sintomas são proeminentes:

- (1) discurso desorganizado
- (2) comportamento desorganizado
- (3) afeto embotado ou inadequado

B. Não são satisfeitos os critérios para Tipo Catatônico.

295.20 Subtipo Catatônico

Um subtipo de Esquizofrenia no qual são satisfeitos os seguintes critérios:

- (1) imobilidade motora evidenciada por cataplexia (incluindo flexibilidade cêrea ou estupor)
- (2) atividade motora excessiva (aparentemente desprovida de propósito e não influenciada por estímulos externos)
- (3) extremo negativismo (uma resistência aparentemente sem motivo a toda e qualquer instrução, ou manutenção de uma postura rígida contra tentativas de mobilização) ou mutismo
- (4) peculiaridades do movimento voluntário evidenciadas por posturas (adoção voluntária de posturas inadequadas ou bizarras, movimentos estereotipados, maneirismos proeminentes ou trejeitos faciais proeminentes)
- (5) ecolalia ou ecopraxia

295.90 Subtipo Indiferenciado

Um subtipo de Esquizofrenia no qual os sintomas que satisfazem o Critério A estão presentes, mas não são satisfeitos os critérios para os Tipos Paranóide, Desorganizado ou Catatônico.

295.60 Subtipo Residual	
Um subtipo de Esquizofrenia no qual são satisfeitos os seguintes critérios:	
A. Ausência de delírios e alucinações, discurso desorganizado e comportamento amplamente desorganizado ou catatônico proeminentes.	
B. Existem evidências contínuas da perturbação, indicadas pela presença de sintomas negativos ou por dois ou mais sintomas relacionados no Critério A para Esquizofrenia, presentes de forma atenuada (por ex., crenças estranhas, experiências perceptuais incomuns).	

ANEXO 4 - Protocolo de Extração de DNA: método *salting out*, descrito por Miller *et al.* (1988)

1. Lise da hemácia

Transferir o volume total de sangue (10 mililitros: ml) para um tubo de 50 ml.

Adicionar 1 vez o tampão A (mantido a 4°C) até completar 20 ml.

Homogeneizar no vórtex.

Deixar na geladeira por 10 minutos.

Centrifugar a 4°C por 10 minutos a 3000 rpm.

2. Lavagem de leucócitos

Descartar o sobrenadante.

Adicionar 20 ml de tampão A.

Ressuspender o sedimento por agitação no vortex.

Deixar no gelo por 10 minutos.

Centrifugar a 4°C por 10 minutos a 3000 rpm.

3. Lise dos leucócitos

Descartar o sobrenadante.

Adicionar 3 ml de tampão B.

Adicionar 200 µl de SDS 10%.

Adicionar 500 µl de tampão C com proteinase K.

Agitar no vortex até ficar parecido com “clara de neve”.

Deixar a 37°C por 24 horas.

4. Precipitação

Adicionar 1 ml de solução D (NaCl 6M)

Agitar durante 1 minuto no vortex.

Centrifugar a 4°C por 20 minutos a 3000rpm.

Transferir cuidadosamente o sobrenadante para um tubo de 15 ml.

Adicionar um volume (1:1) de etanol 100% (mantido a -20°C).

Pescar com a ponteira amarela o DNA precipitado.

Transferir para o tubo Eppendorf de 1,5 ml contendo 1 ml de etanol 70%.

(fazer em isopor contendo gelo seco)

Centrifugar a 4°C por 15 minutos a 13500 rpm.

Descartar o sobrenadante.

Deixar os tubos de cabeça para baixo na estante até secagem.

Ressuspender o sedimento em 1 ml de TE 1X.

5. Dosagem da concentração de DNA

Colocar 1000µL de TE 1X na cubeta 1 (para zerar), e 990µL de TE 1X na cubeta 2.

Fazer a leitura da concentração do DNA, a 260 nm – 280 nm

O ideal é que $DO(260) \div DO(280)$ seja entre 1,7 e 2,1 (representa a qualidade do DNA)

Após a leitura: Acertar a concentração para 100ng/µL

Aliquotar o DNA, colocando no Eppendorf a quantidade de DNA calculada e a quantidade de Tampão TE 1X autoclavado para completar um volume de 100µL.

ANEXO 5 - Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)

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

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

2. Anelamento – A polimerase para assumir suas funções, isto é anexar as bases complementares, transformando as fitas simples em duplas fitas, necessita de um fragmento de DNA já ligado na região previamente escolhida. A solução então é demarcar as extremidades do DNA de interesse nas duas longas fitas simples, tornando-as duplas apenas nesse intervalo. Para isso adicionam-se à solução os *primers* ou iniciadores que são pequenos fragmentos sintéticos de DNA de fita simples – oligonucleotídeos de 20 a 30 bases nitrogenadas de comprimento – que são sintetizados *in vitro* baseados na seqüência do DNA a ser amplificado sendo eles complementares à seqüência do segmento de DNA de interesse. A

hibridização dos *primers* descrito como *annealing*, deve ser feita a uma temperatura inferior a da denaturação (45° a 60°C).

3. Extensão – Quando os *primers* encontram e ligam-se aos segmentos complementares, a DNA-polimerase pode assumir sua função. Inicia-se a partir dos pequenos fragmentos de DNA de fita dupla (resultado do anelamento do *primer*), incorporando um a um os nucleotídeos correspondentes, isto é, as bases juntamente com as moléculas de açúcar e fosfato. A DNA-polimerase liga os nucleotídeos entre si, completando assim as fitas simples e tornando-as duplas (extensão). Os fragmentos de DNA recém-formados fornecem mais moldes para a montagem de novas fitas nos ciclos subseqüentes. Após cada ciclo, o número de fragmentos se duplica, de um formando-se 2 e então novamente 4, 8, 16, 32, 64, 128 e assim por diante. Teoricamente após 20 ciclos têm-se cerca de um milhão, após 30 ciclos, cerca de um bilhão de cópias do fragmento de DNA de interesse.

REFERÊNCIAS

Aires MM. *Fisiologia*, 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999. p.836-7.

Altshuler D, Daly M, Kruglyak L. Guilt by association. *Nat Genet.* 2000;26:135-37.

American Psychiatric Association. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders*, 4rd ed. Washington, DC: American Psychiatric Association; 1994.

Andreasen N. Brave new brain: conquering mental illness in the era of the genome. New York: Oxford University Press; 2001.

Anney RJ, Rees MI, Bryan E, Spurlock G, Williams N, Norton N. Characterisation, mutation detection, and association analysis of alternative promoters and 50 UTRs of the human dopamine D3 receptor gene in schizophrenia. *Mol Psychiatry.* 2002;7:493-502.

[Arinami T, Gao M, Hamaguchi H, Toru M.](#) A functional polymorphism in the promoter region of the dopamine D2 receptor gene is associated with schizophrenia. *Hum Mol Genet.* 1997;6:577-82.

Asherson P, the IMAGE Consortium: Attention-deficit hyperactivity disorder in the post-genomic era. *Eur Child Adolesc Psychiatry.* 2004;13:50-70.

Baar CL, Yun C, Feng Y, Wigg K, Zai G. Haplotype study of three polymorphisms at the dopamine transporter locus confirm linkage to attention deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry.* 2001;49:333-9.

Basile VS, Masellis M, Badri F, Paterson AD, Meltzer HY, Lieberman JA. Association of the *MscI* polymorphism of the dopamine D3 receptor gene with tardive dyskinesia in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*. 1999;21:17-27.

Bleuler E. *Dementia praecox or the group of schizophrenias*. Monograph series on schizophrenia. Vol 1. New York: International University Press; 1950.

Blum K, Braverman ER, Wu S. Association of polymorphisms of dopamine D2 receptor (DRD2), and dopamine transporter (DAT1) genes with schizoid/avoidant behaviors (SAB). *Mol Psychiatry*. 1997;2:239-46.

Bodeau-Pean S, Laurent C, Campion D. No evidence for linkage or association between the dopamine transporter gene and schizophrenia in a French population. *Psychiatry Res*. 1995;59:1-6.

[Bray NJ](#), [Buckland PR](#), [Williams NM](#), [Williams HJ](#), [Norton N](#), [Owen MJ](#), [O'Donovan MC](#). A haplotype implicated in schizophrenia susceptibility is associated with reduced COMT expression in human brain. [Am J Hum Genet](#). 2003;73:152-61.

[Breen G](#), [Brown J](#), [Maude S](#), [Fox H](#), [Collier D](#), [Li T](#), [Arranz M](#), [Shaw D](#), [StClair D](#). 141 C del/ins polymorphism of the dopamine receptor 2 gene is associated with schizophrenia in a British population. *Am J Med Genet*. 1999;88:407-10.

Breier A, Su TP, Saunders R. Schizophrenia is associated with elevated amphetamine-induced synaptic dopamine concentrations: evidence from a novel positron emission tomography method. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:2569–2574.

- Buckland PR, O'Donovan MC, McGuffin P. Clozapine and sulpiride up-regulate dopamine D3 receptor mRNA levels. *Neuropharmacology*. 1993;32:901-7.
- Byerley W, Coon H, Hoff M. Human dopamine transporter gene not linked with schizophrenia in multigenerational pedigrees. *Hum Hered*. 1993a;43:319-22.
- Byerley W, Hoff M, Holik J, Caron MG, Giros B. VNTR polymorphism for the human dopamine transporter gene (DAT1). *Hum Mol Genet*. 1993b;2:335.
- Campion D, d'Amato T, Bastard C, Laurent C, Guedj F, Jay M. Genetic study of dopamine D1, D2, D3 and D4 receptors in schizophrenia. *Psychiatr Res*. 1993;51:215-30.
- Cannon TD, Kaprio J, Lonnqvist J, Huttunen M, Koskenvuo M. The genetic epidemiology of schizophrenia in a Finnish twin cohort: a population-based modeling study. *Arch Gen Psychiatry*. 1998;55:67-74.
- Chen CH, Wei FC, Koong FJ, Hsiao KJ. Association of *Taq I* polymorphism of dopamine D2 receptor gene and tardive dyskinesia in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 1997a;41:827-9.
- Chen CH, Liu MY, Wei FC, Koong FJ, Hwu HG, Hsiao KJ. Further evidence of no association between Ser9Gly polymorphism of dopamine D3 receptor gene and schizophrenia. *Am J Med Genet*. 1997b;2:139-45.
- Chen X, Wang X, O'Neill AF, Walsh D, Kendler KS. Variants in the catechol-o-methyltransferase (COMT) gene are associated with schizophrenia in Irish high-density families. *Mol Psychiatry*. 2004;9:962-7.

Chinaglia G, Alvarez FJ, Probst A, Palacios JM. Mesostriatal and mesolimbic dopamine uptake binding sites are reduced in Parkinson's disease and progressive supranuclear palsy: a quantitative autoradiographic study using [3H]mazindol. *Neuroscience*. 1992;49:317-27.

[Cohen JC](#), [Boerwinkle E](#), [Mosley TH Jr](#), [Hobbs HH](#). Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. [N Engl J Med](#). 2006;354:1264-72.

Comings DE, Comings BG, Muhleman D, Shahbahrani B, Tost D, Knell E. The dopamine D2 receptor D2 locus as a modifying gene in neuropsychiatric disorders. *J Am Med Assoc*. 1991;266:1793-900.

Conne B, Stutz A, Vassalli JD. The 3' untranslated region of messenger RNA: A molecular "hotspot" for pathology? *Nat Med*. 2000;6:637-41.

Cordeiro Q, Junqueira R, Vallada H. Study of association between the ser-9-gly polymorphism of the dopaminergic receptor and schizophrenia. *Arq Neuropsiquiatr*. 2001;59:219-22.

Cordeiro Q, Talkowski M, Wood J, Ikenaga E, Vallada H. Lack of association between VNTR polymorphism of dopamine transporter gene (SLC6A3) and schizophrenia in a Brazilian sample. *Arq Neuropsiquiatr*. 2004;62:973-6.

Crocq MA, Mant R, Asherson P, Williams J, Hode Y, Mayerova A, Collier D, Lannfelt L, Sokoloff P, Schwartz JC. Association between schizophrenia and homozygosity at the dopamine D3 receptor gene. *J Med Genet*. 1992;29:858-60.

Daniels J, Williams J, Asherson P, McGuffin P, Owen M. No association between schizophrenia and polymorphisms within the genes for debrisoquine 4-hydroxylase (CYP2D6) and the dopamine transporter (DAT1). *Am J Med Genet.* 1995;60:85-7.

Davis KL, Kahn RS, Ko G, Davidson M. Dopamine in schizophrenia : a review and reconceptualization. *Am J Psychiatry.* 1991;148:1474-86.

Dean J, Dean A, Burton A, Dicker R. *Epi Infocomputer programs for epidemiology.* Atlanta: Division of Surveillance and Epidemiologic Studies, Epidemiology Program Office, Center for Disease Control, 1990.

Di Bella D, Catalano M, Strukel M, Nobile M, Novelli E, Smeraldi E. Distribution of the MscI polymorphism of the dopamine D3 receptor in an Italian psychotic population. *Psychiatr Genet.* 1994;4:39-42.

Di Forti M, Lappin JM, Murray RM. Risk factors for schizophrenia: all roads lead to dopamine. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2007;17:101-7.

Dollfus S, Campion D, Vasse, T, Preterre P, Laurent C, d'Amato . Association study between dopamine D1, D2, D3 and D4 receptor genes and schizophrenia defined by several diagnostic systems. *Biol Psychiatr.* 1996;40:419-21.

[Dominguez E, Loza MI, Padin F, Gesteira A, Paz E, Paramo M, Brenlla J, Pumar E, Iglesias F, Cibeira A, Castro M, Caruncho H, Carracedo A, Costas J.](#) Extensive linkage disequilibrium mapping at HTR2A and DRD3 for schizophrenia susceptibility genes in the Galician population. *Schizophr Res.* 2007;90:123-9.

Dubertret C, Gorwood P, Ades J, Feingold J, Schwartz JC, Sokoloff P. Meta-analysis of DRD3 gene and schizophrenia: ethnic heterogeneity and significant association in Caucasians. *Am J Med Genet.* 1998;81:318-22.

Dubertret C, Gorwood P, Gouya L, Deybach JC, Ades J. Association and excess of transmission of a DRD2 haplotype in a sample of French schizophrenic patients. *Schizophr Res.* 2001;49:203-12.

[Dubertret C](#), [Gouya L](#), [Hanoun N](#), [Deybach JC](#), [Ades J](#), [Hamon M](#), [Gorwood P](#). The 3' region of the DRD2 gene is involved in genetic susceptibility to schizophrenia. *Schizophr Res.* 2004;67:75-85.

Durany N, Thome J, Palomo A, Foley P, Riederer P, Cruz-Sanchez FF. Homozygosity at the dopamine D3 receptor gene in schizophrenic patients. *Neurosci Lett.* 1996;220:151-4.

Eichhammer P, Albus M, Borrmann-Hassenbach M, Schoeler A, Putzhammer A, Frick U, Klein HE, Rohrmeir T. Association of dopamine D3-receptor gene variants with neuroleptic induced akathisia in schizophrenic patients: a generalization of Steen's study on DRD3 and tardive dyskinesia. *Am J Med Genet.* 2000;96:187-91.

[Ekholm B](#), [Ekholm A](#), [Adolfsson R](#), [Vares M](#), [Osby U](#), [Sedvall GC](#), [Jonsson EG](#). Evaluation of diagnostic procedures in Swedish patients with schizophrenia and related psychoses. *Nord J Psychiatry.* 2005;59:457-64.

El-Khodor B, Boksa P. Caesarean section birth produces long term changes in dopamine D1 receptors and in stress-induced regulation of D3 and D4 receptors in the rat brain. *Neuropsychopharmacology.* 2001;25:423-39.

El-Khodor BF, Boksa P. Transient birth hypoxia increases behavioral responses to repeated stress in the adult rat. *Behav Brain Res.* 2000;107:171-5.

Elkis H. Evolução do conceito e quadro clínico nos dias de hoje Elkis H. In: Louzã Neto MR, Elkis H. *Esquizofrenia: abordagem atual*. São Paulo: Lemos Editorial; 1999.

Elkis, H. A evolução do conceito da esquizofrenia neste século. *Rev Bras Psiquitr.* 2000;22:23-6.

Epstein MP, Satten GA. Inference on haplotype effects in case-control studies using unphased genotype data. *Am J Hum Genet.* 2003;73:1316-29.

[Fan JB, Zhang CS, Gu NF, Li XW, Sun WW, Wang HY, Feng GY, St Clair D, He L.](#) Catechol-O-methyltransferase gene Val/Met functional polymorphism and risk of schizophrenia: a large-scale association study plus meta-analysis. *Biol Psychiatry.* 2005;57:139-44.

[Funke B, Malhotra AK, Finn CT, Plocik AM, Lake SL, Lencz T, DeRosse P, Kane JM, Kucherlapati R.](#) COMT genetic variation confers risk for psychotic and affective disorders: a case control study. *Behav Brain Funct.* 2005;1:19.

Furlong RA, Ho L, Rubinsztein JS, Walsh C, Paykel ES, Rubinsztein D. Analysis of the Monoamine Oxidase A (MAOA) gene in Bipolar Affective Disorder by Association Studies, Meta-Analyses, and sequencing of the promoter. *Am J Med Genet.* 1999;88:398-406.

Gaitonde EJ, Morris A, Sivagnanasundaram S, McKenna PJ, Hunt DM, Mollon JD. Assessment of association of D3 dopamine receptor MscI polymorphism with schizophrenia analysis of symptom ratings, family history, age at onset, and movement disorders. *Am J Med Genet.* 1996;67:455-8.

[Gamma F, Faraone SV, Glatt SJ, Yeh YC, Tsuang MT.](#) Meta-analysis shows schizophrenia is not associated with the 40-base-pair repeat polymorphism of the dopamine transporter gene. *Schizophr Res.* 2005;73:55-58.

[Gejman PV, Ram A, Gelernter J, Friedman E, Cao Q, Pickar D, Blum K, Noble EP, Kranzler HR, O'Malley S.](#) No structural mutation in the dopamine D2 receptor gene in alcoholism or schizophrenia. Analysis using denaturing gradient gel electrophoresis. *JAMA.* 1994;271:204-8.

Gelernter J, Kranzler HR, Satel SL, Rao PA. Genetic association between dopamine transporter protein alleles and cocaine-induced paranoia. *Neuropsychopharmacology.* 1994;11:195-9.

Georgieva L, Dimitrova A, Nikolov I. Dopamine transporter gene (DAT1) VNTR polymorphism in major psychiatric disorders: family-based association study in the Bulgarian population. *Acta Psychiatr Scand.* 2002;105:396-9.

Gill M, Daly G, Heron S, Hawi Z, Fitzgerald M. Confirmation of association between attention deficit hyperactivity disorder and a dopamine transporter polymorphism. *Mol Psychiatry.* 1997;2:311-3.

Giros B, Mestikawy S, Godinot N, Zheng K, Han H, Yang-Feng T. Cloning, pharmacological characterization, and chromosome assignment of the human dopamine transporter. *Mol Pharmacol;* 1992;42:383-90.

[Glatt SJ, Faraone SV, Tsuang MT.](#) DRD2 -141C insertion/deletion polymorphism is not associated with schizophrenia: results of a meta-analysis. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2004;128:21-3.

Goldsmith SK, Shapiro RM, Joyce JN. Disrupted pattern of D2 dopamine receptors in the temporal lobe in schizophrenia. A postmortem study. *Arch Gen Psychiatry.* 1997;54:649-58.

Golimbet VE, Aksenova MG, Abramova LI, Kaleda VG, Orlova VA, Braga EA, Nosikov VV, Trubnikov VI. Association of allelic DRD2 dopamine receptor gene polymorphism with mental diseases of schizophrenic spectrum and affective disorders. *Zh Nevrop Psikhiatr Im SS Korsakova*. 1998;98:32-5.

Golimbet VE, Aksenova MG, Nosikov VV, Orlova VA, Kaleda VG. Analysis of the linkage of the TaqI A loci of the dopamine D2 receptor gene with schizophrenia in patients and their siblings. *Neurosci Behav Physiol*. 2003;33:223-5.

Golimbet VE, Mityushina NG, Scherbatykh TV, Aksenova MG, Abramova LI, Kaleda VG, Nosikov VV, Yurov YB, Rogaev EI. Molecular genetic polymorphism of the genes of neurotransmitter systems in schizophrenics with early manifestation of the disease. *Zh Nevrop Psikhiatr Im SS Korsakova*. 2001;101:48-50.

Goodwin FK, Jamison KR. Manic-depressive illness. New York: Oxford University Press; 1990.

Gottesman I. Schizophrenia genesis: the origins of madness. New York: WH Freeman; 1991.

Grandy DK, Litt M, Allen L, Bunzow JR, Marcionni M, Makam H. The human dopamine D2 receptor gene is located on chromosome 11 at q22-q23 and identifies a Taq I RFLP. *Am J Hum Genet*. 1989;45:778-85.

Grandy DK, Zhangn Y, Civellin O. PCR detection of the TaqA RFLP at the D2 locus. *Hum Mol Genetics*. 1993;12:2197.

[Greenwood TA, Alexander M, Keck PE, McElroy S, Sadovnick AD, Remick RA, Shaw SH, Kelsoe JR.](#) Segmental linkage disequilibrium within the dopamine transporter gene. *Mol Psychiatry*. 2002;7:165-73.

Greenwood TA, Alexander M, Keck PE. Evidence for linkage disequilibrium between the dopamine transporter and bipolar disorder. *Am J Med Genet*. 2001;105:145-51.

Guindalini CSC. *Estudo farmacogenético da dependência de cocaína* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005.

Gutierrez B, Arranz MJ, Collier DA, Valles V, Guillamat R, Bertranpetit J. Serotonin transporter gene and risk for bipolar affective disorder: an association study in Spanish population. *Biol Psychiatry*. 1998;43:843-7.

[Handoko HY, Nyholt DR, Hayward NK, Nertney DA, Hannah DE, Windus LC, McCormack CM, Smith HJ, Filippich C, James MR, Mowry BJ](#). Separate and interacting effects within the catechol-O-methyltransferase (COMT) are associated with schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 2005;10:589-97.

Hauser J, Kapelski P, Czerski PM. Lack of association between VNTR polymorphism of DAT gene and schizophrenia. *Psychiatr Pol*. 2002;36:403-12.

Hawi Z, McCabe U, Straub RE, O'Neill A, Kendler KS, Walsh D, Gill M. Examination of new and reported data of the DRD 3/ MscI polymorphism: no support proposed association with schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 1998;3:150-5.

Heritch AJ. Evidence for reduced and dysregulated turnover of dopamine in schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*. 1990;16:605-615.

Heston LL. Psychiatric disorders in foster home reared children of schizophrenic mothers. *Br J Psychiatry*. 1966;112:819-25.

Hiller W, Dichtl G, Hecht H, Hundt W, von Zerssen D. An empirical comparison of diagnoses and reliabilities in ICD-10 and DSM-III-R. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 1993;242:209-17.

Hirschhorn JN, Altshuler D. Once and again-issues surrounding replication in genetic association studies. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87:4438-41.

[Hoogendoorn ML, Bakker SC, Schnack HG, Selten JP, Otten HG, Verduijn W, van der Heijden FM, Pearson PL, Kahn RS, Sinke RJ.](#) No association between 12 dopaminergic genes and schizophrenia in a large Dutch sample. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2005;134:6-9.

Hori H, Ohmori O, Shinkai T, Kojima H, Nakamura J. Association analysis between two functional dopamine D2 receptor gene polymorphisms and schizophrenia. *Am J Med Genet*. 2001;105:176-8.

Inada T, Sugita T, Dobashi I. Dopamine transporter gene polymorphism and psychiatric symptoms seen in schizophrenic patients at their first episode. *Am J Med Genet*. 1996;26:406-8.

Ingraham LJ, Kety SS. Adoption studies of schizophrenia. *Am J Med Genet*. 2000;97:18-22.

Jaber M, Jones S, Giros B, Caron MG. The dopamine transporter: a crucial component regulating dopamine transmission. *Movement Disord*. 1997;12:629-33.

Jensen J, Willeit M, Zipursky RB, Savina I, Smith AJ, Menon M, Crawley AP, Kapur S. The formation of abnormal associations in schizophrenia: neural and behavioral evidence. *Neuropsychopharmacology*. 2007;2.

[Jeong SH, Joo EJ, Ahn YM, Kim YS.](#) Association study of dopamine transporter gene and schizophrenia in Korean population using multiple single nucleotide polymorphism markers. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2004;28:975-83.

Jolin EM, Weller EB, Weller RA. A biologic model to study the genetics of psychotic, mood, and anxiety disorders: the velocardiofacial syndrome. *Curr Psychiatry Rep*. 2006;8:90-5.

[Jonsson E, Lannfelt L, Sokoloff P, Schwartz JC, Sedvall G.](#) Lack of association between schizophrenia and alleles in the dopamine D3 receptor gene. *Acta Psychiatr Scand*. 1993;87:345-9.

Jonsson E, Brené S, Geijer TH, Terenius L, Tylec A, Persson ML. A search for association between dopamine-related alleles. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 1996;246:297-304.

[Jonsson EG, Flyckt L, Burgert E, Crocq MA, Forslund K, Mattila-Evenden M, Rylander G, Asberg M, Nimgaonkar VL, Edman G, Bjerkstedt L, Wiesel FA, Sedvall GC.](#) Dopamine D3 receptor gene Ser9Gly variant and schizophrenia: association study and meta-analysis. *Psychiatr Genet*. 2003;13:1-12.

[Jonsson EG, Kaiser R, Brockmoller J, Nimgaonkar VL, Crocq MA.](#) Meta-analysis of the dopamine D3 receptor gene (DRD3) Ser9Gly variant and schizophrenia. *Psychiatr Genet*. 2004;14:9-12.

Jonsson EG, Nothen MM, Neidt H, Forslund K, Rylander G, Mattila-Evenden M. Association between a promoter polymorphism in the dopamine D2 receptor gene and schizophrenia. *Schizophr Res*. 1999;40:31-6.

- Joober R, Toulouse A, Benkelfat C, . DRD3 and DAT1 genes in schizophrenia: an association study. *J Psychiatr Res.* 2000;34:285-91.
- Kaiser R, Tremblay PB, Klufmoller F, Roots I, Brockmoller J. Relationship between adverse effects of antipsychotic treatment and dopamine D2 receptor polymorphisms in patients with schizophrenia. *Mol Psychiatry.* 2002; 7:695-705.
- Kampman O, Anttila S, Illi A, Lehtimäki T, Mattila KM, Roivas M, Leinonen E. Dopamine receptor D2 – 141C insertion/deletion polymorphism in a Finnish population with schizophrenia. *Psychiatry Res.* 2003;21:89-92.
- Kapucu LO, Koc E, Gucuyener K, . D2 receptor imaging with iodine-123-iodobenzamide brain SPECT in infants with hypoxicischemic brain injury. *J Nucl Med.* 1998;39:1703-7.
- Kelsoe JR, Sadovnick AD, Krisbjarnarson H. Possible locus for bipolar disorder near the dopamine transporter on chromosome 5. *Am J Med Genet.* 1996;67:533-40.
- Kendell R, Cooper J, Gourlay A, Copeland J, Sharpe L, Gurland B. Diagnostic criteria of American and british psychiatrists. *Arch Gen Psychiatry.* 1971;25:123-30.
- Kendler K, Gardner C. The risk for psychiatric disorders in relatives of schizophrenic and control probands: a comparison of three independent studies. *Psychol Medicine.* 1997;27:411-9.
- Kendler KS, Gruenberg AM, Kinney DK. Independent diagnoses of adoptees and relatives as defined by DSM-III in the provincial and national samples of the Danish Adoption Study of Schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry.* 1994;51:456-68.

Kendler, KS. Overview: a current perspective on twin studies of schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 1983;140:1413-25.

Kety SS, Wender PH, Jacobsen B, Ingraham LJ, Jansson L, Faber B. Mental illness in the biological and adoptive relatives of schizophrenic adoptees. Replication of the Copenhagen Study in the rest of Denmark. *Arch Gen Psychiatry*. 1994;51:442-55.

Kety SS. The significance of genetic factors in the etiology of schizophrenia: results from the national study of adoptees in Denmark. *J Psychiatr Res*. 1987;21:423-9.

Kinney DK, Matthyse S. Genetic Transmission of Schizophrenia. *Ann Rev Med*. 1978;29:459-73.

Knable MB, Hyde TM, Herman MM, Carter JM, Bigelow L, Kleinman JE. Quantitative autoradiography of dopamine-D1 receptors, D2 receptors, and dopamine uptake sites in postmortem striatal specimens from schizophrenic patients. *Biol Psychiatry*. 1994;36:827-35.

Krebs MO, Sautel F, Bourdel MC, Sokoloff P, Schwartz JC, Olie JP. Dopamine D3 receptor gene variants and substance abuse in schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 1998;3:150-5.

Laakso A, Bergman J, Haaparanta M, Vilkman H, Solin O, Syvalahti E. Decreased striatal dopamine transporter binding in vivo in chronic schizophrenia. *Schizophr Res*. 2001;52:115-20.

- [Laakso A, Pohjalainen T, Bergman J, Kajander J, Haaparanta M, Solin O, Syvalahti E, Hietala J.](#) The A1 allele of the human D2 dopamine receptor gene is associated with increased activity of striatal L-amino acid decarboxylase in healthy subjects. *Pharmacogenet Genomics*. 2005;15:387-91.
- Lannfelt L, Sokoloff P, Martres MP, Pilon C, Giros B, Jönsson E. Amino acid substitution in the dopamine D3 receptor as a useful polymorphism for investigating psychiatric disorders. *Psychiatr Genet*. 1992;2:249-56.
- Laruelle M, Abi-Dargham A. Dopamine in the history of the schizophrenic brain. *Dialogues in Clinical Neuroscience*. 2000;2:359-72.
- Laruelle M, Abi-Dargham A, van Dyck CH, . Single photon emission computerized tomography imaging of amphetamine-induced dopamine release in drug-free schizophrenic subjects. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:9235-40.
- Laurent C, Savoye C, Samolyk D, Mallet J. Homozygosity at the dopamine D3 receptor locus is not associated with schizophrenia. *J Med Genet*. 1994;31:260.
- Le Coniat M, Sokoloff P, Hillion J, Martres MP, Giros B, Pilon C. Chromosomal localization of the human D-3 dopamine receptor gene. *Hum Genet*. 1991;87:618-20.
- Lee MS, Lee H, Kwang-Yoon S. Distribution of the Taq I polymorphism of the dopamine D2 receptor in a Korean schizophrenic population. *Psychiatr Genet*. 1995;5:59.
- Levinson DF. Meta-analysis in Psychiatric Genetics. *Curr Psychiatry Rep*. 2005;7:143-51.

Lewis CM, Levinson DF, Wise LH, DeLisi LE, Straub RE, Hovatta. Genome scan meta-analysis of schizophrenia and bipolar disorder, part II Schizophrenia. *Am J Hum Genet.* 2003;73:34-48.

[Li T](#), [Arranz M](#), [Aitchison KJ](#), [Bryant C](#), [Liu X](#), [Kerwin RW](#), [Murray R](#), [Sham P](#), [Collier DA](#). Case-control, haplotype relative risk and transmission disequilibrium analysis of a dopamine D2 receptor functional promoter polymorphism in schizophrenia. *Schizophr Res.* 1998;32:87-92.

Li T, Yang L, Wiese C, Xu CT, Zeng Z, Giros B, Caron MG, Moises HW, Liu X. No association between alleles or genotypes at the dopamine transporter gene and schizophrenia. *Psychiatry Res.* 1994;52:17-23.

Li T, Yang L, Wiese C. No association between alleles or genotypes at the dopamine transporter gene and schizophrenia. *Psychiatry Res.* 1994;52:17-23.

[Liou YJ](#), [Liao DL](#), [Chen JY](#), [Wang YC](#), [Lin CC](#), [Bai YM](#), [Yu SC](#), [Lin MW](#), [Lai IC](#). Association analysis of the dopamine D3 receptor gene ser9gly and brain-derived neurotrophic factor gene val66met polymorphisms with antipsychotic-induced persistent tardive dyskinesia and clinical expression in Chinese schizophrenic patients. *Neuromolecular Med.* 2004;5:243-51.

[Lipska BK](#), [Jaskiw GE](#), [Weinberger DR](#). Postpubertal emergence of hyperresponsiveness to stress and to amphetamine after neonatal excitotoxic hippocampal damage: a potential animal model of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology.* 1993;9:67-75.

Lorenzo CV, Baça-Garcia E, Hernandez MD, Martin CB, Perez-Rodrigues, Saiz- Gonzalez MD, Fernandez P, Gutierrez FJ, Saiz-Ruiz J, Piqueras JF, de Rivera JL, de Leon J. No association between the Ser9Gly polymorphism of the dopamine D3 receptor gene and schizophrenia in a Spanish sample. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2007;144:344-6.

Lowing PA, Owing PA, Mirsky AF, Pereira R. The inheritance of schizophrenia spectrum disorders:a reanalysis of the Danish adoptee study data. *Am J Psychiatry* 1983;140:1167-71.

Lundstrom K, Turpin MP. Proposed schizophreniarelated gene polymorphism: expression of the Ser9Gly mutant human dopamine D3 receptor with the Semliki Forest virus system. *Biochem Biophys Res Commun.*1996;225:1068-72.

Maier W, Mingos J, Eckstein N. Genetic relationship between dopamine transporter gene and schizophrenia: linkage and association. *Schizophr Res.* 1996;20:175-80.

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

Mant R, Williams J, Ascherson P, Parfitt E, McGuffin P, Owen MJ. Relationship between homozygosity at the dopamine D3 receptor gene and schizophrenia. *Am J Med Genet.*1994;54:21-6.

McGuffin . *Psychiatry Genetics & Genomics.* New York: Oxford University Press. Inc.; 2002.

[McGuffin P, Farmer A, Harvey I](#). A polydiagnostic application of operational criteria in studies of psychotic illness. Development and reliability of the OPCRIT system. *Arch Gen Psychiatry*. 1991;48:764-70.

McKeigue PM, Carpenter JR, Parra EJ, Shriver MD. Estimation of admixture and detection of linkage in admixed populations by a Bayesian approach: application to African American populations. *Ann Hum Genet*. 2000;64:171-86.

Meira-Lima IV, Michelon L, Cordeiro Q, Cho HJ, Vallada H. Allelic association analysis of the functional insertion/deletion polymorphism in the promoter region of the serotonin transporter gene. *J Mol Neurosci*. 2005;27:219-24.

Mendes de Oliveira JR, Otto PA, Vallada H, Lauriano V, Elkis H, Lafer B, Zatz M. Analysis of a novel functional polymorphism within the promoter region of the serotonin transporter gene (5-HTT) in Brazilian patients affected by bipolar disorder and schizophrenia. *Am J Med Genet*. 1998;81:225-7.

Messas GP. Análise do papel do polimorfismo Bal I (Ser9Gly) do gene do receptor dopaminérgico subtipo 3 (DRD3) na dependência de cocaína [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2001.

Mill J, Sagvolden T, Asherson P. Sequence analysis of Drd2, Drd4, and Dat1 in SHR and WKY rat strains. *Behav Brain Funct*. 2005;1:24.

Miller SA, Dykes DD, Polesky, HF. A Single salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16:1215.

Mitchell P, Mackinnon A, Waters B. The genetics of bipolar disorder. *Australian and N Z J Psychiatry*. 1993;27:560-80.

[Molero P, Ortuno F, Zalacain M, Patino-Garcia A.](#) Clinical involvement of catechol-O-methyltransferase polymorphisms in schizophrenia spectrum disorders: influence on the severity of psychotic symptoms and on the response to neuroleptic treatment. *Pharmacogenomics J.* 2007;13.

Morimoto K, Miyatake R, Nakamura M, Watanabe T, Hirao T, Suwaki H. Delusional disorder. Molecular genetic evidence for dopamine psychosis. *Neuropsychopharmacology.* 2002;26:794-801.

Murphy DL, Brodie HK, Goodwin FK, Bunney WE. Regular induction of hypomania by L-DOPA in bipolar manic-depressive patients. *Nature.* 1971;229:135-36.

Nanko S, Sasaki T, Fukuda R, Hattori M, Dai XY, Kazamatsuri H. A study of the association between schizophrenia and the dopamine D3 receptor gene. *Hum Genet.* 1993;92:336-8.

Neville MJ, Johnstone EC, Walton RT. Identification and characterization of ANKK1: a novel kinase gene closely linked to DRD2 on chromosome band 11q23.1. *Hum Mutat.* 2004;23:540-5.

[Nicodemus KK, Kolachana BS, Vakkalanka R, Straub RE, Giegling I, Egan MF, Rujescu D, Weinberger DR.](#) Evidence for statistical epistasis between catechol-O-methyltransferase (COMT) and polymorphisms in RGS4, G72 (DAOA), GRM3, and DISC1: influence on risk of schizophrenia. *Hum Genet.* 2007;120:889-906.

Nimgaonkar VL, Sanders AR, Ganguli R, Zhang XR, Brar J, Hogge W . Association study of schizophrenia and the dopamine D3 receptor gene locus in two independent samples. *Am J Med Genet.* 1996;67:505-14.

- Nimgaonkar VL, Zhang XR, Caldwell JC, Ganguli R, Chakravati A. Association study of schizophrenia with dopamine D3 receptor gene polymorphism: probable effect of family history of schizophrenia? *Am J Med Genet.* 1993;48:214-7.
- Noble EP. The DRD2 gene in psychiatric and neurological disorders and its phenotypes. *Pharmacogenomics.* 2000;1:309-33.
- Nordstrom AL, Farde L, Eriksson L, Halldin C. No elevated dopamine receptors in neuroleptic-naïve schizophrenic patients revealed by positron emission tomography and N-methylspiperone. *Psychiatry Res.* 1995;61:67-83.
- Norton, N, Owen, MJ. Can we find the genes that predisposes to schizophrenia? In: McDonald C, Schulze K, Murray RM, Wright P. Schizophrenia: challenging the orthodox. p. 17-22. London: Taylor & Francis Group, 2004.
- Nöthen MM, Cichon P, Propping P, Fimmers R, Schwab SG, Wildenauer DB. Excess of homozygosity at the dopamine D3 receptor gene in schizophrenia not confirmed. *J Med Genet.* 1993;30:708.
- Nunokawa A, Watanabe Y, Muratake T, Kaneko N, Koizumi M, Someya T. No associations exist between five functional polymorphisms in the catechol-O-methyltransferase gene and schizophrenia in a Japanese population. *Neurosci Res.* 2007;7.
- Ohara K, Nagai M, Tani K, Nakamura Y, Ino A, Ohara K. Functional polymorphism of -141C ins/del in the dopamine D2 receptor gene promoter and schizophrenia. *Psychiatry Res.* 1998;81:117-23.

- Ohara K, Nakamura Y, Xie DW, Ishigaki ZL, Tani K. Polymorphisms of dopamine D2-like (D2, D3 and D4) receptors in schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 1996;40:1209-17.
- Ospina-Duque J, Duque C, Carvajal-Carmona L, Ortiz-Barriento D, Soto I, Pineda N. An association study of bipolar mood disorder (type I) with the 5-HTTLPR serotonin transporter polymorphism in a human population isolate from Colombia. *Neurosc Lett*. 2000;292:199-202.
- Ott J. Methods of analysis and resources available for genetic trait mapping. *J Hered*. 1999;90:68-70.
- Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:177-82.
- Parsons MJ, Mata I, Beperet M, Iribarren-Iriso F, Arroyo B, Sainz R, Arranz MJ, Kerwin R. A dopamine D2 receptor gene-related polymorphism is associated with schizophrenia in a Spanish population isolate. *Psychiatr Genet*. 2007;17:159-63.
- Persico AM, Macciardi F. Genotypic association between dopamine transporter gene polymorphisms and schizophrenia. *Am J Med Genet*. 1997;74:53-7.
- Persico AM, Wang ZW, Black DW, Andreasen NC, Uhl GR, Crowe RR. Exclusion of close linkage of the dopamine transporter gene with schizophrenia spectrum disorders. *Am J Psychiatry*. 1995;152:134-6.

Pfaff CL, Parra EJ, Bonilla C, Hiester K, McKeigue PM, Kamboh MI, Hutchinson RG, Ferrell RE, Boerwinkle E, Shriver MD. Population structure in admixed populations: effect of admixture dynamics on the pattern of linkage disequilibrium. *Am J Hum Genet.* 2001;68:198-207.

Prasad S, Dashpande SN, Bhatia T, Wood J, Nimgoankar VL, Thelma BK. Association study of schizophrenia among Indian families. *Am J Med Genet.* 1999;88:298-300.

Prescott C, Gottesman I. Genetically mediated vulnerability to schizophrenia. *Psych Clin North America.* 1993;16:245-66.

Pritchard JK. Are rare variants responsible for susceptibility to common diseases? *Am J Hum Genet.* 2001;69:124–137.

Saha N, Tsoi WF, Low PS, Basair J, Tay JSH. Lack of association of the dopamine D3 receptor gene polymorphism (Bal I) in Chinese schizophrenic males. *Psychiatr Genet.* 1994;4:201-4.

Salem JE, Kring AM. The role of gender differences in the reduction of etiologic heterogeneity in schizophrenia. *Clin Psychol Rev.* 1998;18:795-819.

[Sand P, Stortebecker P, Langguth B, Hajak G, Eichhammer P.](#) No evidence for gender-specific sharing of COMT alleles in schizophrenia. *Psychiatr Prax.* 2004;31:58-60.

Sanders AR, Rincon-Limas DE, Chakraborty R, Grandchamp B, Hamilton JD, Fann WE, Patel PI. Association between genetic variation at the porphobilinogen deaminase gene and schizophrenia. *Schizophr Res.* 1993;8:211-21.

Schindler KM, Pato MT, Dourado A, Macedo A, Azevedo MH, Kennedy JL, Pato CN. Association and linkage disequilibrium between a functional polymorphism of the dopamine-2 receptor gene and schizophrenia in a genetically homogeneous Portuguese population. *Mol Psychiatry*. 2002;7:1002–5.

Schneider K. Psicopatologia clínica. Editora Mestre Jou, tradução da sétima edição alemã, 1968.

Seeman P, Guan HC, van Tol HHM. Dopamine D4 receptors elevated in schizophrenia. *Nature*. 1993;365:441-5.

Seeman, P. Atypical antipsychotics: mechanism of action. *Can. J. Psychiatry*. 2002;47:27-38.

Segman R, Heresco-Levy U, Finkel B, Inbar R, Neeman T, Schlafman M. Association between the serotonin 2C receptor gene and tardive dyskinesia in chronic schizophrenia: additive contribution of 5-HT_{2C}ser and DRD₃gly alleles to susceptibility. *Psychopharmacology*. 2000;152:408-13.

Segman R, Neeman T, Heresco-Levy U, Finkel B, Karagichev L, Schlafman M. Genotypic association between the dopamine D3 receptor and tardive dyskinesia in chronic schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 1999;4:247-53.

Semwal P, Prasad S, Bhatia T. Family-based association studies of monoaminergic gene polymorphisms among North Indians with schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 2001;6:220-4.

Semwal P, Prasad S, Varma PG, Bhagwat AM, Deshpande SN, Thelma BK. Candidate gene polymorphisms among North Indians and their association with schizophrenia in a case-control study. *J Genet*. 2002;81:65-71.

Shaikh S, Collier DA, Sham PC, Ball D, Aitchison K, Vallada H. Allelic association between a Ser-9-Gly polymorphism in the dopamine D3 receptor gene and schizophrenia. *Hum Genet.* 1996;97:714-9.

Sham P. Transmission/disequilibrium tests for multiallelic loci. *Am J Hum Genet.* 1997;61:774-8.

Sham PC, Curtis D. Monte Carlo tests for associations between disease and alleles at highly polymorphic loci. *Ann Hum Genet.* 1995;59:97-105.

Sherrington R, Brynjolfsson J, Petursson H, Potter M, Dudleston K, Barraclough B. Localization of a susceptibility locus for schizophrenia on chromosome 5. *Nature* 1988;336:164-7.

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

Siegel, J. *Estatística não-paramétrica*. São Paulo: Editora McGraw Hill do Brasil; 1981.

Sokoloff P, Giros B, Martres MP, Bouthernet ML, Schwartz JL. Molecular cloning and characterisation of a novel dopamine receptor (D3) as a novel target for neuroleptics. *Nature.* 1990;347:146-51.

Sokoloff P, Lannfelt L, Martres MP, Giros B, Bouthernet ML, Schwartz JC. The third dopamine receptor (D3) as a novel target for antipsychotics. *Biochem Pharmacol.* 1992;43: 659-66.

Spielman RS, Ewens WJ. The TDT and other family-based tests for linkage disequilibrium and association. *Am J Hum Genet.* 1996;59:983-9.

Spitzer RL, Endicott J, Robins E. Research diagnostic criteria: rationale and reliability. *Arch Gen Psychiatry.* 1978;35:773-82.

Spurlock G, Williams J, McGuffin P, Aschauer HN, Lenzinger E, Fuchs K, . European Multicentre Association Study of Schizophrenia: a study of the DRD2 Ser3 and DRD3 Ser9Gly polymorphisms. *Am J Med Genet.* 1998;81:24-8.

[St Clair D](#), [Blackwood D](#), [Muir W](#), [Carothers A](#), [Walker M](#), [Spowart G](#), [Gosden C](#), [Evans HJ](#). Association within a family of a balanced autosomal translocation with major mental illness. [Lancet.](#) 1990;336:13-6.

Statistical Package for Social Sciences (SPSS) for windows 10.0.1. Standard Version, Chicago (IL); 1999.

Steen VM, Lovlie R, MacEwan T, McCreadie RG. Dopamine D3-receptor gene variant and susceptibility to tardive dyskinesia in schizophrenia patients. *Mol Psychiatry.* 1997;2:139-45.

[Stober G](#), [Jatzke S](#), [Heils A](#), [Jungkunz G](#), [Knapp M](#), [Mössner R](#), [Riederer P](#), [Lesch KP](#). Insertion/deletion variant (– 141C ins/del) in the 50 regulatory region of the dopamine D2 receptor gene: lack of association with schizophrenia and bipolar disorder. *J Neural Transm.* 1998;105:101.

Suzuki A, Kondo T, Mihara K, Furukori H, Nagashima U, Ono S, Otani K, Kaneko S. Association between Taq1 a dopamine D2 receptor polymorphism and psychopathology of schizophrenia in Japanese patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2000;24:1105-13.

[Talkowski ME, Mansour H, Chowdari KV, Wood J, Butler A, Varma PG, Prasad S, Semwal P, Bhatia T, Deshpande S, Devlin B, Thelma BK, Nimgaonkar VL.](#) Novel, replicated associations between dopamine D3 receptor gene polymorphisms and schizophrenia in two independent samples. *Biol Psychiatry*. 2006;60:570-7.

Tallerico T, Ulpian C, Liu IS. Dopamine D2 receptor promoter polymorphism: no association with schizophrenia. *Psychiatry Res*. 1999;85:215.

Tienari P, Wynne LC, Laksy K, Moring J, Nieminen P, Sorri A. Genetic boundaries of the schizophrenia spectrum: evidence from the Finnish adoptive family study of schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 2003;160:1587-94.

Tienari P. A psychiatric twin study: Preliminary Report. *Acta Psychiatr Scand*. 1963;39:393-7.

Tunbridge EM, Harrison PJ, Weinberger DR. Catechol-O-methyltransferase, cognition, and psychosis: Val(158)Met and beyond. *Biol Psychiatry*. 2006;60:141-51.

[Tycko B, Lee JH, Ciappa A, Saxena A, Li CM, Feng L, Arriaga A, Stern Y, Lantigua R, Shachter N, Mayeux R.](#) APOE and APOC1 promoter polymorphisms and the risk of Alzheimer disease in African American and Caribbean Hispanic individuals. *Arch Neurol*. 2004;61:1434-9.

Vallada H, Samaia H. Esquizofrenia. *Rev Bras Psiquiatr*. 2000;22:2-4.

Ventriglia M, Bocchio Chiavetto L, Bonvicini C, Tura GB, Bignotti S, Racagni G. Allelic variation in the human prodynorphin gene promoter and schizophrenia. *Neuropsychobiology*. 2002;46:17-21.

[Virgos C, Martorell L, Valero J, Figuera L, Civeira F, Joven J, Labad A, Vilella E.](#) Association study of schizophrenia with polymorphisms at six candidate genes. *Schizophr Res.* 2001;49:65-71.

[Vogel M, Pfeifer S, Schaub RT, Grabe HJ, Barnow S, Freyberger HJ, Cascorbi I.](#) Decreased levels of dopamine D3 receptor mRNA in schizophrenic and bipolar patients. *Neuropsychobiology.* 2004;50:305-10.

Waldman ID, Robinson BF, Feigon SA. Linkage disequilibrium between the dopamine transporter gene (DAT1) and bipolar disorder: extending the transmission disequilibrium test (TDT) to examine genetic heterogeneity. *Genet Epidemiol.* 1997;14:699-704.

Weiss ST, Silverman EK, Palmer LJ. Editorial: case-control association studies in pharmacogenetics. *Pharmacogenomics J.* 2001;1:15715-8.

White HL, McLeod MN, Davidson JR. Catechol O-methyltransferase in red blood cells of schizophrenic, depressed, and normal human subjects. *Br J Psychiatry.* 1976;128:184-7.

Williams J, Spurlock G, Holmans P, Mant R, Murphy K, Jones L, . A metaanalysis and transmission disequilibrium study of association between the dopamine D3 receptor gene and schizophrenia. *Mol Psychiatry.* 1998;3:141-9.

Wing JK, Cooper JE, Sartorius N. The measurement and classification of psychiatric symptoms: an instruction manual for the present state examination and CATEGO program. Cambridge: Cambridge Univ Press; 1974.

Yang L, Weise C, Lannfelt L, Sokoloff P, Xu CT, Zeng Z. No association between schizophrenia and homozygosity at the D3 dopamine receptor gene. *Am Med Genet.* 1993;48:83-6.

[Yu R, Zhang XN, Huang XX, Ding SP, Li JC.](#) Association analysis of COMT polymorphisms and schizophrenia in a Chinese Han population: A case-control study. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2007;144:570-3.