

Quirino Cordeiro Júnior

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

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

Área de concentração: Psiquiatria

Orientador: Prof. Dr. Homero Pinto Vallada Filho

SÃO PAULO

2007

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

A Jony Arrais, pelo auxílio com as análises estatísticas.

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro que recebi, sendo bolsista desta instituição no período de meu Doutorado.

DEDICATÓRIA

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

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

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	13
RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	17
1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1: Esquizofrenia.....	20
1.2: Genética da Esquizofrenia.....	22
1.2.1: Estudos genético-epidemiológicos.....	23
1.2.1.1: Estudos em famílias.....	23
1.2.1.2: Estudos em gêmeos.....	24
1.2.1.3: Estudos em adotivos.....	25
1.2.1.4: Estudos de transmissão genética.....	26
1.2.2: Estudos genético-moleculares.....	28
1.2.2.1: Tipos de estudos genético-moleculares.....	28
1.2.2.1.1: Estudos de ligação (<i>linkage</i>).....	28
1.2.2.1.2: Estudos de associação.....	29
1.3: Sistema Dopaminérgico e Esquizofrenia.....	30
1.3.1: Estudos de associação entre genes do sistema dopaminérgico e esquizofrenia.....	36
I) Polimorfismos do gene do Receptor Dopaminérgico subtipo 2 (<i>DRD2</i>).....	36
a) Polimorfismo <i>TaqI</i> A do <i>DRD2</i> – rs1800497.....	36
b) Polimorfismo -141C Ins/Del do <i>DRD2</i> – rs1799732.....	38
II) Polimorfismo do Receptor Dopaminérgico subtipo 3 (<i>DRD3</i>).....	40

a) Polimorfismo Ser9Gly do <i>DRD3</i> – rs6280.....	40
III) Polimorfismos do gene da Proteína Transportadora de Dopamina (<i>DAT1: Solute Carrier Family 6, member 3: SLC6A3</i>).....	42
a) Polimorfismo VNTR da região 3' não-codificadora do <i>SLC6A3</i>	42
b) Polimorfismo A1343G do gene do <i>SLC6A3</i> – rs6347.....	44
IV) Polimorfismo do gene da Catecol-O-Metiltransferase (<i>COMT</i>).....	45
a) Polimorfismo A/G da região não-codificadora do <i>COMT</i> – rs165599.....	45
2. JUSTIFICATIVA.....	47
2.1. Justificativa Geral.....	48
2.2. Justificativa Específica.....	49
3. OBJETIVOS.....	50
4. HIPÓTESE.....	52
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	54
Amostras.....	55
Análise Laboratorial.....	56
- Genotipagens dos Polimorfismos Realizadas no PROGENE.....	59
1. Genotipagem do polimorfismo <i>TaqIA</i> do <i>DRD2</i>	59
2. Genotipagem do polimorfismo Ser9Gly do gene <i>DRD3</i>	60
3. Genotipagem do polimorfismo do tipo VNTR na região 3' não-codificadora do <i>SLC6A3</i>	61
4. Genotipagem do polimorfismo A1343G do <i>SLC6A3</i>	64
- Genotipagens dos Polimorfismos Realizadas no Laboratório da Empresa Prevention Genetics.....	66

Análise Estatística.....	66
1. Considerações gerais.....	66
2. Estudo caso-controle.....	67
3. Equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	69
4. Poder da Amostra.....	71
5. Desequilíbrio de ligação.....	71
6. Análise de haplótipos.....	72
7. Análise de variáveis de confusão.....	73
6. RESULTADOS.....	75
A) Gênero.....	76
B) Idade.....	76
C) Subtipos de esquizofrenia (DSM-IV).....	76
D) Poder da Amostra.....	77
E) Equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	77
F) Distribuição alélica e genotípica dos polimorfismos estudados.....	78
G) Análise de Desequilíbrio de Ligação (Linkage Disequilibrium – LD).....	121
H) Análise de Haplótipos.....	122
7. DISCUSSÃO.....	123
<i>TaqIA-DRD2</i>	125
-141C Ins/Del- <i>DRD2</i>	127
Ser9Gly- <i>DRD3</i>	128

VNTR-SLC6A3.....	129
A1343G-SLC6A3.....	131
A/G da região UTR do <i>COMT</i>	131
Análise de Homozigosidade.....	133
Comparação entre Grupos.....	133
a) Gênero.....	133
b) Subtipos de Esquizofrenia.....	134
Análises de LD e Haplótipos.....	134
Resultados Falso-Negativos e Falso-Positivos.....	135
Considerações Gerais.....	138
Perspectivas Futuras.....	138
Conclusões.....	140
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	142

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação dos oligonucleotídeos utilizados para a análise dos polimorfismos.....	65
Tabela 2: Valores do equilíbrio de Hardy-Weinberg para casos e controles.....	77
Tabela 3: Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo <i>TaqIA</i> do <i>DRD2</i> entre os grupos casos e controles.....	79
Tabela 4: Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo <i>TaqIA</i> do <i>DRD2</i> entre os grupos casos e controles por gênero.....	80
Tabela 5: Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo <i>TaqIA</i> do <i>DRD2</i> de acordo com o subtipo da SCZ (Subtipo Paranóide).....	81
Tabela 6: Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo <i>TaqIA</i> do <i>DRD2</i> de acordo com o subtipo da SCZ (Subtipo Desorganizado).....	82
Tabela 7: Análise com regressão logística não condicional para variáveis gênero e subtipo de esquizofrenia (simultaneamente).....	83
Tabela 8: Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo <i>TaqIA</i> do <i>DRD2</i> para investigação de homozigidade.....	84
Tabela 9: Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo -141C (Ins/Del) do <i>DRD2</i> entre os grupos casos e controles.....	85
Tabela 10: Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo -141C (Ins/Del) do <i>DRD2</i> entre os grupos casos e controles por gênero.....	86
Tabela 11: Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo -141C (Ins/Del) do <i>DRD2</i> , de acordo com o subtipo da SCZ (Subtipo Paranóide).....	87

Tabela 12: Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo -141C (Ins/Del) do <i>DRD2</i> , de acordo com o subtipo da SCZ (Subtipo Desorganizado).....	88
Tabela 13: Análise com regressão logística não condicional para variáveis gênero e subtipo de esquizofrenia (simultaneamente).....	89
Tabela 14: Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo -141C (Ins/Del) do <i>DRD2</i> para investigação de homozigidade.....	90
Tabela 15: Distribuição dos genótipos e alelos polimorfismo Ser9Gly do gene do <i>DRD3</i> entre os grupos casos e controles.....	91
Tabela 16: Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo Ser9Gly do <i>DRD3</i> entre os grupos casos e controles por gênero.....	92
Tabela 17: Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo Ser9Gly do <i>DRD3</i> , de acordo com o subtipo da SCZ (Subtipo Paranóide).....	93
Tabela 18: Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo Ser9Gly do <i>DRD3</i> , de acordo com o subtipo da SCZ (Subtipo Desorganizado).....	94
Tabela 19: Análise com regressão logística não condicional para variáveis gênero e subtipo de esquizofrenia (simultaneamente).....	95
Tabela 20: Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo Ser9Gly do <i>DRD3</i> para investigação de homozigidade.....	96
Tabela 21: Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo VNTR do <i>SLC6A3</i> entre os grupos casos e controles.....	97
Tabela 22: Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo VNTR do <i>SLC6A3</i> entre os grupos casos e controles por gênero.....	99
(Continuação) Tabela 22: Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo VNTR do <i>SLC6A3</i> entre os grupos casos e controles por gênero.....	101

Tabela 23: Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo VNTR do SLC6A3, de acordo com o subtipo da SCZ (Subtipo Paranóide).....	103
Tabela 24: Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo VNTR do SLC6A3, de acordo com o subtipo da SCZ (Subtipo Desorganizado).....	105
Tabela 25: Análise com regressão logística não condicional para variáveis gênero e subtipo de esquizofrenia (simultaneamente).....	107
Tabela 26: Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo VNTR do gene do SLC6A3 para investigação de homozigidade.....	108
Tabela 27: Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo A1343G do gene do SLC6A3 entre os grupos casos e controles.....	109
Tabela 28: Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo A1343G do SLC6A3 entre os grupos casos e controles por gênero.....	110
Tabela 29: Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo A1343G do gene do SLC6A3, de acordo com o subtipo da SCZ (Subtipo Paranóide).....	111
Tabela 30: Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo A1343G do gene do SLC6A3, de acordo com o subtipo da SCZ (Subtipo Desorganizado).....	112
Tabela 31: Análise com regressão logística não condicional para variáveis gênero e subtipo de esquizofrenia (simultaneamente).....	113
Tabela 32: Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo A1343G do gene do SLC6A3 para investigação de homozigidade.....	114
Tabela 33: Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo A/G da região 3' não codificadora do gene da COMT entre os grupos casos e controles.....	115
Tabela 34: Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo A/G da região 3' não codificadora do gene da COMT entre os grupos casos e controles por gênero.....	116

Tabela 35: Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo A/G da região 3' não codificadora do gene da COMT, de acordo com o subtipo da SCZ (Subtipo Paranóide)....	117
Tabela 36: Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo A/G da região 3' não codificadora do gene da COMT, de acordo com o subtipo da SCZ (Subtipo Desorganizado).....	118
Tabela 37: Análise com regressão logística não condicional para variáveis gênero e subtipo de esquizofrenia (simultaneamente).....	119
Tabela 38: Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo A/G da região 3' não codificadora do gene da COMT para investigação de homozigidade.....	120

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação estrutural do SLC6A3, mostrando os polimorfismos rs6347 no exon 9 e VNTR localizado na região 3' não codificadora.....	44
Figura 2 - Representação esquemática do gene COMT. MB-COMT: COMT ligada à membrana; S-COMT: COMT na forma solúvel.....	46
Figura 3 - Exemplo de BLAST	58
Figura 4 - Representação esquemática do polimorfismo do gene DRD2 após amplificação e digestão com a enzima <i>TaqIAI</i> . Alelo 1: 310pb; Alelo 2: 130pb + 180pb	60
Figura 5 - Representação esquemática do polimorfismo Ser9Gly do gene do DRD3. Alelo 1: 206pb + 111pb + 98pb + 47pb; Alelo 2: 304pb + 111pb + 47pb	61
Figura 6 - Representação esquemática do polimorfismo VNTR do gene do SLC6A3.....	63
Figura 7 - Representação esquemática do polimorfismo A1343G do gene do DAT1. Alelo 1: 209pb; Alelo 2: 110pb + 99pb.....	64

RESUMO

RESUMO

A esquizofrenia é um transtorno mental caracterizado por sintomas psicóticos (delírios, alucinações), distúrbios do pensamento, afeto, volição, apresentando, na maioria dos casos, curso crônico. A prevalência ao longo da vida do transtorno gira ao redor de 1%. Evidências de estudos genético-epidemiológicos com famílias, gêmeos e adotivos têm demonstrado a existência de um componente genético como fator de risco para o transtorno. Desde o final da década de 80, estudos genético-moleculares têm investigado genes de vulnerabilidade para o desenvolvimento do quadro. Os genes que codificam as diferentes partes do sistema dopaminérgico passaram a despertar interesse para os estudos moleculares em pacientes com esquizofrenia, devido ao fato de antagonistas dopaminérgicos melhorarem sintomas desse transtorno, e agonistas dopaminérgicos piorarem tais sintomas. Na presente tese, um total de 245 pacientes com esquizofrenia, de acordo com os critérios diagnósticos do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-IV) e 834 controles foi selecionado com o objetivo de investigar a diferença na distribuição de alelos e genótipos de seis polimorfismos de quatro diferentes genes do sistema dopaminérgico nesses dois grupos. Os resultados das foram: 1. *TaqI* A1/A2 do gene do receptor dopaminérgico tipo 2 (*DRD2*) - rs1800497: genotípica: $\chi^2=3,59$, 2d.f., $p=0,16$; alélica: $\chi^2=3,49$, 1d.f., $p=0,06$, $OR=1,22$ ($0,98<OR<1,52$); 2. -141C (Ins/Del) do *DRD2* - rs1799732: genotípica: $\chi^2=12,74$, 2d.f., $p=0,001$; alélica: $\chi^2=9,78$, 1d.f., $p=0,001$, $OR=1,64$ ($1,19<OR<2,28$); 3- Ser-9-Gly do gene do receptor dopaminérgico tipo 3 (*DRD3*) - rs6280: genotípica: $\chi^2=0,06$, 2d.f., $p=0,97$; alélica: $\chi^2=0,06$, 1d.f., $p=0,80$, $OR=1,03$ ($0,83<OR<1,26$); 4- *VNTR* da região 3' não-codificadora do gene da proteína transportadora de dopamina (*SLC6A3*): genotípica: $\chi^2=6,70$, 10d.f., $p=0,71$; alélica: $\chi^2=3,90$, 6d.f., $p=0,65$; 5- A1343G do *SLC6A3* - rs6347: genotípica: $\chi^2=6,56$, 2d.f., $p=0,03$;

alélica: $\chi^2=5,97$, 1d.f., $p=0,01$, $OR=1,33$ ($1,05<OR<1,69$); 6- A/G da região 3' não-codificadora do gene da catecol-O-metiltransferase (*COMT*) – rs165599: genotípica: $\chi^2=0,22$, 2d.f., $p=0,89$; alélica: $\chi^2=0,02$, 1d.f., $p=0,88$, $OR=1,02$ ($0,82<OR<1,25$). Os resultados mostraram associação dos polimorfismos -141C (Ins/Del) do *DRD2* (rs1799732) e A1343G do *SLC6A3* (rs6347) com esquizofrenia na amostra investigada.

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

ABSTRACT

Schizophrenia is a mental disorder characterized by psychotic symptoms (delusions, hallucinations), disturbances of thought, affect, volition, and, in most cases, presenting a chronic course. The average lifetime prevalence is about 1% in general population. Evidences from genetic epidemiological studies with families, twins and adoptives have demonstrated the existence of an important participation of a genetic component on the etiology of the disorder. Since the end of the 80's, molecular genetic studies have investigated genes of vulnerability for schizophrenia. The genes that codify different parts of the dopaminergic system have caused interest for molecular studies with schizophrenic patients because dopaminergic antagonists improve psychotic symptoms and dopaminergic agonists worsen such symptoms. In the present work a total of 245 schizophrenic patients according to the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV) and 834 controls were selected to investigate differences in the allelic and genotypic distribution of six polymorphisms from four different genes of the dopaminergic system between the groups of patients and controls. The results of the analysis were: 1. *TaqI* A1/A2 of the dopaminergic receptor type 2 gene (*DRD2*) - rs1800497: genotypic: $\chi^2=3.59$, 2d.f., $p=0.16$; allelic: $\chi^2=3.49$, 1d.f., $p=0.06$, OR=1.22 (0.98<OR<1.52); 2. -141C (Ins/Del) of the *DRD2* - rs1799732: genotypic: $\chi^2=12.74$, 2d.f., $p=0.001$; allelic: $\chi^2=9.78$, 1d.f., $p=0.001$, OR=1.64 (1.19<OR<2.28); 3- Ser-9-Gly of the dopaminergic receptor type 3 gene (*DRD3*) - rs6280: genotypic: $\chi^2=0.06$, 2d.f., $p=0.97$; allelic: $\chi^2=0.06$, 1d.f., $p=0.80$, OR=1.03 (0.83<OR<1.26); 4- *VNTR* of the 3' untranslated region of the dopamine transporter gene (*SLC6A3*): genotypic: $\chi^2=6.70$, 10d.f., $p=0.71$; allelic: $\chi^2=3.90$, 6d.f., $p=0.65$; 5- A1343G of the *SLC6A3* - rs6347: genotypic: $\chi^2=6.56$, 2d.f., $p=0.03$; allelic: $\chi^2=5.97$, 1d.f., $p=0.01$, OR=1.33 (1.05<OR<1.69); 6- A/G of the 3' untranslated region of the catechol-O-

methyltransferase gene (*COMT*) - rs165599: genotypic: $\chi^2=0.22$, 2d.f., $p=0.89$; allelic: $\chi^2=0.02$, 1d.f., $p=0.88$, OR=1.02 (0.82<OR<1.25). The results have found an association of the polymorphisms - 141C (Ins/Del) of the *DRD2* (rs1799732) and A1343G of the *SLC6A3* (rs6347) with schizophrenia in the investigated sample.

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

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1: Esquizofrenia

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

Como Kraepelin baseou-se mais em critérios longitudinais para sua formulação diagnóstica, outros autores passaram a estudar possibilidades de construir critérios diagnósticos galgados na apresentação clínica do paciente no momento de sua avaliação clínica. Nesse contexto, Eugen Bleuler, em 1911, publicou seu livro “*Dementia praecox* ou o grupo das esquizofrenias”, cunhando assim o termo esquizofrenia, sendo a maneira pela qual o transtorno vem sendo designado até o presente. Bleuler definiu sinais e sintomas para a esquizofrenia, dividindo-os entre fundamentais e acessórios, e entre primários e secundários. Assim, fundamentais seriam aqueles sinais e sintomas obrigatoriamente presentes, ao passo que os acessórios derivariam dos primeiros e apresentariam menor

especificidade para o transtorno. O mais interessante para a ocasião foi a separação entre sintomas primários e secundários, já que seus critérios seguiam um paradigma psicanalítico: a ruptura da tensão associativa (daí o termo esquizofrenia, do grego, *schizo*=cindido, *phrén*=mente), ligada a uma imperfeição no nível cerebral, definiria a alteração primária na doença. De modo secundário, como uma reação do psiquismo à ruptura primária, portanto na esfera exclusivamente psíquica, se constituiria o componente secundário do transtorno. Deste modo, aparecem os clássicos seis "a"s de Bleuler: distúrbios das associações do pensamento, autismo, ambivalência, embotamento afetivo, distúrbios da atenção e avolição, como parte dos sintomas primários. Sintomas psicóticos, como delírios e alucinações ocupariam o lugar dos sintomas secundários (Bleuler, 1950; Elkis, 1999).

Ainda com o objetivo de caracterizar melhor a esquizofrenia através de uma avaliação transversal do paciente, Kurt Schneider procurou detectar sintomas que fossem essenciais para o diagnóstico do transtorno, classificando-os como "sintomas de primeira ordem", e publicando-os em sua obra "Psicopatologia Clínica", em 1948. Tais sintomas eram formados basicamente por manifestações delirantes e alucinatórias, que, na ausência de transtornos mentais orgânicos, seriam consideradas patognomônicas de esquizofrenia. Apesar de terem se tornado clássicos na investigação diagnóstica para o transtorno, os sintomas de primeira ordem *schneiderianos* foram incapazes de cumprir seu objetivo, já que, com o passar do tempo, percebeu-se que eles também estavam presentes em outros transtornos psiquiátricos (Schneider, 1968).

Desse modo, o diagnóstico de esquizofrenia, acabou sendo construído de maneira politética, valendo-se como base teórica das proposições de Kraepelin, Bleuler e Schneider. No entanto, apesar disso, havia muita discordância diagnóstica entre profissionais com

diferentes formações clínicas. Nesse contexto, a partir do esforço de americanos e ingleses, que encontravam grande heterogeneidade no emprego do diagnóstico de esquizofrenia entre seus psiquiatras (Kendell *et al.*, 1971), critérios diagnósticos mais confiáveis começaram a ser construídos, como o *Present State Examination* (PSE) (Wing *et al.*, 1974) e o *Research Diagnostic Criteria* (RDC) (Spitzer *et al.*, 1978). Procurando também incorporar critérios diagnósticos mais claros e objetivos, a Associação Americana de Psiquiatria reformulou por completo, em 1980, o seu *Diagnostic and Statistical Manual* (Manual Diagnóstico e Estatístico-DSM). Apesar das críticas periodicamente publicadas sobre o DSM, ele ainda continua sendo o critério mais utilizado nos trabalhos científicos na área dos transtornos mentais, estando hoje em sua 4ª edição (DSM-IV) (*American Psychiatric Association*, 1994).

1.2: Genética da Esquizofrenia

Desde o século XIX, Kraepelin bem como outros alienistas da época observavam maior agregação de esquizofrenia em determinadas famílias. Porém, apenas em 1916, Ernst Rüdín, que trabalhava com Kraepelin, foi o primeiro a confirmar essas observações dentro de uma nova abordagem metodológica mais criteriosa.

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

1.2.1: Estudos genético-epidemiológicos:

1.2.1.1: *Estudos em famílias:*

O primeiro estudo epidemiológico realizado para verificar a hipótese da esquizofrenia apresentar um componente genético no seu desenvolvimento foi conduzido em famílias por Ernst Rüdin em 1916, na Alemanha. A partir de então, vários trabalhos se seguiram confirmando a agregação familiar na esquizofrenia. Esses primeiros estudos, no entanto, apresentavam importantes problemas metodológicos. No início da década de 80, novas investigações começaram a utilizar critérios diagnósticos operacionais, abordagem cega para os indivíduos entrevistados e presença de grupo controle. Apesar dessas inovações metodológicas, os resultados desses últimos estudos são muito semelhantes aos dos primeiros (revisões sobre esse tema podem ser encontradas em Gottesmann, 1991; Vallada & Samaia, 2000).

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

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

Ademais, os estudos epidemiológicos com famílias observaram que a prevalência de outros transtornos psicóticos (transtorno esquizoafetivo, psicoses atípicas, transtorno delirante persistente, personalidade esquizóide) também era aumentada em parentes de pacientes com esquizofrenia quando comparada com controles (Gottesman, 1991).

A demonstração do caráter familiar é necessária, porém não suficiente para a comprovação do componente genético, já que algumas doenças com agregação na família ocorrem devido à mesma exposição ambiental (por exemplo, cárie dentária, verminose). Desse modo, estudos com gêmeos e com filhos adotivos foram necessários para discriminar a fonte dessa agregação familiar.

1.2.1.2: Estudos em gêmeos:

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

Tendo-se em vista que a expectativa para a ocorrência de esquizofrenia ao longo da vida gira ao redor de 1%, multiplicando-se pela prevalência de gêmeos em populações européias e norte-americanas, que é de cerca de 2%, pode-se avaliar a dificuldade da realização de estudos em gêmeos em esquizofrenia (Gottesman, 1991). Assim, apenas 2 em 10.000 pessoas serão ao mesmo tempo esquizofrênicos e gêmeos e, não mais que 1 em 15.000 será um gêmeo MZ e apresentará o transtorno. Desse modo, o grande desenvolvimento dessa estratégia de estudo deveu-se à organização dos serviços de registro nacionais dos países escandinavos, sendo o primeiro destes estudos realizado na Finlândia em 1963, por Pekka Tienari (Tienari P, 1963; Prescott & Gottesman, 1993).

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

1.2.1.3: Estudos em adotivos:

Os estudos em adotivos também têm como tarefa principal separar os efeitos genéticos dos ambientais, pois o indivíduo adotado recebe seus genes de uma família, mas sua experiência de vida ocorre como membro de outra. Esses trabalhos têm basicamente dois desenhos principais: 1) no primeiro, investiga-se a frequência do transtorno entre os pais biológicos e compara-se com aquela dos pais adotivos de crianças adotivas que desenvolveram esquizofrenia; 2) no segundo, observa-se a frequência de esquizofrenia nos filhos biológicos de portadores do transtorno que foram adotados ao nascer e compara-se com a frequência em filhos biológicos de pais saudáveis que também foram adotados logo após o nascimento (Gottesman, 1991; Ingraham & Kety, 2000). Também esta categoria de estudos, devido à necessidade de serviços de registro nacionais bastante organizados, tem como principais países envolvidos na sua execução os escandinavos.

O primeiro estudo genético com adotivos e esquizofrenia foi conduzido por Heston (1966). Apesar de não ter utilizado critérios diagnósticos operacionais, seus achados

mostraram que filhos adotivos de mães biológicas com esquizofrenia apresentavam maior risco para o desenvolvimento do transtorno do que filhos adotivos de mães biológicas sem o transtorno. Usando um desenho similar ao do estudo conduzido por Heston (1966), Lowing *et al.* (1983) e Tienari *et al.* (2003) também encontraram que o risco para o desenvolvimento de esquizofrenia nos filhos adotivos de mães com esquizofrenia era maior que o apresentado pelos filhos adotivos de mães controles saudáveis.

Resultados de estudo dinamarquês com familiares de adotivos (Kety, 1987) têm sido reportados durante mais de 30 anos, usando diferentes critérios diagnósticos. Uma nova amostra chamada “Provincial Sample” foi adicionada à amostra original dinamarquesa (“Copenhagen Sample”) para formar uma amostra nacional (“National Sample”). Kety *et al.* (1994) apresentaram os resultados dessas três amostras usando os critérios do DSM-II, e Kendler *et al.* (1994), de maneira independente, reanalisou os dados usando os critérios do DSM-IV. Ambas as análises foram consistentes e indicaram que parentes biológicos de filhos adotivos afetados apresentavam maior risco para esquizofrenia que os parentes adotivos, sendo que estes últimos apresentavam risco para desenvolver o transtorno de maneira similar ao observado na população geral.

1.2.1.4: Estudos de transmissão genética:

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

Os principais modelos de transmissão genética propostos são:

A. *Locus* principal único: pressupõe a existência de um único par de alelos responsável por todo o componente genético do transtorno, e que associado a fatores ambientais, determinariam ou não o seu aparecimento;

B. Modelo oligogênico: propõe que um pequeno número de genes de efeito moderado atue em conjunto para determinar a susceptibilidade ao transtorno;

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

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

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

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

Estes dados excluem o modelo de transmissão de gene único, mendeliano, para a esquizofrenia. O modelo poligênico parece ser o mais adequado para a transmissão genética desse transtorno, no qual vários genes de pequeno efeito atuam em conjunto, provocando a expressão de determinado carácter. Dessa forma, modelos quantitativos ou multifatoriais de herança foram elaborados pressupondo a existência de um traço latente referido como “tendência”. Assim, todos os fatores genéticos e ambientais que influenciariam no desenvolvimento do transtorno, o fariam através de seu efeito sobre a “tendência” do indivíduo, e aqueles cuja “tendência” ultrapassasse um limiar exibiriam a enfermidade, os que não ultrapassassem não a exibiriam. Assim, o padrão de herança da esquizofrenia é típico de doença complexa (como hipertensão arterial sistêmica), no qual ocorre a participação de vários genes (modelo poligênico) interagindo com o componente ambiental (Kinney & Matthyse, 1978; Mitchell *et al.*, 1993).

1.2.2: Estudos genético-moleculares:

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

1.2.2.1: Tipos de estudos genético-moleculares:

1.2.2.1.1: Estudos de ligação (*linkage*):

Uma das estratégias para localizar um gene de importância para o desenvolvimento de certa doença baseia-se no conceito de ligação genética, que se refere ao fato de que duas

regiões gênicas (*loci*), situadas no mesmo cromossomo e muito próximas uma da outra, tendem a ser herdadas conjuntamente (ligadas). Esse tipo de investigação, em geral, necessita de famílias grandes e com múltiplos afetados. O primeiro relato positivo de ligação de uma região cromossômica (onde deve existir gene de susceptibilidade ao transtorno) com marcadores moleculares ocorreu em 1988, quando Sherrington *et al.* detectaram em famílias da Inglaterra e Islândia significativa evidência de ligação entre esquizofrenia e uma região do braço longo do cromossomo 5 (5q), contudo estudos posteriores não reproduziram estes achados. Os estudos de ligação têm encontrado regiões cromossômicas sugestivas de estarem relacionadas ao aumento de risco para o desenvolvimento da esquizofrenia, porém ainda sujeitas à confirmação (Norton & Owen, 2004).

1.2.2.1.2: Estudos de associação:

Outro tipo de investigação molecular realizada é o estudo de associação. Nesse tipo de investigação, o pesquisador levanta a hipótese de um determinado gene estar envolvido na etiopatogenia do transtorno e, então, verifica se a frequência de uma determinada variante gênica (polimorfismo) é significativamente diferente entre uma população de afetados e outra de não-afetados. Busca-se, portanto, determinar se há associação entre a condição de afetado e aquele polimorfismo. Esse tipo de estratégia apresenta a vantagem de possibilitar a detecção de genes que apresentam efeitos discretos ou moderados no desenvolvimento de um determinado transtorno, o que a torna interessante no estudo de transtornos poligênicos e multifatoriais, como a esquizofrenia. Além dos polimorfismos pertencentes aos genes dos sistemas de neurotransmissão dopaminérgico, serotoninérgico e

noradrenérgico, nos últimos anos, alguns genes novos têm sido identificados como potenciais marcadores de susceptibilidade para esquizofrenia (Norton & Owen, 2004).

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

1.3: Sistema Dopaminérgico e Esquizofrenia

No que diz respeito à distribuição do sistema dopaminérgico no cérebro, há quatro principais vias de transmissão, a saber, mesolímbicas, mesocorticais, nigroestriatais e túbero-infundibulares. Além das diferenças anatômicas, há também diferenças funcionais entre as diversas vias dopaminérgicas, evidenciando a heterogeneidade de populações de células nervosas cuja dopamina é o neurotransmissor. Nessas células, cinco subtipos de receptores dopaminérgicos (DRD1 a DRD5) foram identificados (Seeman *et al.*, 1993). Os genes humanos que codificam tais receptores foram localizados nas seguintes regiões cromossômicas: DRD1: 5q31.1; DRD2: 11q22.23; DRD3: 3q13.3; DRD4: 11p15.5; DRD5: 4p16.1. Tais receptores são divididos em duas subfamílias distintas, a DRD1-like (DRD1 e DRD5), que exerce sua ação intracelular ativando a adenil-ciclase, e a DRD2-like (DRD2, DRD3 e DRD4) que inibe a adenil-ciclase e ativa os canais de K⁺. Além disso, a organização genômica dos receptores dopaminérgicos também dão suporte ao conceito que eles derivam de duas famílias distintas. Os genes do DRD1 e DRD5 não contêm introns nas

suas regiões codificadoras, contrastando com os genes do DRD2 (6 introns), DRD3 (5 introns) e DRD4 (3 introns). A presença de introns entre as regiões codificadoras do gene permite o aparecimento de variantes através de *splicing*. Assim, o DRD2 apresenta duas variantes, chamados de DRD2S e DRD2L, que são gerados por *splicing* alternativo de um exon de 87 pares de bases entre os introns 4 e 5. Ambas as formas, no entanto, apresentam o mesmo padrão de distribuição cerebral, revelando também uma mesma resposta farmacológica. Variantes por *splicing* do DRD3 também foram identificadas, porém não demonstraram alterações na função da proteína.

O sistema dopaminérgico apresenta um transportador localizado nos neurônios pré-sinápticos, que é responsável pela recaptura desse neurotransmissor para dentro do neurônio pré-sináptico (Jaber *et al.*, 1997). O gene dessa proteína está localizado na posição 5p15.3.

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

A enzima COMT exerce sua função através de duas formas estruturais, a solúvel (S-COMT – códon 108), e a ligada à membrana (MB-COMT – códon 158). Ambas são

codificadas por um gene localizado na posição 22q11.21. Este gene é composto por seis exons.

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

No entanto, evidências recentes sugerem que a origem da esquizofrenia não se encontra necessariamente nessa desregulação dopaminérgica, mas sim tal fenômeno seria na verdade uma via final de outros processos fisiopatológicos. Assim, um modelo plausível para o desenvolvimento da esquizofrenia coloca que tal transtorno seria consequência da interação entre componentes genéticos de susceptibilidade com fatores de risco ambientais precoces que acometeriam precocemente o indivíduo, levando a alterações do neurodesenvolvimento, o que futuramente levaria a uma desregulação do funcionamento dopaminérgico. Acredita-se também que existiria um componente genético de susceptibilidade para o aparecimento dessa disfunção dopaminérgica futura.

A hipótese do neurodesenvolvimento na esquizofrenia explica a existência do indivíduo predisposto ao quadro, porém não dá conta de explicar como o transtorno inicia-

se a partir dessa susceptibilidade. A resposta pode estar no impacto das alterações do neurodesenvolvimento no funcionamento dopaminérgico (Di Forti, 2007).

Acredita-se que a desregulação dopaminérgica na esquizofrenia ocorre por conta de um mecanismo de sensibilização, no qual a exposição repetida a determinada droga, ou neurotransmissor no caso em questão, não levaria ao aparecimento de tolerância, mas sim ao aparecimento de um fenômeno inverso com o aparecimento de aumento progressivo de resposta neuroquímica e, por consequência comportamental (Laruelle *et al.*, 1996; Laruelle & Abi-Dargham, 2000). Jensen *et al.* (2007) coloca que durante o final da adolescência, período no qual a maior parte dos pacientes inicia o quadro de esquizofrenia, ocorreria uma anormalidade do sistema dopaminérgico, com uma liberação exagerada de dopamina e fora de sincronia com os estímulos tanto ambientais quanto internos responsáveis por essa liberação. Trabalhos realizados com tomografia por emissão de fóton único (*single photon emission computerized tomography* – SPECT) e tomografia por emissão de pósitrons (*positron emission tomography* – PET) têm demonstrado que pacientes com esquizofrenia liberam quantidades excessivas de dopamina em resposta a teste com anfetamina, havendo ainda uma relação entre o grau de liberação e a presença de sintomas psicóticos (Laruelle *et al.*, 1996; Breier *et al.*, 1997).

A importância da ocorrência de fatores de risco ambientais precoces para o aparecimento do fenômeno de sensibilização dopaminérgica na esquizofrenia tem sido investigada em vários estudos. Trabalhos realizados com modelo animal têm mostrado que cobaias submetidas a lesões cerebrais perinatais desenvolvem sistemas dopaminérgicos mais susceptíveis a esse tipo de desregulação dopaminérgica quando maduros. Lipska *et al.* (1993) mostraram que lesões hipocâmpais neonatais em ratos permanecem relativamente assintomáticas durante sua vida adulta até os mesmos serem submetidos ao uso de

anfetamina e a situações de estresse, quando aparece então o fenômeno de hiperresponsividade dopaminérgica. El-Khodor & Boksa (2000; 2001) têm mostrado que lesões cerebrais provocadas por anóxia, durante parto cesariana em ratos, leva a alterações na transmissão dopaminérgica mesocorticolímbica com aumento na resposta comportamental à anfetamina e ao estresse.

Kapucu *et al.* (1998), em estudo com SPECT com crianças vítimas de isquemia cerebral, mostraram que diminuição de receptores DRD2. Tal fenômeno pode ser similar na situação da poda neuronal (*neural pruning*) que ocorre no final da adolescência, mesma época em que ocorre o aparecimento da esquizofrenia. Desse modo, Laruelle e Abi-Dargham (2000) postularam que durante o final da adolescência, a falha no desenvolvimento cortical dos pacientes com esquizofrenia poderia limitar a capacidade do cérebro de lidar com situações de estresse. Assim, essa falha do funcionamento cerebral normal levaria a um processo de sensibilização endógena, sendo que o aumento da atividade dopaminérgica levaria a uma adaptação neuroplástica. Ocorreria, então, um aumento da liberação de dopamina, aumento de receptores dopaminérgicos e de sua afinidade à ligação com o neurotransmissor em áreas cerebrais relacionadas aos sintomas psicóticos (Nordstrom *et al.*, 1995; Laruelle & Abi-Dargham, 2000; Seeman, 2002). Substratos anatômicos para a eficácia dos antipsicóticos antagonistas dopaminérgicos DRD2, incluindo alucinações auditivas, foram investigados em tecidos obtidos em estudo *post-mortem* de pacientes esquizofrênicos (Goldsmith *et al.*, 1997). Havia uma frequência maior de receptores DRD2 nas áreas corticais auditivas, da fala e auditório-visuais, que deveria ter relação tanto com a doença, como com o uso de antipsicóticos, que também podem levar ao fenômeno de sensibilização dopaminérgica, o que explicaria a razão de antipsicóticos perderem sua eficácia com o passar do tempo em determinados pacientes.

Do mesmo modo em que há evidências de uma hiperestimulação de receptores cerebrais dopaminérgicos, principalmente DRD2, em regiões subcorticais, estando relacionada aos sintomas psicóticos, há também estudos mostrando uma diminuição da atividade cerebral dopaminérgica em regiões corticais, que estariam relacionadas aos sintomas negativos do transtorno, como isolamento social, abulia, déficits cognitivos. O estudo da expressão cerebral de receptores dopaminérgicos mostra diminuição de DRD3 e DRD4 na região do córtex pré-frontal. Aparentemente, essa redução deve estar relacionada com a presença do transtorno e não com o uso de antipsicóticos. Tal região cerebral deve apresentar uma hipoatividade dopaminérgica, podendo estar relacionada com a presença dos sintomas deficitários da esquizofrenia. Os receptores DRD3 apresentam uma expressão cerebral quase que exclusiva em áreas límbicas associadas a funções cognitivas e motivação. Estudo com DRD3 mostrou diminuição da expressão gênica do DRD3 mostrou diminuição em linfócitos de pacientes com esquizofrenia (Vogel *et al.*, 2004). Os receptores dopaminérgicos DRD1 também devem estar relacionados com alterações no desempenho cognitivo de pacientes com esquizofrenia, devido a alterações na atividade dopaminérgica.

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

esquizofrenia e variantes genéticas que levam à sua menor atividade enzimática (Chen *et al.*, 2004).

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

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

1.3.1: Estudos de associação entre genes do sistema dopaminérgico e esquizofrenia:

I) Polimorfismos do gene do Receptor Dopaminérgico subtipo 2 (*DRD2*)

a) Polimorfismo *TaqI* A do *DRD2* – rs1800497

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

O primeiro trabalho sugerindo associação entre o *DRD2* e esquizofrenia foi publicado por St Clair *et al.* (1990), identificando a região cromossômica 11q21-22 como de interesse para a pesquisa em indivíduos com transtorno psiquiátricos (região onde se localiza o *DRD2*). Em investigação com população coreana, Lee *et al.* (1995) encontraram associação entre o alelo A1 e esquizofrenia, quando comparado ao grupo controle. No entanto, outros

estudos não confirmaram tal associação (Comings *et al.*, 1991; Nöthen *et al.*, 1993; Campion *et al.*, 1993; Sanders *et al.*, 1993; Gejman *et al.*, 1994; Dollfus *et al.*, 1996; Jonsson *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1997a; Suzuki *et al.*, 2000; Virgos *et al.*, 2001).

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

Golimbet *et al.* (1998), em estudo de associação, detectaram relação positiva entre a presença do genótipo A2/A2 e esquizofrenia. Em um estudo de seguimento, utilizando uma população maior, Golimbet *et al.* (2001) encontraram uma associação estatisticamente ainda mais significativa entre o genótipo A2/A2 e gravidade do quadro clínico de esquizofrenia. No entanto, Suzuki *et al.* (2000) não detectaram essa associação ao estudar tal polimorfismo e gravidade dos sintomas.

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

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

O polimorfismo *TaqI* A do gene do *DRD2* foi um dos primeiros a serem investigados como fator de risco para vários transtornos mentais. No entanto, de maneira interessante,

um novo gene foi mapeado na região onde se localiza tal polimorfismo, que codifica a proteína “ankyrin repeat and kinase domain containing 1” (ANKK1) (Neville *et al.*, 2004). A ANKK1 é uma proteína-quinase, provavelmente exercendo sua ação ligando-se à adenosina 5'-trifosfato (ATP), catalisando a transferência de um grupo fosfato dessa molécula para uma outra, liberando energia. Descobriu-se, que o polimorfismo RFLP do DRD2, na realidade leva à substituição Glu713Lys (C/T) no exon 8 do gene da ANKK1. Por conta disso, pode-se ter uma explicação alternativa aos resultados positivos de associação encontrados entre tal polimorfismo e alguns transtornos psiquiátricos, podendo identificar na verdade o gene da ANKK1 como relacionado à etiopatogenia desses quadros. Além disso, tal polimorfismo pode estar em desequilíbrio de ligação com outra variante gênica do *DRD2* que pode estar relacionado como fator de risco para esquizofrenia.

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

- Alelos do Polimorfismo *TaqI* A do *DRD2* – rs1800497:

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

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

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

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

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

O primeiro trabalho realizado com o polimorfismo -141C Ins/Del do gene do DRD2 (rs1799732) e esquizofrenia foi realizado por Arinami *et al.* (1997), que encontrou associação do alelo -141C Ins e susceptibilidade ao desenvolvimento do transtorno. Alguns estudos que se seguiram também mostraram associação entre esquizofrenia e o alelo -141C Ins (Ohara *et al.*, 1998; Jonsson *et al.*, 1999; Schindler *et al.*, 2002). No entanto, Breen *et al.* (1999) encontrou associação com o alelo oposto. Tais resultados opostos podem se dever ao fato da frequência alélica de tal polimorfismo variar entre diferentes grupos étnicos.

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

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

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

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

Alelo Ins: 5'-tcctaccggttC C Aggccgggga-3'

II) Polimorfismo do Receptor Dopaminérgico subtipo 3 (*DRD3*)

a) Polimorfismo Ser9Gly do *DRD3* – rs6280

Sokoloff *et al.* (1990) descobriram que o gene do DRD3 (*DRD3*) apresenta 3 introns entre suas regiões codificadoras. Le Coniat *et al.* (1991) localizaram esse gene no cromossomo 3 (região: 3q13.3), sendo que o DRD3 difere do DRD2 por ser, além de um receptor pós-sináptico, também um auto-receptor. Na presente tese será estudado o polimorfismo Ser9Gly, que está localizado no exon 1 do gene (uma mudança nucleotídica de adenina (A) por guanina (G) no *DRD3* resulta em uma substituição de aminoácidos (serina por glicina) na posição 9 da proteína). Essa mudança de aminoácido pode alterar sua inserção na membrana neuronal, o que poderia provocar uma alteração funcional (Lannfelt *et al.*, 1992). Em um trabalho *in vitro*, células expressando apenas receptores contendo o aminoácido glicina tinham maior afinidade à dopamina que aquelas células expressando o aminoácido serina (Lundstrom & Turpin, 1996). No entanto, apesar de tais achados, não há consenso acerca da funcionalidade de tal polimorfismo.

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

O primeiro estudo envolvendo o polimorfismo Ser9Gly no *DRD3* mostrou um excesso de homozigose (alelos iguais), tanto de serina como de glicina, nos pacientes com esquizofrenia quando comparados com controles normais ($p=0,0001$), em uma população de caucasianos da França e País de Gales (Crocq *et al.*, 1992). Estudos posteriores realizados em populações caucasianas e miscigenadas (Nimgaonkar *et al.*, 1993; Nothen *et*

al., 1993; Jonsson *et al.*, 1993; Di Bella *et al.*, 1994; Laurent *et al.*, 1994; Mant *et al.*, 1994; Gaitonde *et al.*, 1996; Nimgoankar *et al.*, 1996; Durany *et al.*, 1996; Hawi *et al.*, 1998; Cordeiro *et al.*, 2001) e asiáticas (Nanko *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 1993; Saha *et al.*, 1994; Ohara *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1997b; Prasad *et al.*, 1999) tentaram replicar esse achado, porém sem sucesso.

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

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

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

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

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

- Alelos do Polimorfismo Ser9Gly do *DRD3* – rs6280:

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

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

III) Polimorfismos do gene da Proteína Transportadora de Dopamina (*DAT1*: *Solute Carrier Family 6, member 3*: *SLC6A3*)

a) Polimorfismo VNTR da região 3' não-codificadora do *SLC6A3*

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

O *DAT1* desempenha um importante papel na regulação dos níveis sinápticos de dopamina, mediando a recaptura desse neurotransmissor para dentro do neurônio pré-sináptico (Jaber *et al.*, 1997). Dois estudos *post-mortem* mostraram diminuição da densidade estriatal de *DAT1* em cérebros de pacientes esquizofrênicos crônicos (Knable *et al.*, 1994; Laakso *et al.*, 2001). Estudo com PET encontrou menor densidade de *DAT1* em regiões dos gânglios da base de pacientes esquizofrênicos crônicos, mais especificamente

no terço médio do putâmen, o que pode sugerir uma diminuição na expressão do gene do DAT1 (SLC6A3) nesses pacientes (Chinaglia *et al.*, 1992).

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

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

- Alelos do Polimorfismo VNTR da região 3' não-codificadora do SLC6A3:

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

b) Polimorfismo A1343G do gene do SLC6A3 – rs6347

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

- Alelos do Polimorfismo A1343G do gene do SLC6A3 – rs6347:

Alelo G (Ser) = 5'-cacgctccctctgtc CTC **G** G cctgggccgtggtc-3'

Alelo A (Ser) = 5'-cacgctccctctgtc CTC **A** G cctgggccgtggtc-3'

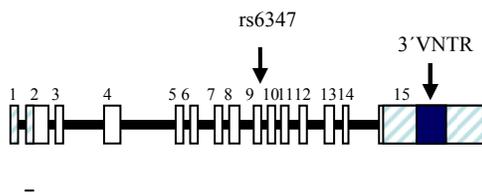


Figura 1 - Representação estrutural do SLC6A3, mostrando os polimorfismos rs6347 no exon 9 e VNTR localizado na região 3' não codificadora

IV) Polimorfismo do gene da Catecol-O-Metiltransferase (*COMT*)

a) Polimorfismo A/G da região não-codificadora do *COMT* – rs165599

Uma vez liberada na fenda sináptica, a dopamina pode ter um dos seguintes destinos: (1) ligação aos seus receptores específicos, através dos quais exerce seus efeitos fisiológicos, (2) recaptação pelas próprias terminações nervosas sinápticas, através do transportador de dopamina, para sua estocagem, reutilização ou metabolização ou (3) inativação, sendo ortometiladas pela ação da catecol-O-metiltransferase (*COMT*) e/ou desaminadas por ação da monoamina-oxidase (*MAO*) (Aires, 1999). A *COMT* promove a transferência do grupo metil do co-substrato S-adenosil-L-metionina, para o grupo 3-hidróxi das catecolaminas, levando à inativação desses compostos.

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

Vários polimorfismos do *COMT* vêm sendo investigados como fatores de risco para o desenvolvimento de *SCZ*.

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

No entanto, estudos que se seguiram à investigação inicial de associação do polimorfismo rs165599 e esquizofrenia têm encontrado resultados conflitantes, com achados tanto positivos (Chen *et al.*, 2004; Handoko *et al.*, 2005; Funke *et al.*, 2005; Nicodemus *et al.*, 2007) quanto negativos (Sand *et al.*, 2004; Molero *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2007; Nunokawa *et al.*, 2007). Além disso, vale ressaltar que estudo com resultados positivos de Chen *et al.*, (2004) encontrou associação entre o alelo oposto (A) do polimorfismo do *COMT* e esquizofrenia, alelo que está relacionado com alta atividade enzimática.

- Alelos do Polimorfismo A/G da região não-codificadora do *COMT* – rs165599:

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

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

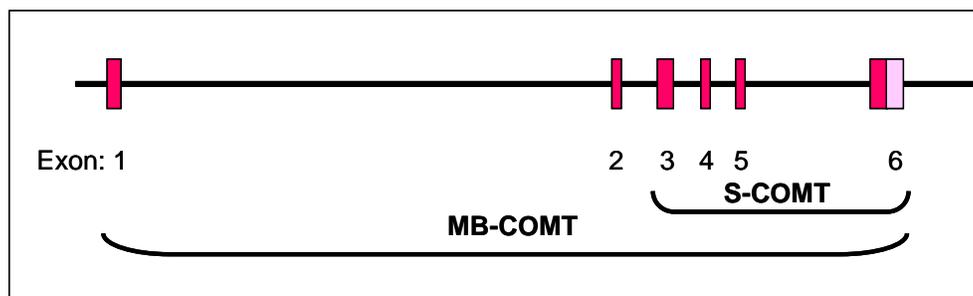


Figura 2 - Representação esquemática do gene *COMT*. MB-*COMT*: *COMT* ligada à membrana; S-*COMT*: *COMT* na forma solúvel

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

2.1. Justificativa Geral:

A consideração conjunta dos estudos epidemiológicos permite afirmar a existência de uma vulnerabilidade genética para o desenvolvimento da esquizofrenia, sendo seu padrão de transmissão característico de doença complexa, ou seja, poligênica e multifatorial. Esses dados sustentam a pertinência científica da realização de estudos genético-moleculares na área. Os genes relacionados ao sistema dopaminérgico confirmam-se como candidatos para estudos de susceptibilidade para esquizofrenia, existindo justificativas para tanto. Os receptores dopaminérgicos são sítios de ação de antipsicóticos, tanto dos típicos, como de muitos atípicos. Anfetaminas e cocaína tendem a provocar exacerbação de sintomas psicóticos em indivíduos susceptíveis, através de sua ação bloqueando a recaptura de dopamina (Goodwin & Jamison, 1990). A ação da L-DOPA tem sido implicada no aparecimento de sintomas psicóticos, pelo fato de disponibilizar dopamina na fenda sináptica (Murphy *et al.*, 1971). Estudos bioquímicos e de neuroimagem funcional têm demonstrado a existência de um desbalanço na atividade dopaminérgica cerebral em indivíduos com esquizofrenia, ocorrendo uma hiperatividade em regiões responsáveis pelo aparecimento de sintomas psicóticos, e uma hipoatividade em regiões relacionadas à presença de sintomas deficitários (Andreasen, 2001).

2.2. Justificativa Específica:

Além das justificativas já expostas, quando do início da realização desta tese, não havia trabalhos realizados na área de genética do sistema dopaminérgico e esquizofrenia com a população brasileira. Por meio dos nossos resultados, buscaremos contribuir para uma melhor compreensão dos achados encontrados na literatura em estudos de associação e esquizofrenia, utilizando os polimorfismos do sistema dopaminérgico em questão. Por fim, apresentamos nesta tese a investigação de um novo polimorfismo em estudos com esquizofrenia.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

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

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

HIPÓTESE

4. HIPÓTESE

H0: Não há diferença entre a distribuição das variantes dos genes estudados entre os grupos estudados (pacientes e controles). A hipótese nula a ser testada é o risco de um indivíduo apresentar a característica (esquizofrenia) independente do marcador (polimorfismo genético).

H1: Existem diferenças estatisticamente significantes na distribuição dessas variantes genéticas entre os grupos.

MATERIAL E MÉTODOS

5. MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Foi selecionada uma amostra de 245 pacientes com diagnóstico de esquizofrenia e 834 controles para o estudo desta tese. Todo indivíduo (paciente ou controle) que foi incluído neste trabalho assinou termo de consentimento pós-informado. O projeto deste Doutorado foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq) (Anexo 2).

A) Casos:

Foram selecionados 245 pacientes com diagnóstico de esquizofrenia para o presente trabalho, de acordo com os critérios do DSM-IV (*American Psychiatric Association*, 1994) (Anexo 3). Todos os indivíduos foram provenientes das enfermarias e ambulatórios do Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP). Os prontuários médicos desses pacientes eram consultados e, em caso de diagnóstico de esquizofrenia, os pacientes eram recrutados para avaliação através de entrevista aberta com o objetivo de completar e confirmar as informações obtidas em prontuários. Dois psiquiatras entrevistavam cada paciente e formulavam sua hipótese diagnóstica, sendo que, em caso de qualquer dúvida ou discordância quanto ao diagnóstico de esquizofrenia, o paciente não era admitido no trabalho.

B) Controles:

Os 834 controles utilizados fazem parte do Banco de DNA do Programa de Genética e Farmacogenética do Instituto de Psiquiatria do HC-FMUSP (PROGENE), tendo sido recrutados no Banco de Sangue do HC-FMUSP. Nesta unidade do HC-FMUSP, todos os doadores de sangue, sempre voluntários, são submetidos a um questionário aplicado por uma enfermeira da equipe, investigando, dentre outras condições clínicas, o uso de substâncias psicoativas e de medicamentos psiquiátricos. Durante a coleta, uma curta entrevista não-padrionizada foi realizada por um psiquiatra, investigando algum possível transtorno mental atual ou durante a história de vida do indivíduo, focando de maneira especial em transtornos psicóticos (Messas, 2001). Esses controles têm sido utilizados em vários estudos do tipo associação realizados pelo PROGENE. Este projeto foi formalmente submetido à direção do Banco de Sangue, que consentiu com sua realização das entrevistas e coletas em suas dependências.

Análise Laboratorial

O trabalho laboratorial contou com as seguintes etapas:

a) Extração do ácido desoxirribonucléico (DNA):

Cerca de 20 ml de sangue venoso periférico foram coletados, por punção venocubital, em tubos com o anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Após a coleta, os tubos foram devidamente armazenados a -4°C até o momento da extração. O DNA genômico foi extraído utilizando-se duas técnicas laboratoriais: a) técnica de fenol-clorofórmio; b) técnica de *salting out* (Miller *et al.*, 1988) (Anexo 4). No início das coletas, a técnica de fenol-clorofórmio era a padronizada no PROGENE, porém, no decorrer dessa

tese, a mesma foi substituída pela de *salting out*, para a qual o aluno recebeu treinamento. Após a extração de DNA, a concentração obtida era mensurada por leitura em espectrofotômetro Gene Quant (Pharmacia Biotech).

b) Detecção de Fragmentos Polimórficos de DNA:

Todos as seqüências dos oligonucleotídeos (*primers*) utilizados nesta tese foram confirmadas (Gráfico 1) no BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

BLAST Ser9Gly DRD3 Forward (GCTCTATCTCCAACCTCTCACA)

Sequences producing significant alignments:

gi 20806260 gb AC092896.9	Homo sapiens 3 BAC RP11-274J15 (Ro...	42.1	0.011
gi 13506728 gb AF263450.1 AF148807S2	Homo sapiens dopamine D3...	42.1	0.011
gi 7159738 emb AJ271348.2 HSA271348	Homo sapiens partial DRD3 ge...	42.1	0.011
gi 5256826 gb AF033621.1 AF033621	Homo sapiens dopamine D3 re...	42.1	0.011
gi 806902 gb U25441.1 HSU25441	Human dopamine D3 receptor (DRD3)	42.1	0.011
gi 19714912 emb AL357150.7	Human DNA sequence from clone RP11...	36.2	0.17
gi 13811918 gb AC017000.5	Homo sapiens BAC clone RP11-42B7 from	36.2	0.66
gi 17408068 gb AC004952.2 AC004952	Homo sapiens PAC clone RP5-103	36.2	0.66
gi 54400857 gb AC131795.3	Mus musculus BAC clone RP24-490N11 fr	36.2	0.66
gi 55774382 gb AC117209.3	Mus musculus BAC clone RP23-281E24 fr	36.2	0.66
gi 46240969 gb AC131721.4	Mus musculus BAC clone RP23-142L24...	34.2	2.6
gi 176573962 gb AC166244.4	Mus musculus chromosome 15, clone RP2	34.2	2.6
gi 84999623 ref XM_949440.1	Theileria annulata strain Ankara...	34.2	2.6
gi 166841636 gb AC108858.16	Mus musculus chromosome 15, clone...	34.2	2.6
gi 37537455 dbj BS000188.1	Pan troglodytes chromosome 22 clo...	34.2	2.6
gi 190017432 emb CR381592.4	Zebrafish DNA sequence from clone...	34.2	2.6
gi 129367450 emb AL672263.13	Mouse DNA sequence from clone RP...	34.2	2.6
gi 6319177 gb AF194970.1 AF194970	Mus musculus LEK1 mRNA, partia	34.2	2.6
gi 182883720 ref XM_899897.1	PREDICTED: Mus musculus centrome...	34.2	2.6
gi 182883718 ref XM_129658.7	PREDICTED: Mus musculus centrome...	34.2	2.6
gi 182883612 ref XM_924334.1	PREDICTED: Mus musculus centrome...	34.2	2.6
gi 182883610 ref XM_916605.1	PREDICTED: Mus musculus centrome...	34.2	2.6
gi 53381266 gb AC140679.4	Mus musculus BAC clone RP24-S11N8 fro	34.2	2.6
gi 181230605 gb AC167554.8	Mus musculus chromosome 15, clone ...	34.2	2.6
gi 192630471 dbj AF003498.2	Homo sapiens genomic DNA, chromos...	34.2	2.6

Alignments

BLAST Ser9Gly DRD3 Reverse (AAGTCTACTCACCTCCAGGTA)

Sequences producing significant alignments:

gi 20806260 gb AC092896.9	Homo sapiens 3 BAC RP11-274J15 (Ro...	42.1	0.011
gi 13506728 gb AF263450.1 AF148807S2	Homo sapiens dopamine D3...	42.1	0.011
gi 806902 gb U25441.1 HSU25441	Human dopamine D3 receptor (DRD3)	42.1	0.011
gi 12057211 gb AF003849.1	Xylella fastidiosa 9a5c, complete gen	36.2	0.17
gi 28059961 gb AF009442.1	Xylella fastidiosa Temecula1, complet	36.2	0.17
gi 186515275 emb ICTS73028.6	Mouse DNA sequence from clone RP2...	36.2	0.66
gi 19031841 emb AL669843.4	Human DNA sequence from clone XXh...	34.2	2.6
gi 15668157 gb AC010982.5	Homo sapiens BAC clone RP11-475116 fr	34.2	2.6
gi 16596561 gb AC079378.2	Rattus norvegicus strain Brown Nor...	34.2	2.6

Alignments

Get selected sequences Select all Deselect all Tree View

> [gi|20806260|gb|AC092896.9|](#) Homo sapiens 3 BAC RP11-274J15 (Roswell Park Cancer Institute Human BAC Library) complete sequence
Length=170330

Score = 42.1 bits (21), Expect = 0.011
Identities = 21/21 (100%), Gaps = 0/21 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 AAGTCTACTCACCTCCAGGTA 21
 |||||
Sbjct 167152 AAGTCTACTCACCTCCAGGTA 167172

> [gi|13506728|gb|AF263450.1|AF148807S2](#) Homo sapiens dopamine D3 receptor (DRD3) gene, exon 2 and partial cds

Figura 3 - Exemplos de BLAST

- Genotipagens dos Polimorfismos Realizadas no PROGENE

1. Genotipagem do polimorfismo *TaqIA* do *DRD2*

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

A reação de amplificação foi realizada utilizando-se: 20ng de DNA genômico, 1,5mM MgCl₂, 50mM KCl, 10mM Tris-HCl (pH=8,0), 10 pmol de cada oligonucleotídeo (Grandy *et. al.*, 1993), 200μM de cada deoxinucleotídeo trifosfato e 0,5U Taq DNA polimerase.

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

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

	11	12	22
310pb			
180pb			
130pb			

Figura 4 - Representação esquemática do polimorfismo do gene DRD2 após amplificação e digestão com a enzima *TaqI*. Alelo 1: 310pb; Alelo 2: 130pb + 180pb

2. Genotipagem do polimorfismo Ser9Gly do gene *DRD3*

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

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

A amplificação foi realizada em termociclador Peltier Thermal Cycler – 200 (MJ Research) utilizando-se as seguintes condições: 1 ciclo de 95°C por 5 minutos para a denaturação inicial do material genômico, 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 56°C por 40 segundos, 72°C por 40 segundos para a amplificação do segmento gênico de interesse e 1 ciclo de 72°C por 10 minutos para a extensão final do fragmento. O produto resultante da amplificação foi digerido com a enzima de restrição *MscI* conforme instruções do

fabricante. Após digestão, o produto obtido foi analisado em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. Os tamanhos dos fragmentos gerados foram:

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

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

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

3. Genotipagem do polimorfismo do tipo VNTR na região 3' não-codificadora do SLC6A3

A amplificação do polimorfismo da região 3' não codificadora do gene DAT1 foi realizada pela técnica de PCR utilizando-se: 20ng de DNA genômico, 1,5mM MgCl₂, 50mM KCl, 10mM Tris-HCl (pH=8,0), 10 pmol de cada oligonucleotídeo (Gill *et al.*, 1997), 200µM de cada deoxinucleotídeo trifosfato e 0,5U Taq DNA polimerase.

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

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

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

Figura 6 - Representação esquemática do polimorfismo VNTR do gene do SLC6A3

4. Genotipagem do polimorfismo A1343G do SLC6A3

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

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

A amplificação foi realizada em termociclador Peltier Thermal Cycler – 200 (MJ Research) utilizando-se as seguintes condições: 1 ciclo de 95°C por 5 minutos para a denaturação inicial do material genômico, 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 58°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto para a amplificação do segmento gênico de interesse e 1 ciclo de 72°C por 5 minutos para a extensão final do fragmento. O produto resultante da amplificação foi digerido com a enzima de restrição *DdeI* conforme instruções do fabricante. Após digestão, o produto obtido foi analisado em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. Os tamanhos dos fragmentos gerados foram:

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

	11	12	22
209pb			
110pb			
99pb			

Figura 7 - Representação esquemática do polimorfismo A1343G do gene do DAT1. Alelo 1: 209pb; Alelo 2: 110pb + 99pb

Tabela 1. Relação dos oligonucleotídeos utilizados para a análise dos polimorfismos

POLIMORFISMOS	PRIMERS
<i>TaqI</i> A do <i>DRD2</i>	<i>Forward</i> CCGTCGACGGCTGGCCAAGTTGTCTA
	<i>Reverse</i> CCGTCGACCCTTCCTGAGTGTCATCA
Ser9Gly do <i>DRD3</i>	<i>Forward</i> GCTCTATCTCCA ACTCTCACA
	<i>Reverse</i> AAGTCTACTCACCTCCAGGTA
VNTR do SLC6A3	<i>Forward</i> TGTGGTGTAGGGAACGGCCTGAG
	<i>Reverse</i> CTTCCTGGAGGTCACGGCTCAAGG
A1343G do SLC6A3	<i>Forward</i> GGTGAAGGAACCCAACTG
	<i>Reverse</i> CACAGCGTGGGCTCTGTG

- Genotipagens dos Polimorfismos Realizadas no Laboratório da Empresa Prevention Genetics

- Os polimorfismos abaixo foram genotipados pela Empresa Prevention Genetics (www.preventiongenetics.com):

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

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

Análise Estatística

1. Considerações gerais

A análise estatística dos resultados de genotipagem passou pela avaliação de duas hipóteses: uma delas é a hipótese nula (H_0) e a outra delas é a hipótese alternativa (H_1). O processo de análise envolveu a rejeição da hipótese nula, o que significaria evidência em favor da hipótese da pesquisa realizada, ou a sua confirmação. Estudos do tipo associação em genética podem seguir o padrão de análise das investigações do tipo caso-controle, analisando-se a exposição a determinado fator etiológico (no caso, os polimorfismos genéticos) e seu resultado, no caso do presente trabalho, o desenvolvimento de esquizofrenia. Assim, foi realizado estudo genético com o objetivo de confirmar ou descartar a associação entre a exposição genética e o aparecimento de esquizofrenia. Para todos os testes estatísticos, o intervalo de significância adotado foi de 5%.

2. Estudo caso-controle

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

Em um estudo do tipo caso-controle, a análise de associação alélica e genotípica refere-se à co-ocorrência de um determinado alelo ou genótipo e uma doença acima do esperado pela chance. É importante ressaltar que a simples associação entre duas variáveis não necessariamente é causal. No caso específico, tal tipo de associação pode se dever a dois fatores principais, a saber, desequilíbrio de ligação (*linkage disequilibrium: LD*), também chamada associação “associação indireta”. A presença de LD entre *loci* genéticos muito ligados é uma causa importante de associação indireta entre um determinado alelo e a doença investigada. O alelo estudado pode não apresentar efeito algum sobre o aparecimento da doença, porém estar em LD com um outro que desempenha esse papel. Assim sendo, a associação alélica pode aparecer não apenas com o polimorfismo genético relacionado à etiopatogenia da doença, mas também com polimorfismos de sua vizinhança (Mc Guffin *et al.*, 2002).

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

Na presente tese, diferenças estatísticas entre afetados e não-afetados no que tange à distribuição das freqüências dos alelos e genótipos dos polimorfismos que apresentam apenas dois alelos foram calculadas por meio do teste de qui-quadrado (Siegel, 1981). Para a comparação entre médias de idade, utilizou-se o teste t de Student. Para tais análises, foi utilizado o pacote estatístico SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 10.0.1.

Para o polimorfismo VNTR do SLC6A3, que apresenta mais de dois alelos possíveis, a análise estatística foi realizada por meio do programa estatístico “CLUMP”, que faz análises a partir da formação de grupos com os alelos mais raros (*clump*: grupo),

com o objetivo de aumentar a chance de encontrar associações que possam existir e que estejam macaradas pela presença dos alelos raros na análise (Sham & Curtis, 1995).

3. Equilíbrio de Hardy-Weinberg

A existência do equilíbrio de Hardy-Weinberg foi demonstrada independentemente por Godfrey Harold Hardy na Inglaterra e por Wilhelm Weinberg na Alemanha, em 1908. Tal princípio afirma que as frequências genóticas de um único *locus* estarão fixas e em equilíbrio em uma população numerosa, que não está em processo evolutivo franco e após uma geração de acasalamento randômico. Para um polimorfismo genético bialélico, se as frequências dos alelos “A” e “a” são respectivamente “p” e “q”, então “ $(p+q)=1$ ”. As frequências esperadas para cada genótipo formados a partir desses alelos (AA, Aa e aa) são p^2 , $2pq$ e q^2 , nas quais “ $p^2+2pq+q^2=1$ ”. Assim, se as frequências dos genótipos em uma determinada população estudada não mostram diferenças significativas desse padrão de distribuição, diz-se que estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg podem estar relacionados a vários fatores, porém no caso do presente estudo, tais desvios podem estar mais comumente relacionados a problemas de genotipagem e estratificação da amostra, principalmente aquela relacionada à estratificação étnica. Marcadores localizados em *loci* distantes, normalmente independentes, podem se apresentar “ligados” após um recente processo de miscigenação entre duas ou mais populações. Apenas após várias gerações de cruzamento aleatório entre as subpopulações é que genes ou marcadores previamente ligados se aproximam do equilíbrio de Hardy-Weinberg, e apresentaram-se independentes, deixando

apenas *loci* bem próximos em DL (Sham, 1997). Portanto, desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg na distribuição genotípica de determinados marcadores e desequilíbrios de ligação entre marcadores distantes podem ser considerados indicativos da presença de subestrutura na amostra, já que esses dois fenômenos podem ocorrer como citado, devido à presença de estratificação étnica populacional (Pfaff *et al.*, 2001).

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

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

O teste de desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg foi feito por meio do teste qui-quadrado de Pearson, usando as frequências observadas dos genótipos obtidas dos dados de genotipagem e as frequências genotípicas esperadas obtidas usando-se o princípio do equilíbrio de Hardy-Weinberg. O cálculo do equilíbrio de Hardy-Weinberg para todos os polimorfismos foi realizado por meio do “HWE Program” (Ott, 1999).

4. Poder da Amostra

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

5. Desequilíbrio de ligação (LD)

Mesmo que dois *loci* ligados possam estar nas proporções genotípicas de Hardy-Weinberg, alelos em cada um deles podem estar associados de forma não aleatória com alelos do outro *locus*, ou seja, podem estar sendo transmitidos juntos com uma frequência diferente da esperada sob segregação independente. Alelos que estão extremamente ligados entre si, localizados em um mesmo cromossomo, tendem a não ser separados durante a meiose, aumentando a chance da ocorrência de gametas com frequências diferentes

daquelas esperadas sob segregação independente. Tal fenômeno acontece devido à redução na frequência de recombinação na região entre os locos. Assim, quando dois marcadores genéticos são transmitidos juntos com uma frequência diferente da esperada sob segregação independente (não-aleatória), diz-se que os marcadores estão em desequilíbrio de ligação (*linkage disequilibrium*: LD).

De maneira geral, conforme maior a distância espacial entre dois alelos em um cromossomo, menor o nível de LD, sendo que a chance de ocorrência de maiores valores de LD é maior com distâncias menores de 50 kb entre eles, e em contrapartida a chance de menores valores aparece com distâncias superiores a 500 kb. Entretanto, grande variabilidade pode ocorrer nos níveis de LD quando comparados à distância em que dois alelos encontram-se um do outro (Mc Guffin *et al.*, 2002).

O valor de R^2 indica o grau de associação entre alelos em diferentes *loci* e pode variar entre 0 e 1. A estimativa de D' é considerada uma boa medida de recombinação gênica. Porém, D' pode ser bastante instável na presença de frequências alélicas e tamanho amostral reduzidos, e alguns estatísticos preferem a medida de R^2 para estudos de associação genéticos (Pritchard, 2001).

Na presente Tese, a análise de LD foi realizada por meio do programa “GENECOUNTING” (<http://www.smd.qmul.ac.uk/statgen/dcurtis/software.html>).

6. Análise de haplótipos

A análise de polimorfismos que estão ligados entre si, apresentando alta taxa de LD, merece atenção especial, pois é possível que a doença que está sendo investigada esteja associada com o haplótipo (que é uma seqüência de alelos de um ou mais loci adjacentes na

mesma região cromossômica). Análise de haplótipos pode ser mais informativa que a análise de um único marcador. Assim, se mais de uma variante gênica (polimorfismo) que confere susceptibilidade a uma determinada doença estiver presente em um mesmo gene, a análise de haplótipo permitirá que se faça a medida do efeito combinado dessas variantes (Epstein & Satten, 2003).

A análise da distribuição da frequência de haplótipos foi realizada através do programa GENECOUNTING.

7. Análise de variáveis de confusão

Em caso da existência de potenciais variáveis de confusão, como gênero, por exemplo, então métodos estatísticos padrão devem ser utilizados para investigá-las, como análise estratificada ou análise de regressão.

No caso da presente tese, utilizou-se análise estratificada e regressão logística para a investigação de gênero e subtipo de esquizofrenia como fatores de confusão para os resultados obtidos.

A regressão logística tem como objetivo descrever a relação entre um resultado (variável dependente) e um conjunto simultâneo de variáveis explicativas (preditoras ou independentes), que seja biologicamente plausível. Na análise estratificada tem-se o mesmo propósito, mas as relações são efetuadas uma a uma, isto é, somente é possível obter a estimativa do risco para um único fator de cada vez, controlando-se o conjunto das demais variáveis. Podem ser citadas como vantagens da análise estratificada sua relativa simplicidade de execução, a facilidade de entendimento e maior proximidade que propicia entre o pesquisador e os dados. Entretanto, ao se aplicar essa técnica, o grau de dificuldade

aumenta na medida em que aumenta o número de variáveis que tiverem que ser consideradas como controle; os testes de homogeneidade entre os estratos, para se verificar a existência de interação entre as variáveis, são feitos em etapa à parte; variáveis quantitativas não podem ser usadas em sua escala original; o nível global de significância é difícil de ser controlado (Dean *et al.*, 1990).

RESULTADOS

6. RESULTADOS

A) Gênero:

- não há diferença estatisticamente significativa na distribuição de gênero:

Amostra:

. Pacientes: 245

- Feminino: 86 (35,1%); Masculino: 159 (64,9%)

. Controles: 834

- Feminino: 314 (37,65%); Masculino: 520 (62,35%)

$X^2=0,53$; $p=0,46$

B) Idade:

Amostra:

. Pacientes: 19-64 anos (média 27,9 anos \pm 7,9); mediana: 26

. Controles: 18-79 anos (média 32,5 anos \pm 9,5); mediana: 31

C) Subtipos de esquizofrenia (DSM-IV):

- Esquizofrenia Paranóide: 169 (68,98%)

- Esquizofrenia Desorganizada: 53 (21,63%)

- Esquizofrenia Catatônica: 2 (0,82%)

- Esquizofrenia Indiferenciada: 3 (1,22%)

- Esquizofrenia Residual: 18 (7,35%)

D) Poder da Amostra:

- hipoteticamente, observando-se as condições descritas a seguir, obteve-se um poder da amostra de 80%: 200 pacientes, 400 controles, nível de significância de 0,05, prevalência do transtorno estudado de 1%, frequência do alelo de risco de 30%, efeito de uma vez e meia maior para o alelo de risco na susceptibilidade para desenvolver o transtorno (OR=1,5). Alterando-se apenas o número de pacientes e de controles para 336 e 800, respectivamente, que é o número de indivíduos que temos para esse estudo, o poder da amostra vai para 91%.

E) Equilíbrio de Hardy-Weinberg:

Tabela 2: Valores do equilíbrio de Hardy-Weinberg para casos e controles

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

F) Distribuição alélica e genotípica dos polimorfismos estudados:

- Os resultados das distribuições genotípicas e alélicas dos polimorfismos investigados entre os grupos de pacientes e controles seguem abaixo:

1. *TaqI* A1/A2 do *DRD2* - rs1800497:

- genotípica: $\chi^2=3,59$, 2d.f., $p=0,16$;

- alélica: $\chi^2=3,29$, 1d.f., $p=0,07$, OR=1,22 (0,98<OR<1,52);

2. -141C (Ins/Del) do *DRD2* - rs1799732

- genotípica: $\chi^2=12,74$, 2d.f., $p=0,001$;

- alélica: $\chi^2=9,78$, 1d.f., $p=0,001$, OR=1,64 (1,19<OR<2,28);

3- Ser-9-Gly do *DRD3* - rs6280

- genotípica: $\chi^2=0,06$, 2d.f., $p=0,97$;

- alélica: $\chi^2=0,06$, 1d.f., $p=0,80$, OR=1,03 (0,83<OR<1,26);

4- *VNTR* da região 3' não-codificadora do *SLC6A3*

- genotípica: $\chi^2=6,70$, 10d.f., $p=0,71$;

- alélica: $\chi^2=3,90$, 6d.f., $p=0,65$;

5- A1343G do *SLC6A3* - rs6347

- genotípica: $\chi^2=6,56$, 2d.f., $p=0,03$;

- alélica: $\chi^2=5,97$, 1d.f., $p=0,01$, OR=1,33 (1,05<OR<1,69);

6- A/G da região 3' não-codificadora do *COMT* – rs165599

- genotípica: $\chi^2=0,22$, 2d.f., $p=0,89$;

- alélica: $\chi^2=0,02$, 1d.f., $p=0,88$, OR=1,02 (0,82<OR<1,25).

- As tabelas que se seguem apresentam os resultados das distribuições alélicas e genotípicas dos polimorfismos estudados, com análises de estratificação baseada em gênero, diagnóstico do subtipo de esquizofrenia e análise e homozigosidade:

. esquizofrenia = SCZ

. graus de liberdade: *d.f.*

1- POLIMORFISMO *TaqI* A DO *DRD2*

Tabela 3: Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo *TaqIA* do *DRD2* entre os grupos casos e controles

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

Tabela 4: Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo *TaqIA* do *DRD2* entre os grupos casos e controles por gênero

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

Tabela 5: Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo *TaqIA* do *DRD2* de acordo com o subtipo da SCZ (Subtipo Paranóide)

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

Tabela 6: Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo *TaqIA* do *DRD2* de acordo com o subtipo da SCZ (Subtipo Desorganizado)

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

Tabela 7: Análise com regressão logística não condicional para variáveis gênero e subtipo de esquizofrenia (simultaneamente)

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

Tabela 8: Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo *TaqIA* do *DRD2* para investigação de homozigossidade

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

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

Tabela 9: Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo -141C (Ins/Del) do *DRD2* entre os grupos casos e controles

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

- Investigação de Razão de Chance (OR) para o Genótipo de risco:

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

Tabela 10: Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo -141C (Ins/Del) do *DRD2* entre os grupos casos e controles por gênero

Masculino					
Polimorfismo	Casos (%)	Controles (%)	χ^2	<i>d.f.</i>	<i>p</i>
GENÓTIPOS					
Ins/Ins	117 (79,06)	329 (66,33)			
Ins/Del	27 (18,24)	146 (29,44)	8,67	2	0,01
Del/Del	4 (2,7)	21 (4,23)			
Total	148 (100)	496 (100)			
ALELOS					
A1	261 (88,18)	804 (81,05)			
Del	35 (11,82)	188 (18,95)	8,09	1	0,004
Total	296 (100)	992 (100)			
Feminino					
Polimorfismo	Casos (%)	Controles (%)	χ^2	<i>d.f.</i>	<i>p</i>
GENÓTIPOS					
Ins/Ins	66 (81,48)	169 (71,31)			
Ins/Del	11 (13,58)	60 (25,32)	4,96	2	0,08
Del/Del	4 (4,94)	8 (3,37)			
Total	81 (100)	237 (100)			
ALELOS					
Ins	143 (88,27)	398 (83,94)			
Del	19 (11,73)	76 (16,03)	1,76	1	0,18
Total	162 (100)	474 (100)			

Tabela 11: Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo -141C (Ins/Del) do *DRD2*, de acordo com o subtipo da SCZ (Subtipo Paranóide)

Polimorfismo	Casos (%)	Controles (%)	χ^2	<i>d.f.</i>	<i>p</i>
-141 C (Ins/Del)					
GENÓTIPOS					
Ins/Ins	123 (78,35)	498 (67,94)			
Ins/Del	28 (17,83)	206 (28,10)	7,2	2	0,02
Del/Del	6 (3,82)	29 (3,96)			
Total	157 (100)	733 (100)			
ALELOS					
Ins	274 (87,26)	1202 (81,99)			
Del	40 (12,74)	264 (18,01)	5,07	1	0,02
Total	314 (100)	1466 (100)			

Tabela 12: Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo -141C (Ins/Del) do *DRD2*, de acordo com o subtipo da SCZ (Subtipo Desorganizado)

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

Tabela 13: Análise com regressão logística não condicional para variáveis gênero e subtipo de esquizofrenia (simultaneamente)

Variáveis	Odds Ratio	Intervalo com 95% de confiança
Gênero	1,11	0,81-1,52
Subtipo de esquizofrenia	1,10	086-1,31

Tabela 14: Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo -141C (Ins/Del) do *DRD2* para investigação de homozigosidade

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

- POLIMORFISMO SER9GLY DO DRD3

Tabela 15: Distribuição dos genótipos e alelos polimorfismo Ser9Gly do gene do DRD3 entre os grupos casos e controles.

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

Tabela 16: Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo Ser9Gly do *DRD3* entre os grupos casos e controles por gênero

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

Tabela 17: Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo Ser9Gly do *DRD3*, de acordo com o subtipo da SCZ (Subtipo Paranóide)

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

Tabela 18: Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo Ser9Gly do *DRD3*, de acordo com o subtipo da SCZ (Subtipo Desorganizado)

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

Tabela 19: Análise com regressão logística não condicional para variáveis gênero e subtipo de esquizofrenia (simultaneamente)

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

Tabela 20: Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo Ser9Gly do *DRD3* para investigação de homozigidade

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

- POLIMORFISMO VNTR DA REGIÃO 3'UTR DO SLC6A3

Tabela 21: Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo VNTR do SLC6A3 entre os grupos casos e controles.

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

ANÁLISES – CLUMP (VNTR SLC6A3):

1. GENÓTIPOS

- Análise Global:

$$X^2=6,70; 10df; p=0,75$$

- Análise com agrupamento dos genótipos em 3 Colunas, tentando-se excluir o viés dos genótipos menos freqüentes:

$$X^2=0,10; 2df; p=0,94$$

- Análise de um genótipo contra os demais:

$$X^2=0,08; 1df; p=0,77$$

2. ALELOS

- Análise Global:

$$X^2=3,96; 6df; p=0,68$$

- Análise com agrupamento dos genótipos em 3 Colunas, tentando-se excluir o viés dos genótipos menos freqüentes:

$$X^2=0,97; 2df; p=0,62$$

- Análise de um genótipo contra os demais:

$$X^2=0,56; 1df; p=0,45$$

Tabela 22: Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo VNTR do SLC6A3 entre os grupos casos e controles por gênero

Masculino					
Polimorfismo	Casos (%)	Controles (%)	X²	d.f.	P
GENÓTIPOS					
11 10	4 (2,52)	6 (1,16)			
11 9	1 (0,63)	5 (0,97)			
10 10	79 (49,69)	262 (50,58)			
10 9	60 (37,73)	192 (37,07)			
10 8	–	4 (0,77)			
10 7	–	2 (0,39)	7,88	10	0,64
10 5	1 (0,63)	1 (0,19)			
10 4	2 (1,26)	1 (0,19)			
9 9	11 (6,91)	40 (7,72)			
9 8	1 (0,63)	4 (0,77)			
9 7	–	1 (0,19)			
Total	159 (100)	518 (100)			
ALELOS					
11	5 (1,57)	11 (1,06)			
10	225 (70,76)	730 (70,46)			
9	84 (26,43)	282 (27,22)			
8	1 (0,31)	8 (0,77)	6,18	6	0,4
7	–	3 (0,29)			
5	1 (0,31)	1 (0,09)			
4	2 (0,62)	1 (0,09)			
Total	318 (100)	1036 (100)			

ANÁLISES – CLUMP (VNTR SLC6A3):

1. GENÓTIPOS

- Análise Global:

$$X^2=7,88; 10df; p=0,64$$

- Análise com agrupamento dos genótipos em 3 Colunas, tentando-se excluir o viés dos genótipos menos freqüentes:

$$X^2=0,40; 2df; p=0,82$$

- Análise de um genótipo contra os demais:

$$X^2=0,11; 1df; p=0,74$$

2. ALELOS

- Análise Global:

$$X^2=6,18; 6df; p=0,4$$

- Análise com agrupamento dos genótipos em 3 Colunas, tentando-se excluir o viés dos genótipos menos freqüentes:

$$X^2=0,32; 2df; p=0,56$$

- Análise de um genótipo contra os demais:

$$X^2=0,08; 1df; p=0,78$$

(Continuação) Tabela 22: Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo VNTR do SLC6A3 entre os grupos casos e controles por gênero

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

ANÁLISES – CLUMP (VNTR SLC6A3):

1. GENÓTIPOS

- Análise Global:

$$X^2=3,84; 10df; p=0,95$$

- Análise com agrupamento dos genótipos em 3 Colunas, tentando-se excluir o viés dos genótipos menos freqüentes:

$$X^2=0,16; 2df; p=0,92$$

- Análise de um genótipo contra os demais:

$$X^2=0,08; 1df; p=0,76$$

2. ALELOS

- Análise Global:

$$X^2=1,66; 6df; p=0,95$$

- Análise com agrupamento dos genótipos em 2 Colunas, tentando-se excluir o viés dos genótipos menos freqüentes:

$$X^2=0,02; 1df; p=0,88$$

- Análise de um genótipo contra os demais:

$$X^2=0,02; 1df; p=0,88$$

Tabela 23: Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo VNTR do SLC6A3, de acordo com o subtipo da SCZ (Subtipo Paranóide)

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

ANÁLISES – CLUMP (VNTR SLC6A3):

1. GENÓTIPOS

- Análise Global:

$$X^2=3,74; 10df; p=0,92$$

- Análise com agrupamento dos genótipos em 3 Colunas, tentando-se excluir o viés dos genótipos menos freqüentes:

$$X^2=0,18; 2df; p=0,91$$

- Análise de um genótipo contra os demais:

$$X^2=0,08; 1df; p=0,78$$

2. ALELOS

- Análise Global:

$$X^2=4,86; 6df; p=0,93$$

- Análise com agrupamento dos genótipos em 3 Colunas, tentando-se excluir o viés dos genótipos menos freqüentes:

$$X^2=0,07; 2df; p=0,85$$

- Análise de um genótipo contra os demais:

$$X^2=0,05; 1df; p=0,82$$

Tabela 24: Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo VNTR do SLC6A3, de acordo com o subtipo da SCZ (Subtipo Desorganizado)

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

ANÁLISES – CLUMP (VNTR SLC6A3):

1. GENÓTIPOS

- Análise Global:

$$X^2=3,95; 10df; p=0,93$$

- Análise com agrupamento dos genótipos em 3 Colunas, tentando-se excluir o viés dos genótipos menos freqüentes:

$$X^2=0,18; 2df; p=0,91$$

- Análise de um genótipo contra os demais:

$$X^2=0,09; 1df; p=0,74$$

2. ALELOS

- Análise Global:

$$X^2=1,78; 6df; p=0,93$$

- Análise com agrupamento dos genótipos em 3 Colunas, tentando-se excluir o viés dos genótipos menos freqüentes:

$$X^2=0,05; 2df; p=0,86$$

- Análise de um genótipo contra os demais:

$$X^2=0,03; 1df; p=0,84$$

Tabela 25: Análise com regressão logística não condicional para variáveis gênero e subtipo de esquizofrenia (simultaneamente)

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

. para a análise do gênero e subtipo de esquizofrenia como possíveis variáveis de confusão na análise de regressão logística, utilizou-se apenas os dois genótipos mais comuns do polimorfismo em questão (10-10 e 10-9, que perfazem um total de 87,75% da amostra) e os dois subtipos de esquizofrenia mais comuns (paranóide e desorganizado, que perfazem 90,61% dos pacientes). Com isso, a idéia foi aumentar a chance de detectar as variáveis de confusão, caso as mesmas existissem

Tabela 26: Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo VNTR do gene do SLC6A3 para investigação de homozigidade

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

- POLIMORFISMO A1343G DO SLC6A3

Tabela 27: Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo A1343G do gene do SLC6A3 entre os grupos casos e controles.

Polimorfismo	Casos (%)	Controles (%)	χ^2	<i>d.f.</i>	<i>p</i>
GENÓTIPOS					
A/A	132 (56,17)	390 (46,76)			
A/G	84 (35,74)	357 (42,81)	6,56	2	0,03
G/G	19 (8,09)	87 (10,43)			
Total	235 (100)	834 (100)			
ALELOS					
A	348 (74,04)	1137 (68,17)	5,97	1	0,01
G	122 (25,96)	531 (31,83)			
Total	470 (100)	1668 (100)			

- Investigação de Razão de Chance (OR) para o Genótipo de risco:

	Casos (%)	Controles (%)	X2	d.f.	p	OR (I.C.)
A/A	132 (56,17)	390 (46,76)	6,49	1	0,01	1,46 (1,08-1,97)
A/G+G/G	103 (43,83)	444 (53,24)				
Total	235 (100)	834 (100)				

Tabela 28: Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo A1343G do SLC6A3 entre os grupos casos e controles por gênero

Masculino					
Polimorfismo	Casos (%)	Controles (%)	χ^2	<i>d.f.</i>	<i>p</i>
GENÓTIPOS					
A/A	84 (55,26)	254 (44,96)	5,24	2	0,07
A/G	55 (36,19)	245 (43,36)			
G/G	13 (8,55)	66 (11,68)			
Total	152 (100)	565 (100)			
ALELOS					
A	223 (73,36)	753 (66,64)			
G	81 (26,64)	377 (33,36)	4,97	1	0,02
Total	304 (100)	1130 (100)			
Feminino					
Polimorfismo	Casos (%)	Controles (%)	χ^2	<i>d.f.</i>	<i>p</i>
GENÓTIPOS					
A/A	48 (57,83)	136 (50,56)			
A/G	29 (34,94)	112 (41,64)	1,38	2	0,50
G/G	6 (7,23)	21 (7,8)			
Total	83 (100)	269 (100)			
ALELOS					
A	125 (75,3)	384 (71,38)			
G	41 (24,7)	154 (28,62)	0,98	1	0,32
Total	166 (100)	538 (100)			

Tabela 29: Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo A1343G do gene do SLC6A3, de acordo com o subtipo da SCZ (Subtipo Paranóide)

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

Tabela 30: Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo A1343G do gene do SLC6A3, de acordo com o subtipo da SCZ (Subtipo Desorganizado)

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

Tabela 31: Análise com regressão logística não condicional para variáveis gênero e subtipo de esquizofrenia (simultaneamente)

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

Tabela 32: Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo A1343G do gene do SLC6A3 para investigação de homozigossidade

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

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

Tabela 33: Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo A/G da região 3' não codificadora do gene da *COMT* entre os grupos casos e controles.

Polimorfismo	Casos (%)	Controles (%)	χ^2	<i>d.f.</i>	<i>p</i>
GENÓTIPOS					
A/A	73 (29,79)	257 (31)			
A/G	122 (49,8)	399 (48,13)	0,22	2	0,89
G/G	50 (20,41)	173 (20,87)			
Total	245 (100)	829 (100)			
ALELOS					
A	268 (54,69)	913 (55,07)	0,02	1	0,88
G	222 (45,31)	745 (44,93)			
Total	490 (100)	1658 (100)			

Tabela 34: Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo A/G da região 3' não codificadora do gene da COMT entre os grupos casos e controles por gênero

Masculino					
Polimorfismo	Casos (%)	Controles (%)	χ^2	<i>d.f.</i>	<i>p</i>
GENÓTIPOS					
A/A	49 (30,82)	76 (31,15)			
A/G	75 (47,17)	268 (47,43)	0,03	2	0,98
G/G	35 (22,01)	121 (21,42)			
Total	159 (100)	565 (100)			
ALELOS					
A	173 (54,4)	620 (54,97)			
G	145 (45,6)	510 (45,13)	0,02	1	0,88
Total	318 (100)	1130 (100)			
Feminino					
Polimorfismo	Casos (%)	Controles (%)	χ^2	<i>d.f.</i>	<i>p</i>
GENÓTIPOS					
A/A	24 (27,91)	81 (30,68)			
A/G	47 (54,65)	131 (49,62)	0,66	2	0,71
G/G	15 (17,44)	52 (19,7)			
Total	86 (100)	264 (100)			
ALELOS					
A	95 (55,23)	293 (55,5)			
G	77 (44,77)	235 (44,5)	0,00	1	0,95
Total	172 (100)	528 (100)			

Tabela 35: Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo A/G da região 3' não codificadora do gene da COMT, de acordo com o subtipo da SCZ (Subtipo Paranóide)

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

Tabela 36: Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo A/G da região 3' não codificadora do gene da COMT, de acordo com o subtipo da SCZ (Subtipo Desorganizado)

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

Tabela 37: Análise com regressão logística não condicional para variáveis gênero e subtipo de esquizofrenia (simultaneamente)

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

Tabela 38: Distribuição dos genótipos e alelos do polimorfismo A/G da região 3' não codificadora do gene da COMT para investigação de homozigosidade

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

G) Análise de Desequilíbrio de Ligação (Linkage Disequilibrium – LD):

- DRD2 TaqI A - ANKK1 / -141C Ins/Del:

. $D' = 0,39$; ; $p = 0,001$

- VNTR DAT1 / A1343G DAT1:

. $D' = 0,27$; $p = 0,005$

H) Análise de Haplótipos:

- ANÁLISES – HAPLÓTIPOS (DRD2 TaqI A / ANKK1 – -141C Ins/Del):

. melhor valor de $p=0,15$ (haplótipo A2-Ins)

. significância global: $p=0,24$; $\chi^2=8,34$, 3d.f.

- ANÁLISES – HAPLÓTIPOS (VNTR DAT1 – A1343G DAT1):

- Não houve diferença significativa na distribuição haplotípica dos polimorfismos

VNTR e A1343 do DAT1 entre os grupos de pacientes e controles:

. melhor valor de $p=0,43$ (haplótipo 10-A)

. significância global: $p=0,63$; $\chi^2=5,37$, 3d.f.

DISCUSSÃO

7. DISCUSSÃO

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

Os trabalhos publicados até o presente momento com os polimorfismos estudados na presente tese mostram resultados ainda inconclusivos. Quanto ao polimorfismo do *TaqI* A do *DRD2*, os resultados têm se mostrado inclusive opostos em vários estudos. Outro polimorfismo também investigado nesta tese do *DRD2* foi o -141C (Ins/Del). Da mesma maneira que ocorre com o polimorfismo do *TaqI* A do *DRD2*, os estudos com este polimorfismo também apresentam resultados inconclusivos, e muitas vezes opostos, encontrando associação com alelos distintos.

Em relação aos polimorfismos Ser9Gly do gene do *DRD3*, a última meta-análise publicada não encontrou evidência de associação com esquizofrenia. No entanto, meta-análise anterior e vários estudos anteriores têm evidenciado associação entre os genótipos homocigotos de tal polimorfismo e esquizofrenia.

Quando tomados em conjunto, os resultados dos estudos com o polimorfismo VNTR do gene do *DAT1* parecem não dar suporte a uma possível associação com esquizofrenia, inclusive corroborados por meta-análise. Em relação ao polimorfismo A1343G-*DAT1*, o mesmo é uma contribuição inédita dessa tese ao estudo da genética de susceptibilidade da esquizofrenia e apresenta resultado positivo.

O polimorfismo A/G da região 3' não codificadora do gene da *COMT* foi descoberto mais recentemente, porém já acumula vários trabalhos realizados na pesquisa da investigação de fatores de susceptibilidade para a esquizofrenia. Os resultados destes

trabalhos, no entanto ainda são inconclusivos, apresentando resultados positivos e negativos na mesma proporção.

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

TaqIA-DRD2

O polimorfismo *TaqI* A do gene do *DRD2* foi um dos primeiros a serem investigados como fator de risco para transtornos psiquiátricos. No entanto, de maneira interessante, durante o correr desta tese, um novo gene foi mapeado na região onde está localizado esse polimorfismo. Tal gene codifica a proteína *ankyrin repeat and kinase domain containing 1* (ANKK1) (Neville *et al.*, 2004). A ANKK1 é uma proteína-quinase, provavelmente exercendo sua ação ligando-se à adenosina 5'-trifosfato (ATP), catalisando a transferência de um grupo fosfato dessa molécula para uma outra, liberando energia. Descobriu-se, que o polimorfismo RFLP do *DRD2* (polimorfismo *TaqI* A), na realidade leva à substituição Glu713Lys no exon 8 do gene da ANKK1 (*ANKK1*). Por conta disso, pode-se ter uma explicação alternativa aos resultados positivos de associação encontrados entre tal polimorfismo e alguns transtornos psiquiátricos, podendo identificar na verdade o gene da ANKK1 como relacionado à etiopatogenia desses quadros. No entanto, devido à grande proximidade existente entre esses dois genes, é possível também que a região terminal do *DRD2* continue sendo de interesse para investigações dos transtornos mentais, incluindo a esquizofrenia, devido ao fato de nessa região existirem polimorfismos tanto do *ANKK1* quanto do *DRD2* que estejam em DL (Dubertret *et al.*, 2004). Além disso, nessa região onde existe o polimorfismo *TaqI* A podem existir estruturas reguladoras da

expressão do *DRD2*. (Michael, et al., 2007). Tais possibilidades mantêm o interesse de estudos com esse polimorfismo para a investigação genético-molecular em esquizofrenia.

Até o momento, apesar dos resultados dos trabalhos com esse polimorfismo em esquizofrenia serem inconclusivos, ainda mantém-se de interesse por conta da *rationale* envolvida na sua escolha, e dos resultados positivos obtidos por alguns autores.

Os resultados do presente trabalho não encontraram associação entre tal polimorfismo e esquizofrenia na amostra estudada. No entanto, observa-se uma tendência de associação com o alelo A2. Alguns estudos têm mostrado aumento da densidade cerebral de receptores DRD2 em indivíduos portadores do alelo A1. Desse modo, acreditava-se que os portadores do alelo A1 apresentariam uma menor resposta dopaminérgica quando comparados àqueles que possuem o alelo A2. Assim, essa tendência à associação entre o alelo A2 e esquizofrenia em nossa amostra faria sentido dentro dessa perspectiva biológica de hiperativação dopaminérgica relacionada à esquizofrenia envolvendo os receptores DRD2. Entretanto, estudo de Laakso *et al.* (2005) mostrou que, devido ao fato da existência de auto-receptores DRD2 nos neurônios dopaminérgicos, essa diminuição de sua densidade cerebral em indivíduos que apresentam o alelo A1 levaria a uma retroalimentação positiva ao neurônio pré-sináptico, que por sua vez aumentaria a produção de dopamina, levando a um aumento da atividade dopaminérgica. No entanto, tal hipótese necessita ainda de confirmação.

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

-141C Ins/Del-DRD2

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

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

Tais resultados opostos entre os alelos do polimorfismo estudado podem estar relacionados com diferenças nas suas frequências entre diferentes grupos étnicos, sendo que o mesmo deve ocorrer com o polimorfismo *TaqI A* do *DRD2* (Michael, *et al.*, 2007).

Há outros exemplos na literatura desse fenômeno. Têm sido descritas associações alélicas opostas para determinado transtorno psiquiátrico, quando são estudadas amostras com diferentes origens étnicas. Um exemplo disso ocorre com o polimorfismo 5-HTTLPR do gene do transportador de serotonina em pacientes com transtorno afetivo bipolar. Esse polimorfismo apresenta uma diferença na inserção/deleção de 44 pares de bases. Em amostras caucasianas européias e americanas, têm sido descrita associação do alelo “s” (*short*: curto) com transtorno afetivo bipolar. No entanto, estudos conduzidos em população brasileira (Mendes de Oliveira, 1998), espanhola (Gutierrez *et al.*, 1998) e colombiana (Ospina-Duque *et al.*, 2000) mostraram maior presença do alelo “s” entre os controles e não entre os pacientes, achado também reproduzido pelo nosso grupo (Meira-Lima *et al.*, 2005). Tal fenômeno pode ocorrer, pois os alelos do polimorfismo investigado podem estar em LD com alelos de um outro polimorfismo. Assim, em um determinado grupo étnico, um alelo “x” de um determinado polimorfismo estaria em LD com um alelo “y” de outro

polimorfismo, ao passo que em outro grupo étnico o mesmo alelo “x” estaria em LD com um alelo “z” daquele polimorfismo do alelo “y” (Weiss *et al.*, 2001). Assim, é importante que sejam realizados trabalhos com tais polimorfismos, incluindo os estudados nesta tese, em amostras étnicas distintas, com o objetivo de elucidar melhor esse tipo de associação.

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

Ser9Gly-*DRD3*

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

A homozigidade é fenômeno que também vem sendo encontrado em outras doenças, como a artrite reumatóide e a psoríase. Uma explicação para tal achado é que a presença de duas formas moleculares de um determinado receptor neuroquímico em um indivíduo poderia resultar em um aumento na sua capacidade de resposta adaptativa a

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

No presente estudo não houve diferença na distribuição alélica ou genotípica entre as populações de casos e controles. Foi também tentado repetir os achados que têm mostrado possível associação entre homozigosidade e o polimorfismo Ser9Gly do *DRD3* esquizofrenia. No entanto, essa associação também não foi evidenciada na presente amostra.

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

VNTR-SLC6A3

Polimorfismos responsáveis por codificar variantes da proteína transportadora de dopamina com maior ou menor atividade na sua ação apresentam interesse para a investigação como fator de risco para a esquizofrenia. O mecanismo que explicaria uma possível associação entre um determinado fenótipo e um polimorfismo localizado dentro da região 3' não codificadora de um gene, como é o caso do VNTR do *SLC6A3*, ainda não é bem compreendido. Alguns estudos têm proposto que essa região possa estar envolvida na

regulação da eficiência da transcrição, na estabilidade do RNA mensageiro ou na localização subcelular do RNA mensageiro (Mignone *et al.*, 2002). Embora esse polimorfismo VNTR no SLC6A3 localize-se na região 3'UTR do gene, estando no final oposto das seqüências promotoras, as seqüências 3'UTR são conhecidas pelo seu papel na regulação da expressão gênica (Asherson *et al.*, 2004). Essas seqüências podem controlar especificamente a exportação nuclear do ácido ribonucléico-mensageiro (mRNA), sua poliadenilação e sua taxa de degradação (Conne *et al.*, 2000). A região 3'UTR pode, então, ser vista como uma região regulatória que é essencial para a expressão apropriada de muitos genes. No entanto, em estudo conduzido por Mill *et al.* (2005), não foi observado efeito desse polimorfismo sobre a expressão gênica.

Os resultados da investigação com o polimorfismo VNTR do gene do SLC6A3 nesta tese estão de acordo com a quase totalidade dos estudos publicados até o momento, que falharam ao tentar encontrar uma associação entre esse polimorfismo e esquizofrenia. No entanto, tal polimorfismo pode estar envolvido na susceptibilidade a outros transtornos psicóticos, como o transtorno bipolar do humor (Kelsoe *et al.*, 1996; Waldman *et al.*, 1997; Greenwood *et al.*, 2001) e paranóia induzida pelo uso de cocaína (Gelernter *et al.*, 1994), bem como a transtornos do espectro esquizofreniforme, como o transtorno de personalidade esquizóide (Blum *et al.*, 1997). No entanto, tal polimorfismo ainda deve ser investigado, especialmente pensando-se no estudo de grupos específicos de sintomas, como as manifestações psicóticas. Além disso, outros SNPs desse gene também podem ser de interesse, como o A1343G, que será apresentado abaixo.

A1343G-SLC6A3

O estudo do polimorfismo A1343G do gene do SLC6A3 é uma contribuição inédita deste trabalho para as investigações genéticas em esquizofrenia. Tal polimorfismo é sinônimo, não havendo mudança de aminoácido na proteína (Ser/Ser) e parece que não é funcional (Greenwood *et al.*, 2002). Apesar disso, seu estudo é importante, pois tal polimorfismo pode estar em LD com outra variante gênica no SLC6A3, que é um gene de interesse para esquizofrenia. Além disso, trabalhos mais recentes vêm demonstrando que polimorfismos sinônimos, que aparentemente não deveriam implicar em alterações na expressão gênica, podem fazê-lo. Estudo realizado com receptores DRD2 mostrou que mutações sinônimas no DNA podem afetar a estabilidade do m-RNA e a síntese do receptor (Duan *et al.*, 2003). Tal fato também justifica a pesquisa com polimorfismos sinônimos, como no caso desta tese.

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

A/G da região UTR do *COMT*

O *COMT* tem sido considerado de interesse para estudos de transtornos psiquiátricos, em especial, esquizofrenia. O *COMT* localiza-se na região cromossômica 22q11, que está relacionada à síndrome velocardiofacial, que é caracterizada por microdeleção hemizigótica nessa mesma região. Tal doença tem incidência de 1:4000 nascidos vivos e apresenta características clínicas marcadas por sintomas somáticos (principalmente alterações congênitas cardiovasculares e anomalias craniofaciais), além de manifestações neuropsiquiátricas, como deficiência mental e sintomas psicóticos. Tal

síndrome é associada com alta prevalência de esquizofrenia, sendo que o risco para o desenvolvimento desse transtorno psiquiátrico é cerca de 25 vezes maior quando comparado com a população geral. Pacientes com esquizofrenia, em geral, também apresentam, em até 2% dos casos, microdeleções na região cromossômica 22q11. Assim sendo, tal hemideleção confere importante risco para o aparecimento de esquizofrenia, sendo menor apenas que a presença de um irmão gêmeo com o transtorno. Desse modo, o gene da COMT coloca-se como de interesse para pesquisas de susceptibilidade para esquizofrenia (Jolin et al., 2006). Ademais, tal gene apresenta um polimorfismo funcional (Val108/158Met), que altera sua atividade enzimática em até quatro vezes, podendo influenciar na disponibilidade sináptica de neurotransmissores, como a dopamina. Além do mais alguns estudos de ligação também têm mostrado resultados positivos entre esquizofrenia e a região 22q11 (Levinson, 2005).

O polimorfismo do *COMT* investigado nesta tese localiza-se na região 3' UTR do *COMT*, próximo ao exon 1. Bray et al. (2003), em estudo *postmortem*, mostraram que tal polimorfismo altera a expressão do *COMT*, sendo que o alelo G, relacionado como fator de risco para esquizofrenia no estudo de Shifman et al. (2002), está relacionado a uma diminuição dessa expressão.

No entanto, estudos que se seguiram à investigação inicial de associação do polimorfismo rs165599 e esquizofrenia têm encontrado resultados inconclusivos. Como tal polimorfismo passou a ser estudado mais recentemente, ainda não há resultados de meta-análise para começar a indicar a participação do papel desse marcador na etiopatogenia da esquizofrenia. Os resultados do nosso trabalho não mostraram associação entre tal polimorfismo do *COMT* e esquizofrenia.

Análise de Homoziguidade

Homoziguidade tem sido reportada como fator de risco para várias doenças, não apenas psiquiátricas. Desse modo, em todos os polimorfismos testamos a hipótese da existência de associação entre esquizofrenia e homoziguidade.

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

Assim sendo, não encontramos associação significativa entre homoziguidade e esquizofrenia na amostra investigada neste trabalho.

Comparação entre Grupos

a) Gênero

Diferenças fenotípicas na SCZ têm sido observadas entre pacientes de gênero distintos (Salem & Kring, 1998). Tais diferenças na apresentação clínica poderiam refletir também em diferenças na susceptibilidade genética ao transtorno. No entanto, ainda não há evidências suficientes para garantir a existência desse componente genético distinto entre os sexos. Estudo genético-epidemiológico com gêmeos, contando com grande amostra, não evidenciou a ocorrência dessa diferença genética baseada no gênero (Cannon et al., 1998). Porém, vários estudos genético-moleculares têm mostrado diferenças na associação alélica e genotípica baseada no gênero dos pacientes. Por conta disso, na presente tese, optou-se

por fazer análise para investigar essa questão nos polimorfismos investigados. Foi realizada análise estratificada por gênero e regressão logística para todos os polimorfismos investigados. Apesar de nos casos nos quais há resultados entre esquizofrenia e os polimorfismos estudados, a associação perdeu-se com a análise de gêneros, podia-se perceber que a diferença de prevalência dos alelos e genótipos mantinha-se entre casos e controles, e que tal fenômeno apareceu devido a uma diminuição do número de indivíduos analisados com a análise estratificada. Assim, ao utilizar a regressão logística, percebeu-se que o gênero realmente não é variável de confusão para a análise de associação entre os polimorfismos investigados como fator de risco para esquizofrenia.

b) Subtipos de Esquizofrenia

Levando-se em conta o subtipo de esquizofrenia como fator de confusão, como no caso do gênero, a regressão logística também descartou tal possibilidade. No entanto, como havia cinco grupos de subtipos de esquizofrenia, porém apenas dois dele representavam uma quantidade significativa de indivíduos – esquizofrenia paranóide: 169 (68,98%), e esquizofrenia desorganizada: 53 (21,63%), com um total de 90,61% dos pacientes – optou-se por utilizar nas análise apenas esses dois grupo de pacientes, com o objetivo de não perder poder estatístico com a análise em muitos com números pequenos.

Análises de LD e Haplótipos

Não houve associação com a análise de haplótipos, mesmo com a participação nesses haplótipos de polimorfismos que mostraram associação com esquizofrenia. Tal fato é compreensível, pois a análise de LD não mostrou que os polimorfismos estudados

compunham blocos haplotípicos. Nosso resultado vai de encontro a trabalho recente publicado por Michael *et al.* (2007) com os polimorfismos TaqI A e -141C (Ins/Del) do *DRD2*.

Resultados Falso-Negativos e Falso-Positivos

Vários fatores podem dificultar que encontremos resultados adequados nos estudos de associação genética em psiquiatria. O baixo poder estatístico de cada estudo individualmente é um deles. Devido ao fato de muitos estudos apresentarem pequena amostra, pode ocorrer um risco maior tanto para o aparecimento de resultados falso-positivos como falso-negativos, contribuindo também para a dificuldade de replicação de achados prévios (Altshuler et al 2000; Hirschhorn et al 2002). No presente trabalho, o poder da amostra mostrou-se adequado para o tipo de estudo que pretendíamos conduzir. Além disso, resultados desse trabalho têm contribuído para meta-análises publicadas na área, no caso estudos com o polimorfismo Ser9Gly (Jonsson *et al.*, 2003; Jonsson *et al.*, 2004).

A diferença étnica entre os grupos de pacientes e casos também pode se configurar em problema para estudos os que conduzimos neste trabalho. Como já exposto nesta tese, em caso de estratificação étnica, a associação pode ser mascarada ou aparecer de maneira espúria. Tal questão pode ocorrer em estudos de associação do tipo caso-controle em geral. Na seqüência seguem exemplos de como tal fenômeno pode ocorrer. O componente genético distinto pode influenciar na manifestação de vários fenótipos, como ocorre, por exemplo, no caso do gene da enzima *proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 serine protease* (PCSK9), cujas variantes estão distribuídas de maneira distinta entre populações de negros e caucasianos, regulando, portanto, de maneira diferente os níveis séricos de

colesterol LDL (*low density lipoproteins*: lipoproteínas de baixa densidade) nessas etnias (Cohen *et al.*, 2006). Na psiquiatria, o componente genético relacionado à etnia tem sido relacionado com a doença de Alzheimer, por exemplo. Há relatos indicando que o gene da apolipoproteína E (ApoE) pode desempenhar papel distinto como fator de risco para Alzheimer entre as etnias caucasiana, hispânica e negra (Tycko *et al.*, 2004). Desse modo, a questão da estratificação populacional em amostras brasileiras é importante questão a ser considerada em estudos genéticos de associação.

O poder para a detecção de associações entre polimorfismos e determinadas características fenotípicas pode estar reduzida em amostras com miscigenação étnica (Spielman & Ewens, 1996; McKeigue *et al.*, 2000). Com o objetivo de enfrentar essa questão, pode-se tentar identificar a origem étnica da amostra e compor grupos de casos e de controles de maneira mais homogênea. No entanto, no Brasil, características físicas como pigmentação da pele, cor e textura do cabelo, formato dos lábios e do nariz, são preditores pobres de ancestralidade (Parra *et al.*, 2003), o que dificulta tal tarefa. Assim, tese de doutorado recente de nosso grupo investigou essa questão (Guindalini, 2005). Foram estudadas amostras de pacientes e controles do Banco de DNA do PROGENE com marcadores gênicos (24 marcadores populacionais) de caracterização étnica. A conclusão da referida tese foi de que comparações entre o grupo de casos e controles revelaram uma similaridade étnica entre os grupos, quanto à frequência alélica dos marcadores populacionais e quanto à contribuição de cada uma das três subpopulações constituintes da amostra, sendo que pós a correção estatística para a presença de estratificação populacional, os testes de associação não apresentaram modificações significativas. Tal fato indica que, apesar da grande miscigenação étnica da população brasileira, esse fenômeno pode não configurar fator responsável por viés em nossos estudos genéticos de associação. Grande

parte dos controles da tese de Guindalini (2005) foi utilizada na presente tese. Além disso, o fato de nossa amostra estar em equilíbrio de Hardy-Weinberg para os polimorfismos estudados indica também que a estratificação populacional pode não ser um problema tão significativo neste trabalho (Weiss *et al.*, 2001).

Outro aspecto que merece ser destacado nessa discussão é a caracterização do diagnóstico dos pacientes. É sempre importante que o diagnóstico do paciente seja feito de maneira confiável, uma vez que toda a investigação biológica subsequente necessita de uma caracterização clínica adequada, já que estamos à procura de substratos biológicos de manifestações clínicas. Assim sendo, o uso de instrumentos diagnósticos estruturados e, portanto, confiáveis tem sido disseminado nos mais distintos estudos em psiquiatria, área na qual o diagnóstico é eminentemente clínico. No entanto, entrevistas com essas características também podem levar a problemas no estabelecimento do diagnóstico, já que sabemos que os quadros clínicos podem modificar sua apresentação ao longo do tempo, dificultando a determinação do diagnóstico em uma única entrevista, em um corte transversal, ademais a confiabilidade entre os diferentes instrumentos diagnósticos também pode se configurar em problema (Hiller *et al.*, 2003). Por outro lado, a avaliação clínica baseada na consulta a prontuários pode trazer dificuldades, já que perde em rigor metodológico. No entanto, é interessante alguns dados que apontam para a consulta de prontuários e informações clínicas gerais das instituições onde os pacientes são acompanhados como sendo de interesse para pesquisas na área de psiquiatria. Ekholm *et al.* (2005), em estudo com uma população de 143 pacientes com esquizofrenia ou transtornos correlatos, encontraram concordância de 94% entre os diagnósticos feitos baseados em prontuários médicos e feitos através da aplicação de instrumento padronizado de avaliação, o OPCRIT (*Operational Criteria*) (McGuffin *et al.*, 1991). Sendo assim, para pacientes em

acompanhamento clínico institucional de longa data, a avaliação por meio dos prontuários médicos pode ser aventada, oferecendo também uma vantagem no que tange ao custo-benefício de sua utilização.

Considerações Gerais

Diante do exposto, fica claro a importância da realização de investigações na área de genética em psiquiatria, mesmo com polimorfismos já estudados na literatura. Assim, o presente trabalho trouxe dados para tentar contribuir com a melhor compreensão da participação dos polomorfismos investigados.

Perspectivas Futuras

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

Outra abordagem interessante para auxiliar na investigação de tais polimorfismos é o *Genome Wide Scan* por meio da técnica de *microarray* com *DNA pooling*. Tal metodologia é importante, pois sendo uma técnica de varredura genômica, pode indicar quais polimorfismos são de interesse para a continuação da investigação em futuras abordagens com estudos do tipo caso-controle. No momento, a parte laboratorial do *pool* de DNA e do *microarray* já foi realizada pelo aluno no “Social, Genetics and Developmental

Psychiatry (SGDP), Institute of Psychiatry, University of London”, sendo que a análise dos resultados do microarray está em andamento.

CONCLUSÕES

Conclusões

De acordo com os resultados obtidos pelas genotipagens realizadas até o momento, existe associação entre os polimorfismos -141C (Ins/Del) do *DRD2* (rs1799732) e A1343G do *SLC6A3* (rs6347) com esquizofrenia na amostra investigada.

Quando todos os dados forem publicados, os mesmos poderão ajudar a compor estudos de meta-análise, que, com amostras maiores poderão apresentar melhores condições de confirmar ou descartar as associações encontradas.

Além disso, os polimorfismos que apresentaram resultados negativos não devem ser descartados, já que amostras maiores, com outros grupos étnicos podem ajudar na elucidação dessa questão. O mesmo deve se passar com os genes, cujos polimorfismos não apresentaram polimorfismos com resultados positivos nesta tese, já que outros polimorfismos nesses genes podem estar associados como fatores de risco para o desenvolvimento de esquizofrenia.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Buckland PR, O'Donovan MC, McGuffin P. Clozapine and sulpiride up-regulate dopamine D3 receptor mRNA levels. *Neuropharmacology.* 1993;32:901-7.

Byerley W, Coon H, Hoff M. Human dopamine transporter gene not linked with schizophrenia in multigenerational pedigrees. *Hum Hered.* 1993a;43:319-22.

Byerley W, Hoff M, Holik J, Caron MG, Giros B. VNTR polymorphism for the human dopamine transporter gene (DAT1). *Hum Mol Genet.* 1993b;2:335.

Campion D, d'Amato T, Bastard C, Laurent C, Guedj F, Jay M. Genetic study of dopamine D1, D2, D3 and D4 receptors in schizophrenia. *Psychiatr Res* 1993;51:215-30.

Cannon TD, Kaprio J, Lonnqvist J, Huttunen M, Koskenvuo M. The genetic epidemiology of schizophrenia in a Finnish twin cohort: a population-based modeling study. *Arch Gen Psychiatry.* 1998;55:67-74.

Chen CH, Wei FC, Koong FJ, Hsiao KJ. Association of *Taq I* polymorphism of dopamine D2 receptor gene and tardive dyskinesia in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 1997a;41:827-9.

Chen CH, Liu MY, Wei FC, Koong FJ, Hwu HG, Hsiao KJ. Further evidence of no association between Ser9Gly polymorphism of dopamine D3 receptor gene and schizophrenia. *Am J Med Genet.* 1997b;2:139-45.

Chen X, Wang X, O'Neill AF, Walsh D, Kendler KS. Variants in the catechol-o-methyltransferase (COMT) gene are associated with schizophrenia in Irish high-density families. *Mol Psychiatry.* 2004;9:962-7.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Di Bella D, Catalano M, Strukel M, Nobile M, Novelli E, Smeraldi E. Distribution of the MscI polymorphism of the dopamine D3 receptor in an Italian psychotic population.

Psychiatr Genet. 1994;4:39-42.

Di Forti M, Lappin JM, Murray RM. Risk factors for schizophrenia: all roads lead to dopamine. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2007;17:101-107.

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

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

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

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

Dubertret C, Gouya L, Hanoun N, Deybach JC, Ades J, Hamon M, Gorwood P.

The 3' region of the DRD2 gene is involved in genetic susceptibility to schizophrenia.

Schizophr Res. 2004;67:75-85.

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

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

Ekholm B, Ekholm A, Adolfsson R, Vares M, Osby U, Sedvall GC, Jonsson EG.

Evaluation of diagnostic procedures in Swedish patients with schizophrenia and related psychoses. *Nord J Psychiatry.* 2005;59:457-64.

El-Khodori B, Boksa P. Caesarean section birth produces long term changes in dopamine D1 receptors and in stress-induced regulation of D3 and D4 receptors in the rat brain.

Neuropsychopharmacology. 2001;25:423-39.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Guindalini CSC. Estudo Farmacogenético da Dependência de Cocaína. Doutorado, Departamento de Psiquiatria da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2005.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Inada T, Sugita T, Dobashi I. Dopamine transporter gene polymorphism and psychiatric symptoms seen in schizophrenic patients at their first episode. *Am J Med Genet.*

1996;26:406-8.

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

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

Jensen J, Willeit M, Zipursky RB, Savina I, Smith AJ, Menon M, Crawley AP, Kapur S. The Formation of Abnormal Associations in Schizophrenia: Neural and Behavioral Evidence. *Neuropsychopharmacology.* 2007;2.

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

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

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

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

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

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

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

Joover R, Toulouse A, Benkelfat C, . DRD3 and DAT1 genes in schizophrenia: an association study. *J Psychiatr Res*. 2000;34:285-91.

Kaiser R, Tremblay PB, Klufmoller F, Roots I, Brockmoller J. Relationship between adverse effects of antipsychotic treatment and dopamine D2 receptor polymorphisms in patients with schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 2002; 7:695-705.

Kampman O, Anttila S, Illi A, Lehtimäki T, Mattila KM, Roivas M, Leinonen E. Dopamine receptor D2 – 141C insertion/deletion polymorphism in a Finnish population with schizophrenia. *Psychiatry Res.* 2003;21:89-92.

Kapucu LO, Koc E, Gucuyener K, . D2 receptor imaging with iodine-123-iodobenzamide brain SPECT in infants with hypoxicischemic brain injury. *J Nucl Med.* 1998;39:1703-7.

Kelsoe JR, Sadovnick AD, Krisbjarnarson H. Possible locus for bipolar disorder near the dopamine transporter on chromosome 5. *Am J Med Genet.* 1996;67:533-40.

Kendell R, Cooper J, Gourlay A, Copeland J, Sharpe L, Gurland B. Diagnostic criteria of American and British psychiatrists. *Arch Gen Psychiatry.* 1971;25:123-30.

Kendler K, Gardner C. The risk for psychiatric disorders in relatives of schizophrenic and control probands: a comparison of three independent studies. *Psychol Medicine.* 1997;27:411-9.

Kendler KS, Gruenberg AM, Kinney DK. Independent diagnoses of adoptees and relatives as defined by DSM-III in the provincial and national samples of the Danish Adoption Study of Schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry.* 1994;51:456-68.

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

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

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

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

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

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

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

Laakso A, Pohjalainen T, Bergman J, Kajander J, Haaparanta M, Solin O, Syvalahti E, Hietala J. The A1 allele of the human D2 dopamine receptor gene is associated with increased activity of striatal L-amino acid decarboxylase in healthy subjects.

Pharmacogenet Genomics. 2005;15:387-91.

Lannfelt L, Sokoloff P, Martres MP, Pilon C, Giros B, Jönsson E. Amino acid substitution in the dopamine D3 receptor as a useful polymorphism for investigating psychiatric disorders. *Psychiatr Genet*. 1992;2:249-56.

Laruelle M, Abi-Dargham A. Dopamine in the history of the schizophrenic brain.

Dialogues in Clinical Neuroscience. 2000;2:359-72.

Laruelle M, Abi-Dargham A, van Dyck CH, . Single photon emission computerized tomography imaging of amphetamine-induced dopamine release in drug-free schizophrenic subjects. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:9235-40.

Laurent C, Savoye C, Samolyk D, Mallet J. Homozygosity at the dopamine D3 receptor locus is not associated with schizophrenia. *J Med Genet*. 1994;31:260.

Le Coniat M, Sokoloff P, Hillion J, Martres MP, Giros B, Pilon C. Chromosomal localization of the human D-3 dopamine receptor gene. *Hum Genet*. 1991;87:618-20.

Lee MS, Lee H, Kwang-Yoon S. Distribution of the Taq I polymorphism of the dopamine D2 receptor in a Korean schizophrenic population. *Psychiatr Genet*. 1995;5:59.

Levinson DF. Meta-analysis in Psychiatric Genetics. *Curr Psychiatry Rep.* 2005;7:143-51.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

McGuffin P. *Psychiatry Genetics & Genomics*. Oxford University Press. Inc., New York, 2002.

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

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

Meira-Lima IV, Michelon L, Cordeiro Q, Cho HJ, Vallada H. Allelic Association Analysis of the Functional Insertion/Deletion Polymorphism in the Promoter Region of the Serotonin Transporter Gene. *J Mol Neurosc*. 2005;27:219-24.

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

Messas GP. Análise do papel do polimorfismo Bal I (Ser9Gly) do gene do receptor dopaminérgico subtipo 3 (DRD3) na dependência de cocaína. Tese de Doutorado, Departamento de Psiquiatria, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2001.

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

Miller SA, Dykes DD, Polesky, HF. A Single Salting Out Procedure for Extracting DNA from Human Nucleated Cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16:1215.

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

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

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

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

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

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

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

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

Nimgaonkar VL, Zhang XR, Caldwell JC, Ganguli R, Chakravati A. Association study of schizophrenia with dopamine D3 receptor gene polymorphism: probable effect of family history of schizophrenia? *Am J Med Genet.* 1993;48:214-7.

Noble EP. The DRD2 gene in psychiatric and neurological disorders and its phenotypes. *Pharmacogenomics.* 2000;1:309-33.

Nordstrom AL, Farde L, Eriksson L, Halldin C. No elevated dopamine receptors in neuroleptic-naive schizophrenic patients revealed by positron emission tomography and N-metylsiperone. *Psychiatry Res.* 1995;61:67-83.

Norton, N, Owen, MJ. Can we find the genes that predisposes to schizophrenia? In: McDonald C, Schulze K, Murray RM, Wright P. Schizophrenia: challenging the orthodox. p. 17-22. London: Taylor & Francis Group, 2004.

Nöthen MM, Cichon P, Propping P, Fimmers R, Schwab SG, Wildenauer DB. Excess of homozygosity at the dopamine D3 receptor gene in schizophrenia not confirmed. *J Med Genet.* 1993;30:708.

Nunokawa A, Watanabe Y, Muratake T, Kaneko N, Koizumi M, Someya T. No associations exist between five functional polymorphisms in the catechol-O-methyltransferase gene and schizophrenia in a Japanese population. *Neurosci Res.* 2007;7.

Ohara K, Nagai M, Tani K, Nakamura Y, Ino A, Ohara K. Functional polymorphism of –141C ins/del in the dopamine D2 receptor gene promoter and schizophrenia. *Psychiatry Res.* 1998;81:117-23.

Ohara K, Nakamura Y, Xie DW, Ishigaki ZL, Tani K, . Polymorphisms of dopamine D2-like (D2, D3 and D4) receptors in schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 1996;40:1209-17.

Ospina-Duque J, Duque C, Carvajal-Carmona L, Ortiz-Barriento D, Soto I, Pineda N, . An association study of bipolar mood disorder (type I) with the 5-HTTLPR serotonin transporter polymorphism in a human population isolate from Colombia. *Neurosc Lett.* 2000;292:199-202.

Ott J. Methods of analysis and resources available for genetic trait mapping. *J Hered.* 1999;90:68-70.

Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:177-82.

Parsons MJ, Mata I, Beperet M, Iribarren-Iriso F, Arroyo B, Sainz R, Arranz MJ, Kerwin R. A dopamine D2 receptor gene-related polymorphism is associated with schizophrenia in a Spanish population isolate. *Psychiatr Genet.* 2007;17:159-63.

Persico AM, Macciardi F. Genotypic association between dopamine transporter gene polymorphisms and schizophrenia. *Am J Med Genet.* 1997;74:53-7.

Persico AM, Wang ZW, Black DW, Andreasen NC, Uhl GR, Crowe RR. Exclusion of close linkage of the dopamine transporter gene with schizophrenia spectrum disorders. *Am J Psychiatry.* 1995;152:134-6.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Siegel, J. Estatística não-paramétrica. Editora McGraw Hill do Brasil, 1981.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ANEXO 1:

- Artigos publicados a partir do trabalho da presente tese:

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

2- Junqueira R, **Cordeiro Q**, Meira-Lima I, Vallada H. Allelic Association Analysis of Phospholipase A2 Genes with Schizophrenia. *Psychiatric Genetics*; 14(3): 157-60, 2004.

3- **Cordeiro Q**, Talkowski M, Wood J, Ikenaga E, Vallada H. Lack of Association Between VNTR Polymorphism of Dopamine Transporter Gene (SLC6A3) and Schizophrenia in a Brazilian Sample. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*; 62(4): 973-6, 2004.

4- **Cordeiro Q**, Vallada H. Lack of Association Between a Polymorphism of the Norepinephrine Transporter Gene and Schizophrenia in a Brazilian Sample. *Revista Brasileira de Psiquiatria*; 26(4): 278, 2004.

5- **Cordeiro Q**, Talkowski ME, Chowdari JW, Wood J, Nimgaonkar V, Vallada, H. Association and Linkage Analysis of *RGS4* Polymorphisms with Schizophrenia and Bipolar Disorder in Brazil. *Genes, Brain and Behavior*; 4(1): 45-50, 2005.

6- **Cordeiro Q**, Vallada H. Lack of Association Between the G681C Polymorphism in the 5-HT1Dbeta Autoreceptor Gene and Schizophrenia. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*; 63(2B): 380-2, 2005.

7- Silva MA, **Cordeiro Q**, Miracca E, Guindalini C, Vallada H. Distribution of Alleles of the VNTR Polymorphism in the 3'-Untranslated Region of the DAT1 Gene (SLC6A3) in

São Paulo/Brazil and its Importance to Genetic Studies of Neuropsychiatric Disorders in Ethnic Admixture Populations. *Revista Médica de Chile*; 133(11):1392-3, 2005.

8- Talkowski M, Basset AS, Brzustowicz LM, Chen X, Chowdari KV, Collier DA, **Cordeiro Q**, Corvin AP, Deshpande S, Egan MF, Gill M, Kendler KS, Kirov G, Levitt P, Lewis DA, Mirnics K, Morris DW, O'Donovan MC, Owen MJ, Seltman H, Semwall P, Sobell JL, Thelma BK, Weinberger DR, Williams NM, Wood J, Nimgaonkar V. Comprehensive Evaluation of a Susceptibility Gene for Schizophrenia: Genotype Based Meta-Analysis of *RGS4* Polymorphisms from Thirteen Independent Samples. *Biological Psychiatry*; 60(2):152-62, 2006.

9- **Cordeiro Q**, Migueta K, Miracca E, Elkis H, Vallada H. Investigation of possible association between Ser9Gly polymorphism of the D3 dopaminergic receptor gene and response to typical antipsychotics in patients with schizophrenia. *Sao Paulo Medical Journal*; 124(3):165-7, 2006.

10- Bertola V, **Cordeiro Q**, Zung S, Miracca EC, Vallada H. Association Analysis Between the C516T Polymorphism in the 5-HT2A Receptor Gene and Schizophrenia. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*; 65(1):11-4, 2007.

- Manuscrito submetido a partir do trabalho da presente tese:

1- **Cordeiro Q**, Siqueira-Roberto J, Zung S, Vallada H. Association between the DRD2 - 141C Insertion/Deletion Polymorphism and Schizophrenia.

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

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

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

1. NOME DO PACIENTE :.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO:..... CIDADE

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :..... SEXO: M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO:..... CIDADE:

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....).....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE GENES DO SISTEMA DOPAMINÉRGICO E ESQUIZOFRENIA

PESQUISADOR: Prof. Dr. Homero Pinto Vallada Filho

CARGO/FUNÇÃO: Professor Associado

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 54.439

UNIDADE DO HCFMUSP: Instituto de Psiquiatria

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO

RISCO MÍNIMO **X**

RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO

RISCO MAIOR

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

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 12 meses

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU

SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

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

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

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

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

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

Prof. Dr. Homero Pinto Vallada Filho

Laboratório de Neurociências (LIM-27)

Instituto de Psiquiatria do HC da FMUSP

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

Caixa Postal 3671 CEP 05403-010

Tel.: (011) 3069 7129

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

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

São Paulo,.....de.....de.....

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)

ANEXO 3:

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

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

<p>ativa; ou (2) se os episódios de humor ocorreram durante os sintomas da fase ativa, sua duração total foi breve relativamente à duração dos períodos ativo e residual.</p>
<p>E. Exclusão de substância/condição médica geral: A perturbação não se deve aos efeitos fisiológicos diretos de uma substância (por ex., uma droga de abuso, um medicamento) ou a uma condição médica geral.</p>
<p>F. Relação com um Transtorno Invasivo do Desenvolvimento: Se existe uma história de Transtorno Autista ou um outro Transtorno Invasivo do Desenvolvimento, o diagnóstico adicional de Esquizofrenia é feito apenas se delírios ou alucinações proeminentes também estão presentes por pelo menos 1 mês (ou menos, se tratados com sucesso).</p>
<p>Classificação do curso longitudinal (pode ser aplicada apenas 1 mês após o aparecimento inicial dos sintomas da fase ativa):</p>
<p>Episódico Com Sintomas Residuais Entre Episódios (episódios são definidos pelo ressurgimento de sintomas psicóticos proeminentes); especificar também se:</p>
<p>Com Sintomas Negativos Proeminentes Episódico Sem Sintomas Residuais Entre Episódios Contínuo (sintomas psicóticos proeminentes estão presentes durante todo o período de observação); especificar também se: Com Sintomas Negativos Proeminentes Episódio Único em Remissão Parcial; especificar também se: Com Sintomas Negativos Proeminentes Episódio Único em Remissão Completa Outro Padrão ou Padrão Inespecífico</p>

Tipos de Esquizofrenia:

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

295.30 Tipo Paranóide

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

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

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

295.10 Tipo Desorganizado

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

A. Todos os seguintes sintomas são proeminentes:

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

B. Não são satisfeitos os critérios para Tipo Catatônico.

295.20 Tipo Catatônico

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

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

295.90 Tipo Indiferenciado

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

295.60 Tipo Residual

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

A. Ausência de delírios e alucinações, discurso desorganizado e comportamento amplamente desorganizado ou catatônico proeminentes.

B. Existem evidências contínuas da perturbação, indicadas pela presença de sintomas negativos ou por dois ou mais sintomas relacionados no Critério A para Esquizofrenia, presentes de forma atenuada (por ex., crenças estranhas, experiências perceptuais incomuns).

ANEXO 4:

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

1. Lise da hemácea

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

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

Homogeneizar no vortex.

Deixar na geladeira por 10 minutos.

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

2. Lavagem de leucócitos

Descartar o sobrenadante.

Adicionar 20 ml de tampão A.

Ressuspender o sedimento por agitação no vortex.

Deixar no gelo por 10 minutos.

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

3. Lise dos leucócitos

Descartar o sobrenadante.

Adicionar 3 ml de tampão B.

Adicionar 200 µl de SDS 10%.

Adicionar 500 µl de tampão C com proteinase K.

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

Deixar a 37°C por 24 horas.

4. Precipitação

Adicionar 1 ml de solução D (NaCl 6M)

Agitar durante 1 minuto no vortex.

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

Transferir cuidadosamente o sobrenadante para um tubo de 15 ml.

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

Pescar com a ponteira amarela o DNA precipitado.

Transferir para o tubo eppendorf de 1,5 ml contendo 1 ml de etanol 70%. (fazer em isopor contendo gelo seco)

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

Descartar o sobrenadante.

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

Ressuspender o sedimento em 1 ml de TE 1X.

5. Dosagem da concentração de DNA

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

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

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

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

Alicotar o DNA, colocandon no eppendorf, a quantidade de DNA calculada e a quantidade de Tampão TE 1X autoclavado para completar um volume de 100µL.

ANEXO 5:

Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)

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

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

2. Anelamento – A polimerase para assumir suas funções, isto é anexar as bases complementares, transformando as fitas simples em duplas fitas, necessita de um fragmento de DNA já ligado na região previamente escolhida. A solução, então é demarcar as extremidades do DNA de interesse nas duas longas fitas simples, tornando-as duplas apenas nesse intervalo. Para isso adicionam-se à solução, os *primers* ou iniciadores que são pequenos fragmentos sintéticos de DNA de fita simples – oligonucleotídeos de 20 a 30 bases nitrogenadas de comprimento – que são sintetizados *in vitro* baseado na seqüência do DNA a ser amplificado sendo eles complementares à seqüência do segmento de DNA de interesse. A hibridização dos *primers* descrito como *annealing*, deve ser feita a uma temperatura inferior a da denaturação (45° a 60°C).

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