

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

**ESTUDIO DE INTERACCIÓN ENTRE EL RECEPTOR
A DOPAMINA TIPO 4 (DRD4) Y EL TRANSPORTADOR
A DOPAMINA (DAT1), EN RELACIÓN AL TRASTORNO
POR DÉFICIT DE ATENCIÓN E HIPERACTIVIDAD Y SUS
COMORBILIDADES**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A :

GABRIELA ARIADNA MARTÍNEZ LEVY

DIRECTOR DE TESIS: DR. CARLOS SABÁS CRUZ FUENTES

MÉXICO D.F.,

ENERO 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

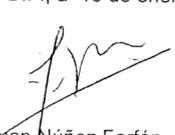
Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 20 de octubre de 2008, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL) de la alumna MARTÍNEZ LEVY GABRIELA ARIADNA con número de cuenta 98062535 con la tesis titulada "Estudio de interacción entre el receptor a dopamina tipo 4 (DRD4) y el transportador a dopamina (DAT1), en relación al Trastorno por Déficit de Atención e Hiperactividad y sus comorbilidades", realizada bajo la dirección del DR. CARLOS SABÁS CRUZ FUENTES:

Presidente: DRA. LORENA SOFIA OROZCO OROZCO
Vocal: DRA. MILAGROS MÉNDEZ UBACH
Secretario: DR. CARLOS SABÁS CRUZ FUENTES
Suplente: M. en C. BEATRIZ ELENA CAMARENA MEDELLIN
Suplente: DR. JULIO MORÁN ANDRADE

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 16 de enero de 2009.



Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente de la interesada.

Estudio de interacción entre el receptor a dopamina tipo 4 (DRD4) y el transportador a dopamina (DAT1), en relación al Trastorno por Déficit de Atención e Hiperactividad y sus comorbilidades.

Estudiante: Biol. Gabriela Ariadna Martínez Levy

Asesor: Dr. Carlos Sabás Cruz Fuentes

Sinodales:

Presidente: Dra. Lorena Sofía Orozco Orozco

Vocal: Dra. Milagros Méndez Ubach

Secretario: Dr. Carlos Sabás Cruz Fuentes

Suplente: M. en C. Beatriz Elena Camarena Medellín.

Suplente: Dr. Julio Morán Andrade

Posgrado en Ciencias Biológicas

Área: Experimental

Entidad: Facultad de Medicina

Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradecimientos:

Al posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por darme las herramientas académicas necesarias para desarrollar este trabajo.

A CONACYT por el apoyo económico recibido que me permitió dedicarle tiempo completo a la realización del presente trabajo.

Al proyecto de CONACYT SEP-2004-COI-46594 y al fondo de apoyo a la investigación del Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz” por el apoyo económico recibido para la realización de este proyecto.

Al Dr. Carlos Cruz por haberme dado todas las herramientas, el apoyo y la confianza para poder desarrollar el presente trabajo; y a los miembros de mi comité sinodal la Dra. Méndez, el Dr. Moran, la Dra. Orozco y la M. en C. Camarena por haber leído el presente trabajo y permitirme mejorarlo gracias a sus comentarios.

Agradecimientos:

A todos los miembros del laboratorio de Genética Psiquiátrica y en especial a Magdalena Briones, Ariadna Gómez y Alejandro Aguilar por todo su apoyo en el trabajo técnico que me ayudaron a realizar para terminar el presente estudio. No olvido tampoco a Carlos Vázquez que siempre estuvo atento a lo que se necesitaba para terminar a tiempo cualquier experimento.

A la Dra. Teresa Fortoul y a todo su laboratorio por haber siempre confiado en mi y haberme dado en un pasado muy cercano todas las herramientas que me han permitido llegar hasta donde estoy.

Dedicatoria:

Con mucho cariño:

A mi madre, padre y hermano

A mi abuelita Eva

A mis abuelos Rosa y Gabino

INDICE:

I. Justificación personal para la realización de la presente Tesis

II. Resumen en Inglés.....

III. Resumen en español.....

IV. Antecedentes.....

 1. Genética y trastornos psiquiátricos:

 2. Trastorno por Déficit de Atención/Hiperactividad (TDAH)

 2.1 Generalidades.....

 2.2 Comorbilidad en el TDAH.....

 2.3 Etiología del TDAH

 2.4 Heredabilidad del TDAH:.....

 2.5 Genética del TDAH.....

 2.5.1 Genes asociados al TDAH

 2.5.2 Estudios de ligamiento genético:.....

 2.5.3 Estudios de asociación

 2.6 Asociación entre el *DRD4* y el *DAT1* en pacientes con TDAH.....

 2.6.1 Receptor a Dopamina D4 (*DRD4*).....

 2.6.2 Transportador de Dopamina 1 (*DAT1*):

 2.6.3 Relación entre el TDAH y los polimorfismos tipo VNTR de los genes *DRD4* y *DAT1*:.....

 2.6.4 Relación entre las comorbilidades del TDAH y los polimorfismos tipo VNTR de los genes *DRD4* y *DAT1*:.....

V. Justificación

VI. Objetivos

 1. Objetivo General.....

2. Objetivos particulares.....	
VII. Hipótesis.....	
IX. Materiales y Métodos.....	
1. Sujetos	
2. Análisis Molecular	
3. Análisis estadístico.....	
X. Resultados.....	
1. Características de los grupos de casos y controles.....	
2. Integridad del ADN:.....	
3. Discriminación alélica:.....	
5. Asociación de los genes DRD4 y DAT1, pacientes con TDAH y sus comorbilidades	
6. Análisis de interacción genética entre el DRD4 y el DAT1 en pacientes con TDAH y sus comorbilidades.....	
XI. Discusión.....	
1. Frecuencias alélicas de la población control del presente estudio, en comparación con otras poblaciones.....	
2. Asociación entre DRD4 y DAT1 en pacientes con TDAH.....	
3. Análisis de interacción entre el DRD4 y el DAT1 en pacientes con TDAH y sus comorbilidades.....	
XII. Conclusiones:	
XIII Perspectivas:	
ANEXO:.....	
XIV. Referencias:	
1.	

I. Justificación personal para la realización de la presente Tesis

El Trastorno por Déficit de Atención e Hiperactividad (TDAH) es un desorden psiquiátrico, multifactorial y complejo, que afecta la vida social, académica y familiar de las personas que lo presentan. Aunque tiene su inicio en la infancia, recientemente se ha reportado que muchos de los pacientes continúan con los síntomas en la adolescencia y la vida adulta, etapas en la que se asocia con problemas de adicciones y comportamiento antisocial. En conclusión, la presencia de dicho trastorno afecta significativamente la vida de quienes lo padecen.

Algunos investigadores consideran que muchas de las conductas características del TDAH se encuentran asociadas con un rasgo de la personalidad conocido como “búsqueda de lo novedoso”. El polimorfismo que mas frecuentemente se ha asociado con estos fenotipos, se propone que apareció hace miles de años, en la época de la migración humana desde África hacia otras regiones del planeta y por lo tanto estas características parecen haber jugado un papel importante en la evolución humana. Sin embargo, se ha propuesto que en el entorno de las sociedades modernas, estos mismos comportamientos (hiperactividad e impulsividad) pueden afectar la vida de los individuos que los presentan. Así, el propósito de desarrollar un trabajo de tesis en relación a la variabilidad genética asociada a un trastorno mental como el TDAH, concuerda con mis intereses como Bióloga de intentar conocer las bases biológico-moleculares de la conducta humana y sus implicaciones sobre los trastornos psiquiátricos.

II. Resumen en Inglés

Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) is a clinically complex and multifactorial psychiatric disorder of inattention, hyperactivity and impulsivity. Family, twin and adoption studies suggest a genetic influence in the etiology of ADHD. Two variable number of tandem repeats (VNTR) polymorphic systems have been frequently associated with this disorder: the 7 repeat (R) allele in exon 3 of the dopamine receptor D4 (DRD4) and the 10R allele located in the 3' untranslated region (UTR) of the dopamine transporter (DAT1).

We conducted a case-control association study between ADHD and these polymorphisms in a group of adolescent inhabitants of the metropolitan area of Mexico City. In addition, we evaluated the interaction between these genes, the disorder and its associated psychiatric comorbidities.

No positive association between ADHD and the 7R allele of DRD4 or the 10R allele of DAT1 was observed; however, compared to controls, patients with internalized comorbidities had a lesser frequency of genotypes with the 7R allele of DRD4 and the 10/10 genotype of DAT1. A logistic regression analysis showed that the simultaneous absence of the 10/10 DAT1 and 7/7 DRD4 genotypes predicts membership to the group of ADHD patients with internalized comorbidities (e.g. Anxiety, Depression).

Our results highlight the importance of cross-ethnic research and the possibility of a distinct genetic basis that underlies the type of comorbidities associated with ADHD. This result should be considered in terms of the study design, and further replication is necessary in an independent sample.

III. Resumen en español

El Trastorno por Déficit de Atención e Hiperactividad (TDAH) es un desorden psiquiátrico complejo y multifactorial, que se caracteriza por inatención, hiperactividad e impulsividad. Las características diagnósticas de este trastorno mental se comienzan a observar en la infancia, en donde los pacientes presentan graves problemas en su vida social, familiar y educativa. En las últimas décadas se ha demostrado que el TDAH persiste en la adolescencia y en la edad adulta, etapas en las que se asocia frecuentemente con problemas de adicciones y comportamiento antisocial.

Es importante destacar que este trastorno psiquiátrico rara vez se presenta en su forma pura; generalmente se presenta junto con otros desórdenes mentales. Esta comorbilidad se puede dar tanto con trastornos del espectro externalizado (i.e. el Trastorno Opositor Desafiante, el Trastorno de Conducta) y/o trastornos del espectro internalizados (i.e. Trastornos del estado de ánimo, como la Depresión Mayor o los Trastornos de Ansiedad). En este sentido, se ha propuesto que el análisis de las comorbilidades puede ayudarnos a definir distintos subtipos clínicos del TDAH.

Hasta el momento no se conoce la etiología de este desorden mental. No obstante, se considera que debe existir una interacción importante entre factores genéticos y ambientales. Lo anterior se sustenta por los estudios en familias, en gemelos y en sujetos dados en adopción. A partir de los estudios en gemelos, se ha calculado que la heredabilidad de este trastorno mental es de alrededor de 0.8; sin embargo, hasta el momento no se han identificado fehacientemente los genes asociados al TDAH. En este sentido gran parte de la investigación se ha enfocado al análisis de genes candidatos.

A partir de estudios farmacológicos, de neuroimagen y en modelos animales, se ha sugerido que los pacientes con TDAH presentan una disfunción en el sistema de neurotransmisión dopaminérgico, que puede explicar parcialmente tanto algunos de los síntomas cardinales del trastorno, cómo la eficacia terapéutica de los fármacos empleados en su tratamiento. Esta evidencia en su conjunto sustenta la realización de estudios de la variabilidad genética de diversas moléculas involucradas en este sistema de comunicación neural. En particular, dos polimorfismos del tipo de Número Variable de Repetidos en Tándem (VNTR) se han asociado frecuentemente con el TDAH: el alelo de 7 repetidos (R) del gen del Receptor a dopamina D4 (*DRD4*) y el alelo de 10R del gen del Transportador de Dopamina (*DAT1*).

Es importante destacar que la mayoría de los estudios en los que se han encontrado estas asociaciones han analizado poblaciones de origen caucásico y que las frecuencias alélicas para ambos polimorfismos difieren significativamente entre distintos grupos étnicos. Asimismo se ha reportado que el alelo asociado a un trastorno psiquiátrico puede variar de acuerdo a la población estudiada, y existe evidencia que sugiere que un mismo alelo o genotipo puede tener efectos fenotípicos opuestos dependiendo del grupo étnico estudiado. Todo lo anterior justifica realizar este tipo de análisis en distintas poblaciones.

El objetivo del presente estudio fue el de llevar a cabo un estudio de asociación entre el TDAH y los dos polimorfismos previamente descritos. Para ello se analizó la variabilidad genética del exón 3 del *DRD4* y de la región 3' no traducida del *DAT1*; además se evaluó la interacción entre ambos polimorfismos en relación con el diagnóstico clínico de TDAH y sus comorbilidades.

No se observó la asociación previamente reportada en población caucásica, entre el alelo de 7R del gen *DRD4* y el alelo de 10R del gen *DAT1* con el TDAH. Sin embargo, por un análisis de regresión logística, encontramos que la ausencia simultánea del genotipo 7/7 del gen *DRD4* y del genotipo 10/10 del gen *DAT1* esta asociada con la presencia del TDAH ($p = 0.04$). Además, en el análisis de las comorbilidades, la ausencia de estos mismos genotipos se asocia al grupo de pacientes TDAH con al menos un trastorno internalizado (grupos internalizado + mixto) ($p = 0.01$).

El presente estudio refleja la importancia de la investigación genética en los diferentes grupos étnicos y propone un modelo de interacción genética para el TDAH. Asimismo, nuestros resultados sugieren que los factores genéticos asociados al TDAH no necesariamente son iguales de acuerdo a las comorbilidades presentes.

IV. Antecedentes

1. Genética y trastornos psiquiátricos:

Los estudios con familias, con gemelos y con sujetos dados en adopción, han proporcionado evidencia fehaciente de que los genes tienen un papel importante en la manifestación de los trastornos psiquiátricos [Asherson y Curran, 2001; Kirley *et al.*, 2002]. Estos padecimientos presentan un patrón de herencia compleja, lo que indica que su etiopatogenia parece ser explicada por la interacción de múltiples variantes genéticas con el ambiente [Merikangas y Swendsen, 1997; Caspi y Moffitt, 2006].

Se han clonado múltiples genes, cuyos productos son de gran relevancia para el funcionamiento adecuado del Sistema Nervioso Central (SNC) [Nicolini *et al.*, 1993; Oak *et al.*, 2000], en la secuencia de estos genes se han descrito una gran cantidad de variantes o polimorfismos que pueden afectar la expresión y/o estructura de la molécula transcrita. Estas variaciones en la secuencia del ADN pueden llegar a provocar un cambio en el funcionamiento normal del SNC y, por lo tanto, influir sobre los elementos emocionales, cognitivos y conductuales que son cardinales en la expresión de los síntomas o rasgos asociados a un tipo particular de trastorno psiquiátrico.

La forma en la que los genes producen este efecto es aún desconocida y a diferencia de los trastornos mendelianos en donde un gen explica una enfermedad, en los padecimientos complejos como los trastornos psiquiátricos, es necesaria la interacción de varios genes con el ambiente (Figura 1) [Merikangas y Risch, 2003; Baca y Orozco, 2004; Caspi y Motiff, 2006]. Asimismo, es importante tomar en cuenta muchas otras variables asociadas a los trastornos heredables; como por ejemplo, la penetrancia (i.e. la frecuencia con la que una

variante genética se exprese en la población), la pleiotropía (i.e. la capacidad de un gen de manifestar diferentes fenotipos simultáneamente), la expresividad (i.e. el grado de influencia de un gen sobre un fenotipo), la poligénia (i.e. la contribución simultánea de varios genes en la presencia de un trastorno) y la epigenética (i.e. cambios no relacionados con la secuencia del ADN que afecta la regulación de la expresión genética, como la metilación del ADN, modificaciones histónicas, entre otras) [Guttmacher y Collins, 2002; Merikangas y Risch, 2003]. Aunado a todo lo anterior existe el problema de la alta comorbilidad (i.e. la alta probabilidad de que dos o más trastornos se presenten conjuntamente) presente en los padecimientos psiquiátricos que pueden enmascarar las características genéticas asociadas a un trastorno en particular [Merikangas y Risch, 2003; Caspi y Moffitt, 2006].

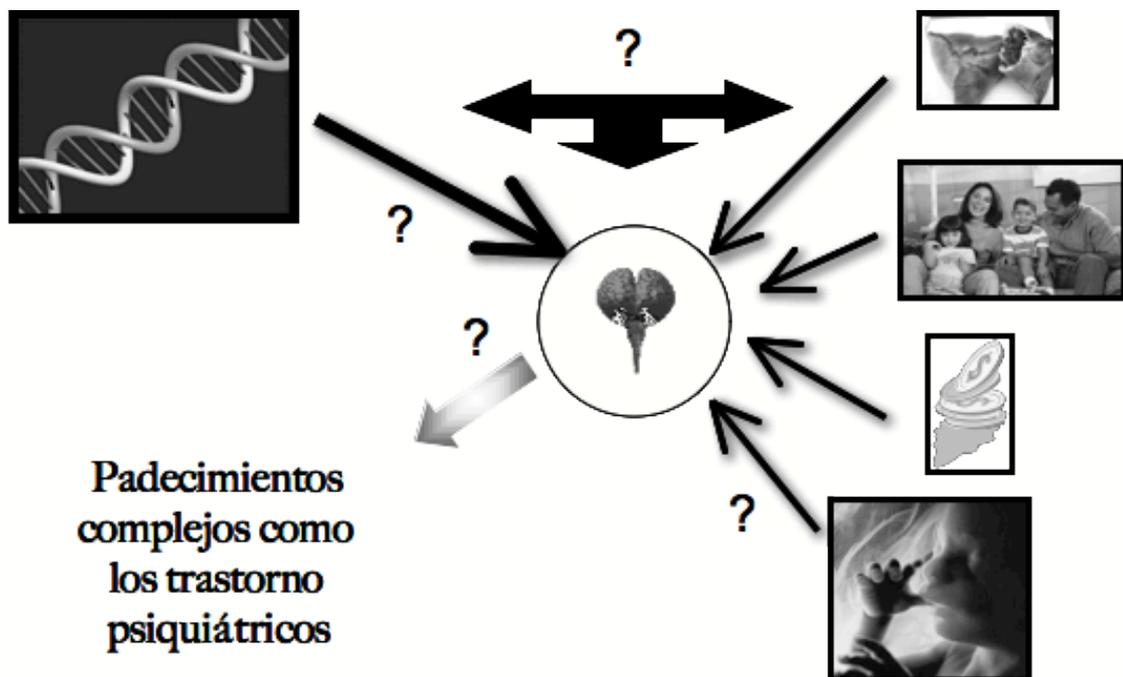


Figura 1: Estudio de las enfermedades complejas. Este esquema intenta reflejar la complejidad de los estudios de genética psiquiátrica, debido a que aún no conocemos los factores que deben presentarse para que una o muchas variantes genética generen un fenotipo como los trastornos mentales.

Específicamente, los genes que participan en el funcionamiento del sistema dopaminérgico cerebral, han sido considerados como interesantes candidatos relacionados con la manifestación de diversas enfermedades mentales, como se describirá con detalle más adelante. Entre los trastornos psiquiátricos asociados a una disfunción de este sistema de neurotransmisión están la esquizofrenia, el abuso de sustancias y el trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH) [Nicolini *et al.*, 1993; Oak *et al.*, 2000; Kirley *et al.*, 2002], siendo este último padecimiento el que se abordará en el presente trabajo.

2. Trastorno por Déficit de Atención/Hiperactividad (TDAH)

2.1 Generalidades

El TDAH es el desorden psiquiátrico que se diagnostica más frecuentemente en los niños, con una prevalencia de por vida del 7 al 17% en la población mundial [Khan y Faraone, 2006; Stefanatos y Baron, 2007]. Se ha reportado que entre 3 al 5% de los niños en edad escolar de nuestro país desarrollan este trastorno [Ortiz-Luna y Aclé-Tomasini, 2006]. En la ciudad de México, un estudio epidemiológico reciente indica que la prevalencia de por vida según el reporte del adolescente es de al menos del 2.4% [Benjet *et al.*, 2008].

El TDAH ha sido definido como un padecimiento de aparición en la infancia. Sin embargo, recientemente se ha reportado que del 50 al 80% de los niños afectados siguen manifestando los síntomas en la adolescencia y la vida adulta [Faraone y Biederman, 2002; Spencer *et al.*, 2002; Comings *et al.*, 2005; Stefanatos y Baron, 2007].

Las características clínicas cardinales para establecer el diagnóstico del TDAH son la inatención, la impulsividad y la hiperactividad motora [Stefanatos y Baron, 2007; Swanson *et*

al., 2007]:

Inatención: Se caracteriza por dificultad en concentrarse. Estos pacientes se distraen fácilmente con pensamientos, sonidos y objetos irrelevantes. Su rendimiento varía dependiendo de la naturaleza de la actividad que se les ha pedido realizar, es decir, ponen atención de manera automática a actividades que les gusta realizar, pero les es complicado atender a detalles de planeación y organización, al igual que llevar a cabo algunas tareas en un tiempo definido y aprender cosas nuevas.

Impulsividad: Estos individuos tienen dificultad en pensar antes de actuar, responden a preguntas antes de que éstas se les hallan formulado por completo y se impacientan al esperar su turno para realizar alguna actividad.

Hiperactividad: A estos sujetos les es difícil mantenerse sentados por largo tiempo, se mueven continuamente en sus asientos, juegan con sus lápices, menean sus pies y tocan todo lo que encuentran. Son inquietos y nerviosos. Generalmente brincan de una actividad a otra tratando de hacer más de una cosa a la vez.

Es importante destacar que según la clasificación basada en el DSM IV-R (de sus siglas en inglés: Diagnostic and Statistical Manual of Mental disorders IV revised, American Psychiatric Association) (Figura 2), para tener un diagnóstico sólido es necesario presentar 6 o más síntomas de falta de atención y/o hiperactividad-impulsividad, por lo menos durante 6 meses, con una intensidad que es inadecuada en relación con el nivel de desarrollo [Stefanatos y Baron, 2007; Swanson *et al.*, 2007].

Estos síntomas en conjunto generan graves problemas en la vida social, familiar y académica de los pacientes [Faraone y Biederman, 2002; Spencer *et al.*, 2002; McGough, 2005;

Bierderman *et al.*, 2006; Stefanatos y Baron, 2007]. Además, en los jóvenes y en los adultos afectados se añaden problemas de adicción y comportamiento antisocial [Faraone y Biederman, 2002; Spencer *et al.*, 2002; Stefanatos y Baron, 2007].

Criterios del DSM-IV para el diagnóstico de Trastorno por Déficit de Atención e Hiperactividad.

- A. (1) o (2):
- (1) seis (o más) de los siguientes síntomas de **desatención** han persistido por lo menos durante 6 meses con una intensidad que es desadaptativa e incoherente en relación con el nivel de desarrollo:
- Desatención*
- (a) a menudo no presta atención suficiente a los detalles o incurre en errores por descuido en las tareas escolares, en el trabajo o en otras actividades
 - (b) a menudo tiene dificultades para mantener la atención en tareas o en actividades lúdicas
 - (c) a menudo parece no escuchar cuando se le habla directamente
 - (d) a menudo no sigue instrucciones y no finaliza tareas escolares, encargos, u obligaciones en el centro de trabajo (no se debe a comportamiento negativista o a incapacidad para comprender instrucciones)
 - (e) a menudo tiene dificultades para organizar tareas y actividades
 - (f) a menudo evita, le disgusta o es renuente en cuanto a dedicarse a tareas que requieren un esfuerzo mental sostenido (como trabajos escolares o domésticos)
 - (g) a menudo extravía objetos necesarios para tareas o actividades (p. ej., juguetes, ejercicios escolares, lápices, libros o herramientas)
 - (h) a menudo se distrae fácilmente por estímulos irrelevantes
 - (i) a menudo es descuidado en las actividades diarias
- (2) seis (o más) de los siguientes síntomas de **hiperactividad-impulsividad** han persistido por lo menos durante 6 meses con una intensidad que es desadaptativa e incoherente en relación con el nivel de desarrollo:
- Hiperactividad*
- (a) a menudo mueve en exceso manos o pies, o se remueve en su asiento
 - (b) a menudo abandona su asiento en la clase o en otras situaciones en que se espera que permanezca sentado
 - (c) a menudo corre o salta excesivamente en situaciones en que es inapropiado hacerlo (en adolescentes o adultos puede limitarse a sentimientos subjetivos de inquietud)
 - (d) a menudo tiene dificultades para jugar o dedicarse tranquilamente a actividades de ocio
 - (e) a menudo «está en marcha» o suele actuar como si «tuviera un motor»
 - (f) a menudo habla en exceso
- Impulsividad*
- (g) a menudo precipita respuestas antes de haber sido completadas las preguntas
 - (h) a menudo tiene dificultades para guardar turno
 - (i) a menudo interrumpe o se inmiscuye en las actividades de otros (p. ej., se entromete en conversaciones o juegos)
- B. Algunos síntomas de hiperactividad-impulsividad o desatención que causaban alteraciones estaban presentes antes de los 7 años de edad.
- C. Algunas alteraciones provocadas por los síntomas se presentan en dos o más ambientes (p. ej., en la escuela [o en el trabajo] y en casa).
- D. Deben existir pruebas claras de un deterioro clínicamente significativo de la actividad social, académica o laboral.
- E. Los síntomas no aparecen exclusivamente en el transcurso de un trastorno generalizado del desarrollo, esquizofrenia u otro trastorno psicótico, y no se explican mejor por la presencia de otro trastorno mental (p. ej., trastorno del estado de ánimo, trastorno de ansiedad, trastorno disociativo o un trastorno de la personalidad).
- Códigos basados en el tipo:*
- F90.0 Trastorno por déficit de atención con hiperactividad, tipo combinado [314.01]:** si se satisfacen los Criterios A1 y A2 durante los últimos 6 meses
- F90.8 Trastorno por déficit de atención con hiperactividad, tipo con predominio del déficit de atención [314.00]:** si se satisface el Criterio A1, pero no el Criterio A2 durante los últimos 6 meses
- F90.0 Trastorno por déficit de atención con hiperactividad, tipo con predominio hiperactivo-impulsivo [314.01]:** si se satisface el Criterio A2, pero no el Criterio A1 durante los últimos 6 meses
- Nota de codificación.** En el caso de sujetos (en especial adolescentes y adultos) que actualmente tengan síntomas que ya no cumplen todos los criterios, debe especificarse en «remisión parcial».

*Tomado del DSMIV-R

Figura 2: Criterios diagnósticos del DSMIV para el TDAH y sus diferentes

2.2 Comorbilidad en el TDAH

El TDAH se presenta muy frecuentemente junto con otros trastornos psiquiátricos, característica a la que se le denomina comorbilidad (Tabla 1) [Rappley, 2005; Faraone y Biederman, 2002; Stefanatos y Baron, 2007; Acosta *et al.*, 2008]. Se ha estimado que entre el 60-90% de los niños y adolescentes con TDAH presentan al menos otro trastorno psiquiátrico, y alrededor del 20%, 3 o más [Stefanatos y Baron, 2007].

La comorbilidad se puede dar con trastornos del espectro externalizado [DSMIV-R; Stefanatos y Baron, 2007], los cuales se caracterizan por conductas desadaptativas que alteran el ámbito en el cual el individuo se desenvuelve, afectando negativamente la relación con las personas que rodean al paciente. Estas características permiten identificar de forma relativamente sencilla la presencia del trastorno, debido a que los sujetos asisten a consulta referidos por maestros o familiares. Entre estos desórdenes mentales encontramos el Trastorno de Conducta (TC) y el Trastorno Opositor Desafiante (TOD) [Sarason y Sarason, 2006].

Los pacientes con TDAH también pueden presentar comorbilidad con trastornos del espectro internalizado [DSMIV-R; Stefanatos y Baron, 2007]. En este caso, las características del desorden psiquiátrico no son necesariamente evidentes para las personas que rodean al paciente; es por lo anterior que su presencia muchas veces se pasa por alto. Los ejemplos más comunes son los Trastornos de Ansiedad o los Trastornos Depresivos [Sarason y Sarason, 2006].

Algunos pacientes pueden presentar comorbilidad tanto con trastornos del espectro externalizado como con desórdenes internalizados, y en este caso se les clasifica dentro del

subgrupo con comorbilidad mixta [DSMIV-R; Stefanatos y Baron, 2007].

Tabla 1: El TDAH es un trastorno que puede coexistir con otros trastornos mentales; algunos de ellos se presentan en la siguiente tabla.

Trastorno con los que presenta comorbilidad el TDAH.	Síntomas de TDAH, que pueden causar confusión.	Síntomas ajenos al TDAH, que definen la comorbilidad.	Dificultad para realizar un diagnóstico correcto.
Trastorno oposicionista desafiante	Comportamiento inadecuado, sobre todo en lo que respecta a seguir reglas. Incapacidad para cumplir ordenes.	Rebeldes o desafiantes, más que presentar una incapacidad para cooperar.	El comportamiento desafiante se asocia con una alta actividad motora. Presencia de mala relación con padres y maestros dificulta determinar los esfuerzos por obedecer.
Trastorno de conducta	Comportamiento inadecuado. Enfrentamiento con quien hace cumplir la ley y con los sistemas legales.	Ausencia de remordimientos. Intención para dañar, agresión y hostilidad. Conducta antisocial.	Las peleas y huidas pueden ser razonables en situaciones sociales adversas.
Trastorno de ansiedad	Falta de atención e inquietud. Dificultades con los cambios.	Preocupación excesiva y/o miedos. Obsesiones y/ compulsiones. Pesadillas.	La ansiedad puede causar un aumento en la actividad motora y falta de atención.
Trastorno depresivo	Irritabilidad. Impulsividad. Desmoralización.	Sentimientos generalizados y persistentes de irritabilidad o tristeza.	Puede ser complicado diferenciar la depresión, cuando se presenta por fracasos repetidos relacionados con el TDAH

Adaptado de Rappley, 2005.

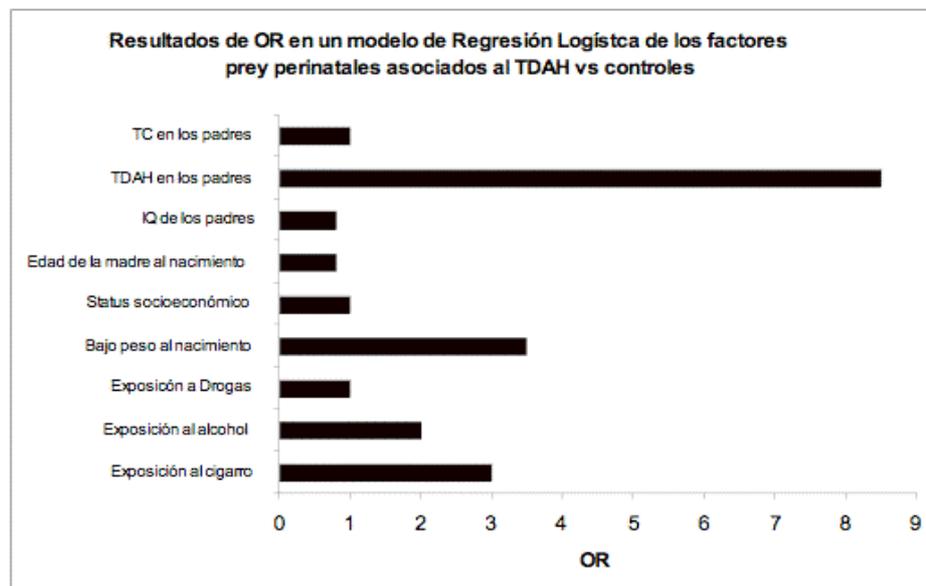
Finalmente, es importante destacar que se ha propuesto que la formación de subgrupos a partir de las comorbilidades presentes en el TDAH, puede ayudarnos a definir distintos subtipos clínicos del trastorno [Biederman *et al.*, 1992; Jensen *et al.*, 2001].

2.3 Etiología del TDAH

Aunque las causas del TDAH son aún desconocidas, el consenso general favorece la idea de que la herencia y la exposición a factores ambientales adversos influyen en la etiopatogenia del trastorno [Kirley *et al.*, 2002; Acosta, 2007; Swanson *et al.*, 2007].

Dentro de los factores ambientales que se han reportado asociados a la presencia de TDAH [Faraone y Biederman, 2002; Swanson *et al.*, 2007; Acosta, 2006], se proponen, entre otros: el bajo peso al nacimiento, tabaquismo en la madre durante el proceso de gestación, la exposición al plomo durante el desarrollo [Faraone y Biederman, 2002; Swanson *et al.*, 2007], el bajo consumo de hierro [Konofal *et al.*, 2005] y disfunción familiar [Stefanatos y Baron, 2007]. Sin embargo, ninguno de éstos ha demostrado por si mismo tener un efecto predictor del trastorno [Spencer *et al.*, 2002; Stefanatos y Baron, 2007; Swanson *et al.*, 2007].

Asimismo, un estudio que analizó factores pre y perinatales asociados al TDAH encontró que la presencia de este trastorno mental en los padres era la variable que generaba el mayor incremento en el riesgo para desarrollar TDAH [Spencer *et al.*, 2002] (Figura 3), lo que indica que podría existir un factor hereditario importante.



Adecuada de Spencer et al., 2002

Figura 3: Factores pre y perinatales asociados al TDAH. Muestra que el factor mas importante es el de tener al menos un padre con TDAH. Abreviaciones: TC: trastorno de conducta, TDAH: Trastorno por Déficit de Atención/hiperactividad, IQ: Coeficiente intelectual.

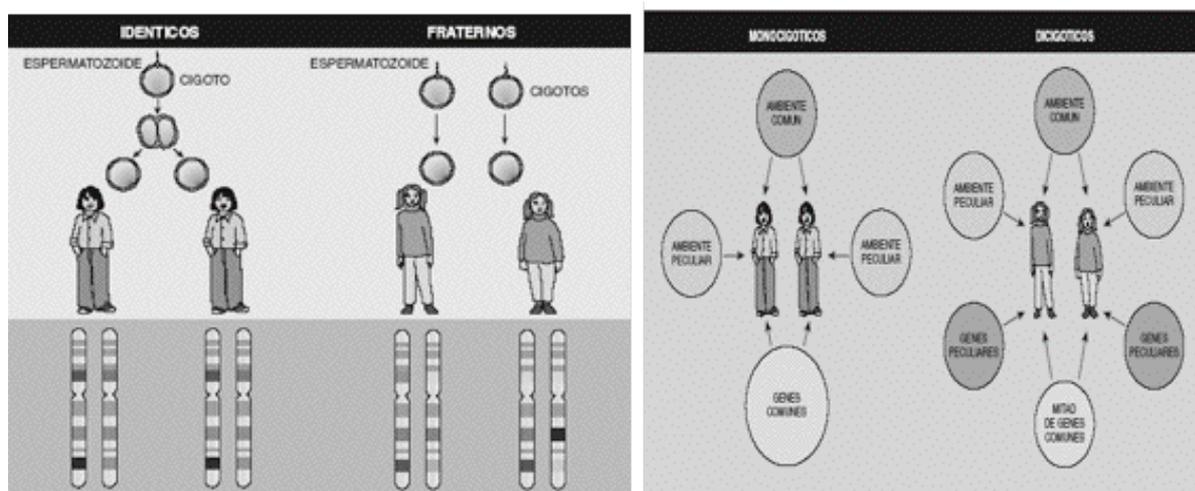
2.4 Heredabilidad del TDAH:

Los estudios en familias, en gemelos y en sujetos dados en adopción nos permiten valorar la influencia de los genes en diversos trastornos y enfermedades [Spencer *et al.*, 2002; Baca y Orozco, 2004; Merikangas and Risch, 2003].

Por ejemplo, se ha mostrado que los familiares de primer grado de pacientes con TDAH tienen un riesgo de 4 a 5 veces mayor de presentar este desorden mental en comparación con individuos normales [Stefanatos y Baron, 2007; Thapar *et al.*, 2007]. Sin embargo, estos datos no sólo podrían explicarse por causas genéticas, sino también por un ambiente familiar compartido [Merikangas and Risch, 2003; Acosta, 2007]. En apoyo a la primera posibilidad se incluye la observación de que los medios hermanos de pacientes con TDAH criados juntos tienen menor probabilidad de desarrollar el trastorno que los hermanos biológicos de los pacientes con TDAH, lo que indica que la agregación en familias de los desórdenes mentales no resulta exclusivamente de un ambiente familiar compartido [Thapar *et al.*, 2007].

Por otro lado, se han realizado varios estudios en sujetos dados en adopción. Estos estudios, se basan en el hecho de que los hermanos biológicos comparten al menos el 50% de su variabilidad genética, y por lo tanto tienen un mayor riesgo de presentar el trastorno, en este caso TDAH, que aquellos que son hermanos adoptivos y que aunque no presentan relación biológica alguna con el sujeto afectado comparten el mismo ambiente familiar [Faraone *et al.*, 2005; Acosta, 2007]. Varios estudios han encontrado que la tasa de prevalencia del TDAH es mayor entre los parientes biológicos de niños con TDAH (padre y hermanos biológicos) con respecto a la tasa de prevalencia de los familiares no biológicamente relacionados de los mismo niños adoptados con TDAH (18% vs 6%) [Sprich *et al.*, 2000; Faraone *et al.*, 2005; Acosta, 2007; Thapar *et al.*, 2007].

Finalmente, los estudios en gemelos monocigóticos se basan en el hecho de que estos individuos comparten el 100% de la carga genética. Por lo tanto, si este trastorno es heredable tendrían mayor probabilidad de que ambos presenten el desorden que los gemelos dicigóticos, quienes sólo comparten el 50% de la variabilidad de su material genético (Figura 4) [Faraone y Biederman, 2002; Faraone *et al.*, 2005; Acosta, 2007]. Lo anterior ha sido corroborado en varios estudios donde se muestra que la concordancia para el fenotipo diagnóstico de TDAH en gemelos monocigóticos es del 50-80% mientras que para los gemelos dicigóticos es del 30-40% [Thapar *et al.*, 1999; Heiser *et al.*, 2004].

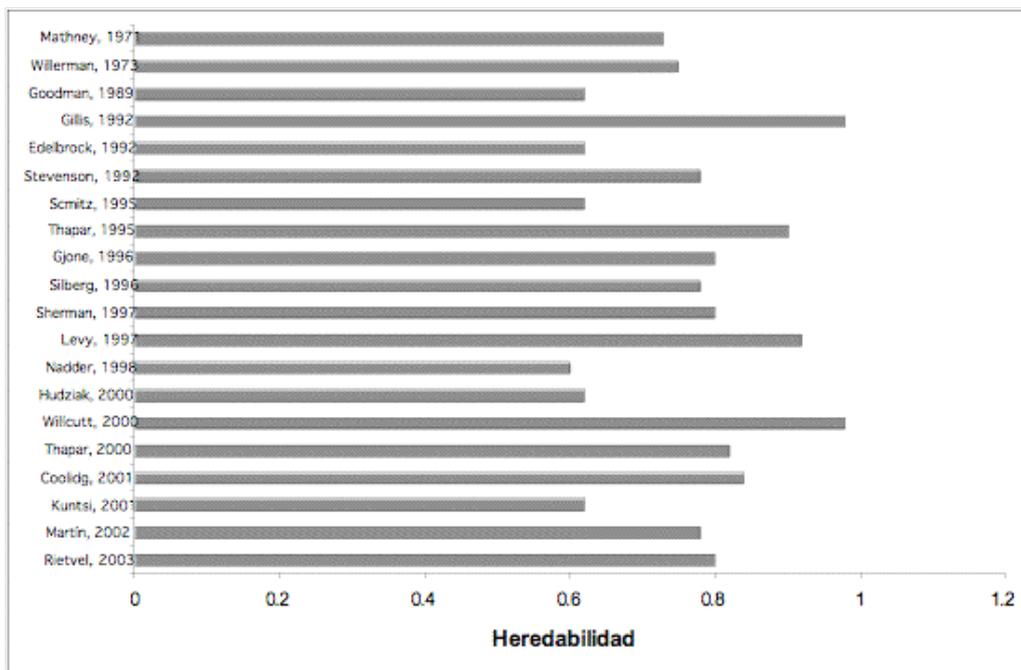


Tomada del Lengrad *et al.*, 2005

Figura 4: Estudios en gemelos. En la imagen de la izquierda se muestra como los gemelos monocigóticos provienen de un solo óvulo fecundado y por lo tanto son genéticamente idénticos y los gemelos dicigóticos provienen de la fecundación de 2 óvulos distintos y por lo tanto son genéticamente diferentes. En la imagen de la derecha se observa como los distintos factores pueden influir sobre fenotipos específicos, en hermanos gemelos monocigóticos y dicigóticos.

A partir de los estudios en gemelos es posible obtener el estadístico de heredabilidad, que se define como la proporción de la variación fenotípica asociada a la variación genética en una muestra específica con un contexto ambiental y con una composición genética determinada [Vitzthum, 2003]. Con respecto al TDAH se ha reportado una heredabilidad que varía según

el estudio entre el 0.6 y 0.9 (Figura 5) [Faraone y Biederman, 2002; Khan y Faraone, 2006; Acosta, 2007]. Estos datos indican que aunque la variabilidad genética puede explicar una parte importante de la etiología de este desorden mental, existen otras variables no biológico-genéticas, como son los factores ambientales previamente mencionados [Báyes *et al.*, 2005; Comings *et al.*, 2005].



Adecuada de Faraone et al., 2005.

Figura 5: Heredabilidad estimada para el TDAH. Gráfica compuesta a partir de 20 estudios de gemelos

2.5 Genética del TDAH

2.5.1 Genes asociados al TDAH

Si bien es sabido que la etiología del TDAH presenta un componente genético importante, se desconocen los genes asociados al trastorno. Sin embargo, se propone que la arquitectura genética de este desorden mental es altamente compleja y poligénica [Asherson, 2004; Báyes *et al.*, 2005; Comings *et al.*, 2005].

Hay dos estrategias generales para detectar que genes contribuyen a la etiología de las enfermedades. Estas son el denominado ligamiento o enlace génico y los estudios de asociación alélica [Faraone y Biederman, 2002; Thapar *et al.*, 2007]. En ambos casos lo que se busca es identificar regiones genéticas y/o genes que influyen sobre el riesgo a desarrollar una enfermedad [Baca y Orozco, 2004; Borecki, 2005].

2.5.2 Estudios de ligamiento genético:

Los estudios de ligamiento están basados en los eventos recombinación que ocurren durante la meiosis, en donde la probabilidad de que dos áreas genéticas en la secuencia de un mismo cromosoma se transmitan de forma conjunta a través de las generaciones depende de la distancia física que existe entre ellos (Figura 6) [Ardlie *et al.*, 2002].

Estos análisis se realizan en individuos relacionados biológicamente, ya sean hermanos o pedigríes extensos y se evalúa el ligamiento entre marcadores polimórficos del ADN y el estatus afectado dentro de la familia. Los marcadores que muestran una fuerte cosegregación con la enfermedad se asume que están en ligamiento (Figura 6). [Ardlie *et al.*, 2002; Merikangas y Risch, 2003; Baca y Orozco, 2004; Borecki, 2005].

La evidencia estadística de ligamiento se mide como LOD score, que es el logaritmo base 10 de la probabilidad de que 2 loci se encuentren ligados entre la probabilidad de que no haya ligamiento. Convencionalmente se ha considerado que cuando el LOD score es mayor a 3 se dice que existe ligamiento [Baca y Orozco, 2004; Borecki, 2005].

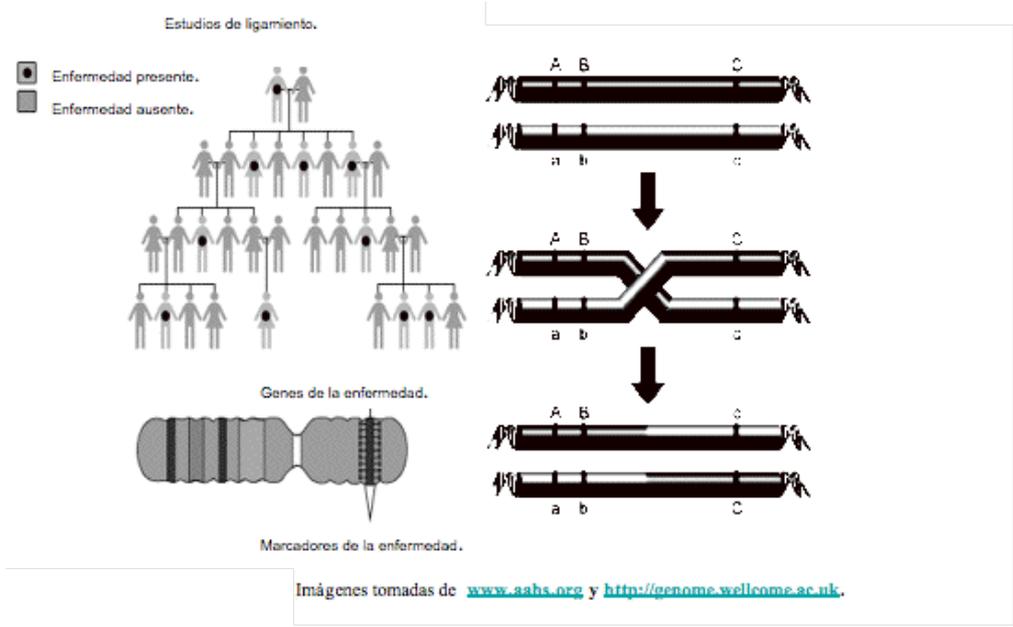


Figura 6: Esquema que explica los estudios de ligamiento genético. En estos estudios se analizan familias en las que se cosegregan un conjunto de alelos de la enfermedad estudiada, véase del lado izquierdo como si dos locus se encuentran cercanos (A y B) pueden heredarse conjuntamente a la siguiente generación.

Existen pocos estudios de ligamiento genético para el TDAH. En ellos se han reportado varias áreas cromosómicas que muestran un enlace significativo en las regiones 4 q13.2, 5 p13, 5 q33.3, 11 q22 y 17 p11, siendo esta última la única área que se ha replicado en más de un estudio (Tabla 2) [Heiser *et al.*, 2004; Comings *et al.*, 2005; Thapar *et al.*, 2007].

Tabla 2: Muestra el LOD obtenido en los estudios de ligamiento del genoma completo en pacientes con TDAH.

Cromosoma	Población				
	Alemania ASP (N= 155) ^a	Colombia Familias (N= 16) ^b	Utrecht (Holanda) ASP (N=164) ^c	Los Ángeles (USA) ASP (N=308) ^d	Los Anglés (USA) y Utrecht (Holanda) ASP (N=424) ^e
5 p13				2.55	3.67
5 p17	2.57				
6 q12				3.30	
7 p13			3.04		
15 q15			3.54		
16 p13				3.73	
17 p11		1.42		3.63	

^a Heiser et al., 2006, ^b Arcos Burgos et al., 2004, ^c Bakker et al., 2003^d Ogdie et al., 2004, ^e Ogdie et al., 2006. ASP= Affected sib pairs. Tomado de Thapar *et al.*, 2007.

La falta de replicación de los estudios de ligamiento genético parece deberse, entre otras razones a que las enfermedades complejas no tienen un modo de herencia simple. Se ha discutido que es más probable que existan varios loci genéticos relacionados con el trastorno; sin embargo, estos loci a diferencia de las enfermedades mendelianas tendrían un efecto fenotípico muy discreto que limita su identificación por el bajo poder analítico que tiene los estudios clásicos de ligamiento [Risch y Merikangas, 1996; Merikangas y Risch, 2003; Baca y Orozco, 2004].

2.5.3 Estudios de asociación

En contraste con el número limitado de estudios de ligamiento, se han publicado múltiples reportes de asociación alélica en relación al TDAH [Khan y Faraone, 2006; Acosta *et al.*, 2007]. En síntesis, los estudios de asociación examinan si una o más variantes genéticas localizadas en la secuencia de genes candidatos están relacionadas con la presencia de un fenotipo específico a nivel poblacional, a diferencia de los estudios de ligamiento que evalúan la cosegregación de un marcador con la enfermedad entre los miembros de una familia [Baca y Orozco, 2004; Borecki, 2005].

Una de las principales razones por la que los estudios de asociación se llevan a cabo con mayor frecuencia, es que como se observa en la tabla 4, se ha reportado que el tamaño de muestra necesario para encontrar ligamiento genético es mucho mayor que el que se necesita para los estudios de asociación, y esto se hace mas evidente cuando el riesgo relativo de un genotipo (y i.e. la probabilidad de que un individuo con un genotipo particular presente la enfermedad) disminuye, como ocurre en el caso de las enfermedades complejas [Risch y Merikangas, 1996].

Tabla 3: Comparación entre los estudios de ligamiento y de asociación.

γ	P	Y	N ¹ (ligamiento)	P(Tr-A)	Het	N ² (asociación)
4.0	0.01	0.520	4260	0.800	0.048	1098
	0.10	0.597	185	0.800	0.346	150
	0.50	0.576	297	0.800	0.500	103
	0.80	0.529	2013	0.800	0.267	222
2.0	0.01	0.502	296,710	0.667	0.029	5823
	0.10	0.518	5382	0.667	0.245	695
	0.50	0.526	2498	0.667	0.500	340
	0.80	0.512	11,917	0.667	0.267	640
1.5	0.01	0.501	4,620,807	0.600	0.025	19,320
	0.10	0.505	67,816	0.600	0.197	2218
	0.50	0.510	17,997	0.600	0.500	949
	0.80	0.505	67,816	0.600	0.286	1663

γ = Riesgo relativo de un genotipo, p= Frecuencia del alelo de riesgo, Y= Probabilidad de compartir alelos N¹= Número de familias requeridas para realizar el estudio, P(tr-A)= Probabilidad de transmitir el alelo de riesgo Het= Heterocigocidad, N²= Número de casos y controles necesarios para realizar un estudio de asociación.

Adaptado de Risch y Merikangas 1996.

Uno de los diseños metodológicos empleados en los estudios de asociación es la prueba de desequilibrio de transmisión (TDT), que evalúa la frecuencia en que un alelo es transmitido de padres heterocigoto a los individuos afectados dentro de una familia [Spielman *et al.*, 1993; Baca y Orozco, 2004; Borecki, 2005]. Si alguno de los alelos estudiados se transmite de los padres hacia los hijos afectados con mayor frecuencia a lo esperado por el azar, entonces se obtiene un dato positivo de asociación [Baca y Orozco, 2004; Borecki, 2005].

Es importante destacar que estos estudios sólo pueden detectar asociación si el marcador alélico se encuentra ligado al locus de la enfermedad y por lo tanto esta metodología es considerada como una prueba tanto de ligamiento como de asociación [Baca y Orozco, 2004].

Entre los problemas que presentan este tipo de estudios es que es necesaria la participación de los tríos (padre, madre y sujeto afectado), además de que al menos uno de los padres debe ser heterocigoto para que la familia sea informativa [Spielman *et al.*, 1993]. Lo anterior complica

la obtención de tamaños de muestra grandes y limita el poder analítico de los mismos [Spielman *et al.*, 1993, Evangelou *et al.*, 2006].

Otra estrategia, a la que se recurre comúnmente es la de casos y controles, en donde comparan las frecuencias de un marcador genético en una muestra de individuos con el fenotipo afectado (i.e. casos), en comparación con una muestra de sujetos no afectados (i. e. controles) y se investiga la ocurrencia simultánea de este marcador con la enfermedad a nivel de la población [Ardlie *et al.*, 2002; Baca y Orozco, 2004; Borecki, 2005]. En este segundo caso es importante tener cuidado en definir adecuadamente al grupo de controles para evitar problemas de estratificación poblacional es decir, diferencias en las frecuencias alélicas entre casos y controles debidas a diferencias en la ancestría de la población y no a la asociación de los genes con la enfermedad, y por lo tanto son proclives a resultados falsos positivos [Merikangas y Risch, 2003; Borecki, 2005; Evangelou *et al.*, 2006].

Los genes candidatos son preferentemente seleccionados con base en la posible relevancia biológica de los mismos en el trastorno o enfermedad a estudiar [Acosta *et al.*, 2007]. Estos se pueden seleccionar a partir de todo el conjunto de datos obtenidos a través de la investigación previa relevante al trastorno de interés. En el caso del TDAH los principales datos provienen de estudios farmacológicos, en modelos animales y de neuroimagen.

Por ejemplo, la experiencia clínica indica que medicamentos como el metilfenidato o las anfetaminas reducen de forma eficiente los síntomas principales del TDAH. Esta eficacia terapéutica se asocia muy probablemente al efecto farmacológico inhibitorio que estas moléculas tienen sobre la recaptura de la dopamina en la neuronas presinápticas [Kirley *et al.*, 2002; Díaz-Heijtz *et al.*, 2006], lo cual tendería a incrementar la influencia inhibitoria de

este neurotransmisor en la corteza prefrontal y las estructuras subcorticales [Kirley *et al.*, 2002; Faraone y Biederman, 2002], mejorando con ello la atención y disminuyendo la distracción e hiperactividad en los pacientes [Faraone y Biederman, 2002; Díaz-Heijtz *et al.*, 2006]. Es importante destacar que estos medicamentos también pueden afectar, aunque en menor grado, al sistema noradrenérgico [Kirley *et al.*, 2002].

Adicionalmente, los estudios en modelos animales han encontrado que una alteración del sistema dopaminérgico central de ratones recién nacidos, por efecto de la administración de la 6-hidroxidopamina, genera hiperactividad motora en estos mismos ratones en su etapa juvenil [DiMaio *et al.*, 2003]. Además, ratones knockout para el gen que codifica al transportador de dopamina (*DAT1*) muestran hiperactividad [Avale *et al.*, 2004], mientras que ratones a los que se les inactiva el gen del receptor a dopamina D4 (*DRD4*) presentan tanto una disminución en la actividad locomotora, como una reducción en la expresión de conductas relacionadas con la curiosidad por estímulos novedosos, lo cual se ha postulado puede reflejar la hiperactividad/impulsividad exacerbada presente en un grupo importante de pacientes con TDAH [Rodríguez *et al.*, 2004].

Por otro lado, estudios de imágenes cerebrales en sujetos con TDAH han mostrado que éstos presentan una disminución en el volumen y la actividad metabólica de la corteza prefrontal derecha [Faraone y Biederman, 2002; Fan *et al.*, 2003; Arnsten, 2006], área neuroanatómica que se ha asociado con la regulación de la atención y la inhibición del procesamiento de estímulos irrelevantes [Fan *et al.*, 2003]. Asimismo, otros estudios han reportado una disminución en el tamaño y la actividad metabólica del núcleo caudado [Faraone y Biederman, 2002; Fan *et al.*, 2003], área que se encuentra profusamente inervada por el sistema dopaminérgico [Arnsten, 2006; Carboni-Roman, 2006; Swanson *et al.*, 2007].

Como se puede inferir a partir de los datos anteriores, se ha propuesto que en el TDAH existe una alteración en la transmisión dopaminérgica [Spencer *et al.*, 2002; Acosta, 2007]. Por lo anterior, en los estudios de asociación se han empleado de manera frecuente genes que codifican para proteínas relacionadas con este sistema de neurotransmisión (Tabla 4) [Faraone y Biederman, 2002; Arnsten, 2006; Díaz-Heijtz, 2006].

De todos los estudios de asociación con genes candidatos, los resultados más consistentes se han encontrado con polimorfismos localizados en los genes que codifican para el *DRD4* y el *DAT1* [Dulawa *et al.*, 1999; Comings *et al.*, 2005; Todd *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006].

Tabla 5: Genes candidatos que se han encontrado asociados al TDAH, en diferentes estudios.

Símbolo	Nombre completo	Sistema de neurotransmisión
<i>DRD2</i>	Receptor a dopamina D2	Dopamina
<i>DRD3</i>	Receptor a dopamina D3	Dopamina
<i>DRD4</i>	Receptor a dopamina D4	Dopamina
<i>DRD5</i>	Receptor a dopamina D5	Dopamina
<i>SCL6A3 (DAT1)</i>	Transportador a dopamina	Dopamina
<i>DBH</i>	Dopamina β hidroxilasa	Catecolaminas
<i>MAO-A</i> y <i>MAO-B</i>	Monoamino oxidasa A y B	Catecolaminas
<i>SCL6A4 (5HTT)</i>	Transportador de serotonina	Serotonina
<i>5HTR1A</i>	Receptor a serotonina 1 ^a	Serotonina
<i>5HTR1B</i>	Receptor a serotonina 1B	Serotonina
<i>TPH</i>	Triptofan hidroxilasa	Catecolaminas
<i>ADRA2α</i>	Receptor a noradrenalina 2 ^a	Adrenalina
<i>ADRA2β</i>	Receptor a noradrenalina 2B	Adrenalina
<i>SCL6A2 (NET)</i>	Transportador de noradrenalina	Adrenalina
<i>GNIR2A</i>	Receptor de glutamato 2 ^a	Glutamato
<i>SNAP 25</i>	Proteína asociada a sinaptosoma 25	Otros

Tomado la revisión de Fraone *et al.*, 2005.

2.6 Asociación entre el *DRD4* y el *DAT1* en pacientes con TDAH

2.6.1 Receptor a Dopamina D4 (*DRD4*)

El *DRD4* pertenece al subgrupo de los receptores de membrana que tienen una alta afinidad para el transmisor dopamina [Van Tol *et al.*, 1991; Oak *et al.*, 2000]. Esta molécula forma

parte de la familia de proteínas con 7 dominios transmembranales que interactúan con proteínas G para activar o inactivar a la adenilato ciclasa [Van Tol, *et al.*, 1991; Oak *et al.*, 2000]. En particular, el *DRD4* forma parte de la sub familia de receptores dopamina tipo 2, los cuales se acoplan a proteínas Gi que actúan inhibiendo la actividad de la adenilato ciclasa (Figura 7) [Oak, *et al.*, 2000; D'Souza *et al.*, 2004].

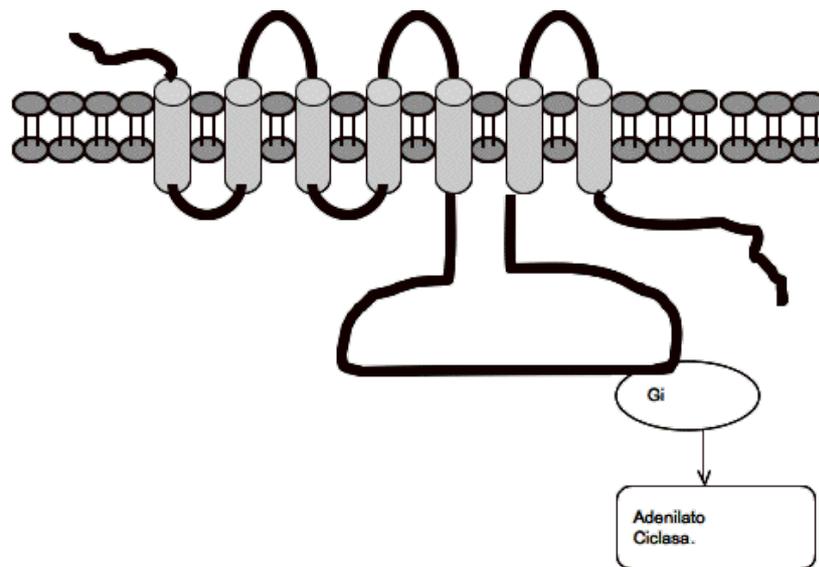


Figura 7: Estructura hipotética del receptor a dopamina D4. En esta imagen se observa que el receptor tiene 7 dominios transmembranales y como la proteína G inhibidora se acopla al receptor en el tercer segmento intracelular.

El radioligando [^3H] NGD 94-1 (2-[4-[(2-fenil-1 H-imidazol-5-yl) metil] -1- piperazinil] pirimidina, que se ha reportado como altamente específico para la proteína DRD4, ha permitido detectar la presencia de este receptor predominantemente en áreas cerebrales como la corteza, el septum, el hipocampo, la amígdala y el hipotálamo. Estos resultados son similares a la distribución reportada para este receptor por técnicas de hibridación *in situ* e inmunohistoquímica en diferentes mamíferos [Oak *et al.*, 2000]. Asimismo la expresión del ARNm del DRD4 se ha reportado en la médula, la corteza prefrontal, el mesencéfalo, el

estriado, la amígdala y en los ganglios basales [D'Souza *et al.*, 2004; Marsden, 2006].

Es importante recordar que en los pacientes con TDAH se ha encontrado una disminución en el volúmen y actividad metabólica de áreas cerebrales como la corteza prefrontal y los ganglios basales [Faraone y Biederman, 2002; Fan *et al.*, 2003; Arnstern, 2006] que, como mencionamos, se encuentran inervadas por el sistema dopaminérgico y se ha reportado la presencia del DRD4 en estas áreas cerebrales [Oak *et al.*, 2000; D'Souza *et al.*, 2006; Mariden, 2006].

El gen que codifica para el *DRD4* muestra una gran homología con los genes *DRD2* y *DRD3*. Fue identificado por Van Tol y colaboradores en 1991, en la búsqueda de una molécula que presentará mayor afinidad que los otros receptores por el antipsicótico atípico clozapina. Por análisis de "Northern Blot" se detectó que el ARNm de este gen tiene un peso de 5.3 kilobases y está constituido por 4 exones [Van Tol *et al.*, 1991]. En 1992 se describió su localización en el cromosoma 11 p15.5 [Gelernter *et al.*, 1992]. El sitio de inicio de la transcripción del gen *DRD4* se encuentra de 400-500 pares de bases (pb) antes del inicio de la traducción y su secuencia promotora comienza una kilobase antes del codón de inicio [Oak *et al.*, 2000].

En su secuencia se han descrito diversos polimorfismos asociados a la enfermedad, dentro de los cuales destaca un polimorfismo localizado en el tercer exón, que está formado por secuencias repetidas en tandem (VNTR) de 48 pares de bases. El número de repetidos en esta región varía de 2 a 11, siendo los más frecuentes en orden decreciente los alelos de 4, 7 y 2R (Figura 8) [Oak *et al.*, 2000; D'Souza *et al.*, 2006].

Asimismo, es importante mencionar que las frecuencias alélicas de este polimorfismo,

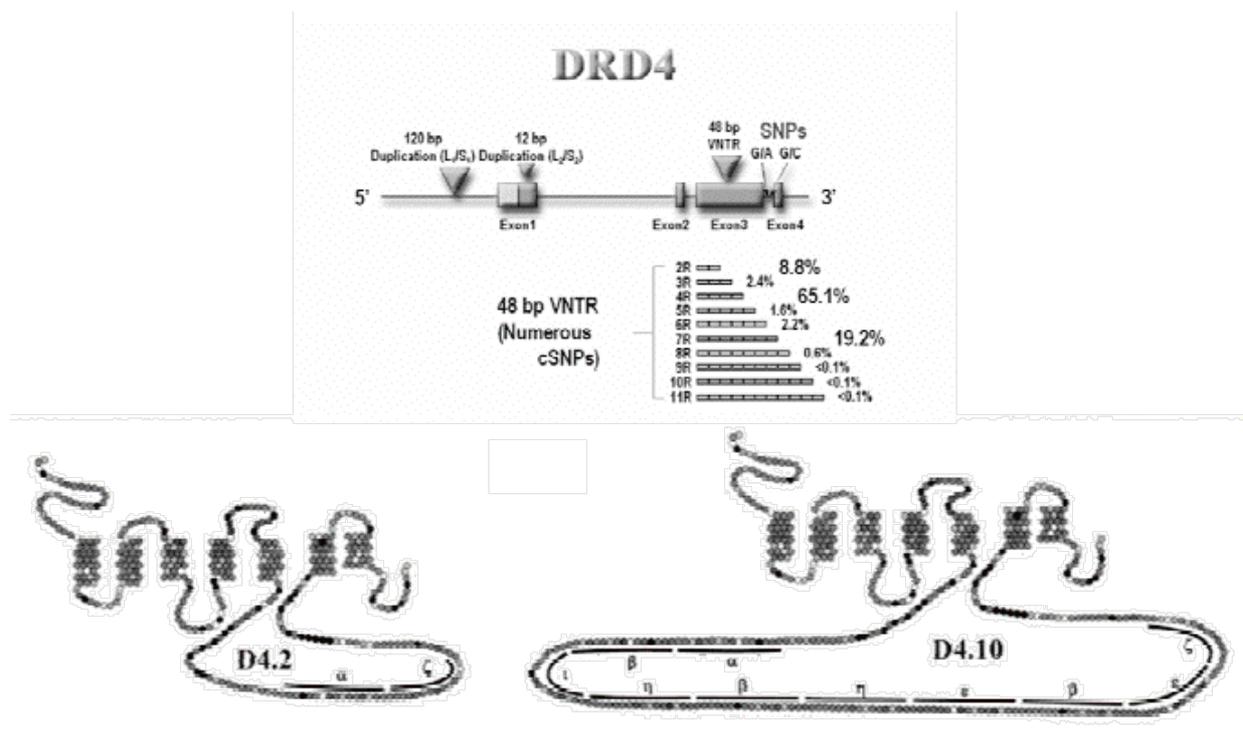
difieren de forma importante entre las poblaciones (Tabla 5) [Chang *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1999; Vyeira *et al.*, 2003].

Tabla 5: Frecuencia de los diferentes alelos del exón 3 del gen *DRD4* en diversas poblaciones.

Población	<i>DRD4</i>									N
	2R	3R	4R	5R	6R	7R	8R	9R	10R	
EUROPA										
Daneses	0.09	0.08	0.67	0	0	0.14	0.02	0	0	32
Fineses	0.06	0.15	0.69	0.02	0	0.06	0.02	0	0	33
Europa central	0.12	0.06	0.57	0.02	0.01	0.21	0.01	0	0	88
Italianos	0.10	0.03	0.69	0.01	0.01	0.15	0.01	0	0	471
Alemanes	0.07	0.03	0.70	0.03	0.01	0.15	0.01	0	0	197
Ingleses	0.04	0.07	0.61	0	0.01	0.26	0.01	0	0	88
Total	0.10	0.05	0.69	0.01	0.01	0.15	0.01	0	0	1351
INDÍGENAS SUDAMERICANOS (Amazonia)										
Quechua	0	0	0.41	0	0.14	0.45	0	0	0	22
Indígenas de Colombia	0	0	0.23	0	0.15	0.62	0	0	0	13
Karitiana	0	0	0.39	0	0	0.60	0.01	0	0	54
Suruí	0.13	0	0.15	0.01	0	0.71	0	0	0	67
Ticuna	0.02	0	0.20	0	0	0.78	0	0	0	64
Zoró	0	0	0.36	0	0	0.64	0	0	0	28
Xavante	0	0	0.32	0.04	0.04	0.43	0.18	0	0	28
Gaviao	0.03	0	0.28	0	0	0.69	0	0	0	29
Wai Wai	0.02	0	0.52	0.05	0.18	0.23	0	0	0	28
Total	0.03	0	0.29	0.01	0.03	0.61	0.02	0	0	333
CHILE										
Santiago	0.06	0.01	0.59	0.02	0.05	0.27	0.01	0.0	0	100

Tomada de Vyeira *et al.*, 2003

Por otra parte, como se observa en la figura 8, la secuencia de nucleótidos en este VNTR indica que podría existir un cambio en el tamaño de la tercera asa intracelular de la proteína; es importante destacar que, por su similitud con los transportadores monoaminérgicos y posible origen evolutivo, es muy probable que en esta área el receptor entré en contacto con proteínas G inhibitorias (Figura 7) [Oak *et al.*, 2000; Wong *et al.*, 2000]. Aunque los estudios *in vitro* no muestran que el tamaño de la tercera asa intracelular tenga un efecto importante con respecto a la actividad funcional del receptor, si indican que pueden existir diferencias discretas en el perfil farmacológico dependiendo del número de repetidos [Ashgari *et al.*, 1995; Jovanovic *et al.*, 1999; Wong *et al.*, 2000], por lo que se propone que debe existir una respuesta diferencial de acuerdo al polimorfismo presente en el exón 3 [Wong *et al.*, 2000].



Imágenes tomadas de de Ding *et al.*, 2002 y Oak *et al.*, 2000.

Figura 8: Variabilidad en el exón 3 del gen DRD4 y su efecto sobre la estructura de la proteína. Un VNTR de más repetidos podría reflejarse en un proteína con el tercer bucle intracelular de mayor tamaño .

1.6.2 Transportador de Dopamina 1 (*DAT1*):

El gen del *SCL6A3* o también llamado *DAT1* codifica para una proteína con 12 dominios transmembranales, que regula la recaptura de dopamina del espacio sináptico, y es el principal mecanismo propuesto para terminar la neurotransmisión dopaminérgica (Figura 9) [Fuke *et al.*, 2001; Torres *et al.*, 2003; Jucaite *et al.*, 2006]. El DAT1 es una proteína de tipo simporte que transporta a este neurotransmisor junto con dos moléculas de Na⁺ y una de Cl⁻ al interior de la neurona presináptica. La energía que requiere para llevar a cabo su función proviene de una bomba Na⁺/K⁺ ATPasa a la que se encuentra acoplada [Fuke *et al.*, 2001; Torres *et al.*, 2003].

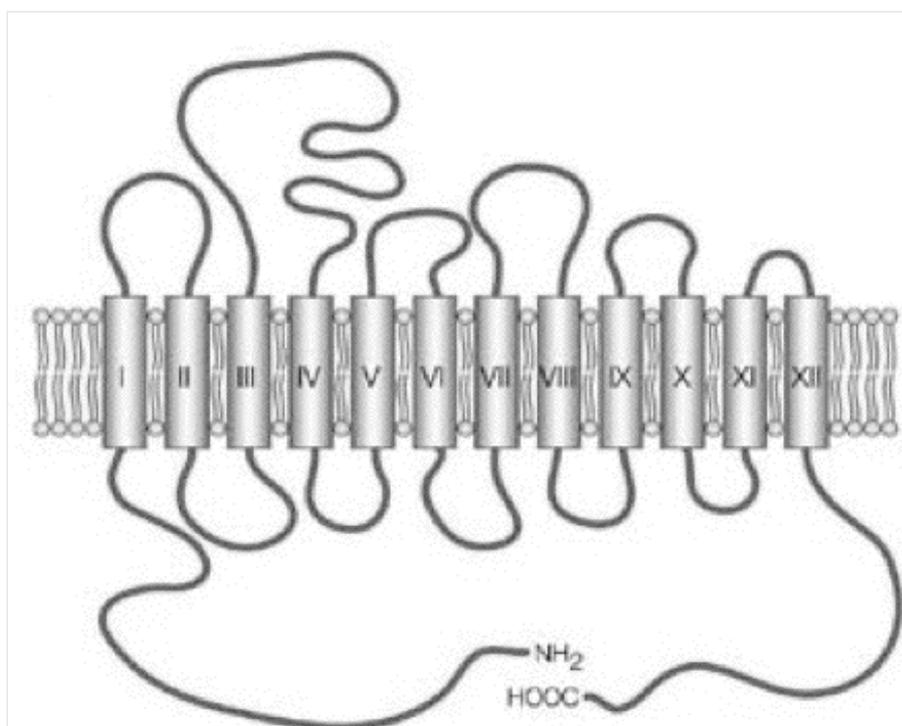


Imagen tomada de Torres *et al.*, 2003.

Figura 9: Esquema hipotético de las proteínas transportadoras de monoaminas. En esta imagen se observa el esquema hipotético de los transportadores monoaminérgicos como DAT, se propone están constituidos por 12 dominios transmembranales y que sus extremos amino y carboxilo se encuentran el espacio intracelular.

Mediante experimentos de hibridación *in situ* se ha detectado la presencia abundante del ARNm de este transportador en el área tegmental ventral y en la sustancia negra del cerebro de rata [Torres *et al.*, 2003]. En estudios con radioligandos se ha encontrado la presencia de este transportador en el estriado, el tálamo, el hipotálamo, el núcleo caudado y el putamen [Jucaite *et al.*, 2006]. Es importante recordar que algunas de estas áreas posiblemente se encuentran afectadas en los pacientes con TDAH [Faraone y Biederman, 2002; Fan *et al.*, 2003; Arnstern, 2006].

Por otro lado, los niveles de este transportador no parecen ser constantes a lo largo de la vida, ya que en estudios de imágenes cerebrales *in vivo*, que utilizan ligandos selectivos para DAT1, han mostrado que los niveles de este transportador disminuyen con la edad [Torres *et al.*, 2003]. Asimismo, la densidad de esta proteína parece verse afectada en varios desórdenes

cerebrales, como la enfermedad de Parkinson, la depresión mayor, la enfermedad de Huntington, la esquizofrenia y el TDAH [Jucaite *et al.*, 2006; Torres *et al.*, 2003]. Además, se ha reportado que este transportador tiene alta afinidad por los psicoestimulantes como el metilfenidato y las anfetaminas [Torres *et al.*, 2003] que, como se mencionó, mejoran los síntomas presentes en los pacientes con TDAH [Kirley *et al.*, 2002].

El gen que codifica para el *DAT1* se localiza en la región 15.3 del brazo corto del cromosoma 5. Este mide alrededor de 65kb y se divide en 15 exones. Se han descrito varios polimorfismos en su secuencia, siendo uno de los más estudiados el VNTR de 40 pb localizado en el exón 15 y ubicado en la región 3' no traducida del gen (Figura 10) [Kang *et al.*, 1999; Fuke *et al.*, 2001; Torres *et al.*, 2003]. El número de repetidos varía de 3 a 13, y se ha reportado que los alelos más comunes son los de 10 y 9 repetidos [Fuke *et al.*, 2000; Torres *et al.*, 2003]. Al igual que en el caso anterior, las frecuencias alélicas de este polimorfismo varían significativamente entre las poblaciones (Tabla 6) [Kang *et al.*; 1999, Vyeira *et al.*, 2003].

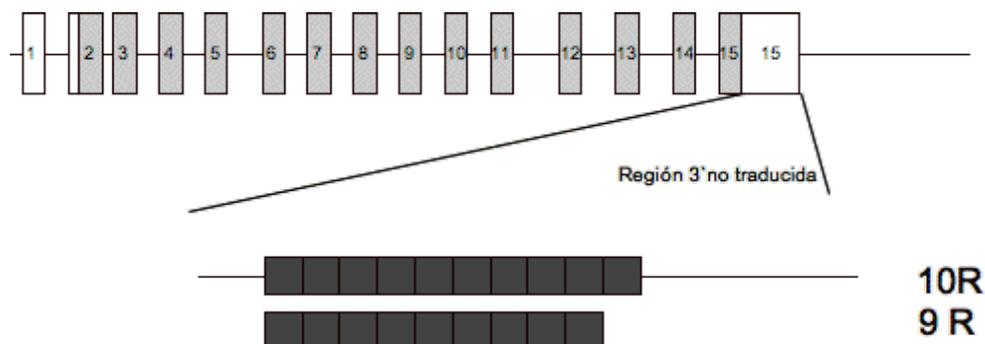


Figura 10: Esquema del gen *DAT1*. En la figura se observa que este gen está constituido por 15 exones, en la 3' traducida hay un polimorfismo tipo VNTR de 40pb que se repite de 3 a 13 veces, siendo las variantes mas comunes las de 9 y 10 repetidos, representadas en la imagen.

Tabla 6: Frecuencia de los diferentes alelos de la región 3'UTR del gen DAT1 en diversas poblaciones.

Población	DAT1.3	DAT1.5	DAT1.7	DAT1.8	DAT1.9	DAT1.10	DAT1.11	DAT1.12	DAT1.13	N
EUROPA										
Griegos	0	0	0	0	0.38	0.52	0.10	0	0	21
Rusos	0	0	0	0	0.11	0.88	0.02	0	0	33
Ingleses	0	0	0	0.01	0.25	0.74	0.01	0	0	295
Italianos	0	0	0	0	0.33	0.66	0.01	0	0	84
Total	0	0	0	0	0.26	0.72	0.01	0	0	433
INDIGENAS SUDAMERICANOS										
Colombia	0	0	0	0	0	1.00	0	0	0	27
CHILE										
Santiago	0	0	0	0.01	0.23	0.74	0.03	0	0	100

Tomada de Vyeira *et al.*, 2003

Debido a que este VNTR se localiza en la región 3' no traducida del gen, no se espera que pudiera cambiar la secuencia y estructura de la proteína; sin embargo, es posible que esta variabilidad pudiera afectar los niveles de expresión del *DAT1* modulando la expresión o degradación del ARNm y/o la eficiencia de la transcripción [Fuke *et al.*, 2001; Mill *et al.*, 2005]. Algunos estudios tanto *in vivo* como *in vitro* han reportado un mayor nivel de expresión del *DAT1* en individuos que presentan el alelo de 10R [Heinz *et al.*, 2000; Fuke *et al.*, 2001; VanNess *et al.*, 2005]. Empero, no todos los datos han sido consistentes. Por ejemplo, Jacobsen y cols. [2000] encontraron en un estudio *in vivo*, que los individuos homocigotos al alelo de 10R mostraron menor unión del ligando al *DAT1* que los que presentaban al menos un alelo de 9R. Otro estudio *in vitro* no encontró relación alguna entre la presencia de algún genotipo en particular y los niveles de unión al *DAT1* [Mill *et al.*, 2005].

Aunque no está claro si este polimorfismo afecta la expresión del transportador, los estudios anteriores sugieren que ésta y/u otra variante genética, con la que se encuentre en desequilibrio de ligamiento, está relacionada con la regulación de la expresión de la proteína *DAT1* [Jacobsen *et al.*, 2000; Fuke *et al.*, 2001; Mill *et al.*, 2005].

Finalmente, es necesario mencionar que la ausencia del gen que codifica para el *DAT1* genera ratones hiperactivos [Avale *et al.*, 2004], característica inherente al TDAH, por lo que cambios en los niveles sinápticos generados por la alteración en la eficiencia de captura de este neurotransmisor podrían estar asociados al trastorno.

2.6.3 Relación entre el TDAH y los polimorfismos tipo VNTR de los genes DRD4 y DAT1:

Varios metanálisis indican que existe una asociación discreta pero significativa entre el alelo de 7R del gen DRD4 [Faraone *et al.*, 2001; Maher *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2006] y el alelo de 10R del gen DAT1 [Faraone *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2007] con el TDAH. Sin embargo, estos estudios se han realizado principalmente en poblaciones de origen caucásico, tanto de Estados Unidos como de Europa [Faraone *et al.*, 2001; Maher *et al.*, 2002; Faraone *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2007].

Como se mostró en las tablas 5 y 6, las frecuencias alélicas de ambos polimorfismos difieren significativamente entre poblaciones [Chang *et al.*, 1996; Kang *et al.*, 1999; Vyeira *et al.*, 2003] y se ha reportado que el alelo asociado a la enfermedad puede variar de acuerdo al grupo étnico estudiado, como se reportó con el alelo de 2R del gen DRD4 en población asiática [Leung *et al.*, 2005] y con el alelo de 9R del gen DAT1 en población india [Das *et al.*, 2007]. Además, existe evidencia de que el efecto de un alelo o genotipo específico no es exactamente el mismo en los diferentes grupos étnicos [Williams *et al.*, 2003, Popper *et al.*, 2007], lo cual hace de sumo interés realizar este tipo de análisis en distintas poblaciones.

En este sentido, existen pocos reportes en población latinoamericana. Por ejemplo, un estudio

en Colombia, en la población *Paisa* de la región de Antioquia, encontró asociación con el alelo de 7R del gen *DRD4* en un diseño de familias [Arcos-Burgos *et al.*, 2004]. En Brasil se reportó asociación positiva con el alelo 7R del gen *DRD4* en el análisis de casos y controles, aunque la asociación fue negativa si el modelo era en familias; en este mismo estudio no se encontró asociación con el alelo de 10R del gen *DAT1* para ninguno de los 2 modelos. Es de destacar que estos investigadores realizaron un análisis de interacción y encontraron un aumento de la presencia combinada de los genotipos con al menos un alelo de 7R (7+) del *DRD4* y 10/10 del *DAT1* en el subgrupo clínico de pacientes TDAH con mayores niveles de hiperactividad e impulsividad con respecto a los que presentaron más problemas de inatención [Roman *et al.*, 2001]. Otro estudio de hermanos no afectados en familias chilenas no encontró asociación ni con el alelo de 7R del gen *DRD4* ni con el alelo de 10R del gen *DAT1*; sin embargo, en el análisis de interacción genética se encontró una mayor presencia del genotipo 7+ de *DRD4* y el genotipo 10/10 de *DAT1* en los hermanos afectados con respecto a los hermanos no afectados [Carrasco *et al.*, 2006]. En conclusión, los pocos estudios en población latinoamericana proponen un modelo de interacción genética entre el *DRD4* y *DAT1*; empero, los datos no han sido del todo consistentes y es necesario replicarlos en otras poblaciones.

2.6.4 Relación entre las comorbilidades del TDAH y los polimorfismos tipo VNTR de los genes *DRD4* y *DAT1*:

El estudio de las variantes polimórficas aquí descritas, con respecto a la presencia de comorbilidades en el TDAH ha sido muy pobre. Hasta nuestro conocimiento, sólo tres estudios han reportado asociación positiva entre el alelo de 7R del gen *DRD4* en pacientes con TDAH que presentaron comorbilidad con trastornos externalizados -e.g. trastorno de

conducta y trastorno oposicionista desafiante- [Rowe *et al.*, 2001; Holmes *et al.*, 2002; Kirley *et al.*, 2004]. Esto concuerda con un estudio de familias realizado en población turca, en el que se encontró que los pacientes que no presentaban el alelo de 7R eran más ansiosos y depresivos que aquellos que tenían por lo menos una copia de esta variante genética [Tahir *et al.*, 2000].

Con respecto al *DATI*, hasta nuestro conocimiento, sólo un estudio ha encontrado que comparados con pacientes con TDAH que presentan trastorno de conducta, aquellos que no lo presentan, muestran asociación con 2 SNPs localizados en este gen [Zhou *et al.*, 2007].

V. Justificación

Estudios en poblaciones de origen caucásico han encontrado una asociación discreta pero significativa entre el alelo de 7R localizado en el exón 3 del gen DRD4 y el alelo de 10R localizado en la región 3' no traducida (3'UTR) del gen DAT1, en sujetos con diagnóstico clínico de TDAH.

Debido a que las frecuencias de alelos y genotipos son diferentes entre poblaciones, los datos anteriores no son directamente extrapolables a individuos de nuestra población, por lo que consideramos de sumo interés realizar este estudio en población mexicana, algo que no se ha reportado previamente.

Asimismo, se considera que el TDAH es un trastorno multifactorial, y en este sentido muchas variables genéticas estarían asociadas al mismo. En consecuencia, resulta muy atractivo empezar a estudiar la interacción entre al menos estos 2 polimorfismos.

Finalmente, se ha reportado que las comorbilidades del TDAH se agregan en familias y que estas características nos pueden ayudar a definir subgrupos clínicos del trastorno, lo que hace importante analizarlas con respecto a las variantes genéticas asociadas a fenotipos clínicos particulares.

VI. Objetivos

1. Objetivo General

- Determinar si existe asociación entre los genes *DRD4* y *DAT1* con el TDAH y sus comorbilidades.

2. Objetivos particulares

1. Determinar si existe asociación entre los genes *DRD4* y *DAT1* con el TDAH en pacientes del INP RF.
2. Determinar si existe asociación entre los genotipos *DAT1* y *DRD4* con alguno de los subgrupos formados a partir de las comorbilidades del TDAH en pacientes del INP RF.
3. Estimar la posible interacción entre el *DRD4* y el *DAT1* y su asociación con el TDAH y sus comorbilidades en pacientes del INP RF.

VII. Hipótesis

1. Los pacientes con TDAH mostrarán un aumento en la frecuencia del alelo de 7R del gen *DRD4* con respecto a los controles.
2. Los pacientes con TDAH mostrarán un aumento en la frecuencia del alelo de 10R del gen *DAT1* con respecto a los controles.
3. El análisis de interacción mostrará que la presencia del genotipo con al menos un alelo de 7R (7+) del gen *DRD4* en conjunto con la presencia del genotipo 10/10 del gen *DAT1* correlaciona con el fenotipo de TDAH.
4. Las frecuencias de ambos alelos serán distintas de acuerdo al tipo de comorbilidades presentes en los pacientes, y probablemente las asociaciones previamente reportadas se encontrarán con algún subtipo específico.

VIII. Consideraciones éticas

Dado que en este estudio se obtuvieron muestras de sujetos humanos, fue necesario que se cumpliera con los criterios éticos descritos en la Declaración de Helsinki.

El estudio fue aprobado por los comités de Ética e Investigación del INP RF. Asimismo, todos los procedimientos fueron realizados bajo el conocimiento y consentimiento escrito de los sujetos de estudio.

IX. Materiales y Métodos

1. Sujetos

Entre febrero del 2002 y octubre del 2007 se reclutaron de la clínica de adolescentes del INP RF 108 individuos (12-18 años) que cumplieron con el diagnóstico clínico de TDAH . El proceso para la obtención del diagnóstico principal y sus comorbilidades con trastornos internalizados y/o externalizados, constó de tres etapas principales:

Inicialmente, a los pacientes se les aplicó la entrevista clínica estructurada, denominada M.I.N.I. KID (de sus siglas en inglés Mini International Neuropsychiatric interview for children and adolescents), que genera entre otros, el diagnóstico presuntivo de TDAH basado en los criterios planteados por el DSMIV-R.

Posteriormente, un psiquiatra certificado documentó la historia clínica del paciente y la corroboró con una entrevista realizada a los padres del mismo.

Finalmente, el diagnóstico definitivo de TDAH y sus comorbilidades se obtuvo a través de la aplicación, por un psiquiatra especializado en adolescentes, del BPRS-C (de sus siglas en inglés Brief psychiatric rating scale for children). En esta etapa, el diagnóstico también fue corroborado con una entrevista con los padres del paciente.

En resumen los criterios de inclusión para el grupo de casos fueron que los participantes cumplieran con el diagnóstico clínico del TDAH según los criterios del DSMIV-R y si que los síntomas del trastorno aparecieron antes de los 6 años de edad. Los participantes fueron excluidos del estudio si la presencia de otro desorden psiquiátrico podía explicar mejor los síntomas reportados.

De 30 individuos con diagnóstico clínico de TDAH se logró obtener la participación de sus padres en el análisis genético.

Por otra parte, las muestras pertenecientes al grupo control se obtuvieron de individuos que participaron en un estudio epidemiológico realizado recientemente por el INP RF, y que tuvo como objetivo estimar la prevalencia de las principales enfermedades mentales en adolescentes que habitan en la ciudad de México [Benjet *et al.*, 2008].

En este proyecto se evaluaron “*cara a cara*” 3005 sujetos de población abierta de entre 12 y 18 años. La evaluación fue realizada por personal previamente entrenado en el uso de la entrevista denominada CIDI-CAPI (de sus siglas en inglés Composite International Diagnostic Interview – Computer Assisted Personal Interview), en su versión adaptada para adolescentes. El CIDI-CAPI genera diagnósticos clínicos psiquiátricos de distintos trastornos mentales, incluidos TDAH y sus comorbilidades, basado en los criterios descritos en el DSMIV-R y el ICD-10 (de sus siglas en inglés International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems). Los 1261 individuos que **NO** cumplieron con los criterios para algún diagnóstico psiquiátrico a lo largo de la vida fueron escogidos como no casos. De estos, 883 proporcionaron muestra de ADN. A partir del grupo anterior se seleccionaron para este análisis, 108 muestras de ADN pareadas por edad y sexo con el grupo de casos; 8 muestras extra fueron seleccionadas aleatoriamente (10% de la muestra), secuenciadas para las regiones polimórficas de interés e incluidas en el análisis, con el objetivo de disminuir posibles errores en la tipificación.

En resumen los sujetos del grupo control no debían cumplir cumplieron con los criterios

diagnósticos para algún trastorno psiquiátrico. Los individuos fueron excluidos de este grupo si no terminaron de contestar la entrevista o si sus padres no accedieron a participar en la parte de entrevista a los padres, o si no se contaba con la muestra genética.

2. Análisis Molecular

Del grupo de pacientes y padres que participaron en la donación de material genético, se obtuvo por venopunción una muestra de 5 ml de sangre y se extrajo el ADN por el método convencional de fenol-cloroformo. En el caso del grupo control se obtuvo una muestra de enjuague bucal y el ADN se extrajo con ayuda del Kit PureGene de la marca GENTRA®.

Ambos métodos de extracción generaron ADN de alto peso molecular ($\approx 23\text{Kb}$) que permitió la exitosa genotipificación de las muestras, en la mayoría de los casos.

La amplificación del VNTR localizado en el exón 3 del gen *DRD4* se llevó a cabo utilizando los primers reportados por Lichter y cols. [1993] y las condiciones descritas previamente en nuestro laboratorio por Aguirre y cols. [2007]. Para el caso del VNTR, localizado en la región 3' UTR del DAT1, se utilizaron los primers y el protocolo reportados previamente por Kang y cols [1999].

La determinación de los alelos específicos para cada polimorfismo se obtuvo mediante la separación de los productos de amplificación por medio de electroforesis en geles de agarosa al 2%. El tamaño de los alelos se estableció comparando las bandas presentes en los geles con marcadores de peso molecular, y/o con algunas muestras previamente secuenciadas. La lectura de los geles de agarosa se realizó por 2 sujetos distintos, los cuales desconocían cual

era el estatus clínico de las muestras. En la mayoría de los casos, las muestras fueron amplificadas por lo menos 2 veces con el objetivo de asegurar su correcta genotipificación. Aquellos resultados que fueron dudosos no se incluyeron en el análisis.

3. Análisis estadístico

El equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) se analizó con la subrutina HW del programa LINKAGE [Ott, 1988].

Las frecuencias alélicas y genotípicas obtenidas se compararon con el programa para análisis estadístico SPSS versión 11. Se les aplicó la prueba no paramétrica de χ^2 (o de Fisher, cuando fue necesario), la cuál evalúa posibles diferencias en las proporciones presentes entre los grupos a analizar. Por otro lado, para estudiar la interacción entre el *DRD4* y *DAT1* se utilizó el análisis de regresión logística.

Para todos los análisis se estimó el OR (razón de momios, de sus siglas en inglés *Odds Ratio*) con un intervalo de confianza (CI) del 95%. Los valores se consideraron significativos cuando la *p* era menor a 0.05. Posteriormente se aplicó la corrección de Bonferroni de acuerdo al número de alelos analizados (2) quedando el valor significativo ($0.05/2= 0.025$) de *p* menor a 0.025.

Finalmente, en los 30 tríos incluidos en el estudio se realizó el análisis de transmisión de alelos (la base de este análisis se explicó brevemente en la sección III 2.5.3) con el programa FBAT 1.7.3 (de sus siglas en inglés Family Based Association Test) [Lange *et al.*, 2003].

X. Resultados

1. Características de los grupos de casos y controles

Al evaluar las variables de edad y sexo entre los grupos de casos y controles, no se encontraron diferencias significativas: edad ($t=0.59$ p (2 colas)= 0.55) y sexo ($\chi^2=0.10$ g.l.=1 p (2 colas) =0.75) (Tabla 7).

Tabla 7: Datos de edad y sexo de los grupos de casos y controles.

	Sexo		Años de edad	
	Masculino N (%)	Femenino N (%)	Media	Desviación Estandar
Controles	105 (91.3)	11 (9.7)	14.2	1.1
Casos	99 (91.6)	9 (8.3)	14.3	1.3

Al analizar las comorbilidades psiquiátricas presentes en el grupo de casos, se encontró que 48 pacientes presentaron, además de TDAH, trastornos de tipo externalizado (i.e. Trastorno oposicionista desafiante, Trastorno disocial y Abuso de sustancias), 27 de tipo internalizado (i.e. Distimia, Trastorno depresivo mayor, Fobias y Desórdenes de ansiedad) y 26 de tipo mixto (i.e. tanto externalizados como internalizados). Sólo 5 sujetos no presentaron comorbilidad psiquiátrica alguna. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos en cuanto a las variables de edad (ANOVA $f=0.89$ $p=0.41$) y sexo ($\chi^2=2.26$ g.l.=2 p (2 colas) =0.33) (Tabla 8).

Tabla 8: Datos de edad y sexo de los grupos del subrupos formados a partir de los trastornos comórbido presentes en el TDAH

	N(%)	Sexo		Años de edad	
		Masculino N(%)	Femenino N(%)	Media	Desviación Estándar
Externalizados	48 (45.3)	44 (91.6)	4 (8.3)	14.14	1.33
Internalizados	27 (25.5)	26 (96.2)	1 (3.7)	14.28	1.21
Mixtos	26 (24.5)	22 (84.6)	4 (15.3)	14.53	1.03

2. Integridad del ADN:

De las 116 muestras obtenidas para el grupo de controles sólo se obtuvieron los genotipos de 84 muestras para el *DRD4* y 113 para el *DAT1*. De los 108 individuos con diagnóstico clínico de TDAH se logró obtener la amplificación óptima de 105 para *DRD4* y de 105 para *DAT1*.

La disminución en la eficiencia de tipificación de las muestras control puede estar relacionada con el origen bucal de las mismas. En nuestro estudio observamos que las muestras de enjuague bucal no son homogéneas en cuanto a su calidad (Figura 11), y detectamos que es necesario emplear ADN de muy buena calidad (poco degradado) para amplificar el polimorfismo del gen *DRD4*, probablemente por la gran cantidad de *GC* que existen en esta área cromosómica. Por otro lado, la amplificación del *DAT1* fue posible aún en muestras que estuvieran ligeramente degradadas. Finalmente, las muestras en las que el ADN estaba muy degradado no amplificaron para ninguno de los polimorfismos (Figura 11).

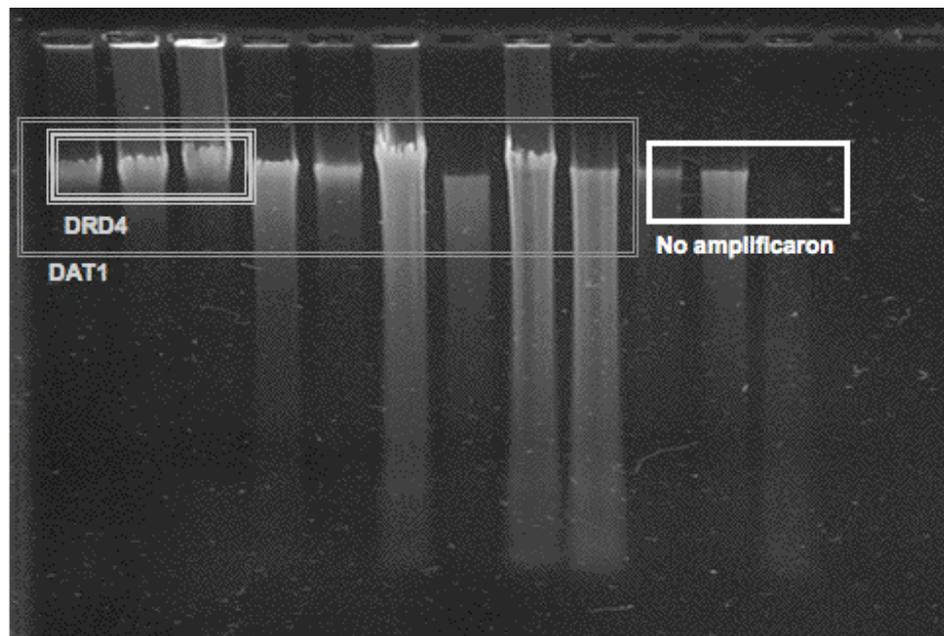


Figura 11: Gel de agarosa al 1% en el que se corrieron las muestras de ADN obtenidas de enjuague bucal. En esta imagen se observa la diferencia en la calidad de las muestras que amplificaron para *DRD4* (cuadro de raya triple), *DAT1* (cuadro de raya dobles) y que no amplificaron (cuadro de raya sencilla).

3. Discriminación alélica:

Como se mencionó en el apartado de metodología, los alelos presentes en las muestras fueron identificados en geles de Agarosa-Metaphor al 2% (1:1), como se observa en la figura 12.

Los alelos más comunes para el DRD4 fueron en orden decreciente de frecuencia el de 4R, el 7R y el 2R y se identificaron gracias a su peso molecular 4R (492 pb) , 7R (636 pb) y 2R (396 pb) (Figura 12)

Para el caso del DAT1 el alelo más común fue el de 10R cuyo peso molecular predicho fue de 478pb, mientras que el alelo de 9R presentó un peso molecular predicho de 438pb (Figura 12).

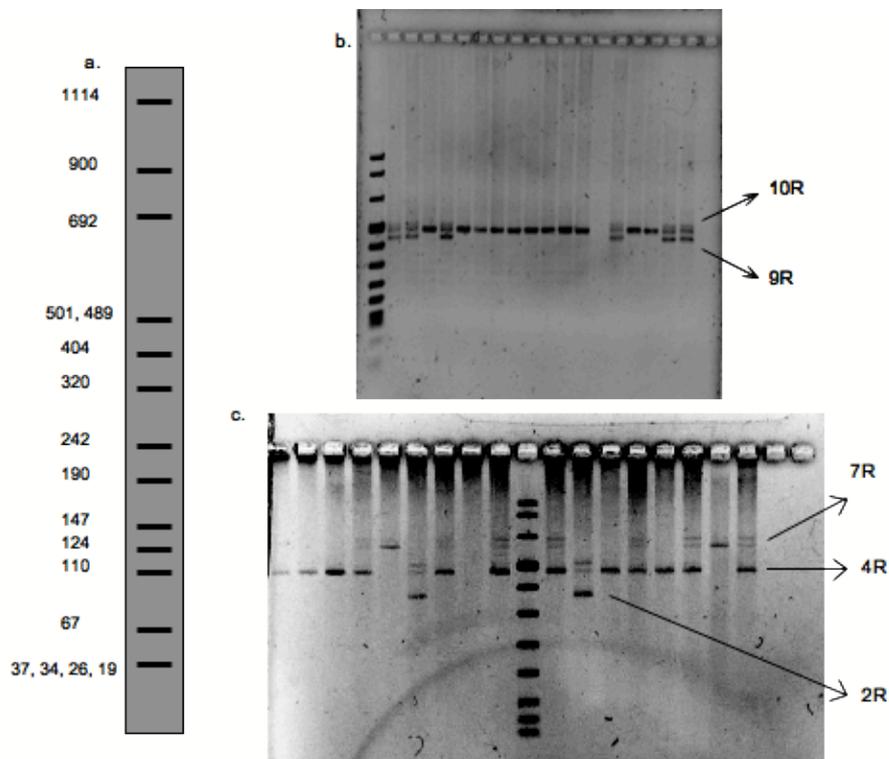


Figura 12: Geles de agarosa-metaphor 2% para detectar los alelos presentes en los genes estudiados y su relación con el marcador del peso molecular VIII de Roche a) Esquema del peso molecular que representan las bandas observadas con el marcador de peso molecular VIII b) Gel para DAT1, se marcaron con flechas las bandas que corresponden a los alelos 9 y 10 c) Gel para DRD4, se marcaron con flechas las bandas que corresponden a los alelos más comunes, que son el de 2R, 4R y 7R.

4. Frecuencias alélicas del DRD4 y del DAT1 en población mexicana y su comparación con otras poblaciones:

Las frecuencias alélicas observadas en el grupo control para los dos polimorfismos analizados se observan en las Tablas 9 (*DRD4*) y 10 (*DAT1*). Estos datos se muestran en relación a las frecuencias reportadas en otras poblaciones [Chen *et al.*, 1999; Kang *et al.*, 1999; Vyera *et al.*, 2003].

Con respecto al gen *DRD4* se observó que al igual que en la mayoría de las poblaciones los alelos de 4 y 7 repetidos representan del 80-90% de la diversidad alélica. Con respecto al gen *DAT1*, notamos que el alelo de 10R es el más común en todas la poblaciones, siendo las poblaciones indígenas de América Latina en las que se encuentra un mayor incremento en la frecuencia de este alelo (Tabla 10).

Tabla 9: Comparación de las frecuencias alélicas (%) del polimorfismo tipo VNTR localizado en el exón 3 del gen *DRD4* en una muestra de controles mexicanos y su comparación con diversas poblaciones.

<i>DRD4</i> %	2	3	4	5	6	7	8	9	
Caucásicos	0.09	0.04	0.67	0.01	0.02	0.16	0.01	0.01	Chen <i>et al.</i> , 1999 Vyera <i>et al.</i> , 2003.
Asiáticos	0.15	0.01	0.79	0.03	0.02	0.01	0.00	0.00	Chen <i>et al.</i> , 1999
Africanos	0.03	0.00	0.83	0.00	0.02	0.11	0.00	0.01	Chen <i>et al.</i> , 1999
Indígenas americanos	0.03	0.00	0.29	0.01	0.03	0.60	0.02	0.00	Vyera <i>et al.</i> , 2003
Chilenos	0.06	0.01	0.59	0.02	0.05	0.27	0.01	0.01	Vyera <i>et al.</i> , 2003
Mexicanos	0.03	0.01	0.58	0.02	0.01	0.35	0.00	0.00	Presente estudio

Tabla 10: Comparación de las frecuencias alélicas (%) del polimorfismo tipo VNTR localizado en la región 3' no traducida del *DAT1* en una muestra de controles mexicanos y su comparación con diversas poblaciones.

<i>DAT1</i> %	10R	9R	Otros	
Caucásicos	0.70	0.29	0.01	Kang <i>et al.</i> , 1999 y Vyera <i>et al.</i> , 2003
Asiáticos	0.91	0.06	0.03	Kang <i>et al.</i> , 1999
Africanos	0.37	0.28	0.35	Kang <i>et al.</i> , 1999
Indígenas mayas	0.93	0.06	0.01	Kang <i>et al.</i> , 1999
Indígenas colombianos	1.00	0.00	0.00	Vyera <i>et al.</i> , 2003
Chilenos	0.74	0.23	0.03	Vyera <i>et al.</i> , 2003
Mexicanos	0.85	0.14	0.00	Presente estudio

5. Asociación de los genes DRD4 y DAT1, pacientes con TDAH y sus comorbilidades

En los individuos control, las frecuencias genotípicas de ambos polimorfismos se encontraron en HWE. Sin embargo, en el grupo de casos, y en particular en el subgrupo de pacientes con TDAH que presentó comorbilidad con trastornos de tipo externalizado, las frecuencias no se encontraron en HWE (Tabla 11).

Tabla 11: Análisis de equilibrio de Hardy Weinberg para los genotipos DRD4 y DAT1.

DRD4 ex3	HWE	DAT1 3'UTR	HWE
Controles N=84	$\chi^2= 4.18$ g.l.= 15 p= 0.99	Controles N= 113	$\chi^2= 0.09$ g.l.= 1 p=0.75
ADHD N= 105	$\chi^2= 62.05$ g.l.= 15 p= 0.00	ADHD N=105	$\chi^2= 1.81$ g.l.= 1 p=0.17
Externalizados N=48	$\chi^2= 55.02$ g.l.= 15 p= 0.00	Externalizados N=49	$\chi^2= 0.00$ g.l.= 1 p= 1.00
Internalizados N=26	$\chi^2= 1.21$ g.l.= 15 p= 0.99	Internalizaos N=27	$\chi^2= 1.39$ g.l.= 1 p= 0.23
Mixtos N=26	$\chi^2= 5.92$ g.l.=15 p= 0.98	Mixtos N=25	$\chi^2= 1.56$ g.l.=1 p= 0.21
Inter. + Mixt. N=52	$\chi^2= 4.95$ g.l.=15 p= 0.29	Mixtos N=52	$\chi^2= 2.95$ g.l.=1 p= 0.08

No se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar las frecuencias alélicas y genotípicas entre los grupos de casos y controles (Tablas 12 a 15). Tampoco se encontró la transmisión preferente de algún alelo en el estudio de familias (Tabla 16)

Tabla 12: Frecuencias genotípicas del DRD4 en los distintos grupos y subgrupos analizados.

DRD4 N (%)	2-4	2-6	2-7	3-4	3-5	3-6	3-7	4-4	4-5	4-6	4-7	5-7	6-7	7-7	Valores estadísticos
Cont. N=84	2 (0.02)	0 (0.00)	3 (0.04)	1 (0.01)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	30 (0.36)	2 (0.02)	2 (0.02)	31 (0.37)	1 (0.01)	0 (0.00)	12 (0.14)	
TDAH N=105	6 (0.06)	1 (0.01)	1 (0.01)	1 (0.01)	1 (0.01)	1 (0.01)	1 (0.01)	35 (0.33)	0 (0.00)	4 (0.04)	44 (0.42)	0 (0.00)	4 (0.04)	6 (0.06)	$\chi^2=17$ gl= 13 p=0.19
Ext. N=48	2 (0.04)	1 (0.02)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (0.02)	0 (0.00)	1 (0.02)	14 (0.29)	0 (0.00)	2 (0.04)	20 (0.42)	0 (0.00)	3 (0.06)	4 (0.08)	$\chi^2=16$ gl= 12 p=0.16
Int. N=26	2 (0.08)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	13 (0.50)	0 (0.00)	1 (0.04)	9 (0.35)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (0.04)	$\chi^2=6.7$ gl= 9 p=0.66
Mixt. N=26	1 (0.04)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (0.04)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	6 (0.23)	0 (0.00)	1 (0.04)	15 (0.58)	0 (0.00)	1 (0.04)	1 (0.04)	$\chi^2=11$ gl= 10 p=0.35
Int.+ Mix. N=52	3 (0.06)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (0.02)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	19 (0.36)	0 (0.00)	2 (0.04)	24 (0.46)	0 (0.00)	1 (0.02)	2 (0.04)	$\chi^2=11$ gl= 9 p=0.29

*Los valores de p reportados para cualquier fila se obtuvieron a partir de la comparación con el grupo control.

Tabla 13: Frecuencias genotípicas del DAT1 en los distintos grupos y subgrupos analizados.

DAT1 N(%)	10-10	10-9	9-9	Valores estadísticos
Controles N= 113	82 (0.73)	29 (0.26)	2 (0.02)	
TDAH N= 105	71 (0.68)	33 (0.31)	1 (0.01)	$\chi^2=1.09$ gl= 2 p=0.55
Exteranlizada N=49	36 (0.74)	12 (0.25)	1 (0.02)	$\chi^2=0.12$ gl= 1 p=0.93
Interanlizada N=27	17 (0.63)	10 (0.37)	0 (0.00)	$\chi^2=1.77$ gl= 2 p=0.41
Mixta N=25	15 (0.60)	10 (0.40)	0 (0.00)	$\chi^2=2.39$ gl= 2 p=0.30
Inter. + Mixt N=52	32 (0.62)	20 (0.38)	0 (0.00)	$\chi^2= 3.13$ gl= 2 p=0.29

*Los valores de p reportados para cualquier fila se obtuvieron a partir de la comparación con el grupo control

Tabla 14: Frecuencias alélicas del DRD4 en los distintos grupos y subgrupos analizados.

DRD4 N(%)	2	3	4	5	6	7	Valores estadísticos
Controles N=84	5 (0.03)	1 (0.01)	98 (0.58)	3 (0.02)	2 (0.01)	59 (0.35)	
TDAH N=105	8 (0.04)	4 (0.02)	125 (0.60)	1 (0.01)	10 (0.05)	62 (0.30)	$\chi^2=7.59$ gl= 5 p=0.18
Externalizada N=48	3 (0.03)	2 (0.02)	52 (0.54)	1 (0.01)	6 (0.06)	32 (0.33)	$\chi^2=6.8$ gl= 5 p=0.23
Internalizada N=26	2 (0.04)	0 (0.00)	38 (0.73)	0 (0.00)	1 (0.02)	11 (0.21)	$\chi^2=5.3$ gl= 5 p=0.38
Mixta N=26	1 (0.02)	1 (0.02)	30 (0.58)	0 (0.00)	2 (0.04)	18 (0.35)	$\chi^2=3.40$ gl= 5 p=0.64
Inter. + Mixt. N=52	3 (0.03)	1 (0.01)	68 (0.65)	0 (0.00)	3 (0.03)	29 (0.28)	$\chi^2=4.54$ gl= 5 p=0.47

*Los valores de p reportados para cualquier fila se obtuvieron a partir de la comparación con el grupo control.

Tabla 15: Frecuencias alélicas del DAT1 en los distintos grupos y subgrupos analizados.

DAT1 N(%)	10R	9R	Valores estadísticos
Controles N=113	193 (0.85)	33 (0.15)	
TDAH N= 105	175 (0.83)	35 (0.17)	$\chi^2=0.35$ gl= 1 p=0.55
Externalizada N=49	84 (0.86)	14 (0.14)	$\chi^2=0.005$ gl= 1 p=0.94
Internalizada N=27	44 (0.82)	10 (0.19)	$\chi^2=0.51$ gl= 1 p=0.47
Mixta N=25	40 (0.80)	10 (0.20)	$\chi^2=0.90$ gl= 1 p=0.34
Inter. + Mixt. N=52	84 (0.81)	20 (0.19)	$\chi^2=0.13$ gl= 1 p=0.29

*Los valores de p reportados para cualquier fila se obtuvieron a partir de la comparación con el grupo control.

Tabla 16: Análisis de desequilibrio de transmisión para DRD4 y DAT1.

	Alelo	Frecuencia	Familias	S	E(S)	Var (S)	Z	P
DRD4	2	0.071	6	*	*	*	*	*
DRD4	4	0.601	18	21.0	21.5	6.25	-0.2	0.84
DRD4	5	0.020	1	*	*	*	*	*
DRD4	6	0.051	5	*	*	*	*	*
DRD4	7	0.257	16	11.0	10.5	4.25	0.243	0.80
DAT1	10	0.77	12	16	15	3.5	0.535	0.59
DAT1	9	0.23	12	8	9	3.5	-0.535	0.59

Es importante mencionar que, basados en estudios previos, esperábamos encontrar un aumento en la frecuencia de los alelos 7R del gen *DRD4* y 10R del gen *DAT1* en el grupo de pacientes comparados con el de controles [Faraone *et al.*, 2001; Maher *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2006; Faraone *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2007]. Por el contrario, encontramos una disminución en la frecuencia de ambos alelos.

6. Análisis de interacción genética entre el DRD4 y el DAT1 en pacientes con TDAH y sus comorbilidades

Es importante recordar que los trastornos psiquiátricos, y en específico el TDAH, son considerados como trastornos complejos en donde debe existir la interacción de múltiples variantes genéticas asociadas a la presencia del desorden mental. Debido a lo anterior, decidimos evaluar la interacción genética entre el *DRD4* y el *DAT1*. Para ello se realizó un análisis de regresión logística en el cual se valoró si la ausencia simultánea del genotipo 7/7 del gen *DRD4* y 10/10 del gen *DAT1* ayuda a encontrar asociación con la presencia del diagnóstico clínico de TDAH y/o con algún subgrupo formado a partir de las comorbilidades presentes en este trastorno (Tabla 17).

El análisis de regresión logística de los datos anteriormente mencionados muestra que la ausencia de los genotipos 7/7 del gen DRD4 y 10/10 del gen DAT1 se asocian con la presencia de TDAH ($p=0.04$) con un OR de 2.09 (95% I.C.= 1.02-4.66). Este resultado no se mantuvo significativo después de la corrección por Bonferroni ($p<0.025$).

En el análisis de las comorbilidades encontramos que la interacción genética mencionada en el párrafo anterior sólo fue evidente en los pacientes TDAH que presentaron al menos un trastorno internalizado comórbido (grupo inter. + mixt.) ($P=0.01$) con un OR de 2.64 (95% I.C.= 1.17-5.97). Es importante destacar que esta relación se mantuvo significativa después de la corrección por Bonferroni ($p<0.025$).

Tabla 17: Análisis de interacción entre el DRD4 y DAT1 con respecto al TDAH y sus comorbilidades

	DRD4 X DAT1			
	b	P	OR	IC 95%
TDAH	0.73	0.04	2.09	1.02 – 4.66
Exteranlizados	0.48	0.27	1.61	0.68 – 3.86
Internalizados	0.94	0.06	2.57	0.95-6.93
Mixtos	1.01	0.05	2.73	1.01-7.42
Inter+Mixtos	0.97	0.01	2.64	1.17 – 5.97

*El gen *DRD4* fue analizado basado en la ausencia del genotipo 7/7, y el gen *DAT1* fue analizado basado en la ausencia del genotipo 10/10.

XI. Discusión

La variabilidad de los genes que codifican para proteínas del sistema dopaminérgico cerebral ha sido objeto de estudio para comprender la etiología del TDAH. Varios meta-análisis han concluido que independientemente de la variabilidad en los resultados de los diferentes estudios, los polimorfismos tipo VNTR localizados en el exón 3 del gen *DRD4* y la región 3' no traducida del gen *DAT1* pueden tener un efecto discreto, en el riesgo a desarrollar TDAH [Faraone *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2006; Maher *et al.*, 2002]. Sin embargo, la mayoría de estos estudios de asociación se han realizado en población caucásica y muy pocos reportes se han enfocado a la población latinoamericana [Arcos-Burgos *et al.*, 2004; Carrasco *et al.*, 2006; Roman *et al.*, 2001], siendo este el primer trabajo realizado en sujetos que habitan en la ciudad de México.

1. Frecuencias alélicas de la población control del presente estudio, en comparación con otras poblaciones

Hasta nuestro conocimiento, el presente estudio es el primero en reportar las frecuencias alélicas para el *DAT1* en población mexicana. Por otro lado, los resultados obtenidos para el *DRD4* fueron similares a los publicados previamente por nuestro laboratorio en un grupo independiente de individuos adultos, sanos mentalmente, que participaron como controles en un protocolo de esquizofrenia [Aguirre *et al.*, 2007].

Aunque el objetivo del presente estudio no fue calcular las frecuencias alélicas de los polimorfismos *DRD4*ex3 y *DAT1*3'UTR en población mexicana, consideramos que dado a que nuestros datos provienen de un estudio epidemiológico, diseñado *ex profeso*, para obtener una muestra representativa, tomando en consideración los distintos grupos de edad,

sexo y nivel socioeconómico de la población adolescente de la ciudad de México, probablemente las frecuencias reportadas en el presente estudio sean cercanas a las frecuencias reales de la población que habita en la ciudad de México, por lo que podrían servir de referencia para futuros estudios.

Las frecuencias genotípicas de ambos polimorfismos estuvieron en equilibrio de Hardy-Weinberg, lo que indica que es poco probable que las diferencias encontradas se deban a problemas de tipificación [Hosking *et al.*, 2004; Wigginton *et al.*, 2005], asimismo sugiere que la población estudiada es sólo una [Salanti *et al.*, 2005; Wigginton *et al.*, 2005]. La aplicación de otras metodologías como los estudios de ancestría podrían ayudar a disminuir los posibles problemas de estratificación poblacional [Hinds *et al.*, 2004].

Finalmente, en este estudio observamos que las frecuencias alélicas para ambos polimorfismos tuvieron valores intermedios con respecto a las reportadas para las poblaciones caucásicas e indígenas de América. Estos resultados están en concordancia con lo reportado previamente por Hinds y cols [2004], quienes mostraron mediante el análisis de un conjunto amplio de marcadores polimórficos no ligados entre sí, que la población mestiza de la ciudad de México se constituye tanto el componente de ancestría caucásica como el componente de ancestría indígena.

2. Asociación entre *DRD4* y *DAT1* en pacientes con TDAH

No se encontró asociación entre los alelos 7R del gen *DRD4* y 10R del gen *DAT1* con el diagnóstico de TDAH, como se había planteado previamente en la hipótesis; por el contrario, encontramos una reducción en la presencia de estos alelos en el grupo de casos. Estudios

previos realizados en América Latina tampoco encontraron asociación con el alelo de 10R del gen *DAT1*, y como se describió previamente en la introducción, los resultados con respecto a alelo de 7R del gen *DRD4*, han sido inconsistentes [Arcos-Burgos *et al.*, 2004; Carrasco *et al.*, 2006; Roman *et al.*, 2001].

Existen varias explicaciones para entender estos resultados. Una podría deberse a problemas de estratificación poblacional, que es uno de los riesgos del diseño de asociación entre casos y controles; sin embargo, esto parece poco probable, debido a que la muestra control se encuentra en HWE [Salanti *et al.*, 2005; Wigginton *et al.*, 2005].

Otra explicación podría ser el bajo poder estadístico de este tipo de estudios cuando la muestra no es muy grande (Faraone *et al.*, 2005); sin embargo, es importante destacar que muchos de los estudios donde se ha encontrado asociación se han hecho con tamaños de muestra similares. Asimismo, los alelos de riesgo propuestos para el TDAH en caucásicos (7R del gen *DRD4* y 10R del gen *DAT1*) mostraron ser muy frecuentes en nuestra población control, lo que incrementa la posibilidad de cometer el error estadístico de tipo 2 (Falso negativo). En este sentido, sería importante poder replicar los resultados del presente estudio con otro grupo de individuos de la misma población y con un tamaño de muestra mayor.

Finalmente, cabe la posibilidad de que los alelos de riesgo reportados en una población no fueran los mismos para otra población, como se ha reportado con el TDAH con respecto al alelo de 2R del gen *DRD4* en población asiática (Leung *et al.*, 2005) y al alelo de 9R de gen *DAT1* en población de la India (Das *et al.*, 2007), tema que se discutirá detalladamente más adelante en este trabajo.

Por otro lado, aunque en los estudios de asociación no es requisito reportar el análisis de HWE para el grupo de casos (Salanti *et al.*, 2005), llama la atención que al hacerlo este grupo se encontrara en desequilibrio. Esto se puede deber a muchos factores entre ellos, el que el TDAH es un trastorno complejo, en donde la evidente heterogeneidad clínica observada en términos de las comorbilidades asociadas al trastorno, podría estar sustentada en una heterogeneidad de los factores asociados, incluidos los genéticos (Biederman *et al.*, 1992; Acosta *et al.*, 2007; Ganizadeh *et al.*, 2008).

Llama la atención que el único subgrupo que no se mantuvo en HWE fue el de pacientes con comorbilidad externalizada. En este sentido, se ha reportado que el subtipo clínico con comorbilidad con trastorno de conducta muestra características particulares tales como representar un fenotipo clínico más severo; debido a lo anterior se ha propuesto como un grupo distinto al resto de los pacientes que presentan TDAH (Holmes *et al.*, 2002), por lo que sería interesante reclutar en el futuro mediato una muestra de mayor tamaño para poder analizar estas características.

3. Análisis de interacción entre el DRD4 y el DAT1 en pacientes con TDAH y sus comorbilidades

El TDAH muy probablemente tiene una naturaleza poligénica, sin embargo hay pocos estudios que han analizado la posible interacción entre dos o más variantes genéticas. Esto resulta particularmente interesante para intentar entender con mayor detalle la influencia de los genes en el trastorno [Spencer *et al.*, 2002; Acosta, 2007; Swanson *et al.*, 2007].

En este estudio observamos que la ausencia simultánea de los genotipos 7/7 del gen *DRD4* y

10/10 del gen *DATI* se asocia con el fenotipo de TDAH. Este resultado contrasta con estudios previos, en donde se encontró una asociación entre la presencia simultánea del genotipo 7+ de *DRD4* y del genotipo 10/10 de *DATI* [Roman *et al.*, 2001; Carrasco *et al.*, 2006] y con otro estudio en donde no se encontró ninguna asociación [Qian *et al.*, 2007]

En este sentido, se ha reportado que el efecto de las variantes genéticas puede variar en función al bagaje étnico de la población de interés. Por ejemplo, el genotipo SS del transportador a serotonina (5HTTLPR) se ha asociado a la presencia de mayores niveles del ácido 5-hidroxi-indolacético (5HIAA: un indicador de los niveles de serotonina) en el líquido céfalo-raquídeo de individuos de origen afro-americano; en tanto, este mismo genotipo se ha asociado a menores niveles de este metabolito en individuos de origen europeo-americano [Williams *et al.*, 2003]. En este mismo sentido, y con respecto al *DRD4*, se encontró una correlación significativa entre los alelos cortos de este sistema polimórfico (es decir alelos de 2-4 R) con el comportamiento externalizado y cuidado parental negativo-intrusivo en individuos afro-americanos, mientras que en individuos europeo-americanos esta misma asociación se encontró con los alelos largos del gen (alelos de 5-7 R) [Popper *et al.*, 2007]. Estas discrepancias se pueden explicar por estilos de vida distintos que pueden influir en la regulación de expresión de los genes o por diferencias genéticas entre los distintos grupos étnicos, asociadas a patrones desiguales en el desequilibrio de ligamiento entre los marcadores genéticos y el alelo de riesgo de la enfermedad.

Sin embargo, el resultado anterior no se mantuvo significativo después de la corrección de Bonferroni, por lo que es probable que sea un falso positivo [Sullivan, 2007] y por lo tanto sería necesario intentar incrementar el tamaño de la muestra y evaluar si se mantiene la asociación.

Por otra parte, resultó interesante observar que la ausencia de los genotipos 7/7 del gen DRD4 y 10/10 del gen DAT1 se asocia al subgrupo de pacientes con al menos un trastorno internalizado, resultado que se mantiene significativo después de la corrección por Bonferroni ($p=0.01$). Esta asociación parece ser congruente con dos estudios previos, uno de los cuáles encontró que pacientes TDAH que no presentan el alelo de 7R DRD4 mostraron ser más ansiosos y depresivos que aquellos que portan por lo menos una copia de esta variante genética [Tahir *et al.*, 2000]. En otro reporte, se observó que la variabilidad genética en otras regiones del DAT1 se asocia a pacientes con TDAH que no presentaron trastorno de conducta [Zhou *et al.*, 2007].

Hasta nuestro conocimiento, este es el primer estudio que analiza este tipo de interacción genética con respecto a las comorbilidades en el TDAH. Estos resultados sugieren que la presencia de comorbilidades con trastornos internalizados en el TDAH representa una entidad genética distinta, una idea que no ha sido suficientemente evaluada en la literatura internacional, debido a que la investigación se ha enfocado en el análisis de las comorbilidades externalizadas.

Asimismo, los resultados del presente estudio proponen que la variabilidad en el *DRD4* y el *DAT1* son una causa común a la presencia de TDAH con comorbilidad internalizada y mixta; sin embargo, es importante mencionar que la interacción entre estos 2 genes probablemente no es suficiente para el desarrollo del trastorno y es necesario evaluar la variabilidad en otros genes, así como factores ambientales adversos.

Por otro lado, el que la asociación se haya encontrado en pacientes con TDAH que presentan al menos un trastorno internalizado, puede deberse a que los genes analizados se encuentren

también asociados a trastornos internalizados y que esta relación sea independiente de la presencia de TDAH. En este sentido, también será importante analizar las frecuencias alélicas y genóticas de estos polimorfismos en pacientes con trastornos como la ansiedad y la depresión.

Finalmente, es importante destacar que los resultados expuestos en el presente estudio deben considerarse como preliminares y es necesario replicar estos datos en muestras independientes y de mayor tamaño.

XII. Conclusiones:

No se encontraron diferencias significativas entre el grupo de pacientes con TDAH y controles, lo que demuestra el valor de los estudios en diferentes grupos étnicos.

Se encontraron diferencias significativas entre los grupos de casos y controles al hacer el análisis de interacción genética, lo que sugiere un efecto poligénico en la expresión de este trastorno psiquiátrico.

Se encontraron diferencias significativas entre los controles y los grupos de casos con comorbilidad internalizada y mixta, lo que sugiere que las comorbilidades del TDAH nos ayudan a identificar distintos subgrupos clínicos y que probablemente cada uno esté asociado a variantes genéticas distintas.

Lo anterior también sugiere que la heterogeneidad clínica está asociada a heterogeneidad genética y refuerza la idea de que más de un gen está involucrado en la etiología de los trastornos psiquiátricos.

Finalmente, es necesario realizar mayor investigación para poder entender la influencia que tienen los genes en el desarrollo de este trastorno psiquiátrico. Algunas de las propuestas se mencionan en el apartado de perspectivas del presente trabajo.

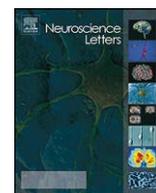
XIII Perspectivas:

1. Intentar replicar estos resultados en una muestra independiente.
2. Realizar estudios de interacción gen-medio ambiente.
3. Estudiar si el efecto de las variantes genéticas asociado al TDAH en este estudio en distintos trastornos internalizados, con el objeto de saber si esta asociación depende de la presencia del TDAH.
4. Por otro lado, sería importante investigar si existe un cambio en la expresión de estos genes de acuerdo al polimorfismo que presenten, con el objetivo de intentar entender como estas variantes genéticas afectan el fenotipo de un individuo.
5. Finalmente, se ha reportado que variantes en la secuencia de los repetidos del VNTR del gen *DRD4* están más asociadas con la presencia del TDAH que el alelo de 7R en sí, por lo que considero de sumo interés analizar estas secuencias en nuestra población de estudio.



Contents lists available at ScienceDirect

Neuroscience Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/neulet

Genetic interaction analysis for DRD4 and DAT1 genes in a group of Mexican ADHD patients

Martínez-Levy Gabriela^a, Díaz-Galvis John^a, Briones-Velasco Magdalena^a, Gómez-Sánchez Ariadna^a, De la Peña-Olvera Francisco^b, Sosa-Mora Liz^b, Palacios-Cruz Lino^b, Ricardo-Garcell Josefina^b, Reyes-Zamorano Ernesto^b, Cruz-Fuentes Carlos^{a,*}

^a Laboratorio de Genética Psiquiátrica, Subdirección de Investigaciones Clínicas, Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente Muñiz", Mexico City, Mexico

^b Clínica de Adolescentes, Dirección de Servicios Clínicos, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 September 2008

Received in revised form

28 November 2008

Accepted 1 January 2009

Keywords:

Attention deficit hyperactivity disorder

Dopamine D4 receptor gene

Dopamine transporter gene

Genetic interaction

Internalized and externalized comorbidities

Mexican

ABSTRACT

Attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD) is a clinically complex and multifactorial psychiatric disorder of inattention, hyperactivity and impulsivity. Family, twin and adoption studies suggest a genetic influence in the etiology of ADHD. Two variable number of tandem repeats (VNTR) polymorphic systems have been frequently associated with this disorder: the 7 repeat (R) allele in exon 3 of the dopamine receptor D4 (DRD4) and the 10R allele located in the 3' untranslated region (UTR) of the dopamine transporter (DAT1). We conducted a case-control association study between ADHD and these polymorphisms in a group of adolescent inhabitants of the metropolitan area of Mexico City. In addition, we evaluated the interaction between these genes, the disorder and its associated psychiatric comorbidities. No positive association between ADHD and the 7R allele of DRD4 or the 10R allele of DAT1 was observed; however, compared to controls, patients with internalized comorbidities had a lesser frequency of genotypes with the 7R allele of DRD4 and the 10/10 genotype of DAT1. A logistic regression analysis showed that the simultaneous absence of the 10/10 DAT1 and 7/7 DRD4 genotypes predicts membership to the group of ADHD patients with internalized comorbidities (e.g. anxiety, depression). Our results highlight the importance of cross-ethnic research and the possibility of a distinct genetic basis that underlies the type of comorbidities associated with ADHD. This result should be considered in terms of the study design, and further replication is necessary in an independent sample.

© 2009 Published by Elsevier Ireland Ltd.

Attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD) is a common childhood-onset psychiatric syndrome of hyperactivity, impulsivity and impaired sustained attention. This disorder has a prevalence of 4–12% in the school-aged population with 50–80% of patients experiencing symptoms that persist through adolescence and into adulthood [33]. Social dysfunction and skill deficits associated with ADHD may have a significant impact on the labor and academic life of affected individuals [1,8].

It has been estimated that 20–55% of ADHD patients express other externalized psychiatric disorders (e.g. conduct disorder, oppositional defiant disorder), whereas approximately 10–50% express internalized (e.g. anxiety, depression) comorbidities, leading to the conceptualization of ADHD as a clinically heterogeneous entity [2,17,33]. Furthermore, it has been reported that these char-

acteristics are aggregated in families [7], leading to some authors to propose that the study of these comorbidities may help in the classification of different ADHD subtypes [7,13,22].

Attention-deficit hyperactivity disorder is regarded as a heritable, complex and multifactorial disorder that involves the interaction of biological and environmental factors [1,35]. Pharmacological studies, animal models and brain images have all demonstrated that catecholamine neural pathways are relevant for understanding the neurobiological basis of this disorder. Specifically, it has been proposed that alterations in the cerebral dopamine system partially explain the cardinal symptoms and effectiveness of pharmacological treatments [5,15,38]. Thus, genes encoding dopamine-related proteins have been evaluated in relation with ADHD [12,15,24].

In particular, two polymorphic systems have been the focus of many published studies: a variable number of tandem repeats (VNTR) in exon III of the dopamine D4 receptor gene (DRD4) and the VNTR located on the 3' untranslated region (3'-UTR) of the dopamine transporter gene (SCL6A3 or DAT1) [15,16,35]. Several meta-analyses have concluded that the 7 repeat (R) allele of DRD4 yield a small but statistically significant effect towards the risk of

* Corresponding author at: Psychiatric Genetic Department, Clinical Research Branch, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramon de la Fuente, Calzada México-Xochimilco 101, San Lorenzo Huipulco, Tlalpan CP 14370, México, D.F., Mexico. Tel.: +55 56552811x210; fax: +55 55133722.

E-mail address: cruz@imp.edu.mx (C.-F. Carlos).

developing ADHD [15,27,29]. The evidence suggesting an association with the 10R allele of DAT1 is less consistent; one meta-analysis supports this association [39] while others do not [27,29].

It has also been suggested that ADHD is polygenic in nature [15,18]. For this reason, interaction analyses may be used as a way of better understanding how genes influence this disorder. To date, only a few reports have explored the genetic interaction between DRD4 and DAT1, as most studies have evaluated the independent effect of these genes [10,19,31,32].

In this way, the aim of the present study was to explore the possible interaction among the aforementioned genes, ADHD, and the psychiatric comorbidities associated with this disorder.

This study was conducted in accordance with the ethical principles of the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethics and Scientific Committees of the National Psychiatric Institute “Ramon de la Fuente” (INPRF) in Mexico City. All procedures were performed with the adequate understanding and written consent of the subjects.

One hundred and five individuals (12–18 years old) who met diagnostic criteria for ADHD were recruited from the Clinic for Adolescents at the INPRF.

A three-stage process was used to establish the ADHD diagnosis. The initial step included a clinical screening for any current psychiatric disorder through the Mini International Neuropsychiatric interview for children and adolescents (M.I.N.I. KID), a short structured interview that renders a presumptive diagnosis of mental disorders based on Diagnostic Statistical Manual IV Revised (DSMIV-R) criteria. Subsequently, a certified psychiatrist by way of a clinical interview confirmed the diagnosis and documented other relevant clinical issues of the patient. Lastly, a definitive diagnosis of ADHD and associated comorbidities was obtained through the application of the Brief Psychiatric Rating Scale for Children (BPRS-C) by a child/adolescent psychiatrist. It is important to mention that the parents of probands were also interviewed at the second and third stages of evaluation in order to corroborate the clinical data.

Participants were excluded if the expressed symptoms were better explained by the presence of another psychiatric disorder, specifically pervasive developmental disorder.

The patients were divided into categories according to the comorbidities identified: externalized, including patients with oppositional defiant disorder, conduct disorder and substance abuse ($n = 48$); and internalized, including those expressing at least one internalized disorder such as dysthymia, major depressive disorder, phobic and anxiety disorders ($n = 53$). Five patients did not present any comorbidity.

The control group included participants from a recent epidemiological survey of mental health in adolescents developed by the INPRF [6]. Three thousand and five subjects (between the ages of 12 and 18) living in the metropolitan area of Mexico City were interviewed face to face by personnel trained in the use of the Adolescent-Composite International Diagnostic Interview-

Computer Assisted Personal Interview (CIDI-CAPI). This inquiry generates a Psychiatric diagnosis based on the DSM IV-R and ICD-10 (International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems) criteria. The 1261 participants who did not fulfill diagnostic criteria for a psychiatric disorder were categorized as non-cases. From the 883 DNA samples available, we chose the first 105 that were age and sex matched with the case group. Eleven additional samples (10% of the sample) were randomly selected, sequenced and included to minimize the loss of information due to genotyping problems.

In addition, it was possible to obtain blood samples from the parents of 30 probands, which were subsequently analyzed in a family association study.

Blood samples from the patients were drawn by venopuncture and DNA was extracted by a conventional phenol-chloroform method. For the control group, mouthwash samples were obtained and DNA was extracted using the Puregene DNA purification Kit (GENTRA).

Amplification of the DRD4 exon 3 VNTR was performed using conditions reported by our group [3] and primers described by Lichter [28]. The DAT1 3'-UTR VNTR was performed as reported by Kang et al. [23]. Genotyping was determined through agarose gel electrophoresis. In order to assure the correct length of the alleles, bands were compared with standards of known molecular weight and/or with the group of samples previously sequenced. Gels were read in a blind fashion by two different evaluators. Almost all samples were genotyped at least twice in order to ensure their correct identification; doubtful genotypes were excluded from the analysis.

Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was tested with the HW subroutine of the genetic LINKAGE program [30].

Allele and genotype frequencies were analyzed with χ^2 -test. A logistic regression analysis was used to evaluate the independent and interactive effect of the simultaneous absence of the 10/10 genotype of DAT1 and 7/7 genotype of DRD4 in ADHD patients and associated comorbidities. These analyses were run with SPSS software (v. 11). Bonferroni correction was then carried out for positive results and the significance level was set at 0.025 (0.05/2, two polymorphic systems).

Finally, the transmission disequilibrium test (TDT) was performed using the 1.7.3 version of the FBAT program [25].

Table 1 shows allelic frequencies for both polymorphic systems. As expected, genotype frequencies in control subjects were in HWE (DRD4: $\chi^2 = 4.18$, d.f. = 15, $p = 0.997$; DAT1: $\chi^2 = 0.095$, d.f. = 1, $p = 0.757$). Since our controls were derived from an epidemiological study, the allelic data reflected in this group should approach to the real frequencies for the adolescent population of Mexico City. It is worth to note that the allele frequencies of the DRD4 polymorphism in exon 3 were comparable with our previous results in an independent control group [3]. Moreover, to our knowledge, this is the first report that documents the genetic variability of the DAT1 3'-UTR polymorphism in Mexicans.

Table 1

Q6 Allele frequencies of DRD4 and DAT1 in controls, ADHD patients, and the comorbidities associated with the disorder.

Polymorphism	Alleles						Statistics	Alleles		Statistics		
	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a	7 ^a		10 ^b	9 ^b			
Controls ($n = 84$)	3.0	0.6	58.3	1.8	1.2	35.1	$\chi^2 = 7.59$, d.f. = 5, $p = 0.18$, 4/no 4 Fisher two side test $p = 0.833$	Controls ($n = 113$)		85.4	14.6	
ADHD ($n = 105$)	3.8	1.9	59.5	0.5	4.8	29.5		ADHD ($n = 105$)		83.3	16.7	$\chi^2 = 0.35$, d.f. = 1, $p = 0.55$
Externalized ($n = 48$)	3.1	2.1	54.2	1.0	6.3	33.3	$\chi^2 = 6.8$, d.f. = 5, $p = 0.23$ 4/no 4 Fisher two side test $p = 0.521$	Externalized ($n = 49$)		89.0	14.3	$\chi^2 = 0.005$, d.f. = 1, $p = 0.94$
Internalized ($n = 52$)	2.9	1.0	65.4	0	2.9	27.8		Internalized ($n = 52$)		80.8	19.2	$\chi^2 = 0.81$, d.f. = 1, $p = 0.36$
												Fisher two side test $p = 0.25$

Numbers in cells represent percentages. The statistical analyses showed correspond to the comparison between the groups represented in the corresponding row vs. controls.

^a DRD4 exon 3 VNTR 48 bp.

^b DAT1 3'-UTR VNTR 40 bp.

Table 2

Q7 The independent and interactive effect of DRD4 and DAT1 in ADHD and associated comorbidities.

	DAT1				DRD4				DAT1 × DRD4*			
	b	p	OR	IC 95%	b	p	OR	IC 95%	b	p	OR	IC 95%
ADHD	0.23	0.42	1.26	0.78–2.26	1.01	0.05	2.75	0.98–7.67	0.73	0.04	2.09	1.02–4.66
Externalized	−0.04	0.90	0.95	0.48–2.03	0.60	0.31	1.83	0.55–6.04	0.48	0.27	1.61	0.68–3.86
Internalized	0.50	0.15	1.65	0.82–3.31	1.42	0.06	4.16	0.83–19.4	0.97	0.01	2.64	1.17–5.97

DRD4 polymorphism was analyzed based on the absence of the 7/7 genotype, and DAT1 was analyzed based on the absence of the 10/10 genotype.

Based on previous reports, an excess of the 7R allele of DRD4 and 10R allele of DAT1 in patients compared to controls was expected. We found instead no significant differences for allele and genotype frequencies between groups of comparison (DRD4 genotype: $\chi^2 = 17.18$, d.f. = 13, $p = 0.19$; DRD4 allele: $\chi^2 = 7.59$, d.f. = 5, $p = 0.18$; DAT1 genotype: $\chi^2 = 1.09$, d.f. = 2, $p = 0.57$; DAT1 allele: $\chi^2 = 0.35$, d.f. = 1, $p = 0.55$). The family study did not show a preferential allelic transmission for either of the genes (DRD4: $z = 0.535$, $p = 0.59$; DAT1: $z = 0.2$, $p = 0.8$).

On the other hand, when the ADHD group was analyzed in terms of other expressed comorbidities we observed a small decrement of 7R allele of DRD4 and the 10R allele of DAT1 in addition to a tendency towards an increasing number of 4R alleles in patients with internalized comorbidities, Table 1.

A logistic regression analysis showed that the simultaneous absence of the 10/10 genotype of DAT1 and 7/7 genotype of DRD4 predicts the presence of ADHD with internalized comorbidities ($b = 0.974$, $p = 0.01$) with an OR of 2.649 (CI 95% 1.175–5.972), Table 2.

Genes that codify proteins involved in neural dopaminergic pathways are interesting candidates for the study of ADHD. A few metanalysis have concluded that, while important variability occurs across studies, the DRD4 exon 3 and the DAT1 3'-UTR polymorphisms render a small effect towards the risk of developing ADHD [14,39]. The majority of association studies have evaluated Caucasian populations and there are few reports in Latin-Americans [10,19,32], making this the first study in subjects of Mexican ancestry.

The allelic frequencies presented in this study were between those reported for Caucasian and Indigenous groups across Latin America (DRD4 [11], DAT1 [23]). These results support the observation that allelic frequencies of both polymorphic systems differ widely across populations [11,23,37], and are in agreement with recent data that show that the population of Mexico City represents a genetic admixture of Caucasian and Indigenous groups [20].

The purported association between the 7R allele of DRD4, the 10R allele of DAT1 and ADHD was not observed in the present study. Previous reports in Latin Americans have failed to show an association with the 10R allele of DAT1, and the literature surrounding the 7R allele of the DRD4 is inconsistent [4,10,19,32]. Possible explanations for this discrepancy include population stratification and the elevated frequency of the risk allele in a relatively small sample. It is also possible that particular genetic variants of specific phenotypes (e.g. ADHD) differ across ethnic groups. This can be seen for example with the association of the 2R allele of DRD4 and ADHD in the Asian population [26], and the lack of association with the 10R allele in the Chinese Han population [38].

To date, there are few studies that have evaluated the genetic interaction between DRD4 and DAT1 in relation to ADHD. While some studies have reported a positive interaction between the 7+ genotype of DRD4 and the 10/10 genotype of DAT1 [10,19,32], others such as Qian et al. did not find the same association [31].

On the other hand, only few reports have evaluated the genetic influences of these polymorphic systems regarding ADHD comorbidities [21,24,36]. For example, an association between the 7R allele of DRD4 and ADHD with externalized disorders has been reported [21,24]. Additionally, a family-based study in a Turkish

population showed that patients without the 7R allele were more anxious and depressed than those possessing at least one copy of this variant [36].

In this sense, the present study showed that the simultaneous absence of the 10/10 genotype of DAT1 and 7/7 genotype of DRD4 predicts membership to the group of patients with internalized comorbidities. This finding raises the following question: does the genetic variability associated with patients expressing internalized comorbidities could differ from those who express solely externalized disorders? This is a proposal that has yet to be extensively studied. Notwithstanding, a more parsimonious explanation could be that our results represent a false positive association [34].

To our knowledge, this is the first study that explores an interaction between DRD4 and DAT1 in relation to ADHD and its comorbidities; nevertheless, the results presented in this study must be considered as preliminary and merit proper replication.

Future research that includes haplotype analysis of these genes, especially for DAT1 [9], as well as psychosocial and adversity factors (e.g. family dysfunction, cognitive style of coping, parental detachment, etc.) is warranted in order to fully understand this heterogeneous, complex, and multifactorial disorder.

Acknowledgements

This study was partially supported by a grant from CONACYT COI-46594-SEP-2004 to CSC-F; GML received a scholarship from CONACYT through the Postgraduate Program in Biological Sciences from the National University of Mexico.

We would like to acknowledge the expert advice from Alma Lenz M.D. and Josué Vásquez M.D. in the clinical classification of cases as well as all members of the Psychiatric Genetics Department involved in this project.

We would like to thank Joanna McDermaid M.D. for the English revision of this paper.

Particularly we are indebted to the patients and families for their continuous support and participation.

References

- [1] M.T. Acosta, et al., Aspectos genéticos y moleculares en el trastorno por Déficit de Atención/Hiperactividad: Búsqueda de los genes implicados en el diagnóstico clínico, *Rev. Neurol.* 44(Suppl. 2) (2007) S37–S41.
- [2] M.T. Acosta, F.X. Castellanos, K.L. Bolton, J.Z. Balog, P. Eagen, L. Nee, J. Jones, L. Palacio, C. Sarampote, H.F. Russell, K. Berg, M. Arcos-Burgos, M. Muenke, Latent class subtyping of attention deficit/hyperactivity disorder and comorbid conditions, *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* 47 (7) (2008) 797–807.
- [3] A.J. Aguirre, R. Apiquián, A. Fresán, C. Cruz-Fuentes, Association analysis of exon III and exon I polymorphisms of the dopamine D4 receptor locus in Mexican psychotic patients, *Psychiatry Res.* 153 (3) (2007) 209–215.
- [4] M. Arcos-Burgos, F.X. Castellanos, D. Konecki, F. Lopera, D. Pineda, J.D. Palacio, J.L. Rapoport, K. Berg, J. Bailey-Wilson, M. Muenke, Pedigree disequilibrium test (PDT) replicates association and linkage between DRD4 and ADHD in multigenerational and extended pedigrees from a genetic isolate, *Mol. Psychiatry* 9 (3) (2004) 252–259.
- [5] A.F.T. Arnsten, Fundamentals of attention/deficit hyperactivity disorder: circuits and pathways, *J. Clin. Psychiatry* 67 (8) (2006) 7–12.
- [6] C. Benjet, M.E. Medina-Mora, G. Borges, et al., youth mental health in a populous city of the developing world: results from the Mexican Adolescent Mental Health Survey, *J. Child Psychol. Psychiatry*, in press.
- [7] J. Biederman, S.V. Faraone, K. Keenan, J. Benjamin, B. Krifcher, C. Moore, S. Spric-Buckminster, K. Ugaglia, M.S. Jellinek, R. Steingard, T. Spencer, D. Nor-

- man, R. Kolodny, I. Kraus, J. Perrin, M.B. Keller, M.T. Tsuang, Further evidence for family-genetic risk factors in attention deficit hyperactivity disorder, patterns in comorbidity in probands and relatives in psychiatrically referred samples, *Arch. Gen. Psychiatry* 49 (1992) 728–738.
- [8] J. Biederman, A.F. Arnsten, S.V. Faraone, A.E. Doyle, T.J. Spencer, T.E. Wilens, M.D. Weiss, S.A. Safren, L. Culppeper, New developments in the treatment of ADHD, *J. Clin. Psychiatry* 67 (1) (2006) 148–159.
- [9] K.J. Brookes, X. Xu, R. Anney, B. Franke, K. Zhou, W. Chen, T. Banaschewski, J. Buitelaar, R. Ebstein, J. Eisenberg, M. Gill, A. Miranda, R.D. Oades, H. Roeyers, A. Rothenberger, J. Sergeant, E. Sonuga-Barke, H.C. Steinhausen, E. Taylor, S.V. Faraone, P. Asherson, Association of ADHD with genetic variants in the 5'-region of the dopamine transporter gene: evidence for allelic heterogeneity, *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 147B (8) (2008) 1519–1523.
- [10] C. Carrasco, P. Rothhammer, M. Moraga, H. Henríquez, R. Chakraborty, F. Aboitiz, F. Rothhammer, Genotypic interaction between DRD4 and DAT1 loci is a high risk factor for attention-deficit/hyperactivity disorder in Chilean families, *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 141 (1) (2006) 51–54.
- [11] F.M. Chang, J.R. Kidd, K.J. Livak, A.J. Pakstis, K.K. Kidd, The world-wide distribution of allele frequencies at the human dopamine D4 receptor locus, *Hum. Genet.* 98 (1) (1996) 91–101.
- [12] R. Díaz-Heijtz, F. Mulas, H. Forsberg, Alteraciones de los patrones de los marcadores de la dopamina en el trastorno por déficit de atención e hiperactividad, *Rev. Neurol.* 42 (Suppl. 2) (2006) S19–S23.
- [13] S.V. Faraone, J. Biederman, E. Mick, A.E. Doyle, T. Wilens, T. Spencer, E. Fraizer, K. Mullen, A family study of psychiatric comorbidity in girls and boys with attention deficit/hyperactivity disorder, *Biol. Psychiatry* 350 (8) (2001) 586–592.
- [14] S.V. Faraone, A.E. Doyle, E. Mick, J. Biederman, Meta-analysis of the association between the 7-repeat allele of the dopamine D(4) receptor gene and attention deficit hyperactivity disorder, *Am. J. Psychiatry* 158 (7) (2001) 1052–1057.
- [15] S.V. Faraone, J. Biederman, Pathophysiology of attention-deficit/hyperactivity disorder, in: K.L. Davis, D. Charney, J.T. Coyle, C. Nemeroff (Eds.), *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress, 1st ed.*, Williams & Wilkins, Lippincott, 2002, pp. 577–596.
- [16] S.V. Faraone, R.H. Perlis, A.E. Doyle, J.W. Smoller, J.J. Goralnick, M.A. Holmgren, P. Sklar, Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder, *Biol. Psychiatry* 57 (2005) 1313–1323.
- [17] A. Ganizadeh, M.R. Mohammadi, R. Moini, Comorbidity of psychiatric disorders and parental psychiatric disorder of ADHD children, *J. Atten. Disord.* 12 (2) (2008) 149–155.
- [18] P. Heiser, S. Friedel, A. Demfle, K. Konrad, J. Smidt, J. Grabarkiewicz, B. Herpertz-Dahlmann, H. Remschmidt, J. Hebebrand, Molecular genetic aspects of attention deficit hyperactivity/disorder, *Neurosci. Behav. Rev.* 28 (2004) 625–641.
- [19] H. Henríquez, M. Henríquez, X. Carrasco, P. Rothhammer, E. Llop, F. Aboitiz, F. Rothhammer, Combinación de genotipos DRD4 y DAT1 constituye un importante factor de riesgo en miembros de familias de Santiago de Chile con déficit atencional, *Rev. Med. Chile* 136 (2008) 719–724.
- [20] D.A. Hinds, R.P. Stokowski, N. Patil, K. Konvicka, D. Kershenovich, D.R. Cox, D.G. Ballinger, Matching strategies for genetic association studies in structured populations, *Am. J. Hum. Genet.* 74 (2004) 317–325.
- [21] J. Holmes, A. Payton, J. Barret, R. Harrington, P. McGuffin, M. Owen, W. Ollier, J. Worthington, M. Gill, A. Kirley, M. Fitzgerald, P. Asherson, S. Curran, J. Mill, A. Gould, E. Taylor, L. Kent, N. Craddock, A. Thapar, Association of DRD4 in children with ADHD and comorbid conduct problems, *Am. J. Med. Genet.* 114 (2) (2002) 150–153.
- [22] P.S. Jensen, S.P. Hinshaw, H.C. Kraemer, N. Leonora, J.H. Newcorn, H.B. Abikoff, J.S. March, L.E. Arnold, D.P. Cantwell, C.K. Conners, G.R. Elliot, L.L. Greenhill, L. Hechtman, B. Hoza, W.E. Pelham, J.B. Severe, J.M. Swanson, K.C. Wells, T. Wigal, B. Vitiello, ADHD comorbidity findings from the MTA study: comparing comorbid subgroups, *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* 40 (2) (2001) 147–158.
- [23] A.M. Kang, M.A. Palmatier, K.K. Kidd, Global variation of a 40 bp VNTR in the 3'-untranslated region of the dopamine transporter gene (SLC6A3), *Biol. Psychiatry* 46 (1999) 151–160.
- [24] A. Kirley, Z. Hawi, M. Phil, G. Daly, M. McCarron, C. Mullins, N. Millar, I. Waldman, M. Fitzgerald, M. Gill, Dopaminergic system genes in ADHD: toward a biological hypothesis, *Neuropsychopharmacology* 27 (4) (2002) 607–618.
- [25] C. Lange, E.K. Silverman, X. Xu, S.T. Weiss, N.M. Laird, A multivariate family-based association test using generalized estimating equations: FBAT-GEE, *Biostatistics* 4 (2003) 195–306.
- [26] P.W.L. Leung, C.C. Lee, S.F. Hung, T.P. Ho, C.P. Tang, S.L. Kwong, S.Y. Leung, S.T. Yuen, F. Lieh-Mak, J. Oosterlaan, D. Grady, A. Harxhi, Y.C. Ding, H.C. Chi, P. Flodman, S. Schuck, M.A. Spence, R. Moyzis, J. Swanson, Dopamine receptor D4 (DRD4) Gene in Han Chinese children with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): increased prevalence of the 2-repeat allele, *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 133B (2005) 54–56.
- [27] D. Li, P.C. Sham, M.J. Owen, L. He, Meta-analysis shows significant association between dopamine system genes and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD), *Hum. Mol. Genet.* 15 (14) (2006) 2276–2284.
- [28] J.B. Lichten, C.L. Barr, J.L. Kenedy, H.H. Van Tol, K.K. Kidd, K.J. Livak, A hypervariable segment in the human dopamine D4 receptor (DRD4) gene, *Hum. Mol. Genet.* 2 (6) (1993) 767–773.
- [29] B.S. Maher, M.L. Marazita, R.E. Ferrell, M.M. Vanyukov, Dopamine system genes and attention deficit hyperactivity disorder: a meta-analysis, *Psychiatr. Genet.* 12 (4) (2002) 207–215.
- [30] J. Ott, Program HWE[®], Utility Programs for Analysis of Genetic Linkage, Columbia University, 1988–2001, <http://linkage.rockefeller.edu/soft/linkutil/>.
- [31] Q. Qian, Y. Wang, J. Li, L. Yang, B. Wang, R. Zhou, S.J. Glatt, S.V. Faraone, Evaluation of potential Gen–Gen interactions for attention deficit hyperactivity disorder in the Han Chinese population, *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 144 B (2007) 200–206.
- [32] T. Roman, M. Schmitz, G. Polanczyk, M. Eizirik, L.A. Rohde, M.H. Hutz, Attention-deficit hyperactivity disorder: a study of association with both the dopamine transporter gene and the dopamine D4 receptor gene, *Am. J. Med. Genet.* 105 (5) (2001) 471–478.
- [33] G.A. Stefanatos, I.S. Baron, Attention-deficit/hyperactivity disorder: a neuropsychological perspective towards DSM-V, *Neuropsychol. Rev.* 17 (1) (2007) 5–38.
- [34] P.F. Sullivan, Spurious genetics associations, *Biol. Psychiatry* 61 (2007) 1121–1126.
- [35] J.M. Swanson, M. Kinsbourne, J. Nigg, B. Lanphear, G.A. Stefanatos, N. Volkow, E. Taylor, B.J. Casey, F.X. Castellanos, P.D. Wadhwa, Etiologic subtypes of attention-deficit/hyperactivity disorder: brain imaging, molecular genetic and environmental factors and the dopamine hypothesis, *Neuropsychol. Rev.* 17 (1) (2007) 39–59.
- [36] E. Tahir, Y. Yazgan, B. Cirakoglu, F. Ozbay, I. Waldman, P.J. Asherson, Association and linkage of DRD4 and DRD5 with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) in a sample of Turkish children, *Mol. Psychiatry* 5 (4) (2000) 396–404.
- [37] G. Vieyra, M. Moraga, H. Henríquez, F. Aboitiz, F. Rothhammer, Distribución de alelos de los genes DRD4 y DAT1 del sistema dopaminérgico en la población mixta de Santiago de Chile, *Rev. Med. Chile* 131 (2) (2003) 135–143.
- [38] Y. Wang, Z. Wang, K. Yao, K. Tanaka, Y. Ynag, O. Shirakawa, K. Maeda, Lack of association between the dopamine transporter gene 3' VNTR polymorphism and attention deficit hyperactivity disorder in Han Children: case-control and family based studies, *Kobe J. Med. Sci.* 53 (3) (2007) 327–333.
- [39] B. Yang, R.C.K. Chan, J. Jing, T. Li, P. Sham, R.Y.L. Chen, A meta-analysis of association studies between the 10-repeat allele of VNTR polymorphism in the 3' UTR of dopamine transporter gene and attention deficit hyperactivity disorder, *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 144B (2007) 541–550.

XIV. Referencias:

1. M. T. Acosta, Aspectos genéticos y moleculares en el trastorno por Déficit de Atención/Hiperactividad: Búsqueda de los genes implicados en el diagnóstico clínico, *Rev. Neurol.* 44(Suppl. 2) (2007) S37-S41.
2. M. T. Acosta, F. X. Castellanos, K. L. Bolton, J. Z. Balog, P. Eagen, L. Nee, J. Jones, L. Palacio, C. Sarampote, H. F. Russell, K. Berg, M. Arcos-Burgos, M. Muenke, Latent class subtyping of Attention Deficit/Hyperactivity disorder and Comorbid conditions, *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* 47(7) (2008) 797-807.
3. J. Aguirre, R. Apiquián, A. Fresán, C. Cruz-Fuentes, Association analysis of exon III and exon I polymorphisms of the dopamine D4 receptor locus in Mexican psychotic patients, *Psychiatry Res.* 153(3) (2007) 209-215.
4. M. Arcos-Burgos, F. X. Castellanos, D. Konecki, F. Lopera, D. Pineda, J. D. Palacio, J. L. Rapoport, K. Berg, J. Bailey-Wilson, M. Muenke, Pedigree disequilibrium test (PDT) replicates association and linkage between DRD4 and ADHD in multigenerational and extended pedigrees from a genetic isolate, *Mol. Psychiatry.* 9(3) (2004) 252-259.
5. K. G. Ardlie, L. Kruglyak, M. Seielstad, Patterns of linkage disequilibrium in the human genome, *Nat. Rev. Genet.* 3(4) (2002) 299-309.
6. F. T. Arnsten, Fundamentals of Attention/Deficit Hyperactivity Disorder: Circuits and Pathways. *J. Clin. Psychiatry* 67(8) (2006) 7-12.
7. P. Asherson, S. Curran, Approaches to gene mapping in complex disorders and their application in child psychiatry and psychology. *Br. J. Psychiatry.* 179 (2001) 122-128.
8. P. Asherson, IMAGE Consortium, Attention-Deficit Hyperactivity Disorder in the post-genomic era, *Eur. Child Adolesc. Psychiatry* 13 (Suppl 1) (2004) I50-I70.
9. V. Ashgari, S. Sanayal, S. Buchwaldt A. Paterson, V. Jovanovic, H. H. M. Van Tol,

- Modulation of intracellular Cyclic AMP levels by different Human Dopamine D4 Receptor Variants, *J. Neurochem.*, 65(3) (1995) 1157-1165.
10. M. E. Avale, T. L. Falzone, D. M. Gelman, M. J. Low, D. K. Grandy, Rubinstein M. The dopamine D4 receptor is essential for hyperactivity and impaired behavioural inhibition in a mouse model of attention deficit/hyperactivity disorder, *Mol Psychiatry*, 9(7) (2004) 718-726.
 11. V. Bara, L. Orozco, La genética de las enfermedades complejas. En: J. P. Luna-Arias, E. Orozco-Orozco (Eds), *La frontera: genética molecular de la enfermedad*, Ed. Instituto Politécnico Nacional, México, D. F., 2004, pp. 77-95.
 12. M. Bayés, J. A. Ramos, B. Cormand, A. Hervás-Zuñiga, M. del Campo, E. Duran-Tauleria, M. Ribasés, E. Vilella-Cuadrada, Y. de Diego-Otero, M. Casas-Brugué, X. Estivill, Genotipado a gran escala en la investigación del trastorno del espectro autista y del trastorno por déficit de atención con hiperactividad, *Rev. Neurol.* 40(Suppl 1) (2005) S187-S190.
 13. C. Benjet, G. Borges, M. E. Medina-Mora, J. Zambrano, S. Aguilar-Gaxiola, Youth mental health in populous city of the developing world: results from Mexican Adolescent Mental Health Survey, *J. Child Psychol Psychiatry* (2008) [Eup ahead of print].
 14. J. Biederman, S. V. Faraone, K. Keenan, J. Benjamin, B. Krifcher, C. Moore, S. Spric-Buckminster, K. Ugaglia, M. S. Jellinek, R. Steingard, T. Spencer, D. Norman, R., Kolodny, I. Kraus, J. Perrin, M. B. Keller, M. T. Tsuang, Further evidence for Family-Genetic Risk Factors in Attention Deficit Hyperactivity Disorder, Patterns in Comorbidity in Probands and Relatives in Psychiatrically referred samples, *Arch. Gen. Psychiatry*, 49 (1992) 728-738.
 15. J. Biederman, A. F. Arnsten, S.V. Faraone, A. E. Doyle, T. J. Spencer, T. E. Wilens,

- M. D. Weiss, S. A. Safren, L. Culpepper, New developments in the treatment of ADHD, *J. Clin. Psychiatry*. 67(1) (2006) 148-159
16. I. B. Borecki, Linkage and association studies: In R. Bridgewater (Ed.), *Encyclopedia of life Science (Online)*, John Wiley & Sons, 2006.
17. A. Carboni-Roman, D. Del Rio Grande, A. Capilla, F. Maestu, T. Ortiz, Bases Neurobiológicas de las dificultades del aprendizaje, *Rev. Neurol.* 42(suppl 2) (2006) s171-S175.
18. C. Carrasco, P. Rothhammer, M. Moraga, H. Henríquez, R. Chakraborty, F. Aboitiz, F. Rothhammer, Genotypic interaction between DRD4 and DAT1 loci is a high risk factor for attention-deficit/hyperactivity disorder in Chilean families. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 141(1) (2006) 51-54.
19. A. Caspi, T. E. Moffitt, Gene-environment interaction in psychiatry: joining forces with neuroscience. *Nat. Rev. Neurosci.*, 7 (2006) 583-590.
20. F. M. Chang, J. R. Kidd, K. J. Livak, A. J. Pakstis, K. K. Kidd, The world-wide distribution of allele frequencies at the human dopamine D4 receptor locus. *Hum. Genet.* 98(1) (1996) 91-101.
21. Ch. Chen, M. Burton, E. Greenberger, J. Dmitrieva, Population Migration and the variation of Dopamine D4 receptor allele frequencies Around the Globe. *Evol. Hum. Behav.*, 20 (1999) 309, 324.
22. D. E. Comings, T. J. Chen, K. Blum, J. F. Mengucci, S. H. Blum, B. Meshkin, Neurogenetic interactions and aberrant behavioral co-morbidity of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): dispelling myths. *Theor. Biol. Med. Model.*, 2 (2005) 50-65.
23. M. Das, K. Mukhopadhyay, DAT1 3'UTR 9R allele: preferential transmission in Indian Children with attention deficit hyperactivity disorder, *Am. J. Med. Genet. B*

- Neuropsychiatr. Genet. 144B(6) (2007) 826-829.
24. R. Díaz-Heijtz, F. Mulas, H. Forsberg, Alteraciones de los patrones de los marcadores de la dopamina en el trastorno por déficit de atención e hiperactividad. *Rev. Neurol.* 42(Suppl 2) (2006) S19-S23.
 25. S. DiMaio, N. Grizenko, R. Jooper, Dopamine genes and attention-deficit hyperactivity disorder: a review, *J. Psychiatry Neurosci.*, 28(1) (2003) 27-38.
 26. Y. C. Ding, H. C., Chi, D. L. Grady, A. Morishima J. R. Kidd, K. K. Kidd, P. Foldman, M. A. Spence, S. Schucks, J. M. Swanson, Y. P. Zhang, Evidence of positive selection at the dopamine receptor D4 gene locus, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99(1) (2002) 309-314.
 27. U. M. D'Souza, C. Russ, E. Tahir, J. Mill, P. McGuffin, P. J. Asherson, I. W. Craig, Functional effects of a tandem duplication polymorphism in the 5' flanking region of the DRD4 gene. *Biol. Psychiatry*, 56(9) (2004) 691-697.
 28. S. C. Dulawa, D. K. Grandy, M. J. Low, M. P. Paulus, M. A. Geyer, Dopamine D4 receptor knock-out mice exhibit reduced exploration of novel stimuli. *J. Neurosci.* 19(21) (1999) 9550-9556.
 29. E. Evangelou, T. A. Trikalinos, G. Salanti, J. P. Ioannidis, Family-based versus unrelated case-control designs for genetic associations, *PLOS Genet.* 2(8)(2006) 1147-1155.
 30. J. Fan, J. Fossella, T. Sommer, Y. Wu, M. I. Posner, Mapping the genetic variation of executive attention onto brain activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 100(12) (2003) 7406-7411.
 31. S. V. Faraone, J. Biederman, E. Mick, A. E. Doyle, T. Wilens, T. Spencer, E. Fraizer, K. Mullen, A Family study of psychiatric comorbidity in girls and boys with attention deficit/hyperactivity disorder, *Biol. Psychiatry*, 50(8) (2001) 586-592.

32. S. V. Faraone, A. E. Doyle, E. Mick, J. Biederman, Meta-analysis of the association between the 7-repeat allele of the dopamine D(4) receptor gene and attention deficit hyperactivity disorder. *Am. J. Psychiatry*, 158(7) (2001) 1052-1057.
33. S. V. Faraone, J. Biederman, Pathophysiology of Attention-Deficit/Hyperactivity disorder. In: K. L. Davis, D. Charney, J. T. Coyle, C. Nemeroff (Eds.), *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress*, Lippincott Williams & Wilkins, 1rst edition, 2002, pp. 577-596.
34. S. V. Faraone, R. H. Perlis, A. E. Doyle, J. W. Smoller, J. J. Goralnick, M. A. Holmgren, P. Sklar, Molecular Genetics of Attention-deficit/Hyperactivity disorder. *Biol. Psychiatry*. 57 (2005) 1313-1323.
35. S. Fuke, S. Suo, N. Takahashi, H. Koike, N. Sasagawa, S. Ishiura, The VNTR polymorphism of the huma dopamine transporter (DAT1) gene affects gene expresión. *Pharmacogenomics. J.*, 1(2) (2001) 152-156.
36. A. Ganizadeh, M. R. Mohammadi, R. Moini, Comorbidity of psychiatric disorders and parental psychiatric disorder of ADHD children, *J. Atten. Disord.* 12(2) (2008) 149-155.
37. J. Gelernter, J. L. Kennedy, H. H. Van Tol, O. Civelli, K. K. Kidd, The D4 dopamine receptor (DRD4) maps to distal 11p close HRAS., *Genomics*, 13(1) (1992) 208-210.
38. A. E. Guttmacher, F. S. Collins, Genomic medicine- a primer, *N. Engl. J. Med.*, 347(19) (2002) 1512-1520.
39. A. Heinz, D. Goldman, D. W Jones, R Palmpur, D. Hommer, J. G. Gorey, K. S. Lee, M. Lonnoila, D. R. Weinberger, Genotype influences in vivo dopamine transporter availability in human striatum, *Neuropsychopharmacology*, 22(2) (2000) 133-139.
40. P. Heiser, S. Friedel, A Dempfle, K Konrad, J. Smidt, J. Grabarkiewicz, B. Herpertz-Dahlmann, H. Remschmidt, J. Hebebrand, Molecular genetic aspects of attention-

- deficit/hyperactivity disorder, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 28(6) (2004) 625-641.
41. D. A. Hinds, R. P. Stokowski, N. Patil, K. Konvicka, D. Kershnerobich, D. R. Cox, D. G. Ballinger, Matching strategies for genetic association studies in structured population, *Am. J. Hum. Genet.*, 74 (2004) 317-325.
42. J. Holmes, A. Payton, J. Barret, R. Harrington, P. McGuffin, M. Owen, W. Ollier, J. Worthington, M. Gill, A. Kirley, M. Fitzgerald, P. Asherson, S. Curran, J. Mill, A. Gould, E. Taylor, L. Kent, N Craddock, A. Thapar, Association of DRD4 in children with ADHD and comorbid conduct problems, *Am. J. Med. Genet.* 114(2) (2002) 150-153.
43. L. Hosking, S. Lumsden, K. Lewis, A. Yeo, L. McCarthy, A. Bansal, J. Riley, I. Purvis, Ch. Xu, Detection of genotyping errors by Hardy-Weinberg equilibrium test, *E. J. Hum. Genet.*, 12 (2004) 395-399.
44. L. K. Jacobsen, J. K Staley, S. S. Zoghbi, J. O. Seibyl, T. R Kosten, R. B. Innis, J. Gelernter, Prediction of dopamine transporter binding availability by genotype: a preliminary report, 157(19) (2000) 1700-1703.
45. P. S. Jensen, S. P. Hinshaw, H. C. Kraemer, N. Leonora, J. H. Newcorn, H. B. Abikoff, J. S. March, L. E. Arnold, D. P. Cantwell, C. K. Conners, G. R. Elliot, L. L. Greenhill, L. Hechtman, B. Hoza, W. E. Pelham, J. B. Severe, J. M., Swanson, K. C. Wells, T. Wigal, B. Vitiello, ADHD comorbidity findings from the MTA study: comparing comorbid subgroups, *J. Am. Acad. Child. Adolesc. Psychiatry.* 40(2) (2001) 147-158.
46. V. Jovanovic, H. C. Guan, H. H. Van Tol, Comparative pharmacological and functional analysis of the dopamine D4.2 and D4.10 receptors variants, *Pharmacogenetics*, 9(5) (1999) 561-568.
47. A. Jucaite, I Odano, H. Olsson, S. Pauli, C. Halldin, L. Farde, Quantitative analyses of

- regional [11C]PE2I binding to the dopamine transporter in the human brain: a PET study, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 33(6) (2006) 657-668.
48. M. Kang, M. A. Palmatier, K. K. Kidd, Global variation of a 40bp VNTR in the 3'-Untranslated region of the Dopamine Transporter gene (SLC6A3), *Biol. Psychiatry*, 46 (1999) 151-160.
49. S. A. Khan, S. V. Faraone, The genetics of ADHD: A literature review of 2005, *Curr. Psychiatry Rep.*, (5) (2006) 393-397.
50. A. Kirley, Z. Hawi, M. Phil, G. Daly, M. McCarron, C. Mullins, N. Millar, I. Waldman, M. Fitzgerald, M. Gill, Dopaminergic system genes in ADHD: Toward a Biological Hypothesis. *Neuropsychopharmacology*. 27(4) (2002) 607-618.
51. A. Kirley, N. Lowe, C. Mullins, M. McCarron, G. Daly, I. Waldman, M. Fitzgerald, M. Gill, Z. Hawi, Phenotype studies of the DRD4 gene polymorphisms in ADHD: association with oppositional defiant disorder and positive family history, *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 131(1) (2004) 38-42.
52. E. Konofal, S. Cortese, M. Lecendreux, I. Arnulf, M. C. Mouren, Effectiveness of iron supplementation in a young child with attention-deficit/hyperactivity disorder, *Pediatrics* 116(5) (2005) e732-e734.
53. C. Lange, E. K. Silverman, X. Xu, S. T. Weiss, N. M. Laird, A multivariate family-based association test using generalized estimating equations: FBAT-GEE. *Biostatistics* 4 (2003) 195-306.
54. L. N. Legrand, W. G. Iacono, M. McGue, Prónostico de alcoholismo y toxicomanías, *Mente y Cerebro* 13 (2005) 66-73.
55. P. W. L. Leung, C.C. Lee, S.F. Hung, T.P. Ho, C.P. Tang, S.L. Kwong, S.Y. Leung, S.T. Yuen, F. Lieh-Mak, J. Oosterlaan, D. Grady, A. Harxhi, Y.C. Ding, H.C. Chi, P. Flodman, S. Schuck, M. A. Spence, R. Moyzis, J. Swanson, Dopamine receptor D4

- (DRD4) Gene in Han Chinese children with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): Increased Prevalence of the 2-repeat allele, *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiat. Genet.* 133B (2005) 54-56.
56. D. Li, P. C. Sham, M. J. Owen, L. He, Meta-analysis shows significant association between dopamine system genes and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Hum. Mol. Genet.* 15(14) (2006) 2276-2284.
57. J. B. Lichter, C. L. Barr, J. L. Kenedy, H. H. Van Tol, K. K. Kidd, K. J. Livak, A hypervariable segment in the human dopamine D4 receptor (DRD4) gene, *Hum. Mol. Genet.* 2(6) (1993) 767-773.
58. S. Maher, M. L. Marazita, R. E. Ferrell, M. M. Vanyukov, Dopamine system genes and attention deficit hyperactivity disorder: a meta-analysis. *Psychiatr. Genet.* 12(4) (2002) 207-215.
59. Ch. A. Marsden, Dopamine: The rewarding years, *Br. J. Pharm.* 147 (2006) S136-S144.
60. J. J. McGough, Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder Pharmacogenomics. *Biol. Psychiatry.* 57 (2005) 1376-1373.
61. K. R. Merikangas, J. D. Swendsen, Genetic epidemiology of psychiatric disorders. *Epidemiol Rev*, 19(1) (1997) 144-155.
62. K. R. Merikangas, N. Risch, Will de genomic revolution revolutioniza psychiatry, *Am. J. Psychiatry*, 160 (2003), 625-635.
63. J. Mill, P. Asherson, I Craig, U. M. D'Souza, Transient expression analysis variants of a VNTR in the dopamine transporter gene (DAT1), *BMC Genet.* 6(1) (2005) 3-10.
64. H. Nicolini, D. Sidenberg, B. Camarena, C. Guerra, G. M. Monteiro, A. Petronis, J. Kennedy, Evaluación de los genes del sistema dopaminérgico en esquizofrénicos mexicanos. *Rev. Invest. Clin.*, 45 (1993) 345-352.

65. J. N. Oak, J. Oldenhof , H. H. V. Tol, The dopamine D4 receptor: one decade of research. *Eur. J. Pharmacol.*, 405 (2000) 303-327.
66. J. A. Ortiz-Luna, G. Acle-Tomasini, Diferencias entre padres y maestros en la identificación de síntomas del trastorno por déficit de atención con hiperactividad en niños mexicanos, *Rev. Neurol.*, 42(1) (2006) 17-21.
67. J. Ott, 1988–2001. Program HWE©. Utility Programs for Analysis of Genetic Linkage. Columbia University. <http://linkage.rockefeller.edu/soft/linkutil/>.
68. C. Popper, M. Willoughby, C. T. Halpern, M. A. Carbone, M. Cox, Parenting Quality, DRD4, and the prediction of externalizing and internalizing behaviours in early childhood, *Dev. Psychobiol.* 49(6) (2007) 619-632.
69. Q. Qian, Y. Wang, J. Li, L. Yang, B. Wang, R. Zhou, S. Glatt S. J., Faraone S.V. Evaluation of Potential Gen-Gen Interaction for Attention Deficit Hyperactivity Disorder in Han Chinese Population, *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 144 B (2007) 200-206.
70. M. D. Rappley, Clinical practice, Attention Déficit Hyperactivity disorder, *N. Engl. J. Med.*, 352 (15) (2005) 1607-1608.
71. N. Risch, K. Merikangas, The future of genetic studies of complex human disease, *Science*, 273(5281) (1996) 1516-1517.
72. R. M. Rodriguiz, R. Chu, M. G. Caron, W. C: Westel, Aberrant responses in social interaction of dopamine transporter knockout mice, *Bheav. Brain Res.*, 148(1-2) (2004) 185-198.
73. T. Roman, M. Schmitz, G. Polanczyk, M. Eizirik, L. A. Rohde, M. H. Hutz, Attention-deficit hyperactivity disorder: a study of association with both the dopamine transporter gene and the dopamine D4 receptor gene. *Am. J. Med. Genet.* 105(5) (2001) 471-478.

74. D. C. Rowe, C. Stever, D. Chase, S. Shermna, A. Abramowitz, I. D. Waldman, Two dopamine genes related to reports of childhood retrospective inattention and conduct disorder symptoms, *Mol. Psychiatry*, 6(4) (2001) 429-433.
75. G. Salanti, G. A. Mountza, E. E. Ntzani, J. P. Ioannidis, Hardy-Weinberg equilibrium in genetic association studies: an empirical evaluation of reporting, deviations, and power. *Eur J Hum Genet.*, 13(7) (2005) 840-848.
76. I. G. Sarason, B. R. Sarason, PSICOPATOLOGÍA Psicología anormal: El problema de la conducta inadaptada, Pearson Prentice-Hall, Edición # 11, 2006, pp481-501.
77. T. J. Spencer, J. Biederman, T. E. Wilens, S. V. Faraone, Overview and neurobiology of attention-deficit/hyperactivity disorder, *J. Clin. Psychiatry*, 63 suppl (2) (2002) 3-9.
78. R. S. Spielman, R. E. McGinnis, W. J. Ewens, Transmission test of linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am. J. Hum. Genet.*, 52(3) (1993) 506-516.
79. S. Sprich, J. Biederman, M. H. Crawford, E. Mundy, S. V. Faraone, Adoptive and biological families of children and adolescents with ADHD, *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.*, 39(11) (2000) 1432-1437.
80. G. A. Stefanatos, I. S. Baron, Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: A Neuropsychological Perspective Towards DSM-V, *Neuropsychol. Rev.* 17(1) (2007) 5-38.
81. P. F. Sullivan, Spurious genetics associations, *Biol. Psychiatry* 61 (2007) 1121-1126.
82. J. M. Swanson, M. Kinsbourne, J. Nigg, B. Lanphear, G. A. Stefanatos, N. Volkow, E. Taylor, B. J. Casey, F. X. Castellanos, P. D. Wadhwa, Etiologic subtypes of attention-deficit/hyperactivity disorder: brain imaging, molecular genetic and environmental factors and the dopamine hypothesis. *Neuropsychol. Rev.* 17(1) (2007) 39-59.

83. E. Tahir, Y. Yazgan, B. Cirakoglu, F. Ozbay, I. Waldman, P. J. Asherson, Association and linkage of DRD4 and DRD5 with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) in a sample of Turkish children, *Mol. Psychiatry*. 5(4) (2000) 396-404.
84. A. Thapar, M. O'Donovan, M. J Owen, The genetics of attention deficit hyperactivity disorder, 14(2) (2005) R275-R282.
85. A. Thapar, K. Langley, M. J. Owen, M. C. O'Dovan, Advance in genetic findings of attention deficit hyperactivity disorder, *Psychol. Med.*, 37 (12) (2007) 1681-1692.
86. A. Thapar, J. Holmes, K Poulton, R. Harrington, Genetic Basis of Attention Deficit hyperactivity, *Br. J. Psychiatry*, 174 (1999) 105-111.
87. R. D. Todd, H. Huang, S L. Smalley, S. F. Nelson, E. G. Willcutt, B. F. Pennington, S. D. Smith, S. V. Faraone, R. J. Neuman , Collaborative analysis of DRD4 and DAT genotypes in population-defined ADHD subtypes. *J. Chile. Psicol. Psychiatry*. 46(10) (2005) 1067-1073.
88. G. E. Torres, R. R. Gainetdinov, M. G. Caron, Plasma membrana monoamine transporters: Structure, regulation and function. *Nat. Rev. Neurosci.*, 4(1) (2003) 13-25.
89. S. H. VanNess, M. J. Owens, C. D: Kilts, The variable number of tandem repeats element in DAT1 regulates in vitro dopamine transporter density. *BMC Genet* 27(6) (2005) 55-66
90. H. H. Van Tol, J. R. Bunzow, H. C. Guan, R. K. Sunahara, P. Seeman, H. B. Niznik, O. Civelli, Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature*, 350(6319) (1991) 610-614.
91. G. Vieyra, M. Moraga, H. Henríquez, F. Aboitiz, F. Rothhammer, Distribución de alelos de los genes DRD4 y DAT1 del sistema dopaminérgico en la población mixta de Santiago de Chile. *Rev. Med. Chil*. 131(2) (2003) 135-143.

92. V. J. Vitzthum, A number no grater than the sum of its parts: The use and abuse of heritability, *Hum Biol*, 75(4) (2003) 539-558.
93. E. Wang, Y. Ding, P. Flodman, J. R. Kidd, K. L. Kidd, D. L. Grady, O. A. Ryder, M. A. Spence, J. M. Swanson, R. K., Moyzis, The Genetic Architecture of Selection at the Human Dopamine Receptor D4 (DRD4) Gene Locus. *Am. J. Hum. Genet.* 73 (2004) 931-944.
94. J. E. Wigginton, D. J. Cluter, G. R. Abecasis, A note on Exact Test of Hardy-Weinberg Equilibrium. *Am. J. Hum. Genet.*, 76 (2005) 887-893.
95. R. B. Williams, D. A. Marchuk, K. M. Gadde, J. C. Barefoot, K. Grichnik, M. J. Helms, C. M. Khun, J. G. Lewis, S. M. Schanberg, M. Stafford-Smith, E. C. Suarez, G. L. Clary, I. K., Svenson, I. C. Siegler, Serotonin-related gene polymorphism and central nervous system serotonin function, *Neuropsychopharmacology*, 28(3) (2003) 533-541.
96. J. Williams, E. Taylor, The evolution of hyperactivity, impulsivity and cognitive diversity, *J. R. Soc. Interface.* 3 (2006) 399-413.
97. A. H. Wong, C. E. Buckle, H. H. Van Tol, Polymorphisms in dopamine receptors: What do they tell us?, *Eur J. Pharmacol*, 410(2-3) (2000) 183-203.
98. B. Yang, R. C. Chan, J. Jing, T. Li., P. Sham, R. Y. Chen, A metanalysis of association studies between the 10-repeat allele of a VNTR polymorphism in the 3'UTR of dopamine transporter gene and attention deficit hyperactivity disorder, *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.*, 144B(4) (2007) 541-550.
99. K. Zhou, W. Chen, J. Buitelaar, T. Banaschewski, R. D. Oades, B. Franke, E. Sonuga-Barke, R. Ebstein, J. Eisenberg, M. Gill, I. Manor, A. Miranda, F. Mulas, H. Roeyers, A. Rothenberger, J. Sergeant, H. C. Steinhausen, J. Lasky-Su, E. Taylor, K. J. Brookes, X. Xu, B. M. Neale, F. Rijdsdijk, M. Thompson, P. Asherson, S. V.

Faraone, Genetic heterogeneity in ADHD: DAT1 gene only affects probands without CD, *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.* 147B (8) (2008) 1481-1487.