

Aline Santos Sampaio

**Catecol O-metiltransferase e o transtorno obsessivo-
compulsivo: revisão sistemática com meta-análise**

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

Programa de Psiquiatria

Orientador: Prof. Dr. Eurípedes Constantino Miguel Filho

Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 13 de outubro de 2011. A versão original
está disponível na Biblioteca da FMUSP

São Paulo

2012

Aline Santos Sampaio

**Catecol O-metiltransferase e o transtorno
obsessivo-compulsivo: revisão sistemática com meta-análise**

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

Programa de Psiquiatria

Orientador: Prof. Dr. Eurípedes Constantino Miguel Filho

Co-orientadora: Dra. Ana Gabriela Hounie

Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 13 de outubro de 2011. A versão original
está disponível na Biblioteca da FMUSP

São Paulo

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Sampaio, Aline Santos

Catecol O-metiltransferase e o transtorno obsessivo-compulsivo: revisão sistemática com meta-análise / Aline Santos Sampaio. -- São Paulo, 2012.

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

Programa de Psiquiatria.

Orientador: Eurípedes Constantino Miguel Filho.

Coorientadora: Ana Gabriela Hounie.

Descritores: 1.Genética 2.Transtorno obsessivo-compulsivo 3.Catecol O-metiltransferase 4.Revisão 5.Meta-análise

USP/FM/DBD-221/12

*Para Lucas e nossa pequena Cecília,
que enchem meu coração de amor e alegria.*

Agradecimentos

Ao professor **Eurípedes C. Miguel** pelas portas que me foram abertas para muitas oportunidades de aprendizado e pela sua valiosa orientação.

A querida **Ana G. Hounie** por ter acreditado neste resultado quando nós ainda nem sabíamos o que era um polimorfismo.

Este trabalho não seria possível sem a colaboração de **Carolina Cappi** e **Nil Morais**, meus parceiros e amigos, e sem o suporte inestimável de **Sonia Borcato** e **Idalina Shimoda**.

Agradeço, em um valor de grandeza tendendo ao infinito, ao trabalho e à paciência dos dois **Carlos**, o **Alberto de Bragança Pereira** que fez a metanálise bayesiana e o **Teles** que fez a metanálise convencional desta tese. Agradeço ainda:

A **Roseli Shavitt**, **Juliana Diniz**, **Cristina Belotto da Silva**, **Isabel Pimentel** e a equipe do ambulatório; **Antonio Carlos Lopes**, **Marcelo Hoexter**, **Carina Chaubet D'Alcante** e a equipe de neuroimagem que participaram no encaminhamento e avaliação dos probandos da pesquisa e aos amigos do PROTOC que fizeram a execução deste trabalho ficar mais prazerosa.

A **Priscila Chacon Neder**, **Maria Conceição do Rosário** e ao sempre lembrado Prof. **Marcos T. Mercadante** por dividirem conosco os frutos dos seus trabalhos.

A **Katia Petribú** e sua equipe da Universidade de Pernambuco pela colaboração na coleta de dados e amostras.

A **Renato Daltro**, **Ana Fernanda** e **Rita Lins** pela ajuda na finalização da tese.

Aos Prof. **Daniel Geller, David Pauls, Evelyn Stewart, Luana Marques, Jordan Smoller, Jacquelyn Crane, Richie Siburian, Jesen Fagerness, Andrew Kirby, Katherine McCarthy** e à equipe do *Psychiatric Neurodevelopmental Genetics Unit* do *Massachusetts General Hospital*, que me acolheram, compartilharam conhecimentos e me proporcionaram um período fantástico de aprendizado

A minha mãe, **Celeste**, por estar ao meu lado e me fazer admirá-la mais a cada dia.

Ao meu pai, **Paulo**, minha inspiração para os caminhos estatísticos.

A **Ricardo, Andrea**, minha família e meus amigos pelo apoio.

“ A tábula da natureza humana nunca foi rasa.”

W.D.Hamilton

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

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

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

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

Sumário

Lista de Siglas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1.Introdução	01
1.1.Transtorno obsessivo-compulsivo.....	01
1.2.Modelos neurobiológicos do TOC e vias envolvidas.....	01
1.3.Genética do TOC.....	04
1.4.Revisão sistemática dos estudos de associação entre genes candidatos e o transtorno obsessivo-compulsivo.....	07
1.4.1 Genes relacionados à serotonina.....	08
1.4.2 Genes relacionados à dopamina.....	10
1.4.3 Genes relacionados ao glutamato.....	13
1.4.4 Genes relacionados ao sistema imune.....	16
1.4.5 Outros genes.....	17
1.4.6 Conclusão sobre associação entre genes candidatos e o transtorno obsessivo-compulsivo.....	19
1.5 Catecolometiltransferase e o transtorno obsessivo-compulsivo.....	21
1.5.1 A enzima catecol O-metiltransferase.....	21
1.5.2 Polimorfismo funcional no gene da catecol O-metiltransferase.....	26
1.5.3 O gene da catecol O-metiltransferase e seu papel na fisiopatologia dos transtornos mentais.....	28
1.6 Revisão sistemática dos estudos de associação entre <i>COMT</i> e o TOC.....	31
1.7 Estudo original de associação entre o gene da <i>COMT</i> e o TOC.....	34
1.7.1 Introdução.....	34
1.7.2 Métodos.....	34
1.7.3 Resultados.....	35
1.7.4 Conclusão.....	37
1.8 Síntese crítica e fundamentos que justificam esta tese.....	37
2.Objetivos	42
3.Hipóteses	43
4. Métodos	44
4.1.Revisão sistemática da literatura.....	44
4.1.1.Critérios de inclusão dos estudos.....	44
4.1.2.Critérios de exclusão dos estudos.....	45
4.1.3 Métodos de busca.....	45
4.1.4 Coleta de dados.....	49
4.1.5 Avaliação da qualidade dos estudos.....	49

4.2.Meta-análise.....	51
4.2.1.Meta-análise convencional.....	51
4.2.2.Meta-análise bayesiana.....	55
5.Resultados.....	59
5.1.Resultados da revisão sistemática.....	59
5.1.1 Apresentação dos estudos de associação baseados em famílias selecionados na revisão sistemática.....	59
5.2.Meta-análise convencional.....	72
5.2.1.Meta-análise com probandos do sexo masculino.....	76
5.2.2.Meta-análise com probandos do sexo feminino.....	82
5.3. Metarregressão.....	87
5.4.Meta-análise bayesiana	90
5.4.1. Meta-análise bayesiana com amostra de probandos do sexo masculino...92	
5.4.2. Meta-análise bayesiana com amostra de probandos do sexo feminino....94	
5.4.3. Comparação das meta-análises com amostra masculina e amostra feminina.....	96
6. Discussão.....	98
6.1. Associação entre o gene da catecol O-metiltransferase e o transtorno obsessivo-compulsivo.....	98
6.2. Catecol O-metiltransferase e o transtorno obsessivo-compulsivo de acordo com o gênero e outros subcomponentes do fenótipo TOC.....	100
6.3. Limitações.....	107
6.4. Perspectivas de estudos futuros.....	109
7. Conclusões.....	112
8. Anexos.....	113
9. Referências	199

Lista de Siglas e Abreviaturas

- 3-MT: 3-Metoxi-Tiramina;
- 5-HTTLPR: Promotor do gene do transportador da serotonina;
- A: Adenina;
- BDNF: Fator neurotrófico derivado do cérebro;
- C/C: Caso/controle;
- C: Citosina;
- *COMT*: Gene da Catecol O-metiltransferase (COMT);
- COMT: Enzima Catecol O-metiltransferase;
- DA: Dopamina;
- DIGS: Entrevista diagnóstica para estudos em genética;
- DNA: Ácido Desoxirribonucléico;
- DOPAC: Ácido-3,4-Diidroxi-Fenilacético;
- DRD4: Gene do receptor de dopamina D4;
- DSM-IV: Manual Diagnóstico e Estatístico para Transtornos Mentais, Quarta Edição;
- DZ: Dizigótico;
- EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético;
- EQZ: Esquizofrenia;
- EUA: Estados Unidos da América;
- FPG: Familiares de primeiro grau;
- G: Guanina;
- GABBR1: Gene do receptor do ácido gama-aminobutírico;
- HRR: Teste do Risco Relativo do Haplótipo;
- HVA: Ácido Homovanílico;
- MAO-A: Gene da Monoamino-oxidase –A;
- Met: Metionina;
- MeSH: *Medical Subject Headings* = Descritores de assuntos médicos;
- MOG2: Gene da glicoproteína oligodendrocítica da mielina 2;
- MOG4: Gene da glicoproteína oligodendrocítica da mielina 4;
- MZ: Monozigótico;
- NaCl: Cloreto de sódio;
- NS: Não significativa;
- pb: Pares de bases;
- PCR: Reação em cadeia da polimerase;
- SCID: Entrevista clínica estruturada para transtornos do DSM-IV;
- SLC1A1: Gene do transportador de glutamato de alta afinidade neuronal/epitelial;
- SOC: Sintomas obsessivo-compulsivos;
- ST: Síndrome de Tourette;
- SVCF: Síndrome Velo-cardio Facial;
- T: Timina;
- TDT: Teste de desequilíbrio de transmissão;
- TEOC: Transtorno do espectro obsessivo-compulsivo;
- TOC: Transtorno Obsessivo Compulsivo;

- TPH2: Genes das enzimas triptofanohidroxilase1 e 2;
- UNPHASED: Nome de um programa para análise de associação genética;
- Val: Valina;
- YBOCS: Escala para sintomas obsessivo-compulsivos *Yale-Brown*;

Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura cristalizada da enzima catecol O-metiltransferase.....	22
Figura 2: Reação catalítica metabolizada pela catecol O-metiltransferase: S-adenosil-L-metionina + catecol = S-adenosil-L-homocisteína + guaiacol.....	22
Figura 3: Metabolismo da Adrenalina e Noradrenalina	24
Figura 4: Metabolismo da dopamina e localização das enzimas catecol O-metiltransferase e monoamino-oxidase A no estriado.....	25
Figura 5: Sequência de aminoácidos da enzima catecol O-metiltransferase humana: destaque para posição 158, onde ocorre a troca da valina (V) por metionina (M).....	26
Figura 6: Resultado do teste de desequilíbrio de transmissão entre polimorfismos e haplótipos do gene catecol O-metiltransferase e o transtorno obsessivo-compulsivo.....	36
Figura 7: Fluxograma de seleção de artigos na revisão sistemática.....	47
Figura 8: Representação gráfica (<i>Forest Plot</i>) da meta-análise de estudos de associação baseados em famílias entre o gene da catecol O-metiltransferase e o transtorno obsessivo-compulsivo.....	73
Figura 9: Gráfico de Begg com pseudo-intervalo de confiança de 95% para avaliação de viés de publicação referente a meta-análise de estudos de associação baseados em famílias entre o gene da catecol O-metiltransferase e o transtorno obsessivo-compulsivo.....	74
Figura 10: Figura de Galbraith para verificação gráfica da heterogeneidade entre estudos referente à meta-análise de estudos de associação baseados em famílias entre o gene da catecol O-metiltransferase e o transtorno obsessivo-compulsivo.....	75
Figura 11: Análise de sensibilidade como os nove estudos incluídos na meta-análise de estudos de associação baseados em famílias entre o gene da catecol O-metiltransferase e o transtorno obsessivo-compulsivo.....	76
Figura 12: Representação gráfica (<i>Forest Plot</i>) da meta-análise de estudos de associação baseados em famílias entre o gene da catecol O-metiltransferase e o transtorno obsessivo-compulsivo - amostra masculina.....	78
Figura 13: Gráfico de Begg para viés de publicação com pseudo-intervalo de confiança de 95%, referente à meta-análise de estudos de associação baseados em famílias entre o gene da catecol O-metiltransferase e o transtorno obsessivo-compulsivo - amostra masculina.....	79
Figura 14: Gráfico de Galbraith para heterogeneidade referente à meta-análise de estudos de associação baseados em famílias entre o gene da catecol O-metiltransferase e o transtorno obsessivo-compulsivo - amostra masculina.....	80
Figura 15: Análise de sensibilidade referente à meta-análise de estudos de associação baseados em famílias entre o gene da catecol O-metiltransferase e o transtorno obsessivo-compulsivo - amostra masculina.....	81
Figura 16: Representação gráfica (<i>Forest Plot</i>) da meta-análise de estudos de associação baseados em famílias entre o gene da catecol O-metiltransferase e o transtorno obsessivo-compulsivo – amostra feminina.....	83

Figura 17: Gráfico de Begg para viés de publicação referente à meta-análise de estudos de associação baseados em famílias entre o gene da catecol O-metiltransferase e o transtorno obsessivo-compulsivo – amostra feminina.....	84
Figura 18: Gráfico de Galbraith para heterogeneidade referente à meta-análise de estudos de associação baseados em famílias entre o gene da catecol O-metiltransferase e o transtorno obsessivo-compulsivo – amostra feminina.....	85
Figura 19: Análise de sensibilidade referente à meta-análise de estudos de associação baseados em famílias entre o gene da catecol O-metiltransferase e o transtorno obsessivo-compulsivo – amostra feminina.....	86
Figura 20: Função de densidade de cada estudo de associação baseado em famílias entre o gene da catecol O-metiltransferase e o transtorno obsessivo-compulsivo e média ponderada das densidades (meta-análise).....	91
Figura 21: Função de densidade de cada estudo de associação baseado em famílias entre o gene da catecol O-metiltransferase e o transtorno obsessivo-compulsivo e média ponderada das densidades (meta-análise) para subgrupo masculino.....	93
Figura 22: Função de densidade de cada estudo de associação baseado em famílias entre o gene da catecol O-metiltransferase e o transtorno obsessivo-compulsivo e média ponderada das densidades (meta-análise) para subgrupo feminino.....	94
Figura 23: Comparação das curvas de densidade entre meta-análises com amostra feminina e masculina.....	96
Figura 24: Densidades dos estudos e média das densidades (meta-análise) levando em conta a variabilidade entre homens e mulheres.....	97

Lista de Tabelas

Tabela 1: Estudos de associação entre o transtorno obsessivo-compulsivo e os polimorfismos do gene do transportador da serotonina (5HTT) e do promotor do transportador da serotonina (5HTTLPR).....	09
Tabela 2: Estudos de associação entre transtorno obsessivo-compulsivo e genes dos receptores da serotonina 2A 1B e 2C (5-HT2A, 5HT1B, 5TH2C) e da enzima triptofanohidroxilase1 e 2 (TH1 E TH2).....	10
Tabela 3: Estudos de associação entre TOC e os genes dos receptores de dopamina 2, 3 e 4 (DRD2, DRD3 e DRD4) e transportador da dopamina (DAT1).....	12
Tabela 4: Estudos de associação entre o transtorno obsessivo-compulsivo e o gene do transportador do glutamato de alta afinidade neuronal/epitelial (SLC1A1).....	15
Tabela 5: Estudos de associação entre o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e o transtorno obsessivo-compulsivo.....	17
Tabela 6: Estudos de associação entre o gene da monoaminooxidase-A e o transtorno obsessivo-compulsivo.....	19
Tabela 7: Distribuição dos alelos e genótipos do polimorfismo rs4680 (ss66862091) do gene da catecol O-metiltransferase entre os subgrupos populacionais.....	27
Tabela 8: Estudos de associação genética entre o gene da catecol O-metiltransferase e o transtorno obsessivo-compulsivo.....	32
Tabela 9: Apresentação dos estudos de associação baseados em famílias selecionados na revisão sistemática.....	67
Tabela 10: Estudos incluídos na meta-análise de estudos de associação baseados em famílias entre o gene da catecol O-metiltransferase e o transtorno obsessivo-compulsivo.....	72
Tabela 11: Teste de Egger para viés de publicação referente à meta-análise de estudos de associação baseados em famílias entre o gene da catecol O-metiltransferase e o transtorno obsessivo-compulsivo.....	74
Tabela 12: Estudos incluídos na meta-análise de estudos de associação baseados em famílias entre o gene da catecol O-metiltransferase e o transtorno obsessivo-compulsivo - amostra masculina.....	77
Tabela 13: Teste de Egger para viés de publicação referente à meta-análise de estudos de associação baseados em famílias entre o gene da catecol O-metiltransferase e o transtorno obsessivo-compulsivo – amostra masculina.....	79
Tabela 14: Estudos incluídos na meta-análise de estudos de associação baseados em famílias entre o gene da catecol O-metiltransferase e o transtorno obsessivo-compulsivo – amostra feminina.....	82
Tabela 15: Teste de Egger para viés de publicação referente à meta-análise de estudos de associação baseados em famílias entre o gene da catecol O-metiltransferase e o transtorno obsessivo-compulsivo – amostra feminina.....	84
Tabela 16: Metarregressão com modelo multivariado avaliando etnia, qualidade do estudo e ano em que o estudo foi realizado em relação à heterogeneidade entre estudos - amostra feminina.....	89

Tabela 17: Metarregressão com modelo multivariado avaliando etnia, qualidade do estudo e ano em que o estudo foi realizado em relação à heterogeneidade entre estudos - amostra feminina.....	89
Tabela 18: Metarregressão avaliando a proporção de mulheres na amostra total dos estudos.....	89
Tabela 19: Parâmetros nos estudos adotados para cálculo da meta-análise.....	91
Tabela 20: Média e intervalos de credibilidade para a densidade meta-análise.....	92
Tabela 21: Parâmetros nos estudos para função de densidade da amostra masculina...93	
Tabela 22: Parâmetros dos estudos para função de densidade da amostra feminina.....95	
Tabela 23: Comparação das probabilidades de logaritmo de razão de chances entre áreas de densidade das curvas de meta-análise para amostra masculina e para amostra feminina.....	97

Resumo

Sampaio AS. Catecol O-metiltransferase e o transtorno obsessivo-compulsivo: revisão sistemática com meta-análise [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012. 219 páginas.

INTRODUÇÃO: O caráter familiar do transtorno obsessivo-compulsivo (TOC) já é bem estabelecido. O gene da catecol O-metiltransferase (COMT) vem sendo objeto de estudo na genética de transtornos mentais, como o TOC. No caso deste transtorno, os resultados de estudos de associação com o gene da COMT são, em sua maioria, contraditórios. Meta-análises prévias, todas elas conduzidas com limitações metodológicas, encontraram achados também divergentes. Nesta tese, foram realizadas: uma revisão sistemática da literatura sobre estudos de associação baseados em famílias envolvendo o polimorfismo Val158Met do gene da COMT e o TOC e duas meta-análises, uma convencional e outra bayesiana, a fim de sintetizar os achados sobre este tema.

MÉTODOS: Este trabalho seguiu o protocolo para revisão sistemática e meta-análise da Rede de Epidemiologia Genética Humana (HuGE). A busca por estudos de associação baseados em famílias foi feita em cinco bases de dados eletrônicas, assim como foram pesquisados estudos não publicados, dentre os quais um estudo ainda inédito, liderado pela autora desta tese. A meta-análise convencional foi calculada com o auxílio do programa STATA V. 11 e a bayesiana a partir da média das verossimilhanças. Foram investigados os vieses de publicação, heterogeneidade, além de análise de sensibilidade e metarregressão.

RESULTADOS: O estudo original, que contou com 83 trios,

conduzido pela autora desta tese, não encontrou associação entre *COMT* e TOC. Este estudo, em conjunto com mais oito estudos (seis estudos publicados e dois não publicados), foram incluídos na meta-análise. As meta-análises com método convencional e bayesiano não encontraram associação entre o polimorfismo Val158Met do *COMT* e o TOC na amostra total, nem nas amostras separadas por gênero.

CONCLUSÕES: Contrariando meta-análises prévias, os achados deste estudo não demonstraram associação entre *COMT* e TOC. No entanto, a participação do gene da *COMT* em subgrupos específicos do TOC e em seus endofenótipos de risco ainda merece ser investigada.

DESCRITORES: Genética, Transtorno obsessivo-compulsivo, Catecol O-metiltransferase, Revisão, Meta-análise.

Summary

Sampaio AS. Catechol O-methyltransferase and obsessive-compulsive disorder: systematic review and meta-analysis [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012. 219 pages.

BACKGROUND: Obsessive-compulsive disorder (OCD) has long been considered a familial disorder. The catechol-O-methyltransferase gene has been studied in several mental disorders, including OCD. Particularly in this disorder, the findings of an association between *COMT* and OCD are inconclusive. Previous meta-analyses, which were conducted with several methodological limitations, found conflicting results. This work comprises: a systematic literature review regarding family-based association studies involving the *COMT* Val158Met polymorphism and OCD, and two meta-analyses, a conventional and a Bayesian meta-analysis, to summarize the findings on this subject. **METHODS:** This study was performed according to the Human Genome Epidemiology network (HuGE) guidelines for systematic review and meta-analysis. The search for family-based association studies were conducted in five electronic databases and in sources from unpublished studies. An original unpublished study, led by the author of this thesis, was included in the meta-analysis. The conventional meta-analysis was calculated with the STATA V.11 software and the Bayesian meta-analysis through the likelihood mean. Publication bias and heterogeneity were investigated. Sensitivity analysis and meta-regression were also performed. **RESULTS:** The original study with 83 OCD trios, conducted by the author of this thesis, found no association between *COMT* and OCD. This study, together with eight other studies (six studies being

published and two unpublished), were included in the meta-analysis. Meta-analyses with the conventional and Bayesian method found no association between the *COMT* Val158Met polymorphism and OCD in the total, female-only or male-only samples.

CONCLUSIONS: Different from previous meta-analyses, this study does not support the association between *COMT* and OCD. However, the involvement of the *COMT* gene in specific subgroups of OCD or endophenotypes associated with a risk for OCD should be further investigated.

KEYWORDS: Genetics, Obsessive-compulsive disorder, Catechol O-methyltransferase, Review, Meta-analysis.

1 – INTRODUÇÃO

1.1. Transtorno Obsessivo-Compulsivo

O transtorno obsessivo-compulsivo (TOC) é o quarto transtorno psiquiátrico mais prevalente, representando um total de 1,0-2,5% da população ao longo da vida (1). Segundo os critérios do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais, quarta edição (DSM-IV), o TOC é caracterizado pela presença de obsessões e/ou compulsões, capazes de interferir no funcionamento normal do indivíduo. Essas obsessões/compulsões ocorrem por no mínimo uma hora por dia, levando a significativo comprometimento social (2).

O TOC é um transtorno geralmente de curso crônico e se manifesta independentemente de sexo, raça, inteligência, estado civil, nível socioeconômico, religião ou nacionalidade. Os estudos transculturais mostram que os sintomas do TOC são semelhantes nas diversas populações e culturas (3), o que fala a favor dos fatores biológicos e genéticos contribuindo para sua etiologia.

1.2. Modelos Neurobiológicos do TOC e vias envolvidas

As técnicas que investigam perfis de atividade metabólica do cérebro trouxeram achados que orientaram a construção de modelos teóricos. Atualmente, o TOC é compreendido como o produto de disfunções de determinados circuitos

fronto-subcorticais, implicados tanto na regulação afetiva do comportamento como nos processos cognitivos (4).

Estudos metabólicos usando a tomografia por emissão de pósitrons (*positron emission tomography*– PET) mostraram que pacientes com TOC, quando em repouso, apresentam hiperatividade (aumento do metabolismo cerebral) nas regiões órbito-frontais e estriatais quando comparados a controles saudáveis (5). Estudos nos quais o exame metabólico cerebral era realizado após determinado estímulo aversivo em pacientes com TOC revelaram que, além das regiões órbito-frontal e estriatal, o córtex do cíngulo anterior e o tálamo também estavam hiperativos (6). Atualmente, o principal modelo neuroanatômico estabelece o aparecimento do TOC como decorrente de alteração no funcionamento do circuito órbito-estriado-tálamo-cortical (7). Com o uso de ressonância magnética estrutural, alterações no volume de regiões cerebrais como córtex órbito-frontal, córtex do cíngulo anterior, corpo estriado, tálamo, amígdala e hipocampo foram observadas em pacientes com TOC quando comparados a controles saudáveis (8).

Os dados sobre resposta terapêutica aos inibidores da recaptação de serotonina fazem com que as vias serotoninérgicas sejam consideradas as principais responsáveis pelo desenvolvimento do TOC. No entanto, existe uma interação entre vias serotoninérgicas, glutamatérgicas e dopaminérgicas nas regiões relacionadas ao TOC que parece contribuir com a sua fisiopatologia (9). A hiperatividade metabólica encontrada nos circuitos córtico-estriado-tálamo-cortical em pacientes com TOC podem estar relacionadas a níveis elevados de glutamato em regiões pré-frontais, tais como córtex órbito-frontal e suas áreas de projeção no estriado (10-12).

Alguns autores propuseram que a dopamina poderia estar envolvida na fisiopatologia do TOC (13, 14). Esta hipótese tem como base os achados de que a exposição a agonistas seletivos dos receptores D2/D3 de dopamina levaram ao desenvolvimento de sintomas compulsivos (15) e os bloqueadores dopaminérgicos (antipsicóticos) foram eficazes no tratamento de pacientes com TOC resistentes ao tratamento com inibidores da recaptação de serotonina (16). Além disso, lesões em estruturas cerebrais que concentram neurônios dopaminérgicos, como os gânglios da base, induzem comportamento obsessivo-compulsivo em humanos (17, 18). Os gânglios da base também estão relacionados à síndrome de Tourette, que é um transtorno considerado do espectro obsessivo-compulsivo por sua frequente comorbidade, semelhança fenomenológica e agregação comum em famílias de portadores de TOC (19).

Existe uma modulação entre os sistemas serotoninérgico e dopaminérgico nos circuitos fronto-tálamo-gânglios da base, implicados no TOC (20). Os neurônios serotoninérgicos exercem uma ação inibitória sobre a transmissão dopaminérgica estriatal (21) e o sistema dopaminérgico tem função regulatória no funcionamento de circuitos córtico-estriado-tálamo-corticais (vias diretas e indiretas) (22) por meio da estimulação de receptores de dopamina D1 e D2. Além disso há uma interação entre o receptor de dopamina D2 e receptores A2A da adenosina, que podem formar heterômeros nos dendritos de neurônios GABAérgicos estriado-palidais, participando da modulação de vias glutamatérgicas, principalmente nos gânglios da base (23).

Juntamente com a monoamino-oxidase A (MAO-A), a catecol O-metiltransferase (COMT) é responsável pelo metabolismo de catecolaminas no

sistema nervoso central. Como existe uma carência de transportador de dopamina (DAT) no córtex pré-frontal, a atividade enzimática da COMT é o fator determinante dos níveis sinápticos de dopamina nessa região (24, 25).

Até o momento, não existe um gene responsável pelo desenvolvimento do TOC, porém diversos genes são relacionados a vias neuronais e mecanismos fisiopatológicos que podem contribuir para sua etiologia.

1.3. Genética do TOC

Apesar de teorias psicológicas terem embasado a construção do conceito nosológico do TOC (26), existem evidências crescentes de que o TOC é mediado por uma interação genético-ambiental. A participação de fatores genéticos na etiologia do TOC foi notada desde as primeiras descrições do quadro (27).

Vários estudos de famílias tem fornecido evidências de que o TOC é familiar (28-31). Uma meta-análise, envolvendo 312 probandos (portadores do transtorno em estudo) e 1.209 familiares em primeiro grau de probandos com TOC, encontrou um risco agregado de 8,2% entre os familiares “caso” e de 2% entre os familiares “controle”, com uma razão de chances (OR) de 4 (95% IC=2,2;7,1) de apresentar TOC (32).

No Brasil, o primeiro estudo de famílias de portadores de TOC demonstrou que, após correção para idade, os riscos para TOC e sintomas obsessivo-compulsivos (SOC) foram de 40,3% entre os familiares de probandos com início dos SOC antes dos 14 anos de idade (início precoce) e de 21,1% entre os familiares dos probandos com início do quadro após os 17 anos de idade (31).

Um estudo de famílias com amostra americana (30) encontrou frequências aumentadas de TOC (22,7%), TOC subclínico (6,5%) e tiques (11,7%) em familiares de primeiro grau (FPG) de 106 crianças e adolescentes com TOC, quando comparados aos FPG do grupo controle (frequência total=4,1%).

Para discriminar a contribuição do componente genético do componente ambiental na etiologia de uma doença, uma das abordagens utilizadas é a de estudo de gêmeos. Este tipo de estudo parte da premissa de que gêmeos monozigóticos (MZ) e dizigóticos (DZ) sofrem influência ambiental semelhante, mas os MZ são geneticamente idênticos, enquanto os DZ compartilham apenas a metade de sua carga genética (50% dos genes em comum). Desse modo, em enfermidades determinadas pelo ambiente, a concordância entre MZ seria próxima à encontrada entre DZ, ao passo que em enfermidades genéticas a concordância entre MZ seria significativamente maior que nos DZ. Em uma revisão, Rasmussen e Tsuang (33) relataram que 51 pares de gêmeos MZ haviam sido estudados, sendo que 32 daqueles (63%) eram concordantes para TOC. Carey e Gottesman (34) estudaram 15 pares de gêmeos MZ e 15 pares de gêmeos DZ, encontrando taxas de concordância de 87% para “neurose obsessiva” entre os gêmeos MZ e 47% entre os gêmeos DZ. Estes estudos permitem calcular uma taxa de herdabilidade entre 26% e 33% para os transtornos do espectro obsessivo-compulsivo, não descartando que outros fatores (i.e. ambientais, socioculturais e perinatais) tenham importância na manifestação de SOC e TOC.

Análises de segregação são testes estatísticos que investigam padrões de transmissão genética entre familiares para determinar o modo de transmissão do fenótipo em um conjunto de várias famílias, de preferência envolvendo várias

gerações (35). Estudos feitos até o momento testando padrões de transmissão do TOC em famílias (29, 36-38) sugerem que genes diferentes parecem influenciar a expressão do TOC. Porém, tais pesquisas não foram suficientemente conclusivas quanto ao modo de transmissão, devido a amostragens pequenas e heterogeneidade fenotípica dos probandos (38). O modelo de transmissão mais aceito para o TOC é o modelo misto ou complexo, que envolve a influência de diversos genes de pequeno efeito em interação com o ambiente (35).

Estudos de associação tem a finalidade de detectar genes específicos envolvidos em um transtorno. Com o desenho de caso-controle, tenta-se investigar se existem diferenças de distribuição estatisticamente significantes de uma variante alélica entre os indivíduos afetados (casos) e não afetados (controles) pelo fenótipo (38). A principal limitação da análise de associação caso-controle pode ocorrer pela estratificação populacional, ou seja, quando os casos não estão etnicamente pareados com os controles. Os estudos baseado em famílias, que avaliam o probando (portador da patologia em estudo), e seus pais biológicos (o que constitui um “trio”), controla o viés da estratificação populacional, uma vez que a comparação é feita dentro de cada núcleo familiar. Nessas análises, o que se avalia são os alelos que foram transmitidos para os afetados em comparação com os alelos não transmitidos por métodos denominados Teste de Desequilíbrio de Transmissão (TDT) e Risco Relativo do Haplótipo (HRR).

Escolhe-se o “gene candidato” a ser pesquisado a partir de alguma hipótese que o relacione ao transtorno estudado. Esta escolha pode se basear em características clínicas, fisiopatológicas ou resposta terapêutica a determinados psicofármacos.

Como uma preparação para a presente tese foram realizados dois estudos: 1) uma revisão sistemática dos estudos de associação dos genes candidatos envolvidos no TOC; 2) um estudo de associação original com 83 trios de portadores de TOC, avaliando polimorfismos do gene da COMT.

A seguir, apresentaremos os principais resultados dos estudos de associação do TOC com diferentes genes candidatos, segundo uma revisão sistemática que fizemos como ponto de partida para esta tese (39).

1.4 Revisão sistemática dos estudos de associação entre genes candidatos e o transtorno obsessivo-compulsivo.

Para a revisão sistemática, que foi feita como preparação para a presente tese, foi realizada uma busca nas bases de dados: Pubmed e EMBASE, de todos os artigos publicados até 4 de maio de 2012, usando os termos MeSH (*Medical Subject Headings*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh>), seus correlatos e sinônimos para “Gene”, “Obsessive Compulsive Disorder” e “Genetic Association Study”

Cada termo foi pesquisado separadamente (Pubmed: termo 1= 1.558.541 resultados; termo 2= 13.319 resultados; termo 3= 102.583 resultados; EMBASE: termo 1=227.040 resultados; termo 2=19.244 resultados; termo 3=16.843 resultados) e posteriormente as três buscas foram combinadas usando o termo “AND” resultando em 188 referências no Pubmed e 49 referências no EMBASE. As referências foram enviadas para o programa de gerenciamento de referências ENDNOTE e duplicatas foram descartadas. As referências foram selecionadas e os textos completos foram avaliados por dois pesquisadores independentes (Aline S. Sampaio e Rita P. Lins), com base nos critérios de inclusão, sejam eles: 1. Estudos originais ou revisões sobre

associação com genes candidatos; 2. Os probandos deveriam preencher critérios pelo DSM III ou DSM IV para transtorno obsessivo-compulsivo e ter o TOC como diagnóstico primário; 3. Os estudos deveriam estar escritos em inglês, português ou espanhol; 4. Estudos com casos ou probandos portadores apenas de colecionismo não foram incluídos.

A lista de referências dos estudos de revisão foram examinadas para avaliar inclusão de novos estudos.

Foram selecionados 154 estudos cujos principais resultados estão resumidos abaixo. Os dados referentes ao gene da COMT, que será assunto desta tese, serão descritos com mais detalhes na seção 1.5.4 desta introdução. A descrição da revisão sistemática dos estudos de associação entre genes candidatos e o TOC está apresentada integralmente no artigo submetido (39) (Anexo 1).

1.4.1 Genes relacionados à serotonina

Gene do transportador da serotonina (SLC6A4, 5-HTT, SERT, 5HTTLPR)

O gene do transportador de serotonina (5HTT) é um gene candidato importante, uma vez que ele representa o alvo primário dos inibidores da recaptação de serotonina (Tabela 1).

Tabela 1: Estudos de associação entre o transtorno obsessivo-compulsivo e os polimorfismos do gene do transportador da serotonina (5HTT) e do promotor do transportador da serotonina (5HTTLPR).

Tipo de estudo	Gene/polimorfismo	População	Fenótipo	Amostra Casos/ controles	Resultados	Referência
CC	5HTTLPR	Italiana	TOC	180/112	NS	(40)
CC	5HTTLPR	Brasileira	TOC	79/202	NS	(41)
CC/BF	5HTTLPR	Francesa/Ale mã	TOC	106 famílias 86/171	NS	(42)
CC/BF	5HTTLPR	Mexicana	TOC	43 famílias 115/136	NS	(43)
BF	5HTTLPR	Alemã	TOC de início precoce	64 famílias	NS	(44)
CC	5HTTLPR VNTR	Indiana	TOC	93/92	Associação entre 5-HTTLPR e gravidade do TOC (P=0,036); VNTR: NS	(45)
CC	5HTTLPRVN TR	Coreana	TOC	148/157	NS	(46)
BF	SLC6A4	Norte- Americana	TOC	54 trios	5-HTTLPR: associado a mulheres com TOC (P =0.03)	(47)
CC	5HTTLPR	Caucasiana	TOC	295/657	NS	(48)
CC	VNTR	Espanhola- caucasiana	TOC	97 TOC/570 controles psiquiátricos/406 controles sadios	Excesso de genótipos 12/12 e 12/10 em pacientes com TOC.	(49)
CC	5HTTLPRVN TR	Espanhola- caucasiana	TOC	99TOC/456 controles psiquiátricos/420 controles sadios	5HTTLPR: NS; VNTR : excesso de genótipo 12/12, 12/10 e 12/9 em pacientes com TOC	(50)
CC	5HTTLPR	Chinesa Han	TOC	207/275	NS	(51)
CC	5HTLLPR	Coreana	TOC	124/171	alelo L no TOC apresentou maiores escores em sintomas religiosos/somáticos (P=0,005)	(52)
BF	5HTT	Norte- Americana	TOC	278 trios	VNTR em Intron 2: P=0,0089 (total), P<0,0002 (mulheres); Intron 7: P=0,0187	(53)

Legenda: TOC: Transtorno obsessivo-compulsivo; NS: não-significante, CC: caso-controle; BF: baseado em famílias; 5HTT: gene do transportador de serotonina; 5-HTTLPR: polimorfismo da região promotora do gene da proteína transportadora da serotonina., VNTR: polimorfismo de número variável de repetições em tandem.

Receptores de serotonina (5-HT2A, 5-HT1B, 5-HT2C)

Achados referentes a estes genes estão resumidos na tabela 2.

Triptofano hidroxilase 1 (TPH1) e Triptofano hidroxilase 2 (TPH2)

A enzima triptofano hidroxilase (TPH) representa o passo de limitação de taxa na síntese da serotonina desta forma, um gene candidato importante. Existem duas formas expressas: TPH1 e TPH2. O TPH1 é detectado periféricamente como no sangue ou duodeno, mas não é encontrado no cérebro. O TPH2 é detectado exclusivamente no cérebro. Estudos com estes genes estão descritos na tabela 2.

Tabela 2: Estudos de associação entre TOC e genes dos receptores da serotonina 2A 1B e 2C (5-HT_{2A}, 5HT_{1B}, 5TH_{2C}) e da enzima triptofano hidroxilase 1 e 2 (TH1 E TH2)

<i>Tipo de estudo</i>	<i>Gene/polimorfismo</i>	<i>População</i>	<i>Fenótipo</i>	<i>Amostra Casos/controles</i>	<i>Resultados</i>	<i>Ref.</i>
BF	<i>5HTR1B5HTR2 A</i>	Norte-Americana	TOC	54 trios	<i>5HTR2A</i> rs6311: associado a TOC + tiques (P=0,05)	(47)
BF	<i>TH2</i>		TOC início precoce	71 trios	Associação com haplótipo rs4570625/rs4565946 G/C: P=0,035 G/T: P=0,022	(54)

Legenda: TOC: Transtorno obsessivo-compulsivo; NS: não-significante, CC: caso-controle; BF: baseado em famílias; 5-HTTLPR: polimorfismo da região promotora do gene da proteína transportadora da serotonina; Ref.: referência

1.4.2 Genes relacionados à dopamina

Alguns autores propuseram que a dopamina poderia estar envolvida na fisiopatologia do TOC (13). O sistema serotoninérgico tem muitas interações com outros neurotransmissores e circuitos neuronais (9) incluindo a modulação entre os dois sistemas na área fronto-tálamo-gânglio da base, circuito este implicado no TOC (20). Tal modulação faz com que os ISRS afetem a transmissão de dopamina indiretamente. Estudos farmacológicos demonstraram que antagonistas dopaminérgicos em combinação com ISRS tem se mostrado efetivo no tratamento do TOC. Estudos animais demonstraram que o uso de agonistas dopaminérgicos induz

movimentos estereotipados repetitivos semelhantes a sintomas obsessivo-compulsivos (55). Da mesma forma, existem relatos de sintomas obsessivo-compulsivos desenvolvidos durante o tratamento com clozapina, um antagonista dos receptores de dopamina D1, D2, D3 e principalmente D4 (56, 57). Achados de estudos de associação envolvendo genes dopaminérgicos e o TOC estão descritos na tabela 3.

Tabela 3: Estudos de associação entre TOC e os genes dos receptores de dopamina 2, 3 e 4 (DRD2, DRD3 e DRD4) e do transportador da dopamina (DAT1)

<i>Tipo de estudo</i>	<i>População</i>	<i>Fenótipo</i>	<i>Casos/controles</i>	<i>Resultados</i>	<i>Referência</i>
CC	Canadense	TOC	100/18	Associação entre TOC e o gene <i>DRD4</i> (P=0,02) que não se manteve após correção para múltiplas testagens; sem associação com <i>DAT1</i> , <i>DRD2</i> ou <i>DRD3</i>	(58)
CC	Sul-africanos brancos	TOC	71/129	NS	(59)
CC	Judeus Ashkenazi e não Ashkenazi	TOC	75/172	NS	(60)
BF CC	Franceses	TOC	55 trios 49 TOC (17 TOC+ tiques)/ 63 controles	<i>DRD4</i> : Ausência de transmissão do alelo de 2 repetições/menor frequência do alelo de 2 repetições em portadores de TOC sem tiques (P=0,005)	(61)
CC	Sul-Africanos brancos	TOC	252/180	<i>DRD4</i> : alelo de 7 repetições foi associado a TOC de início precoce (P=0,02)	(62)
CC	Coreanos	TOC	115/160	Maior frequência do alelo de 2 repetições em portadores de TOC (P=0,04)	(63)
CC	Mexicanos	TOC + tiques	49 TOC-tiques/ 12 TOC+tiques	<i>DRD4</i> : Maior frequência do alelo de 7 repetições (P=0,02)	(64)
CC	Mexicanos	TOC + tiques	54 TOC-tiques/12 TOC+tiques/54	<i>DRD2</i> : Associação entre TOC e o alelo mais frequente, A2 (P=0,01); homoziguidade excessiva do alelo A2 (P=0,001). <i>DRD4</i> : Maior frequência do alelo de 7 repetições do <i>DRD4</i> (P=0,02) e do haplótipo A2R7 (P=0,02) no grupo TOC+tiques.	(65)
CC	Mexicanos	TOC	67 (12 com tiques)/54	<i>DRD2</i> : Maior frequência de homozigotos para A2 em TOC+tiques (P=0,008); não significante para <i>DRD3</i> .	(66)
CC	Holandeses	TOC	150 (56 masculinos)/150 (79 masculinos)	Maior frequência do alelo A2 do <i>DRD2</i> em portadores de TOC do sexo masculino (P=0,02)	(67)
CC	Caucasianos	TOC	97/97	NS	(68)
CC BF	Mexicanos	TOC	210/202	<i>DRD4</i> : Menor frequência do alelo de 4 repetições (P=0,0027);	(69)
		TOC + tiques	38/202	Maior frequência do alelo de 6 repetições no grupo TOC + tiques (P=0,0016)	
		TOC	86 famílias	NS	
BF	Caucasianos	TOC de início precoce	69 trios	<i>DRD4</i> : Menor frequência na transmissão do alelo de 4 repetições (P=0,003)	(70)
BF	Chineses	TOC	103 trios	NS	(71)

DRD2: Gene do Receptor da Dopamina D2; DRD3: Gene do Receptor da Dopamina D3, DRD4: Gene do Receptor da Dopamina D4, BF: baseado em famílias, NS: não significante, TOC: Transtorno obsessivo-compulsivo, TOC+tiques: Transtorno obsessivo-compulsivo associado a transtornos de tiques.

1.4.3 Genes relacionados ao glutamato

Estudos de neuroimagem, modelos animais, estudos farmacológicos e alguns estudos de associação de genes candidatos reforçam a hipótese da participação do glutamato na fisiopatologia do TOC. Estudos de neuroimagem funcional mostraram hiperatividade metabólica nos circuitos córtico-estriado-tálamo-cortical. Níveis anormais de glutamato em pacientes com TOC já foram relatados, com níveis elevados em regiões pré-frontais, tais como córtex órbito-frontal e suas áreas de projeção no estriado (10-12). Os níveis de glutamato no líquido também foram significativamente mais altos em portadores de TOC comparados a controles ($P=0.014$) (72). Drogas que modulam o glutamato vêm sendo recentemente usadas como potencializadores do tratamento farmacológico de TOC em adultos (73, 74), adolescentes e crianças (75). Um estudo de varredura de genoma recente, do qual participamos em colaboração internacional, encontrou que dentre os SNPs associados ao TOC, muitos eram relacionado ao glutamato (76).

Proteína associada ao SAP90/PSD95- 3 - SAPAP3/DLGAP3

Desde que o estudo de Welch et al. (77) trouxe o modelo de ‘grooming’ patológico com o rato com deleção do *Sapap3*, o gene correlato humano passou a ser estudado como candidato no TOC (77). Boardman et al. (78) avaliaram sete polimorfismos no gene que codifica o SAPAP3 em indivíduos com TOC ($n=172$), tricotilomania ($n=45$) e controles ($n=153$) e não encontraram associação (78). Dentro do grupo com TOC houve associação positiva com o início precoce do transtorno e o haplótipo A-T-A-T (rs11583978-rs7541937-rs6662980-rs4652867) (78). Bienvenu

et al. (79) avaliaram 383 famílias e encontraram associação entre quatro polimorfismos do *SAPAP3* e “grooming” patológico (onicofagia, dermatotilexomania e/ou tricotilomania), mas não com TOC (79). Outro estudo sequenciou o gene *SAPAP3* em 44 portadores de TOC e tricotilomania, 44 portadores de TOC sem tricotilomania e 178 controles e genotipou 6 polimorfismos em uma amostra adicional de 281 portadores de TOC e 751 indivíduos da população geral (80). Houve uma associação entre TOC e o polimorfismo A189V ($P=0.045$) (80).

Um gene da mesma família, *DLGAP1* foi encontrado como um dos genes mais ligados ao TOC no estudo de varredura de genoma (81), do qual participamos (já citado acima).

Transportador do glutamato de alta afinidade neuronal/epitelial (SLC1A1, EAAC1)

Hanna et al. (82) encontraram evidência de ligação com TOC na região 9p (cromossomo 9). Em um estudo de replicação, Willour et al. (83) genotiparam 50 famílias com TOC e encontraram pico de ligação em dois marcadores (D9S1792 ($\alpha =0.59$) e D9S1813 ($P=0.006$)) na região 9p24, apenas 0.5 cM (<350 kb) do marcador encontrado por Hanna et al. (82).

SLC1A1, o gene que codifica o transportador do glutamato de alta afinidade neuronal/epitelial (SLC1A1, EAAC1) é um gene candidato, muito estudado no TOC, que se situa na região 9p24 (84) (Tabela 4)

Tabela 4: Estudos de associação entre o transtorno obsessivo-compulsivo e o gene do transportador do glutamato de alta afinidade neuronal/epitelial (SLC1A1)

<i>Tipo de estudo</i>	<i>População</i>	<i>Fenótipo</i>	<i>Amostra Casos/controles</i>	<i>Resultados</i>	<i>Referência</i>
BF	Norte-americanos	TOC de início precoce	71 trios	Associação em dois SNPs adjacentes na região 3' do: rs301430 (P=0,03) na amostra total e rs3780412 (P=0,002) na amostra masculina	(85)
BF	Caucasianos	TOC	157 trios	rs301434 ($\chi^2=12,04$; P=0,006) e rs301435 ($\chi^2=9,24$; P=0,03)	(86)
BF	Norte-Americanos+ Franceses	TOC	66 famílias	rs12682807/rs2072657/rs301430, com mais transmissão de A/T/T na amostra total (P=0,0015) e na amostra masculina (P=0,0031).	(87)
BF	Norte-Americanos	TOC	378 famílias	Forte associação com o SNP rs301443 (P= 0,000067; correção de Bonferroni P = 0,0167)	(88)
CC	Caucasianos	TOC	325/662	rs7858819/rs3087879/rs301430 – associados a TOC mesmo após correção para múltiplas testagens. O haplótipo C/C/G foi duas vezes mais frequente em portadores de TOC que em controles. O SNP rs3933331 foi associado a colecionismo.	(89)

Legenda: TOC: Transtorno obsessivo-compulsivo; NS, não significante; CC: caso-controle; BF: baseado em família; SNP: polimorfismo de troca de base única; A: adenina; C: citosina; G: guanina; T: timina

Receptores do glutamato, ionotrópicos, kainatos 2 e 3 (GRIK2/EAA4 e GRIK3/EAA5)

GRIK2 e 3 contribuem para a regulação da transmissão excitatória e inibitória e tem funções importantes na fisiologia e plasticidade das sinapses (90). O RNA mensageiro do GRIK2 existe em abundância em neurônios piramidais do caudado, que estão envolvidos na fisiopatologia do TOC. Genes que codificam para GRIK2 e GRIK3 foram investigados em um estudo com 156 pacientes com TOC, 141 controles e 124 trios, sendo que o alelo G do SNP rs2238076 do *GRIK2* foi menos transmitido que o esperado para portadores de TOC (P<0,03)(91).

Conduzimos um estudo de replicação (92) e também encontramos associação significativa entre o TOC e o SNP rs1556995 (P=0,03) e o haplótipo G-C dos polimorfismos rs1556995/rs1417182 (P= 0,01) do *GRIK2* (92).

1.4.4 Genes relacionados ao sistema imune

Existem evidências que apoiam o envolvimento do sistema imune no TOC, como o surgimento do TOC associado à Febre Reumática (93-95), à Doença Neuropsiquiátrica Autoimune Pediátrica Associada ao Estreptococo (PANDAS) (96, 97) e às evidências de que transtornos do espectro obsessivo-compulsivo se agregam em famílias de portadores de febre reumática (98). Nosso grupo tem estudado a associação de alguns genes relacionados à resposta imune (abaixo) com o TOC.

Fator de necrose tumoral alfa (Tumor Necrosis Factor alpha, TNFA)

TNFA é uma citocina pró-inflamatória envolvida em doenças autoimunes tais como a Febre Reumática. Polimorfismos na região promotora deste gene foram associados a formas clínicas de Febre Reumática (99). Em um dos nossos estudos (100), avaliamos 111 pacientes com TOC e 250 controles e encontramos associação entre o TOC e o alelo A do polimorfismo rs361525 ($\chi^2=12,05$, $P=0,0005$), o alelo A do polimorfismo rs1800629 ($\chi^2=7,09$, $P=0,007$) e o haplótipo A-A destes dois marcadores ($P=0,0099$) (100). Em um segundo estudo do nosso grupo avaliamos os mesmos polimorfismos em uma amostra de 83 trios de probandos com TOC e encontramos que o alelo G do *TNFA* rs361525 foi mais transmitido para probandos com TOC ($P=0,007$) (101). Contudo, Zai et al. não encontrou associação entre *TNFA* e TOC (102).

Gene do Fator Nuclear Ativador do Polipeptídeo Leve Kappa em Células-B, semelhante a inibidor 1 (NFKBIL1)

Em um dos nossos estudos, avaliamos o polimorfismo rs2071592 do *NFKB1* em 111 pacientes com TOC e 272 controles e não encontramos associação significativa (103).

Interleucina-6 (IL-6)

Em outro estudo nosso, ainda não publicado (104), avaliamos 83 trios com TOC quanto ao polimorfismo rs1800795 na região promotora do *IL-6* e não encontramos associação entre eles (101).

1.4.5 Outros genes

Fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF)

O fator neurotrófico derivado do cérebro (*Brain-derived neurotrophic factor* -BDNF) promove regeneração cerebral, proliferação e conectividade durante o desenvolvimento e participa da manutenção e da plasticidade dos neurônios, mesmo durante a fase adulta (105). Estudos de associação entre o *BDNF* e o TOC estão descritos na tabela 5.

Tabela 5: Estudos de associação entre o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e o transtorno obsessivo-compulsivo

<i>Tipo de estudo</i>	<i>População</i>	<i>Fenótipo</i>	<i>Amostra Casos/ controles</i>	<i>Resultado</i>	<i>Referência</i>
CC	Holandesa/Sul-africana (brancos)	TOC	419/650	NS	(106)
BF	Sul-africana (brancos)	TOC	112/140	Met66 associado ao TOC e TOC de início precoce em homens. Genótipo G/G associado a maior gravidade em mulheres.	(107)
CC	Espanhola	TOC	215/341	Associação com haplótipo de cinco marcadores (com o rs6265) (P=0,006)	(108)
BF	Alemã	TOC	67	NS	(109)
BF	Americana (EUA)	TOC	164	Menor transmissão do alelo Met66	(110)
CC	Caucasiana (EUA)	TOC	295/657	NS	(48)
BF	Canadense	TOC	152	NS	(111)
BF	Americana (EUA)	TOC	54	NS	(47)

Legenda: TOC: Transtorno obsessivo-compulsivo; NS, não significativo; CC: caso-controle; BF: baseado em família; SNP: polimorfismo de troca de base única; A: adenina; C: citosina; G: guanina; T: timina

Monoamino oxidase A (MAO A)

A monoamino oxidase (MAO) é uma enzima mitocondrial que tem a função de degradar várias aminas biogênicas, incluindo a serotonina, adrenalina, noradrenalina e dopamina. Dois polimorfismos funcionais foram mais estudados no TOC. Um dos polimorfismos consiste em um número variável de repetições em série (VNTR) de 30pb, localizado 1.2kb acima das sequências codificantes do *MAO-A* (MAO-Au) e o outro é uma substituição de T por C (rs1137070 ou EcoRV), com o alelo T relacionado a menor atividade enzimática (112). Os estudos de associação entre *MAO-A* e TOC, incluindo um estudo liderado pela autora desta tese (113), estão descritos na tabela 6.

Tabela 6: Estudos de associação entre o gene da monoamino oxidase-A e o transtorno obsessivo-compulsivo

<i>Tipo de estudo</i>	<i>Ploimorfis mo</i>	<i>População</i>	<i>Fenótipo</i>	<i>Amostra Casos/controles</i>	<i>Resultados</i>	<i>Ref.</i>
BF	Exon 8 T/G	Norte-Americanos	TOC	110 famílias	Alelo G como fator de risco para TOC em homens (P= 0,02)	(114)
			TOC/ TOC +TT	25 famílias	Alelo G como fator de risco para TOC (P=0,0004)	
BF CC	Exon 8 T/G	Norte-Americanos	TOC	51 famílias 122/124	Alelo T como fator de risco para mulheres com TOC (CC: P=0,02; BF: P=0,02)	(43)
CC	MAO-Au VNTR	Coreanos	TOC	121/276	Maior frequência do alelo de 3 repetições em homens com TOC	(112)
CC	rs1137070	Sul africanos brancos	TOC	71/129	NS	(59)
BF	rs1465108	Brasileiros	TOC	83	Transmissão preferencial do Alelo A (P=0,0469).	(113)

MAO-A: Monoamino oxidase-A, VNTR: polimorfismo de número variável de repetições em tandem; TOC: transtorno obsessivo-compulsivo; TT: transtornos de tiques; T: timina; G: guanina; BF: baseado em famílias; CC: Caso-controle; NS: não significante; Ref.: referência bibliográfica

Catecol O-metiltransferase (COMT)

Por se tratar do gene de maior interesse nesta tese, os resultados referentes a este gene estão descritos na seção 1.5.

1.4.6 Conclusão sobre associação entre genes candidatos e o transtorno obsessivo-compulsivo

Existe um conjunto de evidências de que fatores biológicos/genéticos são importantes na expressão do TOC. O montante de dados até o momento é típico de estudos de associação que envolvem traços complexos conduzidos em diferentes populações: não há associação conclusiva. Contribuem para a inconsistência dos achados a natureza multifatorial do TOC, sua heterogeneidade na apresentação fenotípica e diferentes métodos utilizados para o diagnóstico do TOC, estratificação populacional em amostras de estudos caso-controle (quando a associação pode sofrer

viés devido a diferença étnica dos participantes) e poder estatístico pequeno de cada um dos estudos, com aumento da probabilidade de resultados falso-positivos.

Além disso, a maioria dos estudos avaliou um ou poucos polimorfismos em cada um dos genes. Com este método é possível detectar associação com marcadores conhecidos, mas não com variantes raras (que apresentam frequência do alelo menor [MAF] de menos de 1%). Para detectar variantes raras, são usados os métodos de sequenciamento ou de genotipagem de um conjunto de polimorfismos (SNPs alvo) ao longo do gene, os quais tem probabilidade alta de estarem em desequilíbrio de ligação (com uma probabilidade mais alta de migrarem unidos em eventos de recombinação ou *crossing over*) com outros polimorfismos (mais raros) não genotipados. As interações entre genes e entre o gene e o ambiente são variáveis que devem ser levadas em consideração, sendo pouco provável que um único gene consiga explicar toda a etiologia e a apresentação fenotípica do quadro.

Como foi dito acima, muitas vias neuronais participam da fisiopatologia do TOC. Isto pode explicar os achados de associação positiva com alguns dos genes estudados. Genes relacionados ao glutamato, assim como o gene do transportador da serotonina, e o gene da COMT (que será apresentado na seção abaixo) tiveram mais estudos de associação positivos com o TOC reproduzidos.

Para esta tese foi estabelecido como gene de interesse o gene da COMT, que será descrito na seção seguinte.

1.5. Catecol O-metiltransferase e o transtorno obsessivo-compulsivo

Por ser o gene da COMT o tema desta tese, serão apresentados a seguir os resultados de duas revisões sistemáticas e um estudo de associação original.

Primeiro, os resultados da revisão sistemática dos estudos de associação entre genes candidatos e o TOC, referentes ao *COMT*, foram destacados dos demais (seção 1.4.4) e apresentados nesta seção (1.6) para permitir uma descrição mais detalhada do gene e suas relações com o TOC.

Além disso, um estudo de associação original com 83 trios de portadores de TOC foi realizado por nós, também como preparação para a tese e encontra-se descrito na seção 1.7 da introdução.

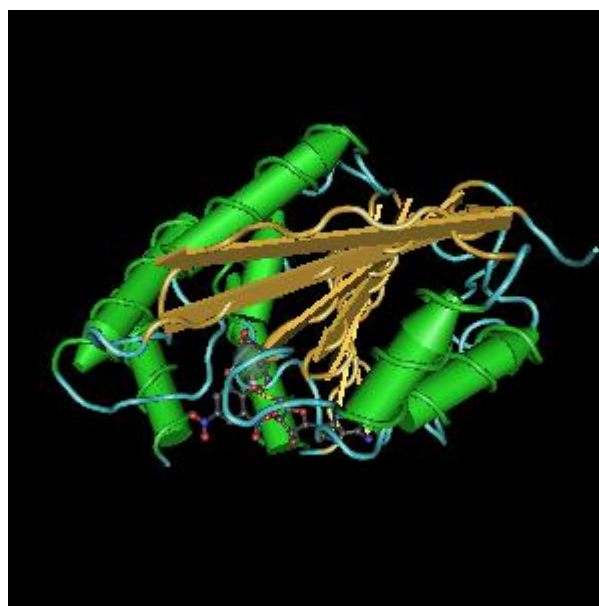
Posteriormente (seção 4 - Métodos), será descrito o trabalho sobre o qual consiste esta tese, que envolve uma segunda revisão sistemática mais específica (seção 4.1), envolvendo apenas estudos baseados em famílias, seguida de meta-análise (seção 4.2).

1.5.1 A enzima catecol O-metiltransferase.

A catecol O-metiltransferase é uma enzima magnésio-dependente (Figura 1) que catalisa a transferência de um grupo metil da S-adenosilmetionina para catecolaminas, incluindo os neurotransmissores norepinefrina, epinefrina e dopamina (115) (Figura 2). São também substratos endógenos da COMT o aminoácido L-DOPA e os catecolestrógenos. Outras substâncias exógenas são metabolizadas pela COMT, tais como as benserazidas, carbidopa, dobutamina, alfa-metildopa (116) e vitamina C (117). O ácido ribonucleico (RNA) mensageiro codificado pelo gene

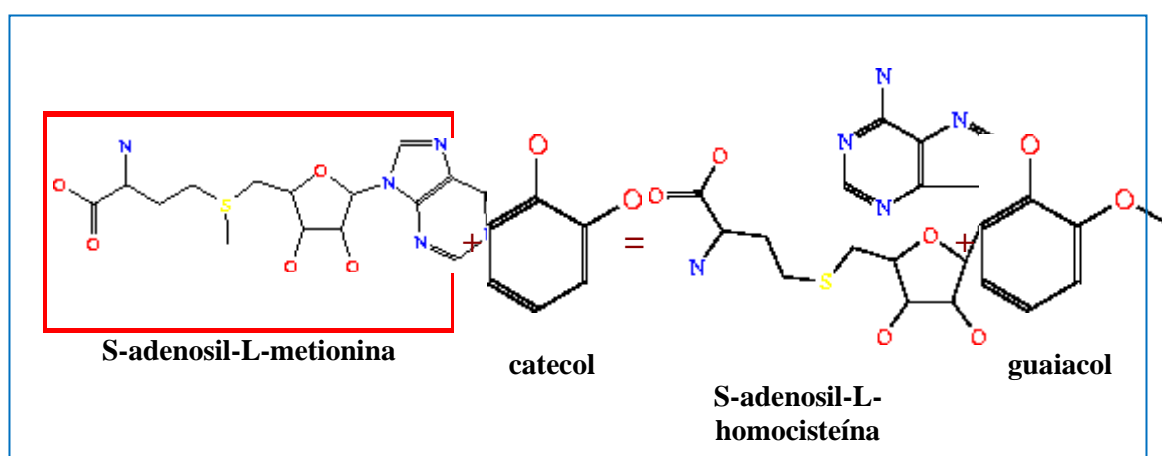
COMT pode produzir duas formas da enzima: uma solúvel e uma transmembrana (118), que agem de forma semelhante (115).

Figura 1: Estrutura cristalizada da enzima catecol O-metiltransferase



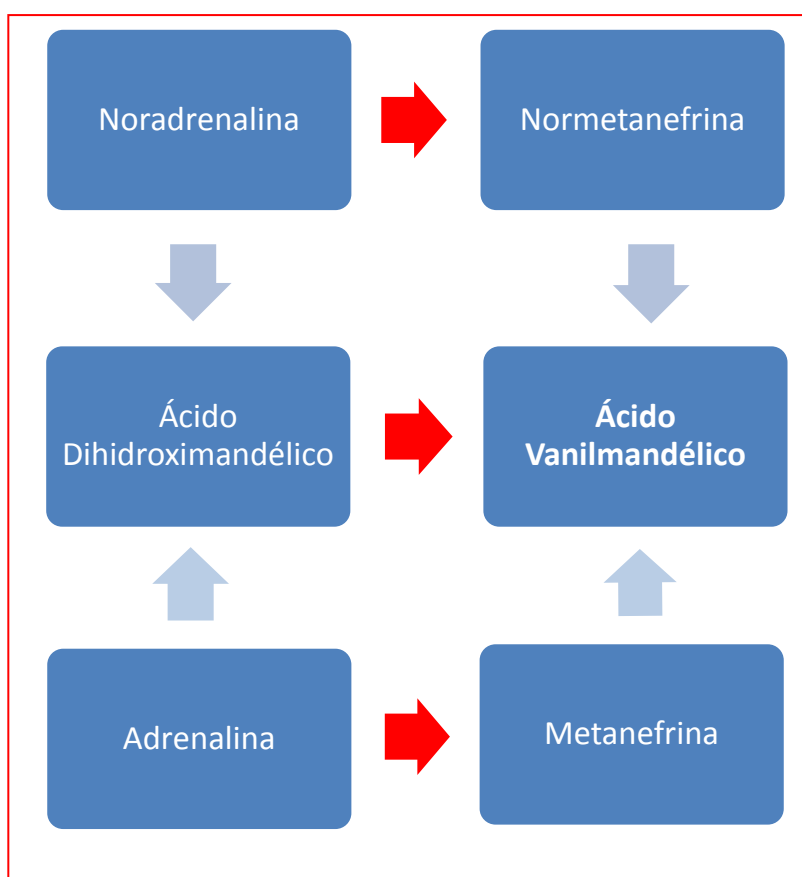
Referência:(119)

Figura 2: Reação catalítica metabolizada pela catecol O-metiltransferase: S-adenosil-L-metionina + catecol = S-adenosil-L-homocisteína + guaiacol.





Referência: (120)

A O-metilação catalizada pela COMT resulta em uma das principais vias de degradação dos neurotransmissores e drogas catecolaminérgicas (120) (Figura 3). COMT e MAO-A são as principais enzimas responsáveis nas vias de metabolismo das catecolaminas, interagindo intimamente para a realização desta função (Figuras 3 e 4). Por exemplo, a principal rota do metabolismo da dopamina é a formação do ácido 3,4-diidroxi-fenilacético (DOPAC), o qual depois é metabolizado em ácido homovanílico (HVA) (Figura 4). Outra rota é a O-metilação da dopamina em 3-metoxi-tiramina (3-MT) pela COMT. A MAO então metaboliza o 3-MT em HVA (121). Apesar de alterações na COMT isoladamente levarem a mudanças drásticas nos níveis de dopamina no córtex frontal (122), elas só levam a mudanças dos níveis de dopamina no estriado quando ocorrem alterações concomitantes na MAO-A (122).

Figura 3: Metabolismo da Adrenalina e Noradrenalina

Legenda:

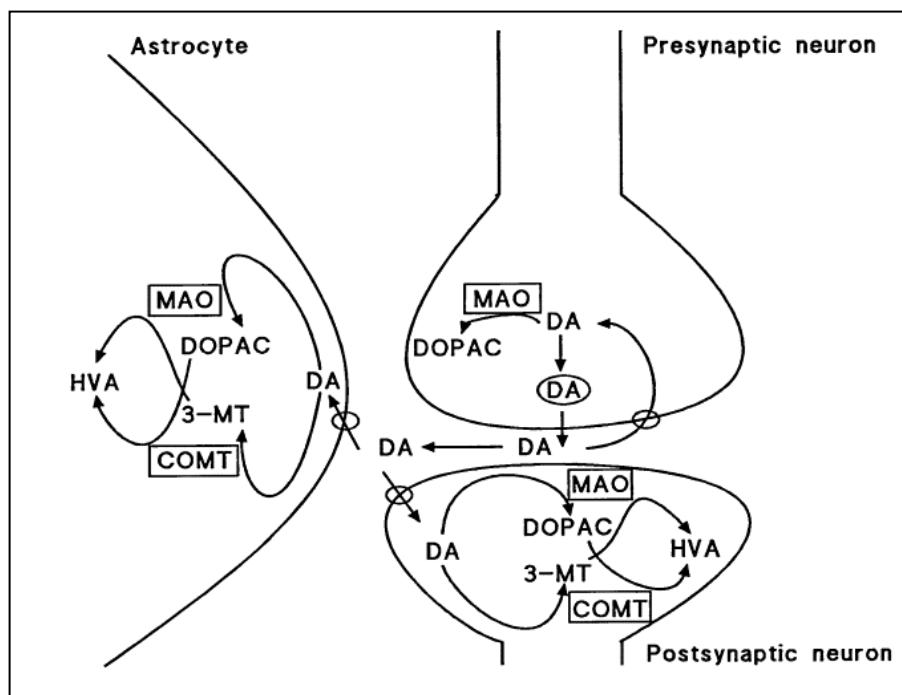
 Enzima catecol O-metiltransferase (COMT)

 Enzima monoamino oxidase-A (MAO-A)

Referência:(123)

Figura 4: Metabolismo da dopamina e localização das enzimas catecol O-metiltransferase e monoamino-oxidase A no estriado.

O-metiltransferase e monoamino-oxidase A no estriado.



Legenda: DA: Dopamina; HVA: ácido Homovanílico; DOPAC: Ácido-3,4-Diidroxi-Fenilacético; 3-MT: 3-Metoxi-Tiramina; COMT: Catecol O-metiltransferase; MAO: monoamino-oxidase; Postsynaptic neuron= Neurônio pós-sináptico; Presynaptic neuron= neurônio pré-sináptico; Astrocyte=Astrócito. Referência:(124)

1.5.2. Polimorfismo funcional no gene da catecol O-metiltransferase

Alguns estudos demonstram que a COMT solúvel tem uma atividade bimodal: 23% da população tem baixa atividade (enzima mais termolábil) em eritrócitos (125, 126), o que sugere uma alteração estrutural na enzima. O polimorfismo mais estudado no gene *COMT* é uma troca de único nucleotídeo (SNP- *single nucleotide polymorphism*) (Val158Met ou rs4680) guanina (G) por Adenina (A) que leva a uma substituição do aminoácido valina por metionina no códon 158 da enzima (Figura 5).

Figura 5: Sequência de aminoácidos da enzima catecol O-metiltransferase humana: destaque para posição 158, onde ocorre a troca da valina (V) por metionina (M).

10	20	30	40	50	60
MPEAPPLLLA	AVLLGLVLLV	VLLLLLRHWG	WGLCLIGWNE	FILQPIHNLL	MGDTKEQRIL
70	80	90	100	110	120
NHVLQHAEPG	NAQSVLEAID	TYCEQKEWAM	NVGDKKGGKIV	DAVIQEHQPS	VLLELGAYCG
130	140	150	160	170	180
YSAVRMARLL	SPGARLITIE	INPDCAAITQ	RMVDFAG <u>V/M</u> KD	KVTLVVGASQ	DIIPQLKKKY
190	200	210	220	230	240
DVDTLDMVFL	DHWKDRYLPD	TLLLEECGLL	RKGTVLLADN	VICPGAPDFL	AHVRGSSCFE
250	260	270			
CTHYQSFLFY	REVV DGLEKA	IYKGGPSEAG	P		

Fonte: (127)

É importante ressaltar que a distribuição dos alelos deste polimorfismo não é homogênea entre os diversos subgrupos étnicos (tabela 7). Por este motivo, os estudos de associação tipo caso-controle devem ser interpretados com cautela, visto o risco de estratificação populacional.

Tabela 7: Distribuição dos alelos e genótipos do polimorfismo rs4680 (ss66862091) do gene da catecol O-metiltransferase entre os subgrupos populacionais.

Grupo Populacional	Frequência do genótipo			Frequência do Alelo	
	A/A	A/G	G/G	A	G
MEX Latino	0,16	0,46	0,38	0,39	0,61
CEU Europeu	0,146	0,46	0,29	0,478	0,52
CHB Asiático (China)	0,146	0,44	0,42	0,366	0,634

Legenda: ss= número de submissão do SNP (polimorfismo de base única); A = Alanina; G = Guanina;

Fonte: NCBI Entrez SNP: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=4680 (128)

Este polimorfismo está associado com a forma termolábil (baixa atividade – alelo 158Met, alelo A ou alelo L) ou termoestável (alta atividade – Val158, alelo G ou alelo H) da enzima (125, 126, 129). Um estudo recente mostrou que portadores de TOC com o alelo 158Met do *COMT* apresentam baixos níveis de 3-O-Metil-Dopa, que resulta da metilação da levodopa, no plasma (130), mostrando que há uma diminuição na atividade da enzima COMT em pacientes com TOC portadores do polimorfismo de baixa atividade.

A homozigotidade do alelo A do polimorfismo rs4680 do *COMT* resulta em um decréscimo para a metade da atividade enzimática e catabolismo da dopamina (131, 132) com subsequente aumento da disponibilidade de dopamina (131, 133, 134), especialmente em córtex pré-frontal (24, 25, 122). De acordo com estudos em ratos, como existe uma carência de transportador de dopamina no córtex pré-frontal, a atividade enzimática da COMT é o fator primário na determinação dos níveis de dopamina na sinapse nessa região (24, 25) e contribui com cerca de metade da degradação de dopamina total (122, 135). Gogos et al (1998) encontraram uma alteração mais atenuada em fêmeas de ratos (136).

1.5.3 O Gene da catecol O-metiltransferase e seu papel na fisiopatologia dos transtornos mentais.

A associação do *COMT* com sintomas psiquiátricos foi sugerida a partir da observação de que o gene *COMT* se localiza na mesma região em que é encontrada uma deleção na Síndrome Velocardiofacial (SVCF), a região 22q11.2. Pacientes com SVCF apresentam um risco aumentado de desenvolver transtornos psiquiátricos tais como esquizofrenia, transtornos de ansiedade (137), transtornos afetivos, transtorno de déficit de atenção/hiperatividade (TDAH) e transtornos invasivos do desenvolvimento (TID). A prevalência de TOC encontrada nos pacientes com SVCF foi de 33,6% (138), o que é muito superior ao encontrado na população geral (2,5 a 3%). Em um estudo posterior, Gothelf et al. (137) encontraram que o fenótipo do TOC nos pacientes portadores da SVCF estava associado ao polimorfismo de baixa atividade da *COMT* ($p=0,007$).

O gene *COMT* passou a ser investigado em modelos de ansiedade em ratos. As fêmeas de ratos mutantes, homozigotas para deleção do gene *COMT*, apresentaram comportamentos compatíveis com maior ansiedade em testes de exploração em ambiente claro e escuro. Ratos machos heterozigotos para a deleção mostraram mais comportamento agressivo (122), o que sugere um papel da *COMT*, diferente entre os sexos, em alguns aspectos do comportamento social e emocional em ratos.

Alguns achados comuns entre portadores de TOC e portadores do alelo A do polimorfismo rs4680 do *COMT* foram encontrados em estudos de neuropsicologia e neuroimagem, levantando a hipótese de que o polimorfismo do *COMT* pode estar associado a endofenótipos de risco para o TOC.

Por exemplo, a rigidez cognitiva é observada como uma característica de portadores de TOC. Estudos mostraram que esta inflexibilidade cognitiva pode estar relacionada a uma menor ativação fronto-estriatal (139, 140). Os portadores do alelo A do polimorfismo rs4680 também apresentaram maior inflexibilidade cognitiva (141-143) quando comparados aos homozigotos para o alelo G (Val).

A memória de trabalho é a habilidade de manter uma informação na memória de curto prazo e manipulá-la no mesmo momento. Ela está envolvida em funções cognitivas complexas e vem sendo considerada um endofenótipo de risco para alguns transtornos psiquiátricos (144). A performance da memória de trabalho é diretamente proporcional à disponibilidade de dopamina em córtex pré-frontal (145). Um estudo demonstrou que homens normais com genótipo A/A (Met/Met) do polimorfismo rs4680 (Val158Met) do *COMT* apresentaram melhores resultados em teste para memória de trabalho (percentagem de resultados nos erros não perseverativos do *Wisconsin Card Sorting Test*) (146). Outros estudos também já mostraram prejuízo na memória de trabalho em portadores de TOC, principalmente naqueles com rituais de checagem (147, 148).

Variações microestruturais na substância branca parecem ser um dos diversos antecedentes para alterações no processamento cognitivo e afetivo ao longo da vida (149). Tais variações diferiram entre portadores dos alelos A e G do polimorfismo rs4680 do *COMT* (150, 151). Portadores de TOC apresentaram menor volume e alteração estrutural de substância branca (152, 153) quando comparados a controles. Outros genes também associados ao TOC já foram associados ao polimorfismo rs4680 do *COMT*, tais como genes relacionados ao glutamato (154) e o gene da glicoproteína oligodendrocítica da mielina (155, 156).

Traços de personalidade também podem estar relacionados a maior risco para desenvolvimento de transtornos mentais (157). Um estudo populacional com gêmeos também encontrou que os escores de sintomas obsessivo-compulsivos estiveram relacionados a maiores escores de neuroticismo e menores escores de extroversão. O mesmo estudo avaliou as correlações genéticas em modelo aditivo sugerindo que os sintomas obsessivo-compulsivos compartilham fatores genéticos com o perfil de personalidade de alto neuroticismo e baixa extroversão (158). Em mulheres, o alelo A do polimorfismo rs4680 também esteve associado a maior esquizofrenia (159), maior neuroticismo (159, 160) e menor extroversão (160).

Como descrito acima, a atividade da COMT pode alterar os níveis de dopamina em córtex frontal e esta área está relacionada a outros transtornos psiquiátricos (161). Assim, alterações na COMT podem levar a apresentações fenotípicas distintas. Estudos já demonstraram associação positiva entre o gene da COMT e esquizofrenia (162-164); anorexia nervosa (165, 166) e presença de psicose na Doença de Alzheimer (167). Também houve associação entre polimorfismos no *COMT* e maior agressividade/hostilidade em portadores de esquizofrenia (143, 168) ou tentativa de suicídio violenta (169) e maior sensibilidade à dor crônica (170).

Também a resposta ao tratamento farmacológico do TOC já foi avaliada em relação ao polimorfismo rs4680 do *COMT*. Um estudo recente encontrou que 48% dos pacientes com TOC que responderam a um ensaio de 10 semanas de tratamento com citalopram (até 60mg) eram portadores do genótipo L/L, o que foi significativamente diferente quando comparado aos não respondedores ($\chi^2 = 10,06$; $df = 2$; $P = 0,007$)(171). Este resultado corrobora a interação entre mecanismos dopaminérgicos e serotoninérgicos na manifestação da sintomatologia do TOC.

1.6 Revisão sistemática dos estudos de associação entre *COMT* e TOC

Diversos estudos investigaram o papel do polimorfismo Val158Met ou rs4680 do *COMT* no desenvolvimento do TOC (tabela 8). Um deles foi realizado por um grupo da USP (41) envolvendo 79 probandos com TOC e 202 controles, não encontrando associação entre o polimorfismo rs4680 e o TOC. Esse estudo, assim como os demais estudos envolvendo o gene da *COMT* e TOC, teve como limitações o não pareamento dos casos e controles pela etnia e o pequeno tamanho amostral.

Tabela 8: Estudos de associação genética entre o gene da catecol O-metiltransferase e o transtorno obsessivo-compulsivo.

<i>Tipo de estudo</i>	<i>População</i>	<i>Fenótipo</i>	<i>Amostra Casos/controles</i>	<i>Resultados</i>	<i>Referências</i>
CC	Sul-Africana branca	Colecionismo	298/307	NS	(172)
CC	Israelense	TOC + EQZ	113 TOC + EQZ / 79 TOC/ 171 controles	NS	(173)
CC	Norte-Americana branca	TOC	73/148	Genótipo A/A (Met/Met) e alelo A (Met) como fator de risco para TOC em homens (P=0,0002)	(174)
BF	Norte-Americana branca	TOC	110 famílias	Alelo A (Met) como fator de risco para TOC em homens (P=0,008)	(114)
BF	Canadense + Norte-Americana	TOC	67 famílias	Homozigozidade para ambos alelos como fator de risco para TOC (P=0,006)	(175)
CC	Sul-africana branca	TOC	54/54	Heterozigozidade como fator de risco para TOC (P=0,002)	(176)
BF	Israelense+ Francesa+ Norte-Americana	TOC	56 famílias	Alelo A (Met) como fator de risco para TOC em mulheres (P=0,048)	(177)
CC	Japonesa	TOC	17/35	NS	(178)
CC	Turca	TOC	59/114	NS	(179)
CC	Brasileira	TOC	79/202	NS	(41)
CC	Holandesa	TOC	320 casos	Genótipo A/A (Met/Met) protege contra a dimensão Tabu do TOC (P=0,06)	(180)
CC	Holandesa+Norte-Americana	TOC	373 / 462	Maior frequência do alelo A (Met) em mulheres do grupo controle	(181)
CC	Holandesa	TOC	87/ 327	Maior frequência do alelo A (Met) em homens com TOC	(182)
BF	Chinesa	TOC	103 trios	NS	(71)
CC	Holandesa	TOC	159/151	Associação entre Met e homens com TOC (P=0,035)	(67)

Legenda: COMT - Catecol O-metiltransferase, TOC: transtorno obsessivo-compulsivo, BF: baseado em família; C/C: caso/controle; YBOCS: Escala Yale-Brown de sintomas obsessivo-compulsivos; Val: valina; Met: metionina; EQZ: esquizofrenia; NS: não-significativo

Dos quinze estudos de associação entre *COMT* e TOC encontrados nesta revisão, a maioria usou o desenho caso-controle. Apenas quatro estudos foram baseados em famílias. Quanto aos resultados: seis estudos não encontraram associação. Um estudo não encontrou associação entre *COMT* e TOC, mas observou,

na análise secundária, o genótipo A/A (Met/Met) conferindo proteção para a dimensão de sintomas obsessivos de "tabu". Os demais estudos tiveram resultados discordantes. Apenas dois estudos encontraram associação para a amostra total de portadores de TOC: um caso-controle encontrou associação com o genótipo G/A (Val/Met) e outro estudo, baseado em famílias, encontrou associação entre o TOC e os outros dois genótipos A/A e G/G. Três estudos encontraram associação entre o alelo A (Met) e o TOC apenas em homens e dois estudos encontraram associação entre o mesmo alelo e o TOC apenas em mulheres. A maioria dos estudos tipo caso-controle não realizou genotipagem para etnia, havendo o risco de viés por estratificação populacional. Apenas quatro estudos foram baseados em famílias, também com achados discordantes.

Isto posto, mesmo que o *COMT* tenha uma participação na etiologia do TOC, os resultados dos estudos de associação entre este gene e o TOC não convergem para uma conclusão, seja devido à estratificação populacional relacionada ao desenho caso controle, seja devido ao pequeno poder estatístico de cada estudo individual (dado o pequeno tamanho amostral de cada estudo).

Continuando a investigação sobre a associação entre o polimorfismo do *COMT* e o TOC, foi feito um estudo de associação original com 83 trios brasileiros, descrito a seguir (seção 1.6). Este foi mais um passo em direção ao agrupamento de informações para a meta-análise que é o estudo principal desta tese (seção 4.2).

1.7 Estudo original de associação entre o gene da COMT e o TOC

1.7.1 Introdução

Como um segundo passo na preparação para a presente tese, foi feito um estudo original de associação (183) com 83 trios de portadores de TOC (51 deles captados no ambulatório do PROTOC, Instituto de Psiquiatria da Faculdade de Medicina da Universidade São Paulo e 32 deles do Serviço de Psiquiatria da Universidade de Pernambuco). Destes, 73 eram trios informativos (com pais heterozigotos).

1.7.2 Métodos

Este estudo seguiu as orientações da declaração de Helsinque e todos os participantes ou seus responsáveis legais forneceram seu consentimento assinado. Os participantes foram avaliados usando a apostila de primeiro atendimento do PROTOC, com metodologia já publicada (184).

Resumidamente, para a avaliação diagnóstica foram utilizados os instrumentos Entrevista Clínica Estruturada para Transtornos Psiquiátricos do Eixo I (*Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders, Clinician Version-SCID*)(185) para sujeitos a partir dos 16 anos, ou o Questionário para Transtornos Afetivos e Esquizofrenia para Crianças de Idade Escolar, versão atual e ao longo da vida (*Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia for School age Children - K-SADS - PL*)(186) além da Escala de Sintomas Obsessivo-Compulsivos Yale-Brown (*Yale-Brown Obsessive-Compulsive Scale - YBOCS*) (187). O ácido desoxi-

ribo-nucleico (DNA) foi extraído de amostras de sangue usando a técnica “salting out”(188). Onze polimorfismos do *COMT* (**rs4680 ou Val158Met**, rs737866, rs933271, rs1544325, rs5993883, rs740603, rs13306281, rs2239393, rs4646316, rs165774, rs9332377) foram genotipados na Unidade de Genética Psiquiátrica e do Neurodesenvolvimento do Hospital Geral de Massachusetts, um hospital escola associado à Universidade de Harvard (Boston, Massachusetts, Estados Unidos) como parte de um trabalho de colaboração para estudos em genética (76). A genotipagem foi feita por uma equipe cega para o estado de afetado do sujeito, em uma placa de 384 poços, com a plataforma Sequenom MassARRAY (Sequenom, San Diego, CA, USA).

O Teste de desequilíbrio de transmissão (TDT) foi realizado para os SNPs com o programa PLINK, também desenvolvido pelo grupo da Universidade de Harvard (189, 190), e a análise de haplótipos foi feita usando o programa Haploview 3.32 (191).

1.7.3 Resultados

Três marcadores no gene da *COMT* (rs2239393, rs13306281 e rs1544325) foram excluídos por não cumprir os critérios de controle de qualidade. Os outros oito SNPs estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE).

Nenhum dos 8 SNPs ou 2 haplótipos foi associado à presença do TOC (Figura 6). O alelo A (Met) do SNP rs4680 (Val158Met) apresentou 34 transmissões e 37 não-transmissões dos pais heterozigotos para os filhos afetados (OR:0,919; χ^2 :0,127; P= 0,7218), também não mostrando associação com TOC mesmo quando as amostras de probandos do sexo feminino (OR:0,8; χ^2 : 0,444; P=0,505) e

Legenda: Block: bloco haplotípico; kb: kilobase; P= valor de P; rs4680: polimorfismo Val158Met

A figura representa a posição dos polimorfismos estudados (rs) ao longo do gene e abaixo dos seus nomes, o valor de P para o teste de associação (TDT) entre cada polimorfismo e o TOC. O triângulo invertido é composto por quadrados de tonalidades diferentes, sendo que os mais escuros representam maior desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos, isto é, maior chance deles serem transmitidos juntos, o que forma os blocos haplotípicos. Foram encontrados dois blocos de haplótipos, nomeados *Block 1* e *Block 2* e no topo da figura encontra-se descrito o valor de P para o teste de associação (TDT) entre cada combinação de alelos (haplótipos) e o TOC.

1.7.4 Conclusão do estudo original

Os polimorfismos e haplótipos do *COMT* avaliados neste estudo não foram associados ao TOC, TOC subclínico, transtornos do espectro obsessivo-compulsivo ou ao TOC em comorbidade com transtornos de tiques. O pequeno tamanho amostral e o baixo poder estatístico podem explicar tais resultados.

1.8 Síntese crítica e fundamentos que justificam esta tese.

Como a maioria dos estudos de associação em TOC tem amostras pequenas, sua credibilidade depende da capacidade em controlar viéses. As meta-análises, ao combinar amostras de diferentes estudos, podem aumentar o poder estatístico e oferecer estimativas mais precisas. Entretanto, estas também envolvem riscos de

portarem viéses de diferentes modalidades (193).

Existem na literatura até o momento 3 meta-análises neste tema. A primeira delas (194) incluiu três estudos caso-controle (174, 195, 196) totalizando 144 casos e 337 controles, três estudos de famílias (175, 197, 198) e um estudo de família não publicado (199), totalizando 269 probandos (1288 indivíduos genotipados) e não encontrou associação significativa entre o polimorfismo rs4680 e o TOC. Algumas limitações desse estudo foram incluir apenas estudos publicados na língua inglesa e o tamanho amostral limitado, mesmo com a amostra combinada (Categoria B segundo *montante de evidência*- vide seção V.3.1.).

Outra meta-análise, com estudos caso-controle, publicados em língua inglesa, encontrados após uma busca no Medline (n=1908 indivíduos), encontrou associação entre TOC e o alelo Met em homens, mas não em mulheres (182).

Recentemente, uma terceira meta-análise (200), que incluiu estudos do tipo caso-controle (n=2192 indivíduos) e estudos baseados em família (n=307 trios; total de 3113 indivíduos genotipados), também encontrou associação entre *COMT* e TOC apenas na amostra masculina. Esta meta-análise foi precedida por uma revisão sistemática, porém incluiu apenas artigos publicados. Apesar de incluir a maior amostra combinada, este estudo ainda se encaixa na categoria B de montante de evidência, segundo o protocolo interino de Veneza (201) que significa que menos de 1000 indivíduos portadores do genótipo mais raro foram incluídos no estudo (vide seção 4.1.5.).

A fim de minimizar potenciais viéses em revisões sistemáticas e meta-análises em genética, surgiu a rede de Epidemiologia Genética Humana (HuGE), uma iniciativa do Departamento de Genômica em Saúde Pública do Centro de Controle e

Prevenção de Doenças do governo do Estados Unidos da América (202). Nenhuma das meta-análises prévias seguiu este método.

Resumidamente, o protocolo HuGE de revisão sistemática preconiza uma busca ampla em diversas bases de dados (são recomendadas ao menos Pubmed, ISI Science Citation Index, EMBASE e BIOSIS), sem determinar limites ou filtros na busca, inclusive para idioma. Adicionalmente deve haver uma busca de literatura cinza ou fontes de literatura que geralmente não são indexadas em bases de dados. Sob a denominação de literatura cinza se incluem teses e trabalhos de ascensão em todos os níveis da educação superior, resumos de conferências, livros, resumos de pôsteres, relatos técnicos e revistas não indexadas que não possam ser encontradas em buscas eletrônicas, escritas geralmente, mas não sempre, em idiomas distintos ao inglês (203). Além disso a lista de referências de revisões e dos artigos mais relevantes encontrados deve ser avaliadas e estudos não publicados devem ser incluídos na revisão.

A seleção dos artigos segue o método sistemático, exigindo a busca em diversas bases de dados, avaliação independente dos estudos por dois investigadores, contato com os autores para esclarecimentos e para busca de trabalhos não publicados. A meta-análise deve excluir amostras superpostas e o viés de publicação e heterogeneidade devem ser avaliados, inclusive pelo teste I^2 . A análise de sensibilidade deve ser realizada para avaliar o impacto de cada estudo na meta-análise especialmente daqueles que se desviam do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE). Além disso, sugere-se avaliações adicionais de variância entre estudos como metarregressão.

O protocolo HuGE está disponível integralmente na internet

(http://www.medicine.uottawa.ca/public-health-genomics/web/assets/documents/HuGE_Review_Handbook_V1_0.pdf).

Outra limitação das meta-análises com estudos de associação entre *COMT* e TOC se refere à ausência de controle do viés de estratificação populacional. Por exemplo, foram incluídos estudos tipo caso-controle, com amostras provenientes de diversos grupos populacionais. A maioria dos estudos não fez genotipagem para etnia e as meta-análises não avaliaram a etnia como uma variável de confusão.

Estudos de associação baseados em famílias são uma alternativa para minimizar o viés de estratificação populacional. Diante disso, nesta tese, optamos por fazer uma meta-análise incluindo apenas estudos baseados em família para verificar se controlando para o risco de viés de estratificação populacional chegar-se-ia aos mesmos resultados.

Um obstáculo deve ser vencido em uma meta-análise com estudos de associação baseados em famílias; para cálculo da meta-análise são utilizadas a razão de chances, erro padrão e seus logaritmos. Nos estudos de associação tipo caso-controle a razão de chances é calculada e apresentada nos resultados, juntamente com o intervalo de confiança. Para os estudos de associação baseados em famílias é utilizado o teste de desequilíbrio de transmissão que dá resultados em qui-quadrado, portanto deve ser recalculada a razão de chances a partir dos dados de transmissão e não transmissão dos alelos (204, 205).

Uma estratégia usada é a de converter estudos baseados em famílias em estudos caso-controle, considerando os pais como controles e os probandos como casos. No entanto, esta estratégia não é adequada, uma vez que casos e controles não

podem ser relacionados e o mais adequado é utilizar as frequências de transmissão e não transmissão dos alelos para cálculo da razão de chances.

A abordagem bayesiana também pode ser usada em meta-análises em genética. Na análise bayesiana, os parâmetros seguem uma distribuição de probabilidade e o conhecimento sobre eles (antes de receber os dados) é resumido em uma distribuição *a priori* $\pi(\theta)$ (206). Na análise bayesiana, a verossimilhança dos dados y observados na amostra, dado o parâmetro populacional θ , são usados para modificar a hipótese *a priori* $\pi(\theta)$. O conhecimento atualizado é resumido na densidade *a posteriori* $\pi(\theta/y)$ (206).

Pode ser incluído neste *a priori*, a evidência acumulada, de estudos científicos prévios, sobre um parâmetro. Mas, em meta-análises, pode ser difícil de construir um *a priori* informativo com o conhecimento existente (206).

O método bayesiano ajusta a meta-análise para viés de publicação e permite a inclusão de covariáveis na análise (207). Além disso, ela favorece uma interpretação mais natural de intervalos de parâmetros, aqui chamados intervalos de credibilidade (207).

Até onde conhecemos, não há relato na literatura de meta-análise sobre a associação entre *COMT* e TOC que tenha utilizado o método *HUGE* e a abordagem bayesiana.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo primário - Realizar uma meta-análise com os dados de estudos selecionados em uma revisão sistemática da literatura sobre estudos de associação baseados em famílias, envolvendo o polimorfismo rs4680 do gene da catecol O-metiltransferase e o transtorno obsessivo-compulsivo, utilizando o protocolo internacional do HuGE.

2.2 Objetivo secundário - Comparar os resultados da meta-análise convencional com os da meta-análise realizada por método bayesiano.

3. HIPÓTESES

H0: A hipótese nula é de que não haverá transmissão preferencial do alelo de baixo funcionamento (A ou Met) do polimorfismo Val158Met (rs4680) do *COMT* para os probandos com TOC na amostra combinada.

H1: A meta-análise dos estudos de associação baseados em famílias evidenciará uma transmissão preferencial do alelo de baixo funcionamento (A ou Met) do polimorfismo Val158Met (rs4680) do *COMT* para os probandos com TOC.

4. MÉTODOS

4.1 Revisão sistemática da literatura.

Esta revisão sistemática é mais específica que a apresentada na introdução. Ela seguiu as diretrizes do HuGE (202) (www.cdc.gov/genomics) para revisões sistemáticas e meta-análise em genética humana e incluiu apenas estudos de associação baseados em famílias com a finalidade de melhor controlar o viés de estratificação populacional.

4.1.1 Critérios de inclusão dos estudos:

Estudos de associação baseados em famílias envolvendo o polimorfismo Val158Met (rs4680) do *COMT* e o transtorno obsessivo-compulsivo.

Os estudos deveriam:

- Ter trios com probandos que preenchessem critérios completos segundo DSM III, DSM III-R, DSM IV, DSM IV TR, CID 9 ou CID 10 para TOC.
- Terem sido executados em qualquer país e apresentados em qualquer idioma. Tradutores nativos foram consultados quando necessário.
- Serem trabalhos originais, publicados ou não publicados, no formato de artigos, pôsteres, conferências ou aulas apresentadas em eventos científicos; teses ou dissertações. Revisões da literatura seriam pesquisadas com o objetivo de encontrar possíveis trabalhos adicionais nas suas listas de referências bibliográficas ou citações.

4.1.2 Critérios de exclusão dos estudos

- Caso houvesse trabalhos que compartilhassem amostras, seria incluído apenas aquele trabalho com maior número amostral. Dados de possível compartilhamento de amostra foram esclarecidos através de contato com o autor.
- Estudos que determinassem apenas colecionismo como fenótipo de interesse foram excluídos, dadas as características específicas desta dimensão em comparação com as outras apresentações do TOC.
- Caso o TOC não fosse o diagnóstico primário e sim uma comorbidade avaliada em portadores de outras doenças (Síndrome Velocardiofacial, Esquizofrenia), o estudo seria excluído.

4.1.3 Métodos de busca:

Os descritores foram selecionados através da base de dados MeSH (*Medical Subject Headings*) do Pubmed, sendo incluídos todos os sinônimos separados pelo termo “OR” a fim de aumentar a sensibilidade da busca na primeira etapa, como descrito abaixo:

1: "*Disorder, Obsessive-Compulsive OR Disorders, Obsessive-Compulsive OR Obsessive Compulsive Disorder OR Obsessive-Compulsive Disorders OR Neurosis, Obsessive-Compulsive OR Neuroses, Obsessive-Compulsive OR Neurosis, Obsessive Compulsive OR Obsessive-Compulsive Neuroses OR Obsessive-Compulsive Neurosis OR OCD*"

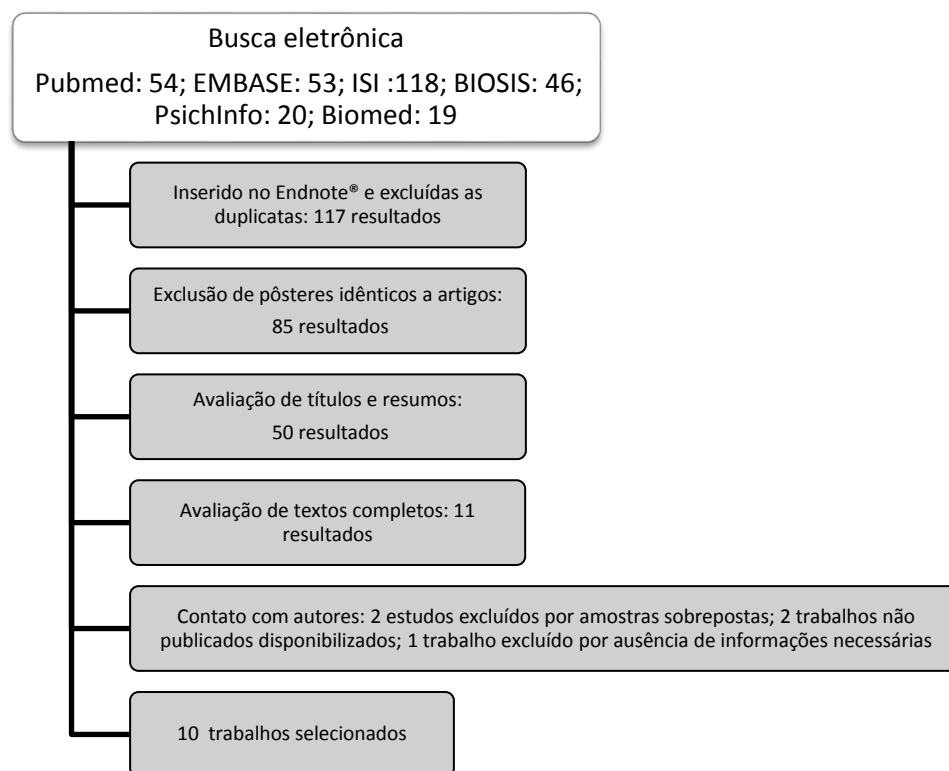
2: “*O-Methyltransferase, Catechol OR Catechol Methyltransferase OR Methyltransferase, Catechol OR Catechol-O-Methyltransferase OR Catechol O Methyltransferase OR COMT*”

3: “*Gene*”

A busca contemplou os artigos publicados até 03 de junho de 2012. Estes termos (1, 2 e 3) foram pesquisados separadamente e os resultados de cada uma das buscas foi combinado usando o termo “AND”. Essa busca foi repetida de forma idêntica em cada uma das bases de dados. Na base “*Pubmed*” foram encontrados 54 resultados; na “*ISI of Knowledge*”, 118 resultados; na “*BIOSIS preview*”, 46 resultados; na “EMBASE”, 53 resultados; na “*PsychInfo*”, 20 resultados; na “*Biomed central*”, 19 resultados.

Todos os resultados (310 referências) foram adicionados no programa de gerenciamento de referências bibliográficas Endnote ®, no qual, as referências idênticas (em duplicata) foram descartadas, resultando em 117 referências (Figura 7).

Figura 7: Fluxograma de seleção de artigos na revisão sistemática



Em seguida, por meio da avaliação de títulos e resumos pelo autor desta tese, foram excluídas referências de pôsteres apresentados em congressos, simpósios ou encontros científicos cujos resumos fossem idênticos a resumos de artigos publicados, resultando em 85 referências.

Posteriormente, os títulos foram avaliados por dois investigadores e descartados na avaliação inicial quando claramente não preenchiam critérios de inclusão, resultando em 50 títulos/resumos que não puderam ser rejeitados com alto grau de certeza. Os textos completos e dados suplementares destas 50 referências foram obtidos para avaliação por dois investigadores independentes. Um terceiro investigador avaliou os textos para os quais havia discordância quanto à sua inclusão. Nesta etapa, estudos de revisão e estudos de associação do tipo caso-controle foram

excluídos após avaliação de trabalhos adicionais na lista de referências bibliográficas. Também nesta fase, foi feita uma busca no Google[®] sem achados adicionais relevantes. Dezesete estudos (71, 181, 192, 194, 197, 198, 205, 208-217) e um trabalho não publicado (199) foram selecionados nesta etapa.

Os investigadores foram contatados por correio eletrônico para esclarecer a elegibilidade dos seus estudos para a revisão, a presença de amostras superpostas e disponibilidade de estudos não publicados (Anexo E). Os autores foram ainda questionados quanto à disponibilidade de trabalhos não publicados para inclusão na meta-análise. Oito estudos foram excluídos nesta etapa: um deles foi excluído por não ter probandos com diagnóstico primário de TOC (215), outro por ser apenas o título de uma conferência apresentada em congresso, sem informações adicionais (214), quatro deles por se tratar de revisões da literatura (194, 208, 211, 216), dois deles por serem estudos do tipo caso-controle (181, 212) e um deles por não ser estudo de associação com o polimorfismo rs4680 (217). Dois trabalhos não publicados foram disponibilizados após contato com os autores (Veenstra-Vanderweele e OCF MINI Collaborative Subgroup).

Ao final de todas as etapas, dez estudos foram selecionados: cinco artigos publicados em revistas científicas indexadas (177, 198, 205, 213, 218), três pôsteres apresentados em congressos e publicados como resumo em revistas indexadas (192, 209, 210), dentre os quais o nosso estudo original apresentado nesta tese e dois trabalhos não publicados foram incluídos nessa revisão (199, 219).

4.1.4 Coleta de Dados

Os dados dos dez estudos selecionados foram extraídos por dois investigadores independentes, utilizando um formulário para extração dos dados (Anexo F). Os dados incluídos no formulário foram: área geográfica de origem da amostra e subgrupos étnicos incluídos (definidos como: ancestralidade caucasiano-europeia, latina, asiática, africana ou mista), frequências dos genótipos, frequências dos alelos transmitidos e não transmitidos, média de idade dos probandos, proporção de indivíduos do sexo masculino e feminino na amostra e, caso a associação tenha sido calculada de forma independente para cada sexo, a contagem de alelos transmitidos e não transmitidos para cada sexo foi também listada. Também foi extraída informação quanto aos métodos de genotipagem, método de leitura dos genótipos, equilíbrio de Hardy-Weinberg e se os membros da equipe de laboratório eram cegos para a presença de TOC nos sujeitos.

Ao final, os dados extraídos foram comparados para conferir a confiabilidade e foi obtido consenso por discussão.

4.1.5 Avaliação da qualidade dos estudos

A qualidade metodológica dos estudos foi avaliada independentemente por dois investigadores, de acordo com critérios pré-definidos (Anexo G), baseados em meta-análises prévias (220, 221) e nos critérios do HuGE (193). Os escores, que variaram de 0 (mais baixo) a 10 (mais alto), foram utilizados como covariável na metarregressão (Anexo G).

Ao final do estudo, com o objetivo de interpretar o montante de evidência em estudos de associação entre *COMT* e TOC encontrados na literatura, foi aplicado o

Protocolo Interino de Veneza (201) para avaliação de revisões e meta-análises em genética. Este protocolo foi estabelecido para determinar a credibilidade da evidência acumulada relacionada ao tema. Resumidamente, este protocolo usa três critérios principais:

Montante de Evidência: notas A, B e C foram definidas com base no tamanho da amostra, levando em conta a frequência do genótipo mais raro do polimorfismo. Neste caso, o número de indivíduos na amostra (casos + controles) com o genótipo Met/Met. Para nota A é necessária amostra de mais de 1.000 indivíduos homozigotos para o alelo Met na amostra; B corresponde a um número entre 100 e 1.000 indivíduos homozigotos para Met e nota C é dada quando menos de 100 indivíduos homozigotos para o alelo menor (Met) foram genotipados.

Replicação dos resultados: a nota A é dada para replicação extensiva incluindo pelo menos uma meta-análise bem conduzida com mínima inconsistência entre estudos (I^2); Nota B para replicação com ao menos uma meta-análise com algumas limitações metodológicas ou inconsistência entre estudos (I^2) moderada; Nota C se não for encontrada associação ($P < 0,05$); se não houver replicação independente ou se houver falha na tentativa de replicar a associação; estudos dispersos; meta-análises enviesadas ou com grande inconsistência.

Proteção contra viés: a nota A é dada quando o viés por avaliação fenotípica ou genotípica, confundidores (como a estratificação populacional), publicação seletiva (para meta-análises) ou outros podem ser julgados como não sendo importantes e não invalidando a presença de associação. A nota B seria dada quando não existir viés óbvio que afete a presença de associação, mas não houver informação suficiente para avaliar os reais riscos de viés. A nota C seria dada quando

houver chance considerável de viés ou viés demonstrável que possa afetar a presença ou ausência de associação.

Informações adicionais podem ser obtidas com mais detalhes no Protocolo Interino de Veneza publicado (201).

4.2 Meta-análise

4.2.1 Meta-análise convencional

Para a aplicação do procedimento de meta-análise foram levantados os dados dos estudos selecionados pela revisão sistemática descrita. Para cada estudo selecionado o tamanho de amostra (n), com os respectivos número de alelos L (Met) transmitidos (t1), número de alelos H (Val) transmitidos (th), número de alelos L não transmitidos (u1) e número de alelos H não transmitidos (uh) foram avaliados a fim de obter a razão de chances (OR) e o intervalo de confiança (I.C.95%). Para obter a estimativa da medida metanalítica, mostrada no gráfico *Florest plot*, a análise foi realizada após a transformação logarítmica dos OR, mediante a aplicação da expressão matemática

$$\log OR = \log[(t1/th)/(u1/uh)] \quad (1)$$

com o respectivo erro-padrão

$$se \log OR = \sqrt{[(1/t1)+(1/th)+(1/u1)+(1/uh)]} \quad (2)$$

obtido pelo método de Woolf (222). Assim, foi possível comparar a chance de transmissão com a de não transmissão dos alelos. Todas as análises foram realizadas com o programa STATA V.11 e adotou-se o nível de significância de 0,05 ($P \leq$

0,05). Nas seções seguintes serão apresentados os procedimentos de diagnóstico (Testes para viés de publicação, Heterogeneidade, Análise de Sensibilidade e Metarregressão) aplicados após a realização da meta-análise.

Testes para viés de publicação

Uma das preocupações ao realizar uma meta-análise é se a publicação seletiva pode levar a viés nos resultados meta-analíticos. O viés de publicação é mais provável quando os estudos incluídos na meta-análise foram selecionados através de uma busca exclusiva da literatura publicada. Particularmente, se os resultados influenciam a possibilidade de publicação, por exemplo, se estudos com grande número amostral e resultados positivos tem maior chance de publicação.

O teste de correlação de postos ajustados de Begg e Mazumdar (223) e o teste de regressão assimétrica de Egger (224) foram aplicados para a detecção de possível viés de publicação. O teste de Begg e Mazumdar correlaciona o tamanho de efeito padrão com a variância da amostra usando o procedimento de correlação de postos de Kendall e obtém um valor de p . Esse teste possibilita o teste da hipótese de existência de viés de publicação, mediante a correlação de postos ajustados e da visualização gráfica (Gráfico Funil) da distribuição dos estudos segundo as estimativas de efeito padrão com a variância. Enquanto isso, o teste análogo de Egger permite a detecção de possível assimetria ao verificar se o intercepto da reta de regressão estimada se desvia significativamente do zero ao regredir-se o efeito padronizado versus a sua precisão.

Desta forma, a ausência do zero no intervalo de confiança de 95% indicaria a assimetria no gráfico o que apontaria para o potencial viés de publicação.

Em resumo, os testes de viés de publicação tem por motivação a observação de que, sob o pressuposto de um efeito subjacente diferente de zero e ausência de viés, os estudos pequenos teriam tanto precisão próxima à zero, uma vez que a precisão é uma função dependente de tamanho de amostra, quanto o efeito padrão próximo à zero (divisão por um ‘grande’ erro padrão correspondente).

Por outro lado, os estudos grandes teriam tanto grande precisão quanto grande efeito padrão (pela divisão por um erro padrão ‘pequeno’). Assim, os efeitos padrões iriam aparecer ao longo da linha de regressão, em direção à origem, com uma inclinação que estima tanto tamanho quanto direção do efeito subjacente. Desta forma, o tamanho do intercepto (ou coeficiente linear, que significa o valor que y assume quando x é igual a zero) dá uma medida de assimetria: quanto maior o desvio do zero, maior a assimetria (225), revelando o viés de publicação e assimetria dos estudos pequenos, ao diferirem sistematicamente dos grandes estudos. Uma correlação significativa é interpretada como um forte indício de viés de publicação. Este teste deve ser interpretado com cautela, visto que seu poder é relacionado ao número de estudos incluídos (225).

Teste de Heterogeneidade

Metodos gráficos são importantes em checar e explorar potenciais fontes de heterogeneidade, dentre os quais o método de Galbraith é o mais indicado. Dado que $\hat{\theta}_i$ é o efeito estimado de tratamento de um estudo i , a posição de cada estudo no eixo horizontal dá uma indicação do peso de cada estudo na meta-análise. O eixo vertical dá a contribuição de cada estudo na estatística Q , que significa a distância entre cada ponto dos estudos e a linha de regressão igual a q_i^2 , onde:

$$q_i^2 = w_i(\hat{\theta}_i - \bar{\theta})^2, \text{ e } Q = \sum q_i^2. \quad (3)$$

Pontos fora da margem de confiança são aqueles com maior contribuição para heterogeneidade. O teste Q de heterogeneidade é calculado computando o desvio de cada tamanho de efeito da média, elevado ao quadrado e ponderado pelo inverso da variância do dado estudo; e a soma destes valores de todos os estudos leva a soma ponderada dos quadrados ou Q. Isto significa que o tamanho de efeito real varia entre os estudos e a inclusão de estudos pequenos contribui para o aumento da variância entre estudos e para a heterogeneidade (226). Pela baixa sensibilidade deste teste, é recomendado estabelecer o nível de significância (valor de P) em 0,10 ou 0,20, em vez de 0,05 convencionalmente estabelecido.

A inconsistência entre os estudos incluídos na meta-análise foram avaliadas com o teste I^2 de heterogeneidade:

$$I^2: (Q-df)/Q. \quad (4)$$

Trata-se de uma medida que estimar o quanto da proporção da variância é real ou qual a proporção da dispersão é devido à heterogeneidade. O teste I^2 tem a vantagem de ser uma medida absoluta, na mesma escala do tamanho de efeito e não é afetado pelo número de estudos incluídos. Os resultado do I^2 podem ser interpretados como: $I^2 < 25\%$ - pouca evidência de inconsistência entre os estudos; I^2 entre 25% e 50% - possível presença de inconsistência; $I^2 > 50\%$ - aponta presença de inconsistência entre os estudos.

Análise de sensibilidade

Para avaliar a influência dos estudos individuais sobre a estimativa do efeito metanalítico foi realizada análise de sensibilidade. Essa análise consistiu em nove

meta-análises, nas quais foi computado o efeito metanalítico omitindo-se um estudo de cada vez.

Metarregressão

Uma regressão logística foi realizada usando como covariáveis: grupo étnico da amostra do estudo, frequência de probandos do sexo feminino e uma nota baseada na qualidade do estudo. A qualidade dos estudos foi avaliada determinando-se um escore para a qualidade dos métodos descritos e o risco de viés. Os critérios de avaliação foram modificados de meta-análises prévias (220, 221), baseados nos parâmetros de avaliação de qualidade dos estudos descritos no HuGE (202). O escore variou entre 0 e 10. Foram avaliados os critérios: representatividade dos casos, método de avaliação fenotípica, método de avaliação do genótipo – se os trabalhadores de laboratório eram cegos para as características dos sujeitos (afetado ou não afetado), equilíbrio de Hardy-Weinberg, e método de análise estatística - se foram adotadas medidas para minimizar o viés de múltiplas testagens, se foram excluídos trios que não tiveram taxa mínima de genotipagem maior que 75%, frequência do alelo menor (MAF) superior a 2% ou ausência de erros mendelianos (Anexo G).

4.2.2 Meta-análise bayesiana

Para representar a falta de informação sobre um determinado estado de natureza (ou o valor de um parâmetro) usa-se uma distribuição *a priori* não informativa, em nosso caso a distribuição uniforme no intervalo (0;1). Esta distribuição representa nossa total incerteza sobre o valor verdadeiro da proporção de

determinado atributo, no nosso caso de transmissões dos alelos G a A do rs4680 do *COMT*. A função operacional usada em nossos cálculos para obter-se a distribuição *a posteriori* é a unidade, em todos os pontos do intervalo unitário. Desta forma, a densidade *a posteriori* será obtida pela normalização da função de verossimilhança. Isto é, calculamos a área sob a função de verossimilhança e a usamos como a constante de normalização para que a função obtida se torne uma função de densidade de probabilidade. Em geral, os valores dos parâmetros são desconhecidos e podem ser inferidos por dados ou quantidades observáveis, tais como as frequências de transmissão dos polimorfismos. Dado o modelo de probabilidade $p(y|\pi)$, parta o qual y é a observação amostral e π o parâmetro de interesse, após a observação de y , esta é uma função apenas deste parâmetro π , desconhecido e de interesse. Para que p se torne uma função de probabilidade calculamos a área, a , sob esta função e consideramos a função de densidade obtida como:

$$f(\pi|y) = p(y|\pi) \div a. \quad (5)$$

Esta é a função *a posteriori* usada nos nossos cálculos a seguir.

Com o objetivo de definirmos um modelo bayesiano de meta-análise, definimos a verossimilhança de cada um dos estudos. Denotemos por T o número de vezes que um determinado alelo foi transmitido e por U o número de vezes que este alelo não foi transmitido. A verossimilhança neste caso é representada por:

$$p(U,T|p) = p^T(1-p)^U \quad (6)$$

Normalizando esta função iremos obter a função de densidade Beta com parâmetros $T+1$ e $U+1$ definida como:

$$f(\pi|U,T) = (T! \times U!) \pi^T(1-\pi)^U \div (T+U+1)! \quad (7)$$

Lembremos que $X!$ é o fatorial de X , por exemplo: $5!=1\times 2\times 3\times 4\times 5$, e que a função f é definida para todo valor de π entre 0 e 1.

Em resumo, como a família de densidades Beta é rica em formas funções simétricas, assimétricas, constante, dispersas e concentradas, é usada para representar nossas opiniões sobre uma proporção π . Diante da ignorância *a priori* sobre π (representada por uma Beta com parâmetros $\mathbf{a}=1$ e $\mathbf{b}=1$ ou equivalentemente pela densidade uniforme), a densidade *a posteriori* de p seria uma Beta com parâmetros $\mathbf{A}=\mathbf{U}+1$ e $\mathbf{B}=\mathbf{T}+1$.

Caso as observações \mathbf{U} e \mathbf{T} assumam altos valores, possivelmente teríamos problemas de precisão ao trabalharmos com as densidades Beta definidas acima. Para evitar problemas de precisão, a aproximação para a distribuição Logística-Normal foi usada. Isto é, se no lugar de π , trabalharmos com a transformação logarítmica da razão de chances (*Odds Ratio*, OR):

$$\lambda = \ln[\pi/(1-\pi)] \quad (7)$$

o problema com a precisão desaparece. Adotar o modelo Logístico-Normal corresponde a dizer que os LogOR tem *a posteriori* uma distribuição normal. Mais precisamente:

$$\lambda = \ln[p/(1-p)] \quad (8)$$

tem distribuição normal com média $\mathbf{m}=\mathbf{Di}(\mathbf{a})-\mathbf{Di}(\mathbf{b})$ e variância $\mathbf{v}=\mathbf{Tri}(\mathbf{a})+\mathbf{Tri}(\mathbf{b})$, \mathbf{Di} para a função Digamma e \mathbf{Tri} para a função Trigamma. Assim, a densidade *a posteriori* de λ é normal com média $\mathbf{m} = \mathbf{Di}(\mathbf{T}+1)-\mathbf{Di}(\mathbf{U}+1)$ e variância $\mathbf{v} = \mathbf{Tri}(\mathbf{T}+1)+\mathbf{Tri}(\mathbf{U}+1)$.

Como todas as variáveis são conhecidas apresentamos as distribuições de cada estudo. A média ponderada dessas distribuições é a distribuição metanalítica. As médias foram ponderadas pelo tamanho das amostras.

Foi adotado o mesmo procedimento avaliando as amostras masculina e feminina de cada um dos estudos, separadamente.

5. RESULTADOS

5.1. Resultados da Revisão Sistemática

Ao final de todas as etapas, dez estudos foram selecionados: cinco artigos publicados em revistas científicas indexadas (71, 177, 198, 205, 213), três pôsteres apresentados em congressos e publicados como resumo em revistas indexadas - um deles sendo o nosso estudo original realizado com 83 trios brasileiros (192, 209, 210) - e dois trabalhos não publicados (199, 219) (tabela 9). Dos dez estudos, um deles não disponibilizou a informação do número de transmissões (205), não sendo incluído na meta-análise. O estudo não publicado do OCF-MINI apresentava uma pequena superposição de amostras com o estudo de Schindler et al (213). Por meio de contato com os autores e uma vez que o estudo OCF-MINI disponibilizou dados individuais dos sujeitos, foi possível excluir dados dos sujeitos que haviam participado de ambos estudos a fim de incluir os dois estudos na meta-análise sem o risco de superposição de amostras. Os demais estudos apresentaram critérios suficientes para a inclusão na meta-análise.

5.1.1 Apresentação dos estudos de associação baseados em famílias selecionados na revisão sistemática

Os estudos serão discutidos brevemente, por ordem cronológica da data de publicação ou de genotipagem no caso de estudos não publicados:

Di Bella et al., 1998. Trata-se de resumo de pôster apresentado no IV Congresso Mundial de Psiquiatria Genética, ocorrido em Bonn, Alemanha, em Outubro de

1998 (Anexo H), publicado em suplemento da revista *American Journal of Medical Genetics*. Foi o primeiro estudo de associação baseado em famílias entre *COMT* e TOC feito na tentativa de replicar o estudo de caso-controle de Karayiorgou et al (1997)(174). Através de contato com a autora principal, foi disponibilizado o pôster na íntegra (Anexo H). Neste estudo, foram avaliados 67 probandos (36 masculinos e 31 femininos) com TOC e seus pais. O diagnóstico foi feito por entrevista clínica estimado pela YBOCS. A presença de tiques foi investigada nos probandos e seus pais. Todos eram descendentes de italianos. A genotipagem foi feita por PCR e a leitura em gel de poliacrilamida corado com brometo de etídio. A análise estatística foi feita tanto usando Teste do Risco Relativo do Haplótipo (HRR), quanto o Teste de desequilíbrio de transmissão (TDT). As frequências dos genótipos foram avaliadas e não houve diferença entre os sexos. A amostra estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE). Não foi encontrada associação entre *COMT* e TOC pelo HRR (amostra total: $\chi^2=0,497$, 1 df, $P=0,48$; amostra masculina: $\chi^2=0,027$, 1 df, $P=0,869$; amostra feminina: $\chi^2=0,533$, 1 df, $P=0,465$) ou pelo TDT (por alelos: $\chi^2=0,397$, 1 df, $P=0,528$; por genótipos: $\chi^2=0,397$, 1df, $P=0,528$). Este estudo foi bem conduzido e, apesar de ter sido o primeiro estudo baseado em famílias no tema, só foi publicado em forma de resumo, provavelmente por seus achados negativos.

Karayiorgou et al. 1999. Este estudo também teve a intenção de replicar os achados do estudo caso-controle conduzido pelo mesmo grupo em 1997. Foram avaliados 110 probandos com TOC e seus pais. O diagnóstico foi estabelecido usando a Entrevista Diagnóstica para Estudos em Genética (DIGS) além da YBOCS e da escala Yale de gravidade global de tiques (YGTSS). Foi feita análise de confiabilidade entre

entrevistadores com concordância de 92%. A genotipagem foi feita por PCR com um radioisótopo do Fósforo (^{32}P -dCTP). O produto do PCR passou por eletroforese em gel de poliacrilamida, que posteriormente foi desidratado e a visualização foi feita por autorradiografia noturna. Autorradiografia é o uso de filme de radiografia para detectar materiais radioativos. A análise estatística foi feita usando TDT e HRR. Foi encontrada associação, tanto pelo TDT ($\text{qui}^2=5,82$; $P=0,0079$) como pelo HRR ($\text{qui}^2=4,76$; $P=0,0146$) entre *COMT* e TOC apenas na amostra masculina, reproduzindo os achados do grupo com o estudo caso-controle prévio (174). Foi realizado cálculo da razão de chances de transmissão de um genótipo em relação ao outro na amostra masculina, também encontrando associação positiva entre os genótipos contendo o alelo Met (Met/Met versus Met/Val+Val/Val: OR=2,59; IC95%=1,07-6,25) e o TOC. Alguns pontos devem ser observados: **a.** não há descrição do grupo populacional ou etnia da amostra estudada; **b.** os autores realizaram as análises da amostra total e da amostra feminina com o modelo bicaudal e as análises da amostra masculina com modelo unicaudal. Eles justificam o uso do modelo unicaudal por se tratar de um estudo de replicação. Por estes pontos, trata-se de um estudo com a maior chance de viés e de erro tipo I.

Schindler et al. (2000). Este artigo apresenta resultados da Tese de Doutorado do seu primeiro autor. A tese também foi acessada, onde mais detalhes da metodologia foram descritos (227). Foram avaliados 72 portadores de TOC e seus pais provenientes de 2 centros em Buffalo, New York, EUA e de Toronto, Canadá usando a Entrevista diagnóstica para estudos em genética (DIGS) ou a SCID, além da YBOCS. A genotipagem foi realizada por PCR e os produtos passaram por gel de

agarose, foram corados com brometo de etídio e foram visualizados através de luz ultravioleta. A análise estatística foi feita com TDT (amostra total: $\chi^2=0,37$; $P=0,54$; amostra masculina: $\chi^2=0,032$, $P=0,86$; amostra feminina: $\chi^2=0,44$, $P=0,51$) e HRR ($\chi^2=0,5$, $P=0,48$; amostra masculina: $\chi^2=0,89$, $P=0,35$; amostra feminina: $\chi^2=1,87$, $P=0,17$) não encontrando associação para amostra total ou separada por sexo. Foi realizada uma análise HRR por genótipos, também sem achados significantes, apenas quando os homozigotos (Val/Val e Met/Met) foram agrupados e comparados com os heterozigotos (Val/Met) houve uma associação positiva entre homozigotidade e TOC ($\chi^2=5,66$, $P=0,037$). Este foi um estudo bem conduzido, houve um cuidado na seleção de sujeitos com ancestralidade caucasiano-europeia, sendo excluídos sujeitos de outras etnias. Porém, não houve controle para múltiplas análises.

Veenstra-Vanderweele, comunicação pessoal. Este estudo foi encontrado na lista de referências da meta-análise de Azzam e Mathews (194). Após contato com o autor ele cedeu as mesmas informações que foram usadas na meta-análise prévia (Anexo E) e informou que os métodos estavam descritos em um estudo publicado por seu grupo (228). O estudo prévio investigava associação entre o TOC e genes relacionados à serotonina, então as informações sobre genotipagem do polimorfismo do COMT não puderam ser extraídas do artigo. Por ser uma comunicação pessoal, diversos dados ficaram faltando, sendo impossível calcular o HWE. Não foi encontrada associação entre TOC e *COMT*, mas como a amostra analisada foi muito pequena (28 trios), o resultado pode estar refletindo apenas ausência de poder estatístico.

Alsobrook et al, 2002. Este estudo incluiu 56 trios de probandos com TOC provenientes de 3 centros: Israel, França e Estados Unidos da América. Os participantes foram avaliados com entrevista estruturada STOBS, a genotipagem foi feita por PCR com marcador fluorescente e leitura direta em gel de agarose. A análise estatística foi feita usando o HRR e o TDT. Foi encontrada significância apenas para amostra feminina ($P=0,048$) pelo HRR. O TDT não encontrou associação para amostra total ou separada por sexo. Apesar de ter sido colocado no artigo que a amostra analisada era suficiente para um poder estatístico de 80%, segundo nossos cálculos com o programa Cálculos de Poder em Genética (229) a amostra de 56 trios atinge cerca de 10% de poder de refutar a hipótese nula. Não foi informado o HWE e não foram disponibilizados dados suficientes para o cálculo. Não foram feitas medidas para controlar o viés de múltiplas análises eo resultado positivo encontrado para amostra feminina ($P=0,048$) não se manteria significativa se a correção de Bonferroni tivesse sido aplicada ($P<0,017$ para 3 análises).

Camarena et al, 2005. Trata-se de resumo de pôster apresentado no XIII Congresso Mundial em Psiquiatria Genética que foi publicado na revista *American Journal of Medical Genetics*. Também através de contato com os autores o pôster foi disponibilizado na íntegra (Anexo I). O estudo incluiu 93 famílias. A análise estatística foi realizada com o programa Teste de Associação Baseado em Famílias (FBAT) e não foi encontrada associação para amostra total ($z=0,679$, $P=0,496$), amostra masculina ($z=1$, $P=0,317$) ou amostra feminina ($z=0,186$, $P=0,852$). Foram investigados neste estudos escores da YBOCS para obsessões e compulsões, escores da escala de Hamilton para Depressão (Ham-D), idade de início do TOC

(precoce ou tardio) e presença de tiques, mas nenhuma destas variáveis mostrou associação com o polimorfismo rs4680 do *COMT*. Este foi mais um estudo bem conduzido que, provavelmente devido achados negativos, foi publicado apenas como resumo de pôster apresentado em evento científico.

OCF-MINI, comunicação pessoal. Este estudo é resultado de uma colaboração internacional coordenada pelo Prof. David Pauls da Universidade de Harvard que teve a intenção de realizar um estudo de varredura de genoma com pacientes com TOC (76). Um subgrupo de centros envolvidos na colaboração decidiu realizar um estudo de associação baseado em famílias com um conjunto de polimorfismos em genes candidatos, incluindo o gene da *COMT*. Foram avaliados 353 trios provenientes de França (Paris), EUA (Califórnia, Massachusetts, Michigan) e Canadá (Toronto). Apesar da maioria ser de ascendência caucasiano-europeia, sujeitos de outras etnias não foram excluídos da amostra. Apenas centros que tinham, em sua maioria, amostras de outra etnia não entraram no estudo. Este estudo também não usou um método uniforme de entrevista diagnóstica. A maioria dos centros adotou uma entrevista estruturada e todos usaram a YBOCS, mas métodos de avaliação diferentes foram agrupados na amostra final. Não apenas o polimorfismo rs4680 foi avaliado, mas houve uma seleção de polimorfismos baseados em dados da literatura e na ligação entre marcadores (SNPs alvo) a fim de cobrir a extensão do gene. Na presente tese, só foram apresentados os dados referentes ao polimorfismo rs4680. O método de genotipagem foi automatizado com placa matriz de massa e leitura por espectrofotômetro e os trabalhadores do laboratório estavam cegos para o estado de afetado. A amostra estava em HWE, erros mendelianos foram excluídos e houve uma

seleção dos polimorfismos baseado em critérios de qualidade (frequência do alelo menor $>0,02$; taxa mínima de genotipagem $>75\%$, ausência de erros mendelianos, HWE). A análise estatística foi conduzida com o TDT com o programa PLINK. O resultado obtido foi contrário aos demais estudos: foi encontrada associação entre *COMT* e TOC apenas na amostra feminina ($\chi^2=4,46$, $P=0,03$). Foi realizado teste de permutações. Os resultados deste estudo encontram-se no anexo J.

Wray et al. 2008. Este estudo foi realizado com uma amostra censitária de gêmeos da Austrália, (18.742 indivíduos), dos quais 105 famílias eram de portadores de TOC. Foi usada a Entrevista Diagnóstica Internacional Composta (CIDI) para diagnóstico de TOC e a genotipagem foi automatizada com placa matriz de massa e leitura por espectrofotômetro. A análise estatística foi feita por regressão logística. Houve exclusão de amostra baseada em critérios de qualidade: taxa de genotipagem $<99,5\%$ e ausência de erros mendelianos ou de HWE. Medidas para reduzir chance de resultado falso-positivo, como a análise de permutações, foram implementadas. Não foi encontrada associação entre os polimorfismos, genótipos ou haplótipos do *COMT* estudados e o TOC. Foi um estudo bem conduzido com excelente metodologia de genotipagem e controle de qualidade, mas não foi disponibilizada informação de transmissões ou da razão de chances, não sendo possível incluí-lo na meta-análise.

Sampaio et al. 2010. Este estudo foi descrito anteriormente na seção 1.7 e está apresentado nos anexos B, C e D. Ele fez parte da mesma colaboração internacional do estudo OCFMINI e segue metodologia semelhante, porém incluiu apenas

população brasileira de ancestralidade mista. O trabalho foi submetido (183) e encontra-se no anexo B e seu resumo foi apresentado como pôster no 65°. Encontro da Sociedade de Psiquiatria Biológica (Society of Biological Psychiatry 65th Annual Meeting), que ocorreu em maio de 2010, em Louisiana, E.U.A. (192) (Anexo C). Neste estudo foram realizadas análises secundárias por gênero, presença de comorbidade com transtorno de tiques, e ainda considerando o estado de afetado quando 75% ou mais dos critérios diagnósticos para TOC foram preenchidos (TOC + TOC subclínico) ou quando os transtornos do espectro obsessivo-compulsivo foram agrupados. Estas análises também resultaram em não associação (Anexo D).

W.Liu et al, 2011. Estudo recente que avaliou 103 trios de portadores de TOC de etnia chinesa para polimorfismos de genes relacionados à serotonina e dopamina. A genotipagem foi feita por PCR, a análise do TDT foi feita pelo Programa para análises estatísticas, versão 9.14 (SAS 9.14). A amostra esteve em HWE e não houve associação entre *COMT* e TOC na amostra total ($P=0,62$), nem quando dividida por sexo ou idade de início (idade de início precoce = até 16 anos). As informações a respeito de métodos e resultados são sucintas e mesmo após tentativas de contato com o autor, os dados referentes à análise nos subgrupos masculino e feminino não foram disponibilizadas.

Tabela 9: Apresentação dos estudos de associação baseados em famílias selecionados na revisão sistemática

Referência	Alsobrook et al., 2002 (177)	Karayorgou et al, 1999 (198)	Schindler et al, 2000(213)	Wray et al, 2008(205)	DiBella et al, 1998(210)	Camarena et al, 2005(209)	Veenstra-VanderWeele, (199). Descrito em(47)	OCF-MINI, comunicação pessoal(219)	Sampaio et al, 2010 (192)	W.Liu et al,2011(230)
Área geográfica de origem da amostra	Israel; Paris (França); e New Haven (E.U.A.)	E.U.A.	Buffalo (E.U.A.), Toronto (Canadá)	Austrália	Itália	México	Michigan (E.U.A.)	Toronto (Canadá); San Francisco, Michigan e Connecticut (E.U.A)	São Paulo e Recife (Brasil);	China (Han)
Subgrupo étnico	Caucasiano-Europeu	Não informado	Caucasiano-europeu	Caucasiano-europeu (95%) confirmado por genotipagem	Caucasiano-europeu. Todos descendentes de Italianos	Hispânico	Caucasiano-europeu.	Caucasiano-europeu	Hispânico	Asiática
Definição do fenótipo	TOC de acordo com DSM III ou DSM IV	TOC de acordo com DSM IV	TOC de acordo com DSM IV	TOC de acordo com DSM IV	TOC de acordo com DSM IV	TOC de acordo com DSM IV	TOC de acordo com DSM III-R	TOC de acordo com DSM IV	TOC de acordo com DSM IV	TOC de acordo com DSM IV.
Método de avaliação diagnóstica	Avaliação de especialista + STOBS	DIGS + YBOCS	DIGS + YBOCS (Buffalo), SCID + YBOCS (Toronto)	CIDI	Avaliação de especialista + YBOCS	DIS + YBOCS	SCID ou KSADS-E, STOBS, YBOCS, FISC – 90% de confiabilidade entre entrevistadores	Entrevista direta segundo o DSM IV +YBOCS	SCID/K-SADS +YBOCS	Critérios do DSM IV +YBOCS
Tamanho de amostra	56 trios- 26 masculinos e 30 femininos	110 trios - 54 masculinos e 56 femininos	72 trios - 29 masculinos e 43 femininos	110 trios- 49 masculinos e 61 femininos	67 trios - 31 masculinos e 36 femininos	71 trios - 45 masculinos e 26 femininos	28 trios	353 trios - 223 masculinos e 129 femininos	83 trios– 44 masculinos e 39 femininos	103 trios: 62 masculinos e 41 femininos

Continua

Tabela 9: Apresentação dos estudos de associação baseados em famílias selecionados na revisão sistemática (continuação)

Referência	Alsobrook et al., 2002 (177)	Karayorgou et al, 1999 (198)	Schindler et al, 2000(213)	Wray et al, 2008(205)	DiBella et al, 1998(210)	Camarena et al, 2005(209)	Veenstra-VanderWeele, (199). Descrito em (47)	OCF-MINI, comunicação pessoal(219)	Sampaio et al, 2010 (192)	W.Liu et al,2011(230)
idade	Não informado	Não informado	Não informado	Não informado	Homens (26.82+-6.39); Mulheres (31.11+-7.07); (p=0.016)	Não informado	Probandos: 42.7 +-20.3	Não informado	Probandos:28,5; masculinos: 28,6; femininos: 28,4	Não informado
Local de recrutamento	Clínicas especializadas em TOC.	Anúncios publicitários (84.5%) ou de clínicas particulares (15.5%)	Encaminhado de serviços psiquiátricos ambulatórios	Populacional – recrutado no registro Australiano de gêmeos	Sequencialmente recrutados no ambulatório especializado	Não informado	Ambulatório especializado em TOC e grupo de apoio aos portadores de TOC (OCF)	Clínicas psiquiátricas.	Ambulatório especializado em TOC	Recrutados para pesquisa em genética.
Tipo de amostra biológica	Sangue ou esfregaços bucais.	Sangue	Sangue	Sangue ou esfregaço bucal	Sangue	Sangue	Sangue ou saliva	Sangue	Sangue	Não informado
Método de extração do DNA	Sangue: Método de Lahiri and Nurnberger (231). Esfregaços bucais: Puregene kit (Gentra Systems, Minneapolis, EUA)	Isolamento de linfócitos por vírus de Epstein-Barr para linhagens celulares permanentes.	Protocolos estabelecidos (etanol Tris-EDTA)	Não informado	Método de precipitação de NaCl (231)	Método de precipitação de NaCl (231)	PureGene Kit para isolamento de DNA (Gentra Systems, Minneapolis, EUA)	Método de precipitação de NaCl (231)	Método de precipitação de NaCl (231)	Método de precipitação de NaCl (231)

Continua

Tabela 9: Apresentação dos estudos de associação baseados em famílias selecionados na revisão sistemática (continuação)

Referência	Alsobrook et al., 2002 (177)	Karayorgou et al, 1999 (198)	Schindler et al, 2000(213)	Wray et al, 2008(205)	DiBella et al, 1998(210)	Camarena et al, 2005(209)	Veenstra-VanderWeele, (199). Descrito em (47)	OCF-MINI, comunicação pessoal(219)	Sampaio et al, 2010 (192)	W.Liu et al,2011 (230)
Método de genotipagem	PCR e enzima de restrição (232, 233)	PCR e enzima de restrição	PCR e enzima de restrição	PCR – reação de extensão de primer	PCR com enzima de restrição	PCR (132)	Não informado	PCR multiplex seguido de extensão de base única em plataforma para MassArray Sequenom (234). Sim	PCR multiplex seguido de extensão de base única em plataforma para MassArray Sequenom (234). Sim	PCR
Cegagem dos profissionais de laboratório	Não informado	Não informado	Não informado	Não informado	Não informado	Não informado	Não informado	Sim	Sim	Não informado
Método de leitura dos genótipos	Os genótipos eram lidos diretamente da placa de gel.	A placa de gel era seca e os sinais detectados por autorradiografia noturna (overnight).	A placa de gel era corada com Brometo de Etídio e as bandas eram visualizadas diretamente por luz ultravioleta.	MALDI-TOF espectrometria de massa	Os genótipos eram lidos diretamente da placa de gel corada com Brometo de Etídio.	Os genótipos eram lidos com luz ultravioleta diretamente da placa de gel corada com Brometo de Etídio.	Não informado	MassARRAY RT – Espectrômetro de massa	MassARRAY RT – Espectrômetro de massa	Não informado
Equilíbrio de Hardy-Weinberg	Não informado. Não há dados suficientes para o cálculo.	Não informado. Calculado=0,97	Não informado. Calculado=0,51	Equilíbrio calculado em não afetados, não relacionados = 0,57. Exclusão de erros mendelianos.	Em Equilíbrio. Calculado = 0,73	Não informado. Calculado = 1	Não informado. Sem dados suficientes para cálculo.	Em Equilíbrio. Erros mendelianos foram excluídos.	Em Equilíbrio. Erros mendelianos foram excluídos.	Em equilíbrio.

Continua

Tabela 9: Apresentação dos estudos de associação baseados em famílias selecionados na revisão sistemática (continuação)

Referência	Alsobrook et al., 2002 (177)	Karayior gou et al, 1999 (198)	Schindler et al, 2000(213)	Wray et al, 2008(205)	DiBella et al, 1998 (210)	Camarena et al, 2005(209)	Veenstra-VanderWeele, (199). Descrito em (47)	OCF-MINI, comunicação pessoal(219)	Sampaio et al, 2010 (192)	W.Liu et al, 2011(230)
Métodos de análise estatística	HRR pelo teste exato de Fisher e TDT – programa SPSS 9.0	TDT/McNemar e HHRR	HRR e TDT (Java TDT/S-TDT v1.1)	Regressão Logística (UNPHASED v3.10)	HRR (235) e TDT (ETDT)	TDT (BFAT v 1.4.1)	TDT	TDT (PLINK)	TDT (PLINK)	TDT (SAS 9.14)
Ano	2002	1999	2000	2008	1998	2005	2001	2006	2010	2011
Frequência alelo A	0.42	NI	0,42	NI	0.48	0.39	NI	0.48	0.44	
Amostra total	56	110	72	105	67	71	28	353	73	103
Alelos A Transmitidos - Total	43	NI	31	NI	29	52	15	151	34	43
Alelos A não Transmitidos – Total	35	NI	36	NI	34	62	10	141	37	40
qui –quadrado - Total	0.82	0.32	0,37	NI	0,4	Z=0.68	1	1.07	0.13	0.46
P- Total	0.37	0.57	0,54	0.52	0,53	0.05	0.32	0.34	0.72	0.613
Trios - Homens	26	47	29	49	36	45	NI	223	44	62
Alelos A transmitidos – Homens	19	30	15	NI	39	34	11	89	18	

Continua

Tabela 9: Apresentação dos estudos de associação baseados em famílias selecionados na revisão sistemática (conclusão)

Referência	Alsobrook et al., 2002 (177)	Karayiorgou et al, 1999 (198)	Schindler et al, 2000(213)	Wray et al, 2008(205)	DiBella et al, 1998 (210)	Camarena et al, 2005(209)	Veenstra-VanderWeele, (199). Descrito em (47)	OCF-MINI, comunicação pessoal(219)	Sampaio et al, 2010 (192)	W.Liu et al,2011(230)
Alelos A não transmitidos – Homens	21	14	16	NI	38	36	6	94	17	
Qui- quadrado – Homens	0.1	5.82	0,03	NI	0.03	1	1.47	0.14	0.03	
P – Homens	0.75	0.01	0,86	NI	0.87	Z=0.32	0.23	0.71	0.87	
Trios Mulheres	30	56	43	61	31	26	NI	129	39	41
Qui-quadrado – Mulheres	2.63	1.04	0.44	NI	0.53	Z=0.19	0	4.46	0.44	
Alelos A transmitidos Mulheres	24	20	16	NI	31	18	4	60	16	
Alelos A não Transmitidos Mulheres	14	27	20	NI	27	26	4	39	20	
P –Mulheres	0.11	0.37	0.51	NI	0.47	0.85	1	0.03	0.51	

Legenda: TOC = Transtorno obsessivo-compulsivo; DSM- III= Manual Diagnóstico e Estatístico para Transtornos Mentais, Terceira Edição; DSM-IV= Manual Diagnóstico e Estatístico para Transtornos Mentais, Quarta Edição; STOBS= Entrevista para Tourette e outros transtornos do comportamento; HRR= Teste do Risco Relativo do Haplótipo; TDT= Teste de desequilíbrio de transmissão; PCR = Reação em cadeia da polimerase; SPSS = Pacote estatístico para ciências sociais; DIGS= Entrevista diagnóstica para estudos em genética; YBOCS= Escala de sintomas obsessivo-compulsivos da Yale-Brown; SCID= Entrevista clínica estruturada para transtornos do DSM-IV ; EDTA = ácido etilenodiamino tetra-acético; CIDI= Entrevista Diagnóstica Internacional Composta da Organização Mundial de Saúde; UNPHASED= programa para análise de associação genética; NaCl = Cloreto de sódio; DIS= Roteiro para entrevista diagnóstica; BFAT= Ferramenta para teste de associação baseado em famílias; OCF = Fundação Transtorno obsessivo-compulsivo; DSM- III R= Manual Diagnóstico e Estatístico para transtornos mentais, Terceira edição revisada; K-SADS= Entrevista para transtornos afetivos e esquizofrenia para crianças em idade escolar; FISC: Roteiro e critérios para informante familiar; OCF-MINI= Subgrupo da colaboração para estudos em genética da Fundação Transtorno Obsessivo-compulsivo; PLINK= Ferramenta de análise para estudos de associação de genoma inteiro; SAS 9.14 =Programa para análise estatística, versão 9,14

5.2. Meta-análise convencional

Nove estudos, sendo seis estudos publicados (71, 177, 192, 198, 209, 210, 213), dois estudos não publicados (199, 219) e o nosso estudo original (183, 192) foram selecionados para meta-análise, totalizando 958 trios (2874 indivíduos) (Tabela 10).

Os resultados estão representados graficamente utilizando o logaritmo da razão de chances no eixo x, o qual tem como resultado nulo $\log OR=0$ (que equivale a $OR=1$).

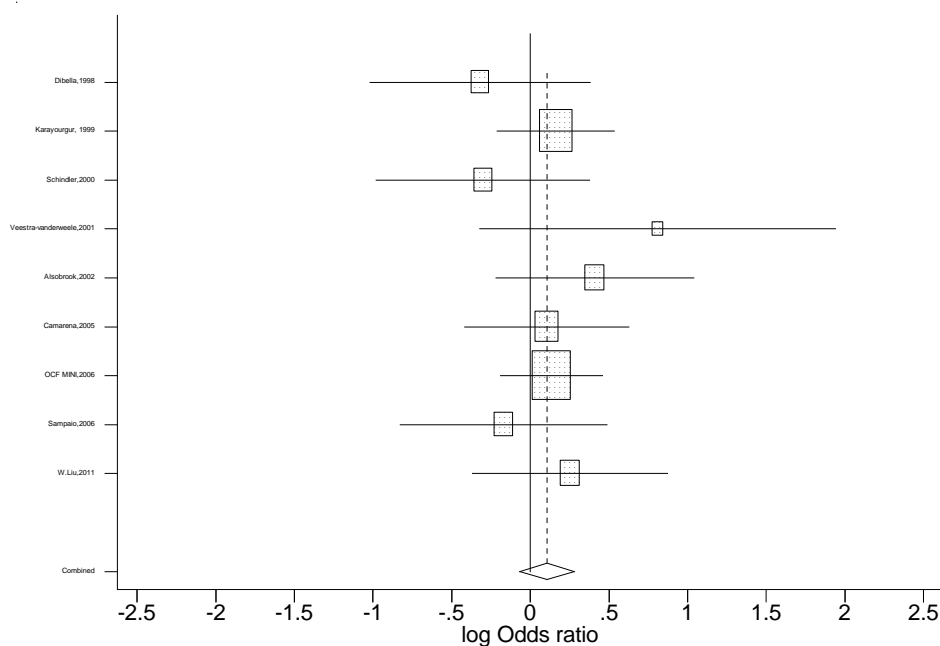
A análise compilada dos nove estudos (Tabela 10) não mostrou associação entre o polimorfismo da COMT e o TOC, com resultado idêntico nas análises de efeito fixo e aleatório ($OR:0,107$; $IC95\%:-0,068$ a $0,282$; $P=0,23$) (Figura 8).

Tabela 10: Estudos incluídos na meta-análise de estudos de associação baseados em famílias entre o gene da catecol O-metiltransferase e o transtorno obsessivo-compulsivo

Autor, ano	Etnia	Qualidade	logOR	selogOR	OR	IC 95%
Dibella,1998	Italiana	4	-0,32	0,36	0,73	0,36-1,47
Karayiorgou,1999	Caucasiana	4	0,16	0,19	1,178	0,81-1,71
Schindler,2000	Caucasiana	4	-0,3	0,35	0,74	0,38-1,46
Veestra- vanderweele,2001	Caucasiana	4	0,81	0,58	2,25	0,73-6,98
Alsobrook,2002	Caucasiana	4	0,41	0,32	1,51	0,8-2,83
Camarena,2005	Latina	4	0,11	0,27	1,11	0,66-1,88
OCF MINI,2006	Caucasiana	8	0,14	0,17	1,14	0,83-1,59
Sampaio,2010	Latina	8	-0,17	0,34	0,84	0,44-1,63
W.Liu,2011	Asiática	5	0,25	0,32	1,29	0,69-2,4

Legenda: OR: razão de chances; logOR: logaritmo da razão de chances; selogOG: erro padrão do logaritmo da razão de chances; IC95%: intervalo de confiança de 95%

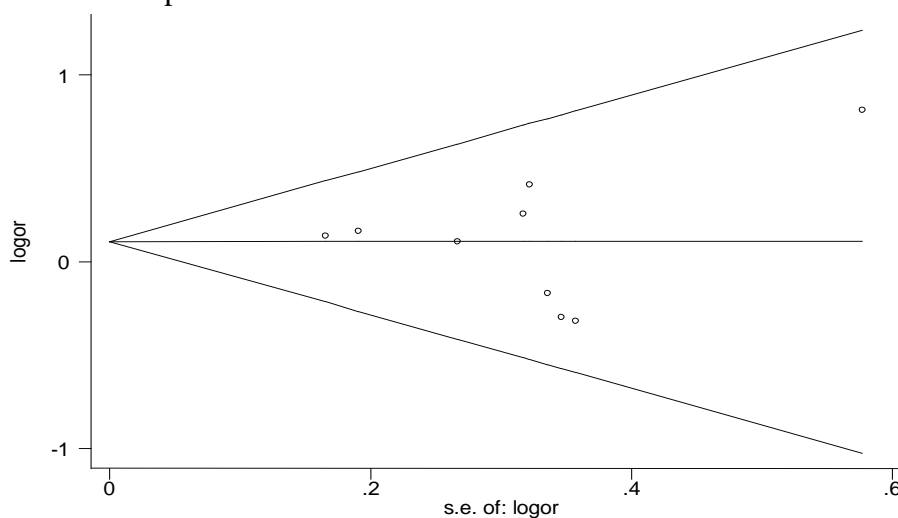
Figura 8: Representação gráfica (*Forest Plot*) da meta-análise de estudos de associação baseados em famílias entre o gene da catecol O-metiltransferase e o transtorno obsessivo-compulsivo.



Legenda: log Odds Ratio: Logarítmo da razão de chances

Os testes de Egger ($P=0,937$) (Tabela 11) e de Begg ($P=0,754$) não acusaram viés de publicação, e o gráfico de Begg mostra simetria (Figura 9). Não foi encontrada heterogeneidade entre os estudos pelo teste Q ($Q=6,183$ com 8 graus de liberdade; $P= 0,627$; estimativa da variância entre estudos baseada no momento=0,000), nem pela verificação gráfica de Galbraith (Figura 10). Na figura de Galbraith (Figura 10) os estudos menores e com resultados menos precisos aparecem no lado esquerdo e os maiores estudos no lado direito. A linha central (linha de regressão) representa a média do logarítmo da razão de chances (logOR). As linhas ± 2 representam os limites em 95% das médias do logOR. A maioria dos estudos esteve na área entre as linhas ± 2 , mostrando ausência de heterogeneidade.

Figura 9: Gráfico de Begg com pseudo-intervalo de confiança de 95% para avaliação de viés de publicação referente a meta-análise de estudos de associação baseados em famílias entre o gene da catecol O-metiltransferase e o transtorno obsessivo-compulsivo



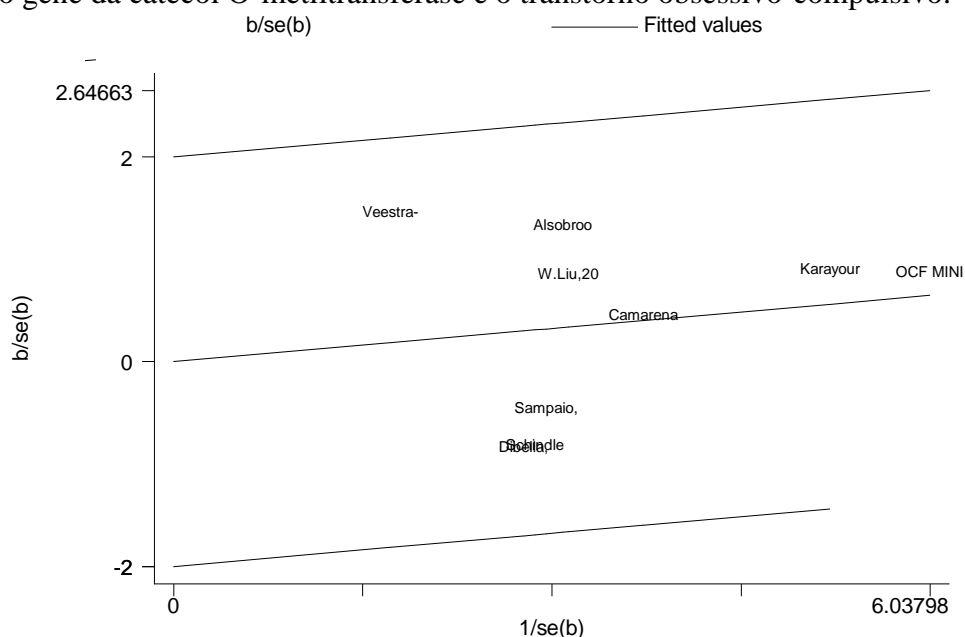
Legenda: logor: Logarítmo da razão de chances; s.e. of: logor: erro padrão do logarítmo da razão de chances.

Tabela 11: Teste de Egger para viés de publicação referente à meta-análise de estudos de associação baseados em famílias entre o gene da catecol O-metiltransferase e o transtorno obsessivo-compulsivo.

Efeito Padrão	Coefficiente	Erro Padrão	P	IC 95%
Inclinação	0,13	0,25	0,63	-0,47 a 0,72
Viés	-0,08	0,94	0,94	-2,29 a 2,13

Legenda: EP: erro padrão; P: Valor de P; IC95%: Intervalo de confiança de 95%

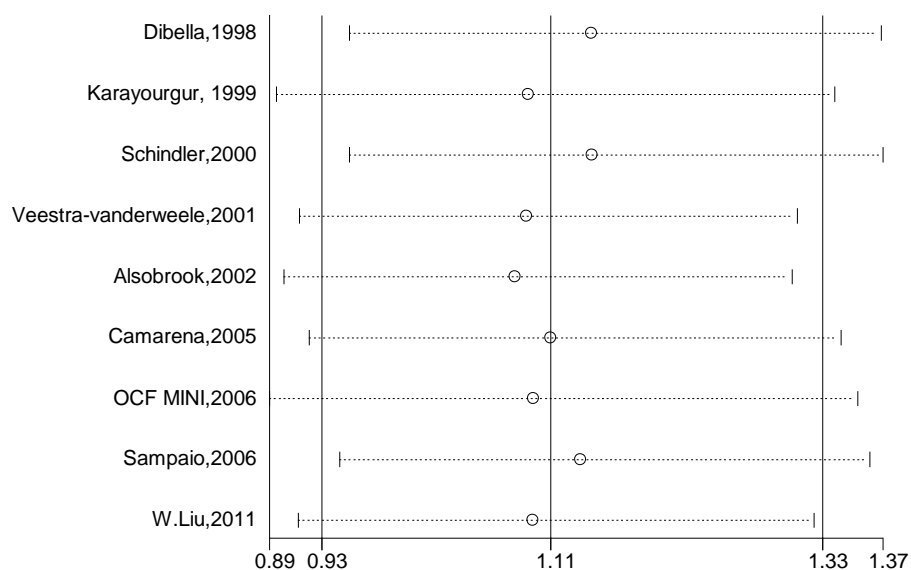
Figura 10: Figura de Galbraith para verificação gráfica da heterogeneidade entre estudos referente à meta-análise de estudos de associação baseados em famílias entre o gene da catecol O-metiltransferase e o transtorno obsessivo-compulsivo.



Legenda: se: erro padrão; b: Fitted values: valores ajustados; $b/se(b)$: efeito padrão; $1/se(b)$: inverso do erro padrão.

Avaliando a influência individual de cada estudo incluídos na meta-análise com a análise de sensibilidade (Figura 11), não houve associação significativa entre o polimorfismo rs4680 do *COMT* e o TOC quando a meta-análise foi re-calculada omitindo um dos estudos por vez. Na figura 11, ao lado do nome do autor e ano do estudo, há uma linha que representa o resultado da meta-análise com omissão deste estudo, sendo a linha o intervalo de confiança e o círculo a estimativa metanalítica.

Figura 11: Análise de sensibilidade como os nove estudos incluídos na meta-análise de estudos de associação baseados em famílias entre o gene da catecol O-metiltransferase e o transtorno obsessivo-compulsivo



5.2.1. Meta-análise com probandos do sexo masculino

A análise apenas com probandos do sexo masculino foi realizada com oito estudos (Tabela 12), visto que em um deles (71) não foi obtida informação, separada por sexo, sobre frequências de transmissão de alelos ou valor de razão de chances.

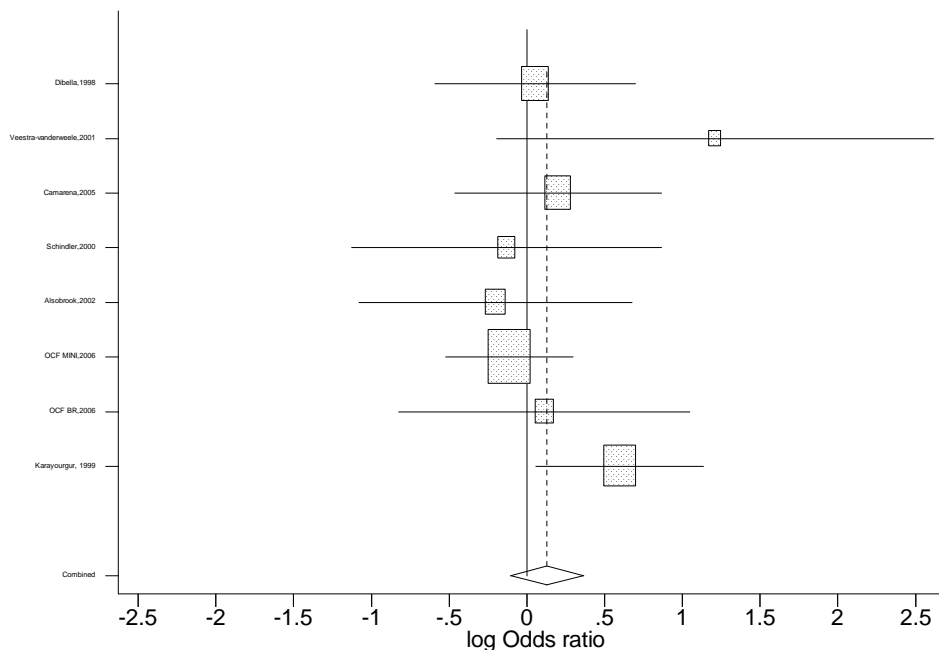
A meta-análise não mostrou associação entre o polimorfismo rs4680 do *COMT* e o TOC ($P=0,883$) tanto na análise com efeito fixo (OR: 0,130; IC95%: -0,106 a 0,366; $P= 0,280$) como com efeito aleatório (OR:0,135; IC95%: -0,111 a 0,381; $P=0,283$) (Figura 12).

Tabela 12: Estudos incluídos na meta-análise de estudos de associação baseados em famílias entre o gene da catecol O-metiltransferase e o transtorno obsessivo-compulsivo - amostra masculina

Autor, ano	Etnia	Qualidade	logOR	selogOR	OR	IC 95%
Dibella,1998	Italiana	4	0,05	0,33	1,06	0,55 a 2,01
Karayorgou,1999	Caucasiana	4	0,60	0,28	1,82	1,06 a 3,12
Schindler,2000	Caucasiana	4	-0,13	0,51	0,88	0,33 a 2,38
Veestra- Vanderweele,2001	Caucasiana	4	1,21	0,72	3,36	0,82 a 13,7
Alsobrook,2002	Caucasiana	4	-0,2	0,45	0,82	0,34 a 1,97
Camarena,2005	Latina	4	0,20	0,34	1,22	0,63a 2,38
OCF MINI,2006	Caucasiana	8	-0,11	0,21	0,90	0,60 a 1,35
Sampaio,2010	Latina	8	0,11	0,48	1,12	0,44 a 2,86

Legenda: OR: razão de chances; logOR: logaritmo da razão de chances; selogOG: erro padrão do logaritmo da razão de chances; IC95%: intervalo de confiança de 95%

Figura 12: Representação gráfica (*Forest Plot*) da meta-análise de estudos de associação baseados em famílias entre o gene da catecol O-metiltransferase e o transtorno obsessivo-compulsivo - amostra masculina



Legenda: log Odds ratio: Logarítmo da razão de chances

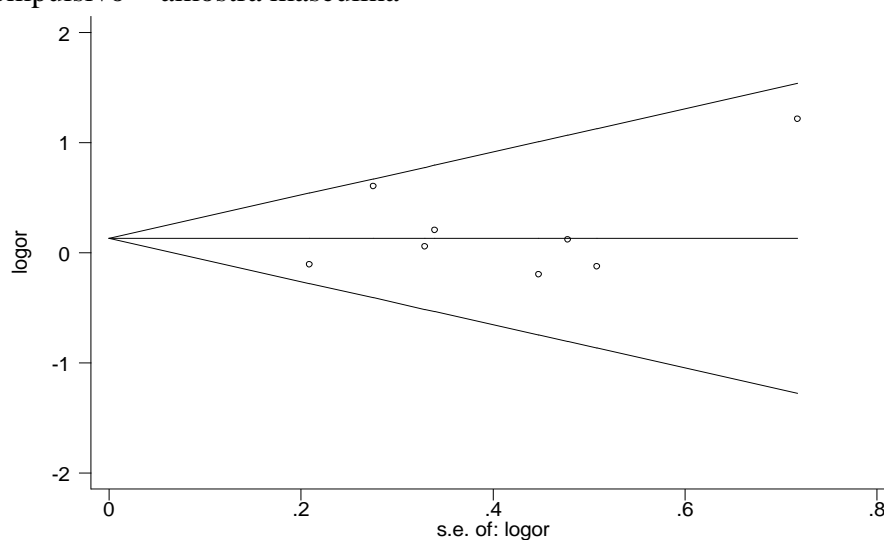
Não houve evidência de viés de publicação pelos testes de Egger ($P=0,742$) (Tabela 13) e de Begg ($P=0,711$). O gráfico de Begg mostra simetria (Figura 13). Também não houve evidência de viés de heterogeneidade entre os estudos de acordo com os testes Q ($Q= 7,378$ com 7 graus de liberdade; $P= 0,391$); com a estimativa de variância entre estudos baseada no momento ($= 0,007$) e com o gráfico de Galbraith (Figura 14).

Tabela 13: Teste de Egger para viés de publicação referente à meta-análise de estudos de associação baseados em famílias entre o gene da catecol O-metiltransferase e o transtorno obsessivo-compulsivo – amostra masculina.

Efeito Padrão	Coefficiente	Erro Padrão	P	IC95%
Inclinação	-0,13	0,37	0,74	-1,04 a 0,78
Viés	0,8	1,09	0,49	-1,86 a 3,48

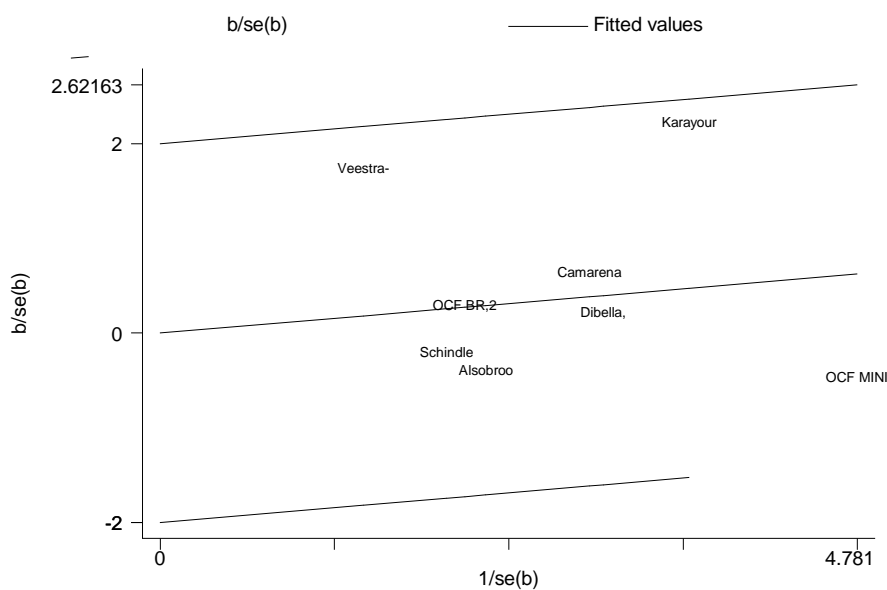
Legenda: Coef: coeficiente; P: valor de P; IC95%: intervalo de confiança de 95%

Figura 13: Gráfico de Begg para viés de publicação com pseudo-intervalo de confiança de 95%, referente à meta-análise de estudos de associação baseados em famílias entre o gene da catecol O-metiltransferase e o transtorno obsessivo-compulsivo - amostra masculina



Legenda: logor: Logarítmo da razão de chances; s.e. of: logor: Erro padrão do logarítmo da razão de chances.

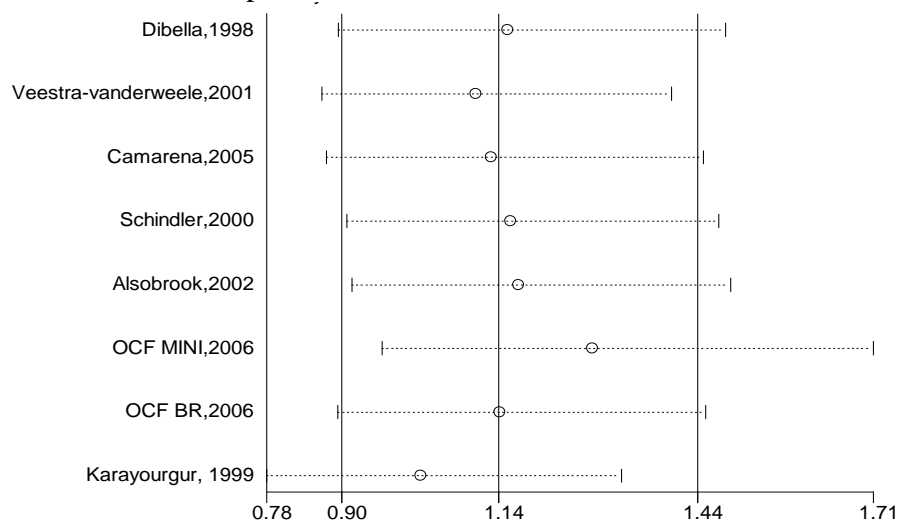
Figura 14: Gráfico de Garlbraitth para heterogeneidade referente à meta-análise de estudos de associação baseados em famílias entre o gene da catecol O-metiltransferase e o transtorno obsessivo-compulsivo - amostra masculina



Legenda: se: erro padrão; b:; Fitted values: valores ajustados; $b/se(b)$: efeito padrão; $1/se(b)$: inverso do erro padrão.

A análise de sensibilidade (Figura 15) mostrou um desvio no sentido de associação positiva com alelo Met quando o estudo OCFMINI é omitido e no sentido de associação com alelo Val quando o estudo de Karayiorgou et al, 1999 é omitido, porém sem determinar significância estatística.

Figura 15: Análise de sensibilidade referente à meta-análise de estudos de associação baseados em famílias entre o gene da catecol O-metiltransferase e o transtorno obsessivo-compulsivo - amostra masculina



Legenda: OCF BR, 2006= Sampaio, 2010

5.2.2. Meta-análise com probandos do sexo feminino

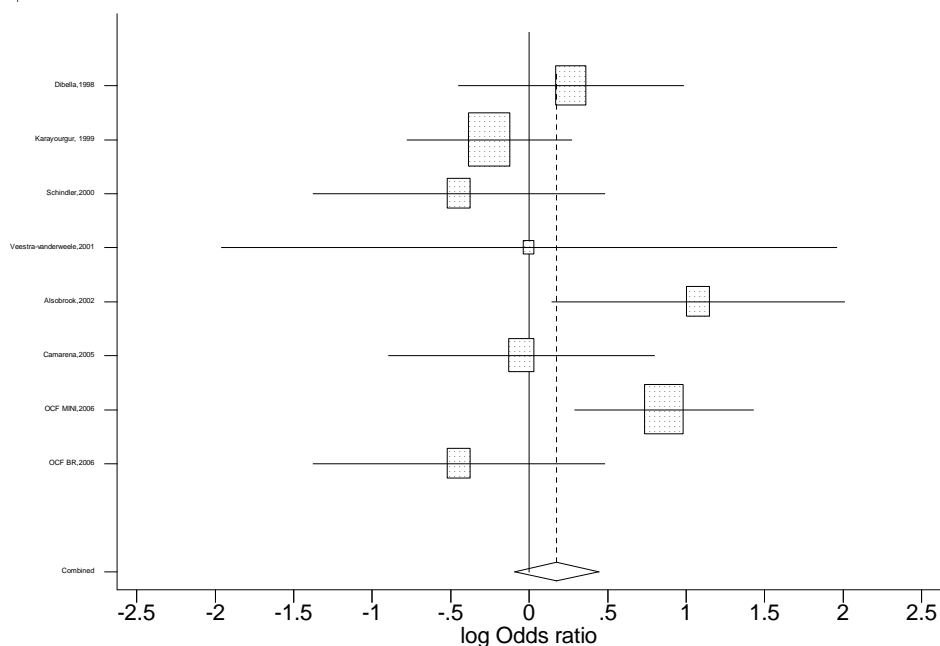
Na amostra feminina, as análises com efeito fixo (OR:0,175; IC95%: -0,095 a 0,444; P= 0,204) e com efeito aleatório (OR:0,156; IC95%: -0,271 a 0,583; P=0,475) tiveram resultados diferentes, mas ambas não mostraram associação entre o polimorfismo rs4680 do *COMT* e o TOC (P=0,883) (Tabela 14 e Figura 16).

Tabela 14: Estudos incluídos na meta-análise de estudos de associação baseados em famílias entre o gene da catecol O-metiltransferase e o transtorno obsessivo-compulsivo – amostra feminina

Autor, ano	Etnia	Qualidade	logOR	selogOR	OR	IC 95%
Dibella,1998	Italiana	4	0,27	0,37	1,31	0,64 a 2,67
Karayiorgou,1999	Caucasiana	4	-0,25	0,27	0,78	0,46 a 1,31
Schindler,2000	Caucasiana	4	-0,45	0,47	0,64	0,25 a 1,62
Veestra- vanderweele,2001	Caucasiana	4	0	1	1	0,14 a 7,10
Alsobrook,2002	Caucasiana	4	1,08	0,48	2,94	1,16 a 7,46
Camarena,2005	Latina	4	-0,05	0,43	0,95	0,41a 2,23
OCF MINI,2006	Caucasiana	8	0,86	0,29	2,37	1,34 a 4,19
Sampaio,2010	Latina	8	-0,45	0,47	0,64	0,25 a 1,62

Legenda: OR: razão de chances; logOR: logaritmo da razão de chances; selogOG: erro padrão do logaritmo da razão de chances; IC95%: intervalo de confiança de 95%

Figura 16: Representação gráfica (*Forest Plot*) da meta-análise de estudos de associação baseados em famílias entre o gene da catecol O-metiltransferase e o transtorno obsessivo-compulsivo – amostra feminina



Legenda: log Odds ratio: logaritmo da razão de chances, OCF BR, 2006: Sampaio, 2010

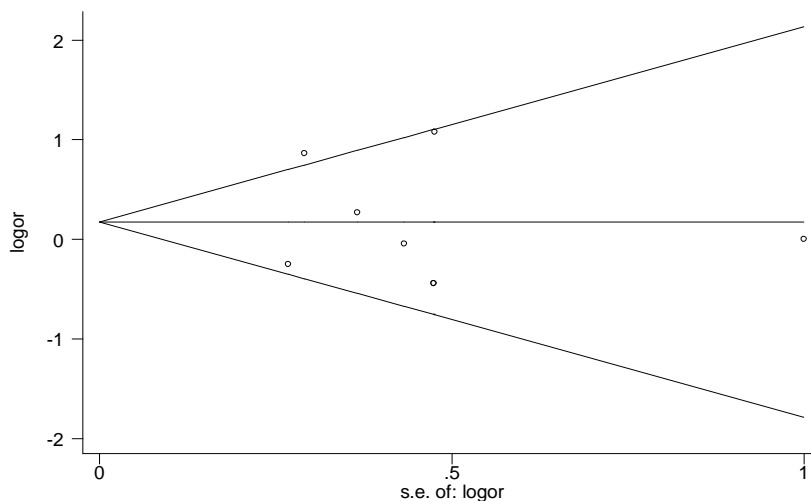
Não houve evidência de viés de publicação pelos testes de Egger ($P=0,797$) (Tabela 15) e de Begg ($P=1,0$) e o gráfico de Begg foi simétrico (Figura 17). Foi sugerida presença de heterogeneidade entre os estudos pelos testes Q ($Q= 15,49$ com 7 graus de liberdade; $P=0,03$); variância entre estudos baseada no momento = $0,194$). Além disso o estudo OCFMINI se dispersou além do limite de 95%, apontando para presença de heterogeneidade entre estudos, no gráfico de Galbraith (Figura 18). O resultado do teste I^2 de heterogeneidade ($I^2=54,8\%$) reforça a presença de inconsistência entre estudos selecionados.

Tabela 15: Teste de Egger para viés de publicação referente à meta-análise de estudos de associação baseados em famílias entre o gene da catecol O-metiltransferase e o transtorno obsessivo-compulsivo – amostra feminina

Efeito Padrão	Coeficiente	Erro Padrão	P	IC95%
Inclinação	0,35	0,7	0,63	-1,36 a 2,07
viés	-0,49	1,81	0,8	-4,9 a 3,93

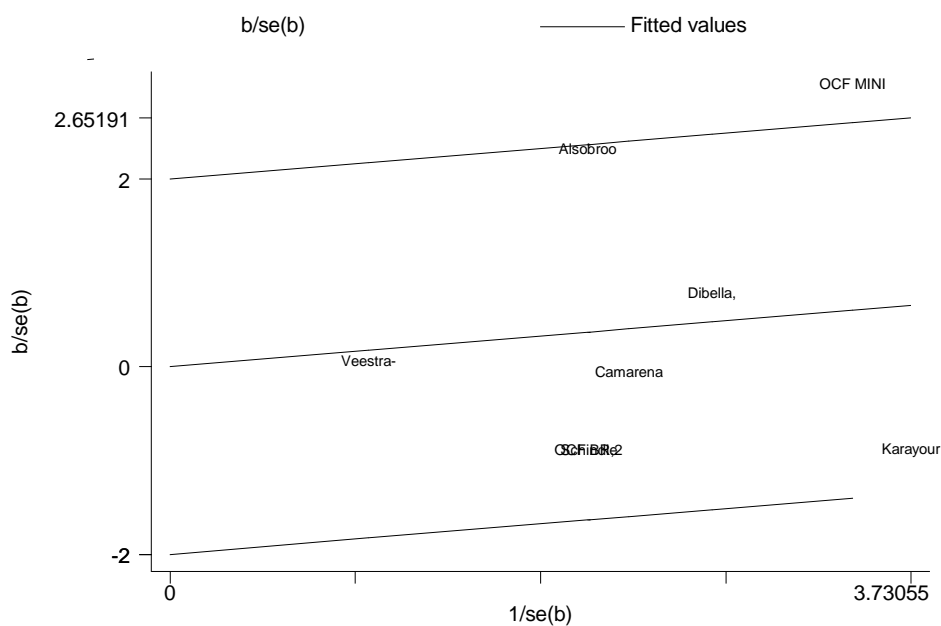
Legenda: EP: erro padrão; IC95%: Intervalo de confiança de 95%

Figura 17: Gráfico de Begg para viés de publicação referente à meta-análise de estudos de associação baseados em famílias entre o gene da catecol O-metiltransferase e o transtorno obsessivo-compulsivo – amostra feminina



Legenda: logor: Logrítmo da razão de chances; s.e. of: logor: Erro padrão do logarítmo da razão de chances.

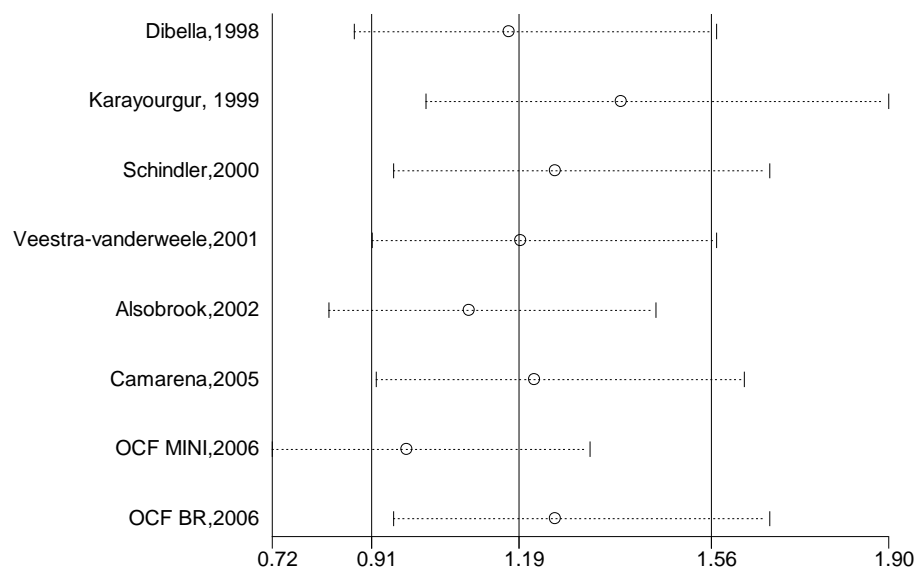
Figura 18: Gráfico de Galbraith para heterogeneidade referente à meta-análise de estudos de associação baseados em famílias entre o gene da catecol O-metiltransferase e o transtorno obsessivo-compulsivo – amostra feminina



Legenda: Fitted values: valores ajustados; $b/se(b)$: efeito padrão; $1/se(b)$: inverso do erro padrão.

A análise de sensibilidade também mostra desvios discretos com a omissão dos estudos OCFMINI e Karayiorgou, 1999 (Figura 19), sem levar a associação significativa.

Figura 19: Análise de sensibilidade referente à meta-análise de estudos de associação baseados em famílias entre o gene da catecol O-metiltransferase e o transtorno obsessivo-compulsivo – amostra feminina



Legenda: OCF BR, 2006 = Sampaio, 2010

5.3. Metarregressão

Assumindo que $p < 0,10$ aponta presença de heterogeneidade no teste Q, foi detectada presença de heterogeneidade entre estudos na amostra feminina. A fim de avaliar possíveis fontes para esta heterogeneidade, foi realizada uma metarregressão com a amostra feminina dos oito estudos incluídos na meta-análise.

Como o maior número de estudos tem sua população composta por caucasianos, esta etnia foi adotada como referência para comparação em relação a italianos e latinos. O estudo italiano foi avaliado separadamente pois geneticamente a população italiana tem uma característica única, com presença de marcadores da etnia caucasiana, semita e latina (236).

Além da etnia, o ano de publicação (ou de genotipagem das amostras em caso de estudo não publicado) e a nota referente à qualidade do estudo foram adicionados ao modelo de metarregressão uma vez que a metodologia de pesquisa em genética se modernizou.

Foi realizada metarregressão com modelo multivariado, que avalia interação entre todas as variáveis independentes simultaneamente. Neste modelo, as a etnia latina em comparação com caucasiana ($P=0,002$; IC95%=-2,45 a -0,53) e o ano de realização/publicação do estudo ($P=0,005$; IC95%=0,09 a 0,53) (Tabela 16) contribuíram para explicar a heterogeneidade. Também quando a variável *score de qualidade do estudo* foi excluída, a comparação entre latinos e caucasianos ($P=0,008$; IC95%=-1,89 a -0,28) e o ano de realização do estudo ($P=0,002$; IC95%=0,06 a 0,27) (Tabela 17) se mantiveram significantes.

Por fim, uma vez que a amostra feminina apresentou heterogeneidade entre os estudos, foi realizada uma nova metarregressão com a amostra total, tendo como co-

variável a proporção de mulheres na amostra de cada estudo. O percentual de mulheres, nos estudos, se associou negativamente com logOR, mas não apresentou significância estatística ($P=0,354$) (Tabela 18).

Tabela 16: Metarregressão com modelo multivariado avaliando etnia, qualidade do estudo e ano em que o estudo foi realizado em relação à heterogeneidade entre estudos - amostra feminina

	Coef.	Erro Padrão	P	IC95%
ITA x CEU	0,89	0,48	0,07	-0,06 a 1,84
LAT x CEU	-1,49	0,49	0,002	-2,45 a -0,53
Qualidade	-0,24	0,16	0,13	-0,55 a 0,07
Ano	0,31	0,11	0,005	0,09 a 0,53
Cons.	0,33	0,54	0,54	-0,73 a 1,39

Legenda: ITA: amostra italiana; LAT: amostra latina; CEU: amostra caucasiana; IC95%: intervalo de confiança de 95%; Coef.: coeficiente; EP: erro padrão

Tabela 17: Metarregressão com modelo multivariado avaliando etnia, qualidade do estudo e ano em que o estudo foi realizado em relação à heterogeneidade entre estudos - amostra feminina

	Coeficiente	Erro Padrão	P	IC95%
ITA x CEU	0,64	0,46	0,16	-0,25 a 1,53
LAT x CEU	-1,09	0,41	0,008	-1,89 a -0,28
Ano	0,17	0,05	0,002	0,06 a 0,27
Cons.	-0,37	0,27	0,17	-0,9 a 0,16

Legenda: ITA: amostra italiana; LAT: amostra latina; CEU: amostra caucasiana; IC95%: intervalo de confiança de 95%

Tabela 18: Metarregressão avaliando a proporção de mulheres na amostra total dos estudos

	Coeficiente	Erro Padrão	P	IC95%
% mulheres	-0,009	0,009	0,35	-0,027 a 0,01
Cons.	0,43	0,4	0,28	-0,35 a 1,22

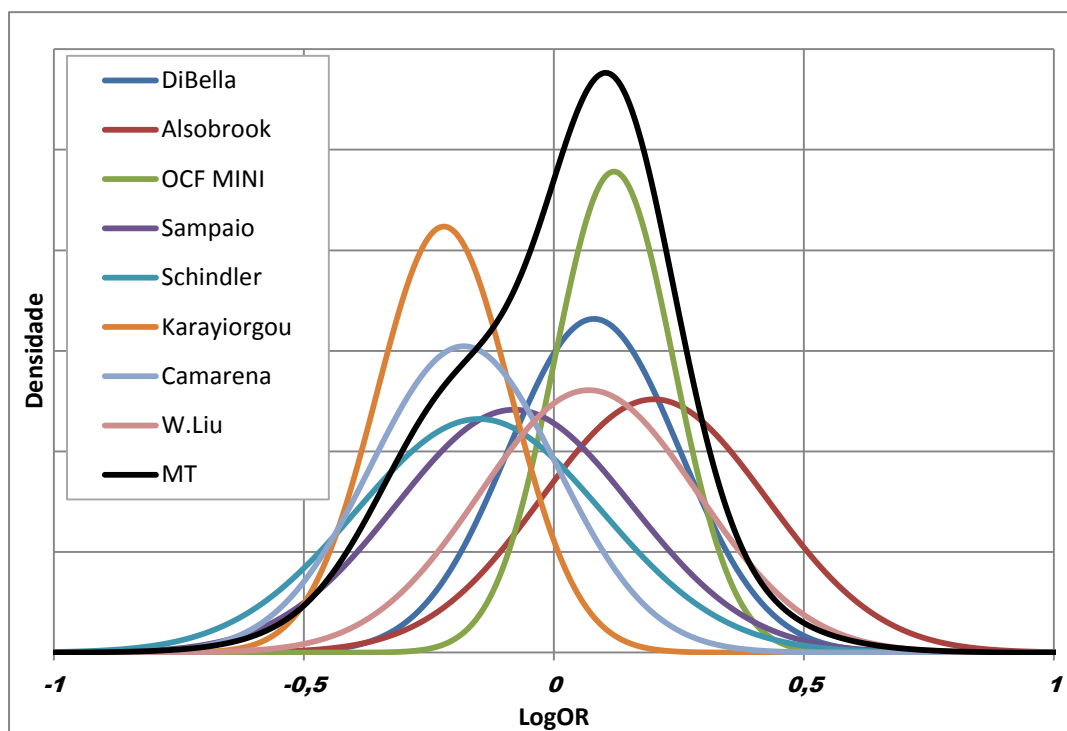
Legenda: % mulheres: Percentual de mulheres na amostra dos estudos incluídos na meta-análise; IC95%: intervalo de confiança de 95%

5.4. Meta-análise bayesiana

Para estas análises foram incluídos oito estudos, pois o estudo de Veenstra-Vanderweele (comunicação pessoal) foi excluído por tamanho amostral muito pequeno.

Em um gráfico que tem como eixo x o logatítmo da razão de chances e como eixo y a densidade de cada estudo, obtemos a função da distribuição do $\log OR$ $\lambda = \ln[\pi/1-\pi]$ de cada estudo e a média ponderada (usando o tamanho da amostra como peso) dessas densidades, que corresponde à meta-análise (Figura 20). Na figura, a curva da meta-análise foi multiplicada por 2 para que se sobressaísse das outras densidades. Através da figura 20 é possível observar que a curva tem o zero próximo ao seu valor de densidade máximo, o que indica que a hipótese nula não foi rejeitada. A área aproximada de valores de $\log OR$ maiores que zero não foi significativamente maior que a área com valores de $\log OR$ negativos. Considerando o total dos estudos e usando a densidade metanalítica foram obtidos os intervalos para cada parâmetro (Tabela 20). Uma vez que os parâmetros: $\log OR$ inclui o zero, razão de chances (OR) inclui o valor 1 e a frequência (p) inclui o valor 0,5 em seus intervalos de credibilidade de 95%, a meta-análise não mostra associação entre o polimorfismo rs4680 do *COMT* e o TOC (Tabela 20).

Figura 20: Função de densidade de cada estudo de associação baseado em famílias entre o gene da catecol O-metiltransferase e o transtorno obsessivo-compulsivo e média ponderada das densidades (meta-análise).



Legenda: LogOR: logaritmo da razão de chances; MT: média das verossimilhanças ou meta-análise.

Tabela 19: Parâmetros nos estudos adotados para cálculo da meta-análise

Estudos	DiBella	Alsobrook	OCF MINI	Sampaio	Schindler	Karayo rgou	Camarena	W.Liu
N	67	56	352	73	72	110	71	103
T	70	43	149	34	31	115	52	43
U	65	35	133	37	36	106	62	40
Di(T+1)	4,26	3,77	5,01	3,54	3,45	4,45	3,96	3,77
DI(U+1)	4,18	3,57	4,89	3,62	3,60	4,67	4,14	3,70
Tri(T+1)	0,014	0,023	0,007	0,029	0,033	0,009	0,019	0,023
Tri(U+1)	0,015	0,028	0,008	0,027	0,027	0,009	0,016	0,025
Média	0,08	0,20	0,12	-0,08	-0,15	-0,22	-0,18	0,07
DP	0,172	0,226	0,119	0,236	0,245	0,135	0,187	0,218

Legenda: N: tamanho da amostra; T: número de alelos Met transmitidos; U: número de alelos Met não transmitidos; Di(T+1): função Digamma para transmissões; DI(U+1): função Digamma para não-transmissões; Tri(T+1): função Trigamma para transmissões; Tri(U+1): função Trigamma para não-transmissões; DP: desvio padrão

Tabela 20: Média e intervalos de credibilidade para a densidade meta-análise

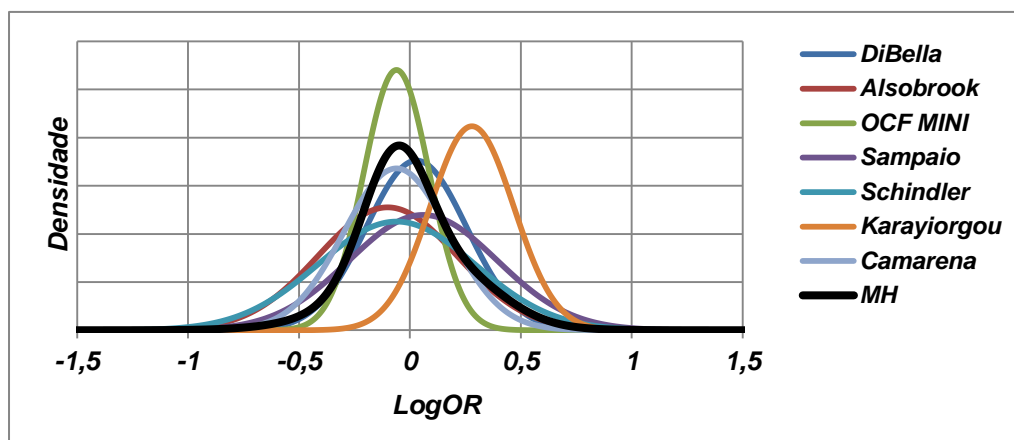
Parâmetros	Credibilidade	Meta-análise
LogOR = 1	Limite Inferior	-0,454
	média	0,013
	Limite Superior	0,408
Odds Ratio= $p/(1-p)$	Limite Inferior	0,635
	média	1,013
	Limite Superior	1,504
Frequência = p	Limite Inferior	0,388
	média	0,503
	Limite Superior	0,601

Legenda: LogOR: Logaritmo da razão de chances; Odds Ratio: razão de chances; Meta-análise: valores dos parâmetros na função metanalítica

5.4.1. Meta-análise bayesiana com amostra de probandos do sexo masculino

Uma vez que o estudo W. Liu et al. (71) não incluiu informações sobre análise separada por sexo, as meta-análises com os subgrupos masculino e feminino foram realizadas com 7 estudos. Também no subgrupo masculino a curva de densidade da meta-análise apresentou relativa simetria ao redor do $\log\text{OR}=0$, e com área de valores de $\log\text{OR}$ positivos sem diferença da área de valores com $\log\text{OR}$ negativos o que indica ausência de associação entre o polimorfismo estudado e o TOC. As curvas não apresentaram dispersão importante, mostrando pouca variabilidade entre estudos (Figura 21).

Figura 21: Função de densidade de cada estudo de associação baseado em famílias entre o gene da catecol O-metiltransferase e o transtorno obsessivo-compulsivo e média ponderada das densidades (meta-análise) para subgrupo masculino



Legenda: LogOR: logaritmo da razão de chances; MH: densidade para amostra masculina ou meta-análise para amostra masculina.

Tabela 21: Parâmetros nos estudos para função de densidade da amostra masculina

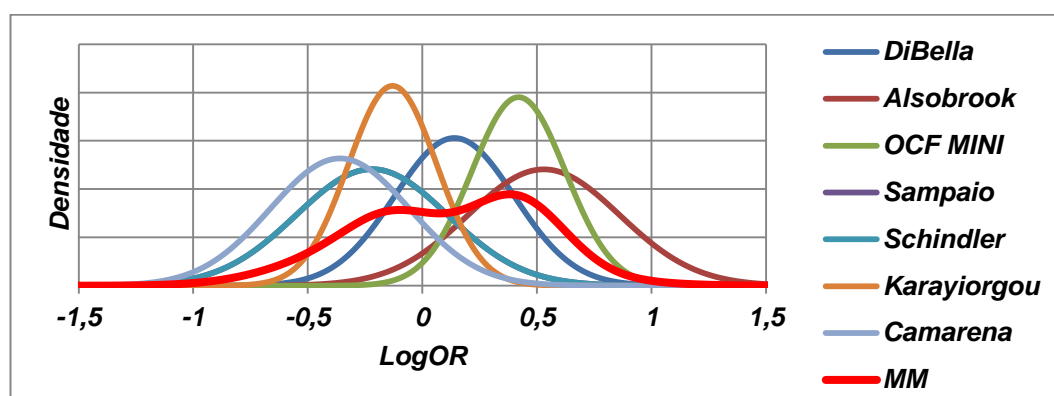
Estudos	DiBella	Alsobrook	OCF MINI	Sampaio	Schindler	Karayiorgou	Camarena
N	36	26	223	44	29	54	45
T	39	19	89	18	15	65	34
U	38	21	94	17	16	49	36
Di(T+1)	3.68	2.97	4.49	2.92	2.74	4.18	3.54
Di(U+1)	3.65	3.07	4.55	2.86	2.80	3.90	3.60
Tri(T+1)	0.025	0.051	0.01	0.05	0.065	0.015	0.029
Tri(U+1)	0.026	0.047	0.01	0.06	0.061	0.02	0.027
Média	0.03	-0.10	-0.06	0.06	-0.06	0.28	-0.06
DP	0.227	0.313	0.15	0.33	0.354	0.188	0.238

Legenda: N: tamanho da amostra; T: numero de alelos Met transmitidos; U: número de alelos Met não transmitidos; Di(T+1): função Digamma para transmissões; Di(U+1): função Digamma para não-transmissões; Tri(T+1): função Trigamma para transmissões; Tri(U+1): função Trigamma para não-transmissões; DP: desvio padrão

5.4.2. Meta-análise bayesiana com amostra de probandos do sexo feminino

Foram incluídos 7 estudos na meta-análise, pois um dos estudos não disponibilizou informação separada por sexo (71). No subgrupo feminino a curva de densidade da meta-análise foi menos simétrica com maior área de valores de logOR positivos, mas sem diferença significativa (Figura 22). A curva metanalítica também incluiu o $\log OR=0$ no eixo x , o que indica ausência de associação entre o polimorfismo rs4680 e o TOC. Neste gráfico é possível observar maior dispersão entre as curvas dos estudos incluídos, representando maior variabilidade e heterogeneidade entre estudos. A curva que representa o estudo Sampaio et al., 2010 está sobreposta à curva que representa o estudo Schindler et al., 2000 (Figura 22) por terem o mesmo número de alelos Met transmitidos e não transmitidos na amostra feminina (Tabela 22).

Figura 22: Função de densidade de cada estudo de associação baseado em famílias entre o gene da catecol O-metiltransferase e o transtorno obsessivo-compulsivo e média ponderada das densidades (meta-análise) para subgrupo feminino



Legenda: LogOR: Logarítmo da razão de chances, MM: densidade média para amostra feminina ou meta-análise para amostra feminina.

Tabela 22: Parâmetros dos estudos para função de densidade da amostra feminina

Estudos	DiBella	Alsobrook	OCF MINI	Sampaio	Schindler	Karayiorougou	Camarena
N	31	30	129	39	43	56	26
T	31	24	60	16	16	50	18
U	27	14	39	20	20	57	26
Di(T+1)	3,45	3,20	4,10	2,80	2,80	3,92	2,92
Di(U+1)	3,31	2,67	3,68	3,02	3,02	4,05	3,28
Tri(T+1)	0,03	0,04	0,02	0,06	0,06	0,02	0,05
TriU+1)	0,04	0,07	0,03	0,05	0,05	0,02	0,04
Média	0,14	0,53	0,42	-0,22	-0,22	-0,13	-0,36
DP	0,26	0,33	0,20	0,33	0,33	0,19	0,30

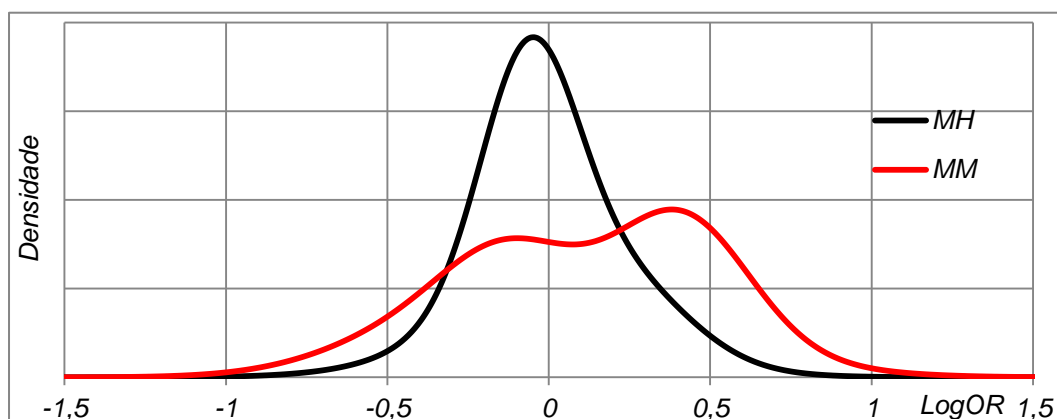
Legenda: N: tamanho da amostra; T: número de alelos Met transmitidos; U: número de alelos Met não transmitidos; Di(T+1): função Digamma para transmissões; Di(U+1): função Digamma para não-transmissões; Tri(T+1): função Trigamma para transmissões; Tri(U+1): função Trigamma para não-transmissões; DP: desvio padrão

5.4.3. Comparação das meta-análises com amostra masculina e amostra feminina

Não houve associação entre o polimorfismo rs4680 do *COMT* e o TOC na meta-análise dos subgrupos masculino e feminino, nem na amostra total. A maior dispersão entre estudos na amostra feminina se reflete no formato da curva com dois ápices (Figura 23).

Quando foi feita a meta-análise levando-se em consideração a variabilidade entre homens e mulheres (e sem a inclusão do estudos W.Liu et al, 2011), a curva da densidade média teve formato discretamente diferente (Figura 24) daquela encontrada pela média das verossimilhanças dos 8 estudos (Figura 20). Quando comparadas as áreas das curvas, com logOR positivo, das meta-análises com amostras de probandos femininos e masculinos tem-se que a probabilidade de uma mulher escolhida ao acaso ter valor de logOR maior do que a do homem escolhido também ao acaso é de 60,52%. Portanto, houve na metanálise bayesiana uma tendência discreta a maior positividade na amostra feminina.

Figura 23: Comparação das curvas de densidade entre meta-análises com amostra masculina e feminina



Legenda: LogOR: logaritmo da razão de chances; MH: verossimilhança média para amostra masculina ou meta-análise para amostra masculina; MM: verossimilhança média para amostra feminina ou meta-análise para amostra feminina.

Tabela 23: Comparação das probabilidades de logaritmo de razão de chances entre áreas de densidade das curvas de meta-análise para amostra masculina e para amostra feminina.

	Homens	Mulheres	Média
$P(\text{LogOR} \leq 0)$	54.543%	39.813%	48.113%
$P(\text{LogOR} > 0)$	45.457%	60.187%	51.887%

Legenda: $P(\text{LogOR} < 0)$: probabilidade do logaritmo da razão de chances ter valor menor ou igual a zero; $P(\text{LogOR} > 0)$: probabilidade do logaritmo da razão de chances ter valor maior que zero.

Figura 24: Densidades dos estudos e média das densidades (meta-análise) levando em conta a variabilidade entre mulheres e homens.



Legenda: LogOR: logaritmo da razão de chances

6. DISCUSSÃO

6.1. Associação entre o gene da catecol O-metiltransferase e o transtorno obsessivo-compulsivo

Existe um conjunto de evidências de que fatores genéticos contribuem para a expressão do TOC. A relação do polimorfismo rs4680 do *COMT* com o TOC vem sendo estudada por diferentes grupos com achados não concordantes, tanto em estudos originais como em meta-análises envolvendo esses estudos. Buscando superar limitações metodológicas de estudos prévios, como por exemplo a interferência da estratificação populacional, esta tese teve como foco os estudos de associação baseados em famílias que avaliassem tal polimorfismo no TOC.

A metodologia HuGE adotada permitiu uma busca extensiva e minuciosa enriquecendo os resultados e trazendo vantagens metodológicas quando comparada às revisões sistemáticas feitas habitualmente. Isto pode ser observado na revisão sistemática com todos os genes no TOC, apresentada na introdução desta tese (seção 1.6, tabela 8) que encontrou apenas quatro estudos de associação baseados em famílias envolvendo o gene *COMT* e o TOC, enquanto que a partir da metodologia HuGE, dez estudos foram selecionados.

Seguindo o protocolo acima, os resultados da meta-análise realizada nesta tese, tanto com método convencional como com o método bayesiano, não encontrou associação entre o polimorfismo rs4680 do *COMT* e o TOC na amostra total ou quando os trios de probandos masculinos e femininos foram analisados separadamente.

A metodologia HuGE de revisão sistemática teve uma influência na ausência de associação observada nesta meta-análise. Isto ocorreu porque, segundo esta metodologia, incluíram-se estudos não publicados e literatura cinza (bibliografia publicada em fontes pouco acessíveis por bases de dados, vide descrição detalhada na seção 1.8), aumentando-se a chance de inclusão de estudos com achados negativos (que muitas vezes não são publicados). Deste modo, o resultado da análise com a amostra agrupada (meta-análise) tende à nulidade (193), e há menor risco de resultado falso-positivo e de viés de publicação.

Os achados da presente meta-análise, juntamente com os achados da meta-análise de Azzam e Mathews (194), não confirmam a associação entre *COMT* e homens com TOC encontrada nas outras meta-análises realizadas por Pooley et al. (182) e Taylor 2012 (200). Vale ressaltar que a meta-análise de Polley et al.(182) incluiu apenas estudo tipo caso-controle e a meta-análise atual incluiu apenas estudos baseados em famílias. Esta diferença entre os critérios de inclusão de estudos traz repercussões: os estudos tipo caso-controle conseguem obter maior poder estatístico para o mesmo número de casos que o estudo de trios. No entanto, ele está mais sujeito ao viés de estratificação populacional.

É interessante notar que, usando uma metodologia de revisão mais adequada, o método HuGE, a meta-análise atual conseguiu incluir um número maior de artigos que as meta-análises de Azzam e Mathews (194) e de Pooley et al.(182). Já o estudo de Taylor (200), publicado este ano (quando esta tese já se encontrava em fase de conclusão, cuja busca foi realizada em primeiro de março de 2012) incluiu o mesmo número de artigos (nove). Seis estudos analisados aqui, não foram lá incluídos representando a omissão de 694 trios (2.082 indivíduos). Vale ressaltar que entre

estes seis estudos que foram incluídos na nossa meta-análise há dois estudos originais (183, 219), ainda não publicados, que tiveram a participação da autora desta tese, tendo sido um deles em primeira autoria (183).

Portanto, a presente meta-análise é aquela com maior contingente de estudos de família até o momento. Ainda assim, com uma amostra de 2874 indivíduos genotipados, a presente meta-análise, também não alcançou um tamanho de amostra ideal. Segundo o protocolo interino de Veneza (201) que classifica o que há de conhecimento acumulado sobre associação gene-doença (vide seção 4.1.5), e considerando em 20% a frequência de indivíduos portadores do genótipo Met/Met, a amostra da nossa meta-análise tem quase 575 indivíduos com este genótipo. Por ser um valor inferior a 1000, a presente meta-análise, assim como as meta-análises prévias, manteve a categoria B de *montante de evidência*. Na categoria *replicação*, a associação entre *COMT* e TOC seria categoria C uma vez que a associação não foi replicada neste estudo. E em relação ao item *proteção contra viés*, uma vez que a informação sobre controle de viés estava incompleta na maioria dos estudos incluídos nas meta-análises, a categoria seria B. Segundo o protocolo interino de Veneza (201), o conjunto de conhecimento sobre a associação entre *COMT* e TOC teria categoria final BCB, que significa uma fraca evidência de associação.

6.2. Catecol O-metiltransferase e o transtorno obsessivo-compulsivo de acordo com o sexo e outros subcomponentes do seu fenótipo.

A ausência de associação observada nesta revisão pode ter algumas explicações não relacionadas à metodologia dos estudos. Como ilustrado na introdução, a COMT tem um papel central no metabolismo da dopamina (237, 238) e age em interação próxima com outras moléculas, como a enzima MAO-A (239, 240) e o transportador de dopamina (DAT) (241). O TOC envolve interação entre vias dopaminérgicas, serotoninérgicas e glutamatérgicas (10, 242-245). Com isso, uma alteração funcional na COMT seria apenas um dos componentes de uma destas vias, e mecanismos compensatórios envolvendo a MAO-A, DAT, ou outras substâncias poderiam em tese evitar o desenvolvimento do TOC.

A enzima COMT tem função de metabolizar catecolaminas em diversas regiões do SNC, podendo ter repercussões inespecíficas quando da sua alteração funcional. Talvez, por este motivo, estudos com polimorfismos do *COMT* mostraram associação com diversos transtornos psiquiátricos, tais como: psicose induzida por *cannabis* (246) ou por estresse (247), comportamento suicida (248), esquizofrenia (162-164, 249-254), transtorno afetivo bipolar (252, 254, 255), alcoolismo (256, 257), transtornos por uso de substâncias (258, 259), depressão (260, 261), anorexia nervosa (166) e transtorno de hiperatividade e déficit de atenção (137) e outros transtornos psiquiátricos em diferentes estudos (165, 262-267).

Além disso, o TOC é um transtorno heterogêneo, existe a hipótese de que diferentes subgrupos de TOC possam receber influência de diferentes genes. Entre esses subgrupos, é em relação ao sexo que a associação entre *COMT* e TOC tem sido mais estudado. Diversos estudos, com diferentes genes, mostraram associação genética diferente entre sexos (67, 85, 86, 88, 107, 114, 174, 177, 181, 182, 268-272).

Nossos resultados não encontraram associação para nenhum dos gêneros, quando avaliados separadamente, mas a amostra feminina apresentou heterogeneidade entre os estudos. Como foi apresentado na introdução, a enzima COMT participa do metabolismo dos catecol-estrógenos. Alguns dos estudos de associação entre *COMT* e TOC apresentaram associação positiva apenas para um dos sexos. A atividade enzimática da COMT provavelmente está sob controle hormonal. Comparação entre homens e mulheres encontrou uma atividade hepática da COMT significativamente menor em mulheres (273). Um estudo avaliou a atividade enzimática hepática da COMT em ratos e encontrou redução em 30% da atividade após cinco dias de administração de estradiol, o que mostra um efeito modulador da atividade da COMT por hormônios sexuais femininos (274).

Um estudo brasileiro avaliou a atividade da COMT em hipotálamo de ratos durante o seu desenvolvimento e maturação sexual (275). Eles encontraram que a atividade da COMT passou a ser maior em fêmeas a partir do oitavo dia de vida. A diferenciação sexual no cérebro de ratos ocorre, por exposição de hormônios sexuais, durante a vida intra-uterina e até o 7º. dia de vida. Neste estudo, os autores observaram que a exposição à testosterona à época do nascimento de fêmeas reduziu a atividade da COMT na vida adulta ao mesmo nível de atividade encontrada nos machos e que a atividade da COMT nos machos castrados ao nascimento foi idêntica à das fêmeas quando adultos (275). Estes achados mostram que a atividade da COMT é diferente entre os sexos e que esta diferença parece ser epigeneticamente mediada.

Estudos em animais mostraram que o *COMT* influencia os níveis centrais de catecolaminas, de forma diferente para cada sexo (122) e estudos em portadores da

Síndrome Velocardiofacial mostram diferenças entre os sexos, moderadas pelo *COMT*, em estrutura e função do córtex pré-frontal (276). Wang et al. (2009) em um estudo de expressão do gene *COMT*, encontraram menor expressão do gene em pacientes com TOC que em controles e mulheres tiveram expressão mais baixa que homens (277).

No entanto, ainda são pouco conhecidas as repercussões do polimorfismo rs4680 no comportamento de mulheres (278-280).

Três estudos incluídos nesta meta-análise encontraram associação específica para sexo. O estudo de Karayourgur et al. (198) encontraram transmissão preferencial do alelo de baixo funcionamento (Met) nos portadores de TOC do sexo masculino ($P=0,01$). Este foi um dos primeiros estudos de famílias no tema e apresentou algumas limitações metodológicas: pequeno número amostral (47 probandos masculinos), método de genotipagem dependente do avaliador e sujeito a viés de aferição, não foram apresentados dados de controle de qualidade e de equilíbrio de Hardy-Weinberg. Apesar da associação diferencial para sexo ter sido a hipótese principal, também foram feitas múltiplas análises (HRR, TDT para alelos e avaliação dos genótipos para ambos os sexos) e não foi utilizada ferramenta para correção dos resultados para múltiplos testes. O estudo do OCF-MINI (219) encontrou uma associação entre o rs4680 e o TOC apenas nos probandos caucasianos do sexo feminino. Este foi o estudo com maior amostra (129 probandos caucasianos do sexo feminino), o qual estabeleceu critérios de qualidade rigorosos e métodos de genotipagem automatizados, o que reduziu o risco de viés de aferição. Apesar deste estudo ter utilizado amostras de diferentes centros, que adotaram entrevistas diagnósticas diversas, todas foram baseadas nos critérios do DSM-IV, de modo que a

amostra deve ser homogênea em termos de diagnóstico. Este estudo também realizou múltiplas análises (outros polimorfismos foram avaliados) e a associação positiva não se manteve após o teste de permutações, utilizado para minimizar o risco de resultado falso positivo. Alsobrook et al. (197) encontraram uma associação entre *COMT* e TOC na amostra feminina ($P=0,048$) quando feita análise com o teste HRR. Este estudo teve um tamanho de amostra modesto (56 trios) e não realizou controle para múltiplas testagens.

A influência do sexo pode ter explicações diferentes. Como revisado por de Mathis et al. (281) o TOC em homens tende a ter início mais precoce, mais sintomas de simetria, contagem, sexuais, religiosos e de colecionismo. Homens também tem mais transtornos de tiques, transtornos por uso de substâncias e fobia social em comorbidade com o TOC. Já as mulheres tem início mais tardio do TOC, mais rituais de limpeza e comorbidade com transtornos de controle dos impulsos (281).

Como dissemos acima, a associação entre *COMT* e TOC poderia ainda estar associada a subcomponentes do fenótipo. Os subgrupos do TOC podem ser organizados, entre outras formas, por gênero, idade de início dos sintomas, dimensão dos sintomas e comorbidade com outros transtornos mentais, como transtorno de tiques (282, 283). Além disso, é possível que o gene da *COMT* esteja relacionado a endofenótipos (definidos como traços biológicos quantitativos herdáveis (284)) associados a maior risco para o desenvolvimento do TOC. Abaixo discutimos os diferentes achados dos estudos do *COMT* no TOC, segundo estas diversas variáveis.

Por exemplo, estudos prévios mostraram associação genética apenas quando a amostra foi dividida entre aqueles com idade de início precoce e tardia do TOC (62,

63, 71, 78, 85, 228, 285). Uma vez que as evidências de influência genética são mais robustas para TOC de início precoce que para o TOC de início tardio (29, 31), a associação entre genes candidatos e o TOC pode ser mais facilmente demonstrada no subgrupo de idade de início precoce. Não foi possível avaliar esta característica na meta-análise pois esta não foi uma variável avaliada pela maioria dos estudos.

Existe também uma tentativa de subdividir o TOC de acordo com a dimensão de sintomas apresentada pelos pacientes, com a hipótese de que estes estariam relacionados com um substrato neurobiológico específico. O colecionismo, por exemplo, tem características específicas em termos de epidemiologia, resposta ao tratamento, achados de neuroimagem (172, 286-288) e genéticos (289). Um estudo mostrou que o genótipo Met/Met esteve menos frequente em pacientes com maiores escores na dimensão de sintomas “tabu” (290). Diferentes dimensões de sintomas parecem estar relacionadas à ativação de diferentes vias neurais. Um estudo com ressonância magnética funcional encontrou que pacientes com predominância de sintomas de limpeza tinham maior ativação nas regiões pré-frontal ventromedial e núcleo caudado direito; nos que tinham mais sintomas de checagem, a ativação era maior no putâmen/ glóbulo pálido e áreas corticais dorsais; nos que apresentam mais colecionismo, a ativação era maior no giro pré-central esquerdo e córtex órbito-frontal direito e para sintomas aversivos, a região occipito-temporal esquerda (291). Como a COMT tem influência principalmente em áreas corticais, talvez ela possa contribuir com a fisiopatologia do TOC apenas em dimensões específicas de sintomas onde o papel dessas estruturas é mais relevante. Na presente meta-análise, as dimensões de sintomas também não foram avaliadas especificamente uma vez que este dado não constava nos estudos selecionados.

É importante ainda relatar a peculiaridade das comorbidades psiquiátricas, uma vez que estas, no TOC, são mais uma regra que uma raridade. Por exemplo, estudos de família apontam de forma consistente uma associação entre TOC e Síndrome de Tourette (292-295). O envolvimento do sistema dopaminérgico (244) é um fator comum entre o TOC e os transtornos de tiques. A Síndrome de Tourette já foi associada a genes relacionados à dopamina tais como o gene do receptor da dopamina D2 (DRD2) (87, 296, 297), receptor da dopamina D4 (DRD4) (298), transportador da dopamina (DAT) (299) e monoamino oxidase A (MAO-A) (298). Estudos prévios (descritos na seção 1.3.1.2) também relataram achados positivos de associação entre alguns genes relacionados à dopamina e o TOC com comorbidade com transtorno de tiques (65, 66, 69). Porém é interessante notar que nenhum dos estudos avaliando o gene da COMT em portadores de Síndrome de Tourette ou transtornos de tiques como diagnóstico principal encontrou associação positiva (300-303). Isso talvez tenha relação com o fato da Síndrome de Tourette ter como base fisiopatológica uma alteração em gânglios da base. As alterações da COMT não levam a mudança na disponibilidade de dopamina nos gânglios da base por efeito compensatório exercido pela MAO-A (122). Porém, na fisiopatologia do TOC o córtex frontal está envolvido e há alteração significativa da disponibilidade da dopamina nesta região pela variação do polimorfismo rs4680 do *COMT* (122). No nosso estudo original, não foi encontrada associação entre os polimorfismos do *COMT* e o TOC com comorbidades com transtornos de tiques (Anexo C). Também por escassez de dados sobre fenótipo nos outros estudos selecionados, a comorbidade com transtornos de tiques não foi avaliada na meta-análise.

Quanto à associação entre COMT e endofenótipos de risco para o TOC, a resposta de sobressalto após estímulo acústico é um comportamento de base neurobiológica, geneticamente mediado, que mede a reatividade emocional refletindo um estado defensivo-motivacional. Aumento desta resposta reflexa já foi associado a transtornos de ansiedade e ao TOC (304, 305). O alelo 158Met do COMT foi associado a maior resposta de sobressalto reflexa (306) em um estudo recente que avaliou essa resposta reflexa em adultos com e sem história de maus tratos na infância quanto o polimorfismo rs4680 e encontrou que os portadores do genótipo Val/Val tinham respostas de maior magnitude enquanto os homozigotos para o alelo Met tinham respostas embotadas diante de estímulos aversivos. Os sujeitos expostos a maus tratos na infância tiveram maiores respostas de susto quando portadores do genótipo Val/Val, mas não houve influência na resposta em portadores do alelo Met (307).

Finalmente, os achados negativos foram concordantes para ambas metodologias adotadas: convencional e bayesiana o que reforça a acurácia dos achados.

6.3. Limitações

Algumas explicações para os achados negativos da presente meta-análise merecem ser discutidas. Primeiro, mesmo com todos os cuidados da metodologia utilizada, o número de estudos selecionados na revisão sistemática e incluídos na meta-análise foi pequeno. Com isso, o poder estatístico é reduzido e a chance de resultado falso negativo.

Da mesma forma, em um universo pequeno de estudos, a influência de cada um no resultado é alta. Isso, somando-se ao fato da heterogeneidade dos métodos e amostras empregados em cada estudo, diminui a confiabilidade dos resultados.

Buscando uma abordagem mais conservadora, os testes para heterogeneidade foram aplicados mesmo para as análises com resultados negativos. A análise com a amostra feminina encontrou heterogeneidade entre os estudos.

Os estudos de Alsobrook et al. e o do OCFMINI encontraram associação positiva entre COMT e TOC na amostra feminina. Este último estudo foi o que mais contribuiu para heterogeneidade no gráfico de Garlbraithe (Figura 18). De fato ele, assim como o estudo de Sampaio et al., 2010, usa métodos de genotipagem e de controle de qualidade diferentes dos demais. Além disso, ele é o estudo com maior tamanho amostral inserido na meta-análise, portanto o que mais contribui com os resultados da meta-análise, como visto na análise de sensibilidade.

Para avaliar covariáveis que contribuíssem para a heterogeneidade, foi realizada uma metarregressão. O ano de execução dos estudos foi uma covariável significativamente associada à presença de heterogeneidade na amostra feminina pela metarregressão. O estudo OCFMINI é também um estudo recente (ainda não publicado), o que pode estar relacionado a este achado. A inclusão do estudo OCFMINI na meta-análise, por ser um estudo com amostra grande, é importante por aumentar o poder da análise, não apenas contribuindo com viés.

A etnia latina também contribuiu para explicar a heterogeneidade entre estudos na amostra feminina, pela metarregressão. Dois estudos incluíram participantes com esta etnia: o estudo original, com brasileiros, apresentado nesta tese (183) e o estudo de mexicano de Camarena et al. (209). A metodologia do nosso

estudo original, por ser diferente dos demais, pode estar contribuindo para o achado de heterogeneidade.

A heterogeneidade encontrada na meta-análise com amostra feminina também pode ser reflexo do fato de as mulheres terem início mais tardio dos sintomas de TOC, e do TOC com idade de início tardio ter menor influência genética. Assim, é possível que a etiologia do TOC na população feminina sofra menor influência genética e maior influência do ambiente, do que na população masculina.

Por meio da meta-análise bayesiana, a heterogeneidade entre estudos fica visível, e não há como apontar um único estudo como responsável pela dispersão.

Os resultados da meta-análise são restritos ao polimorfismo funcional rs4680 e não ao gene *COMT*. Outros polimorfismos no gene, haplótipos e variações raras não foram avaliados. Portanto, não podemos descartar com segurança a participação do *COMT* na fisiopatologia do TOC.

6.4. Perspectivas de estudos futuros

Os resultados obtidos na presente tese apontam para a hipótese nula. Porém, não permitem que a hipótese de associação entre o polimorfismo rs4680 do *COMT* e o TOC possa ser refutada definitivamente.

Diversos processos intermediários entre a expressão do *COMT* e o fenótipo final podem ter uma papel relevante em influenciar a compreensão da associação entre *COMT* e o TOC. Entre esses, destacam-se a interação entre genes, a interação

entre gene e o ambiente, fatores epigenéticos e fenótipos intermediários, como endofenótipos.

Uma vez que a COMT interage com outras enzimas e moléculas no metabolismo e distribuição de neurotransmissores catecolaminérgicos no sistema nervoso central, a epistase genética deve ser avaliada. Portanto, a associação entre o gene da COMT e o TOC quando em interação com outros genes (tais como *MAO-A* e *DAT*) merece ser avaliada no futuro.

Além disso, devemos ter em mente que os processos genéticos são dinâmicos e alterações podem surgir pela interação com o ambiente. Por exemplo, em relação ao polimorfismo rs4680 do *COMT* existem achados consistentes de que os portadores do alelo Val tem maior chance de desenvolver psicose ou esquizofrenia com o uso de *cannabis* (308)

Fatores ambientais podem também influenciar, alterando as moléculas do DNA ou RNA, ou apenas alterando sua expressão ao longo da vida (309). Estes eventos, chamados epigenéticos, ainda precisam ser mais investigados no TOC.

Eventos ambientais tem papel relevante no surgimento do TOC, como por exemplo, fatores pré, peri e pós natais (310), gravidez, período puerperal (311, 312) e nascimento de bebê na família (313), infecção por estreptococos (96, 97), acompanhada ou não por Febre Reumática (93, 94, 314). Além disso, Alguns pesquisadores discutem a hipótese de que as metilações do DNA podem ser inversamente proporcionais à idade, então a exposição a fatores ambientais em idade precoce aumentaria a susceptibilidade à alteração na expressão gênica, epigeneticamente mediada (315). Mecanismos epigenéticos que influenciem o desenvolvimento do TOC, bem como a faixa etária de maior vulnerabilidade à

influência ambiental ainda precisam ser estudados. Uma vez que a atividade da COMT é modulada pela diferenciação sexual hormônio-dependente (279), a investigação da influência do *COMT* no desenvolvimento do TOC em fases de alteração hormonal como na puberdade, gravidez e puerpério seria um passo interessante.

Diversos estudos apontam para influência do polimorfismo rs4680 do gene da COMT em funções cognitivas envolvidas com o TOC (316). Considerando a grande variabilidade fenotípica que uma alteração genética pode provocar, o uso de fenótipos intermediários ou endofenótipos (definidos como traços biológicos quantitativos herdáveis (284)), pode funcionar como elo entre a variante genética e o diagnóstico sindrômico e assim ajudar na elucidação da relação entre o *COMT* e o TOC.

Assim, a comparação do desempenho de indivíduos com TOC, portadores de cada genótipo do polimorfismo rs4680 do *COMT*, em testes neuropsicológicos de funções cognitivas corticais, tais como memória de trabalho, inflexibilidade cognitiva e controle de impulsos, podem ser interessantes para esclarecer a verdadeira relação entre o *COMT* e o TOC.

7. CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados, é possível concluir que:

1. O método HuGE se mostrou eficaz em permitir uma busca abrangente de estudos de no tema.
2. As metanálises mostraram ausência de associação entre o polimorfismo rs4680 (Val158Met) do *COMT* e o transtorno obsessivo-compulsivo. Também não houve associação quando as análises foram realizadas em sub-grupos separados por sexo.
3. O uso de diferentes métodos meta-analíticos, convencional e bayesiano, trouxe resultados concordantes quanto à ausência de associação entre o polimorfismo rs4680 (Val158Met) do gene da *COMT* e o transtorno obsessivo-compulsivo.

O presente estudo confirma a hipótese nula, não encontrando transmissão preferencial dos alelos do polimorfismo rs4680 do *COMT* para probandos com TOC. A hipótese nula foi novamente confirmada uma vez que não houve diferença no resultado alcançado com os métodos convencional e bayesiano.

8. ANEXOS

8.1 – Anexo A: Revisão Sistemática dos Estudos de Associação Genética no Transtorno Obsessivo-Compulsivo. Submetido a Revista de Psiquiatria Clínica em 22 de junho de 2012 (39).

Revisão Sistemática dos Estudos de Associação Genética no Transtorno Obsessivo-Compulsivo / Systematic Review of Genetic Association Studies in Obsessive-Compulsive Disorder

Aline Santos Sampaio^{1,2}, Rita Márcia Pacheco Lins², Renato Daltro-Oliveira², Lucas de Castro Quarantini^{2,3}, Ana Gabriela Hounie¹, Eurípedes Constantino Miguel¹

1. Departamento e Instituto de Psiquiatria, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil
2. Departamento de Neurociências e Saúde Mental, Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, Bahia, Brasil
3. Universidade Federal da Bahia (UFBA), Pós-graduação em Medicina e Saúde, Salvador, Bahia, Brasil

Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - Rua Ovídio Pires de Campos, 785, 3º andar, CEAPESQ, sala 7. CEP: 05.403-010, Cerqueira César, São Paulo, SP

Telefone: +55 11 (11) 2661-6972

Autor para correspondência:

Aline Santos Sampaio

Email: aline.sampaio@ufba.br

RESUMO

INTRODUÇÃO: O caráter familiar do transtorno obsessivo-compulsivo (TOC) já é bem estabelecido. Ele segue o modelo complexo de transmissão genética, que envolve a influência de diversos genes de pequeno efeito em interação com o ambiente. **MÉTODOS:** Foi realizada uma revisão sistemática de estudos de associação genética com o TOC. **RESULTADOS:** Foram selecionados 154 artigos cujos principais resultados foram agrupados em grupos de genes relacionados à serotonina, dopamina, glutamato, GABA, outros genes (MAO-A, BDNF, COMT), substância branca, sistema imune e hormônios. **CONCLUSÃO:** Há grande variabilidade nos achados de estudos de associação entre os diversos genes candidatos estudados e o TOC. Genes relacionados às vias glutamatérgicas são candidatos promissores, porém não há associação conclusiva entre nenhum dos genes candidatos estudados e o TOC. Estudos de associação com grande tamanho amostral, avaliação de subgrupos mais homogêneos do fenótipo e meta-análises ainda são necessários.

Palavras-chave: associação, gene, transtorno obsessivo-compulsivo, revisão

ABSTRACT

Systematic Review of Genetic Association Studies in Obsessive-Compulsive Disorder

BACKGROUND: The obsessive-compulsive disorder (OCD) segregates in families. It follows a complex model of genetic transmission, which involves the influence of several genes of small effect interacting with the environment. **METHODS:** We performed a systematic review of genetic association studies in OCD. **RESULTS:** We selected 154 papers and described their main results grouped as: serotonin-related genes, dopamine-related genes, glutamate-related genes, GABA-related genes, white matter-related genes, immune system-related genes, hormones-related genes and other genes. **CONCLUSION:** There is high variability between findings of association studies among the several candidate genes studied in OCD. Glutamate-related genes are promising candidates for OCD, but there is

noconclusiveassociationbetween any of thecandidate genesstudiedand OCD. Association studieswith largesample size, evaluation of more homogeneous subgroupsof phenotypeand meta-analysesare still needed.

Keywords: association, gene, obsessive-compulsive disorder, review

INTRODUÇÃO

Transtorno Obsessivo-Compulsivo

O transtorno obsessivo-compulsivo (TOC) é o quarto transtorno psiquiátrico mais frequente com uma prevalência de 2,0% a 2,5% ao longo da vida (1). Segundo os critérios do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-IV), o TOC é caracterizado pela presença de obsessões e/ou compulsões, capazes de interferir no funcionamento normal do indivíduo. Essas obsessões/compulsões ocorrem por no mínimo uma hora por dia e acarretam sofrimento significativo ou comprometimento social (2).

O TOC é um transtorno em geral crônico e se manifesta independentemente de sexo, raça, inteligência, estado civil, nível socioeconômico, religião ou nacionalidade. Os estudos transculturais mostram que os sintomas do TOC são semelhantes nas diversas populações e culturas (3), fatos que falam a favor de fatores biológicos e genéticos contribuindo para sua etiologia.

Genética do TOC

Apesar de teorias psicológicas terem embasado o surgimento do conceito de TOC (26) existem evidências crescentes de que o mesmo é mediado por uma interação genético-ambiental. De fato, o envolvimento de fatores genéticos na etiologia do TOC vem sendo enfatizado desde as primeiras descrições do quadro (27).

Vários estudos de famílias tem fornecido evidências de que o TOC é familiar (28-31). Uma meta-análise, envolvendo 312 probandos e 1.209 familiares de primeiro grau de probandos com TOC, encontrou um risco agregado de 8,2% entre os familiares “caso” e de 2% entre os familiares “controle”, com uma razão de chances de 4 (95% IC=2,2;7,1) de apresentar TOC (32). Estudos de gêmeos(33, 34)permitem calcular uma taxa de herdabilidade entre 26% e 33% para os transtornos do espectro

obsessivo-compulsivo. O modelo de transmissão mais aceito para o TOC é o modelo misto ou complexo, que envolve a influência de diversos genes de pequeno efeito em interação com o ambiente (35).

Estudos de associação tem a finalidade de detectar genes específicos envolvidos em um transtorno. Com o desenho de caso-controle, tenta-se investigar se existe uma distribuição significativamente diferente de uma variante alélica entre os indivíduos afetados (casos) e não afetados (controles) pelo fenótipo (38). A principal limitação da análise de associação caso-controle pode ser pela estratificação populacional, ou seja, quando os casos não estão etnicamente pareados com os controles. Os estudos baseado em famílias, que avaliam o probando, e seus pais biológicos, o que constitui um “trio”, controla o viés da estratificação populacional, uma vez que a comparação é feita dentro de cada núcleo familiar. Nessas análises, o que se avalia são os alelos que foram transmitidos para os afetados em comparação com os alelos não transmitidos por métodos denominados Teste de Desequilíbrio de Transmissão(TDT) e Risco Relativo do Haplótipo (HRR).

Escolhe-se o “gene candidato” a ser pesquisado a partir de alguma hipótese que o relacione ao transtorno estudado. Essa escolha pode se basear em características clínicas, fisiopatológicas ou resposta terapêutica a determinados psicofármacos. Esta revisão busca apresentar os resultados dos estudos de associação entre genes candidatos e o TOC.

MÉTODOS:

Foi realizada uma revisão sistemática através de busca de artigos publicados até 4 de maio de 2012 nas bases de dados: Pubmed e EMBASE, usando os termos MeSH, seus associados ou sinônimos para *obsessive-compulsive disorder*, *gene* and *catechol-O-methyltransferase*.

Cada termo foi pesquisado separadamente (Pubmed: termo 1= 1662401 resultados; termo 2= 14124 resultados; termo 3= 14124 resultados; EMBASE: termo 1= 227.040 resultados; termo 2= 19.244 resultados; termo 3= 16.843 resultados) e posteriormente as três buscas foram combinadas usando o termo “AND” resultando em 202 referências no Pubmed e 49 referências no EMBASE. As referências foram enviadas para o programa de gerenciamento de referências ENDNOTE® e as

duplicatas foram descartadas. As referências foram selecionadas e os textos completos avaliados por dois pesquisadores independentes (A.S.S. e R.M.P.), com base nos critérios de inclusão, sendo eles: 1. Estudos originais ou revisões sobre associação com genes candidatos; 2. Os probandos deveriam preencher critérios pelo DSM III ou DSM IV para transtorno obsessivo-compulsivo; 3. Os estudos deveriam estar escritos em inglês, português ou espanhol.

A lista de referências dos estudos selecionados foi examinada para avaliar estudos não encontrados na base de dados.

RESULTADOS

Foram selecionados 154 estudos cujos principais resultados estão resumidos abaixo.

GENES RELACIONADOS À SEROTONINA

Gene do transportador da serotonina (SLC6A4, 5-HTT, SERT, 5HTTLPR)

Cromossomo: 17; Localização: 17q11.1-q12

O gene do transportador de serotonina é um gene candidato importante, uma vez que ele representa o alvo primário dos Inibidores da Recaptação de Serotonina (IRS). Hanna e colaboradores relataram uma associação entre os níveis sanguíneos de serotonina e genótipos específicos da 5HTT em famílias de pacientes com TOC (317).

Uma região polimórfica, composta por 16 elementos repetidos, foi descrita próxima do início da zona de transcrição do gene 5HTT, o polimorfismo 5-HTTLPR consiste de uma inserção ou deleção de 44-pb envolvendo elementos repetidos de 6 a 8 vezes gerando dois alelos funcionais: um alelo curto (S) e alelo longo (L) (318). No entanto, Hu e colaboradores relataram que o polimorfismo 5-HTTLPR é funcionalmente trialélico, resultando da substituição de A por G no alelo L (319). Outro polimorfismo deste gene corresponde a um variável número de repetições em tandem (VNTR) no par de base 17(bp), o VNTR é denominado STin2 e envolve diferentes alelos (320). Os estudos relacionados com o gene 5HTT estão descritos na **tabela 1**.

Receptor de serotonina tipo 2A (HTR2A, 5-HT2A)

Cromossomo: 13; Localização: 13q14-q21

As evidências que sugerem uma ação do receptor 2A da serotonina no TOC partem de relatos de benefício no uso de alucinógenos (estimulantes potentes de 5HT2A) e a tendência da clozapina em desencadear SOC em portadores de esquizofrenia (321). Os dois polimorfismos mais estudados no TOC são -1438 A/G e T102C. Alguns estudos demonstram associação entre TOC e o alelo AA do polimorfismo -1438 G/A em mulheres (271, 272) e em amostra de crianças e adolescentes (285). Esses resultados não foram replicados em outros estudos (50, 321). Liu e colaboradores estudaram uma amostra chinesa de 103 trios e encontrou uma associação significativa entre TOC e o polimorfismo 5HT2A-1438G/A ($p=0,0389$), e um desequilíbrio de transmissão no grupo de início tardio ($p=0,0132$) e no grupo masculino ($p=0,0255$) (71). Em relação a variante T102C, vários estudos não encontraram associação significativa com o TOC (46, 321). Tot e colaboradores encontraram que os genótipos T102T e o genótipo AA da variante -1438 A/G estavam associados a um aumento da gravidade do TOC (322). Meira-Lima e colaboradores também encontraram que a variante silenciosa C516T estava associada ao TOC (41).

Receptor de serotonina tipo 1B (HTR1B, 5HT1B)

Cromossomo: 6; Localização: 6q13

Os efeitos benéficos dos antipsicóticos atípicos e substâncias alucinógenas em receptor 5HT1B em alguns pacientes com TOC, sugerem que esse receptor possa estar envolvido na neurobiologia do TOC.

Mundo e colaboradores encontraram uma transmissão preferencial do alelo G861 para portadores de TOC (323) e confirmou esses achados em um estudo longitudinal (324). Camarena e colaboradores também encontraram uma transmissão preferencial da variante G861 comparada a C861 no grupo com escores mais altos da YBOCS (Escala de Sintomas Obsessivo-Compulsivos Yale-Brown), apesar de não terem encontrado associação com TOC (325). Liu e colaboradores encontraram associação desse gene com TOC de início precoce ($p=0,0389$) (71). Por sua vez, dois outros estudos tiveram achados negativos (44, 326). Achados preliminares de associação entre o alelo G861 e sintomas de ordem/arranjo/simetria deixam a sugestão de análises fenotípicas mais refinadas em estudos em genética (327).

Receptor da 5-hidroxitriptamina (serotonina) tipo 2C (HTR2C, 5HT2C)

Cromossomo: X; Localização: Xq24

O tratamento crônico do TOC com ISRS pode resultar em redução da transmissão dopaminérgica mesocorticolímbica através da ativação do 5HT2C, que pode representar um evento importante para a eficácia terapêutica dos ISRS (328, 329). Estudo em ratos, os quais apresentavam deleção do gene 5HT2C, evidenciou comportamentos semelhantes a sintomas compulsivos (330). Tsaltas e colaboradores mostrou exacerbação de SOC após administração de m-CPP (agonista 5HT2C) (331). Dois estudos de associação entre uma variante estrutural na região N-terminal extracelular do receptor 5HT2C e o TOC tiveram achados negativos. Essa variante resulta de substituição do aminoácido cisteína-por-serina a posição 23 (332), mas ainda não possui uma função definida (60, 333).

Triptofano hidroxilase 1 (TPH1)

Cromossomo: 11; Localização: 11p15.3-p14

Triptofano hidroxilase (TPH) representa uma etapa importante na síntese do 5HTT, desta forma é um gene candidato importante. Existem duas formas de expressão: TPH1 e TPH2.

O TPH1 é detectado periféricamente tanto no sangue como no duodeno, mas não é encontrado no cérebro. Dois estudos de associação não encontraram achados significantes entre esse gene e o TOC (44, 60).

Triptofano hidroxilase 2 (TPH2)

Chromosome: 12; Location: 12q21.1

O TPH2 é detectado exclusivamente no cérebro. Um estudo encontrou associação entre este gene e o TOC de início precoce (334).

GENES RELACIONADOS À DOPAMINA

O sistema serotoninérgico tem muitas inter-relações com outros neurotransmissores e circuitos neuronais (9). A dopamina tem uma participação importante na fisiopatologia do TOC (13) e participa de uma interação com o sistema dopaminérgico na área fronto-tálamo-gânglio da base (20). Tal modulação faz com

que os ISRS afetem a transmissão de dopamina indiretamente e influencia o desenvolvimento do TOC (20). Estudos farmacológicos encontraram que antagonistas dopaminérgicos em combinação com ISRS mostraram-se efetivos no tratamento do TOC. Estudos em animais encontraram que o uso de agonistas dopaminérgicos induz movimentos estereotipados semelhantes a alguns SOC (55). Da mesma forma, existem relatos de SOC desenvolvidos durante o tratamento com a clozapina, um antagonista do receptor de dopamina D4 (DRD4) (56, 57).

Gene do transportador da dopamina (DAT1 ou SLC6A3)

Cromossomo: 5; Localização: 5p15.3

O gene transportador da dopamina tem um papel central na remoção da dopamina das sinapses no mesencéfalo. A recaptação e difusão da dopamina pelo DAT1 altera a magnitude, duração e configuração espacial da ativação do receptor, induzida pelo transmissor, modificando desta forma a neurotransmissão dopaminérgica (321). Ratos com deleção do DAT apresentam comportamentos estereotipados sequenciais (335), de forma similar aos observados em transtornos de gânglios da base, tais como TOC e Síndrome de Tourette. DAT1 tem um polimorfismo de repetições em VNTR de 40bp com 3 a 11 repetições na região 3' não traduzida que pode influenciar na expressão do gene e nos níveis da proteína DAT1 no cérebro (336). Os estudos que investigaram associação entre DAT e TOC tiveram achados negativos (112, 337). Ver **tabela 2**.

Receptor de dopamina D2 (DRD2)

Cromossomo: 11; Localização: 11q23

O receptor D2 de dopamina (DRD2) é encontrado em níveis altos nos gânglios da base, o que o faz um gene candidato para a fisiopatologia do TOC. Apesar de alguns estudos não terem encontrado associação entre esse gene e o TOC, Nicolini e colaboradores encontraram uma frequência mais alta da variante A2A2 do DRD2 em TOC + tiques ($p=0,008$) (66). Em outro estudo, Nicolini e colaboradores encontraram associação entre o alelo TaqIA2 do DRD2 ($p=0,01$) e o TOC e um excesso de homozigotos A2A2 no grupo de TOC+ tiques ($p=0,001$) (65). Denys e colaboradores encontraram uma maior frequência do alelo A2 do DRD2 apenas em homens com TOC ($p=0,02$) (67). Ver **tabela 2**.

Receptor D3 da dopamina (DRD3)

Cromossomo: 3; Localização: 3q13.3

O antagonismo ao receptor dopaminérgico D3 tem um efeito ansiolítico. A função e expressão do DRD3 é diminuída durante o estresse e a depressão, enquanto o tratamento crônico com ISRS ou drogas noradrenérgicas aumenta o RNAm do DRD3, compensando o efeito inicial do estresse (321). A variante mais estudada é um SNP que leva a substituição da glicina por serina no códon 9 (Ser9Gly), mas os estudos com esse gene e o TOC tiveram achado negativos (58, 66). Ver **tabela 2**.

Receptor de dopamina D4 (DRD4)

Cromossomo: 11; Localização: 11p15.5

O receptor dopaminérgico D4 (DRD4) está envolvido em funções cerebrais superiores, modulação da síntese e *turnover* cerebral da dopamina. No gene que codifica o DRD4, existe um polimorfismo VNTR (48pb com 2 a 10 repetições em tandem) no terceiro exon, que é de grande interesse para estudos psiquiátricos (338). Os resultados de estudos de associação entre TOC e DRD4 não são conclusivos. Alguns estudos encontraram uma maior frequência do alelo de 7 repetições em portadores de TOC e tiques (64, 65). Millet e colaboradores encontraram ausência de transmissão do alelo de 2 repetições ($p=0,005$) e em um estudo de caso-controle, eles encontraram uma frequência do alelo de 2 repetições significativamente mais baixa em portadores de TOC ($p=0,02$) (61). Hemmings e colaboradores encontraram associação entre o alelo de 7 repetições e TOC de início precoce ($p=0,02$) (62). Camarena e colaboradores encontraram menor frequência do alelo de 4 repetições do DRD4 em pacientes com TOC ($p=0,0027$) e frequência mais alta do alelo de 6 repetições no grupo com tiques ($p=0,0016$) (69). Walitza e colaboradores encontraram, em um estudo baseado em família, menor transmissão do alelo de 4 repetições ($p=0,003$) (216). Ver **Tabela2**.

GENES RELACIONADOS AO GLUTAMATO

Estudos de neuroimagem, de modelos animais, farmacológicos e alguns estudos de associação de genes candidatos reforçam a hipótese da participação do glutamato na

fisiopatologia do TOC. Estudos de neuroimagem funcional mostraram hiperatividade metabólica nos circuitos cortico-estriato-talâmico. Níveis anormais de glutamato foram relatados em pacientes com TOC, com predomínio em regiões pré-frontais, tais como córtex orbitofrontal e suas áreas de projeção no estriado (10-12). Os níveis de glutamato no líquido também foram significativamente mais altos em portadores de TOC comparados a controles ($p=0,014$)(72). Drogas que modulam o glutamato vêm sendo recentemente usadas como potencializadores do tratamento farmacológico do TOC em adultos (73, 74), adolescentes e crianças (75). Além disso, genes relacionados ao glutamato, assim como genes relacionados à serotonina, tiveram mais estudos de associação positiva com TOC replicados. Diante disso vê-se que a investigação de genes glutamatérgicos como candidatos para TOC tem se mostrado um campo promissor.

Gene da proteína associada ao SAP90/PSD95- 3 - SAPAP3/DLGAP3

Cromossomo: 1; Localização: 1p35.3-p34.1

A família de proteínas associada ao SAP90/PSD95 (SAPAP) é componente de densidade pós-sináptica (PSD) que interagem com outras proteínas em um complexo chave-fechadura nas sinapses glutamatérgicas. Resultados de estudos com ratos sugerem que o Sapap3 pode estar envolvido na fisiopatologia do TOC e tricotilomania (77). O rato com deleção do Sapap3 desenvolveu lesões faciais auto-provocadas, secundárias a comportamento de *grooming* excessivo, e mostrou disfunções em sinapses córtico-estriatais. Quando estes ratos receberam ISRS, tal comportamento melhorou. Também, a expressão seletiva do Sapap3 no estriado, mediada por lentivírus, recuperou as alterações sinápticas e comportamentais dos ratos mutantes. Desde que os estudos de Welch e colaboradores trouxeram este modelo animal para TOC e *grooming* patológico com o rato com deleção do Sapap3, o gene correlato humano passou a ser estudado como candidato no TOC (77). Boardman e colaboradores avaliaram sete polimorfismos no gene que codifica o SAPAP3 em indivíduos com TOC ($n=172$), tricotilomania ($n=45$), e controles ($n=153$), e não encontraram associação (78). Dentre o grupo com TOC houve associação positiva com o início precoce do transtorno e o haplótipo A-T-A-T (rs11583978-rs7541937-rs6662980-rs4652867) (78). Bienvenu e colaboradores avaliaram 383 famílias e encontraram associação entre quatro polimorfismos do

SAPAP3 e *grooming* patológico (onicofagia, dermatotilexomania e/ou tricotilomania), mas não com TOC (79). Outro estudo sequenciou o gene SAPAP3 em 44 portadores de TOC e tricotilomania, 44 portadores de TOC sem tricotilomania e 178 controles, genotipou 6 polimorfismos em uma amostra adicional de 281 portadores de TOC e 751 indivíduos da população geral, e notou uma associação entre TOC e o polimorfismo A189V ($p=0,045$) (80).

Receptor Ionotrópico Glutamatérgico N-methyl D-aspartato 2B (GRIN2B, NMDAR2B)

Cromossomo: 12; Localização: 12p12

GRIN2B é o gene que codifica uma subunidade do receptor NMDA (339). Arnold e colaboradores estudaram 130 famílias de portadores de TOC e encontraram que um haplótipo formado por dois polimorfismos do GRIN2B - 5072T/G ($p=0.014$) e 5072G-5988T esteve associado à suscetibilidade ao TOC ($p=0.002$) (327). Posteriormente eles avaliaram 16 pacientes com TOC virgens de tratamento com ressonância magnética do encéfalo e genotiparam para os polimorfismos do GRIN2B (rs1019385, rs890, rs1805476 e rs1805502), e encontraram que o rs1019385 estava associado a menor concentração de glutamato no córtex cingulado anterior (327).

Transportador do glutamato de alta afinidade neuronal/epitelial (SLC1A1, EAAC1)

Cromossomo: 9; Localização: 9p24

SLC1A1, gene que codifica o Transportador do glutamato de alta afinidade neuronal/epitelial (SLC1A1, EAAC1), é um gene fortemente candidato que se situa na região 9p24 (84). Hanna e colaboradores estudando 7 famílias de portadores de TOC de início precoce, encontraram evidência de ligação na região 9p (82). Em um estudo de replicação, Willour e colaboradores genotiparam 50 famílias com TOC, e encontraram pico de ligação em dois marcadores: D9S1792 (alpha $p=0,59$) e D9S1813 ($p=0,006$) na região 9p24 (83), apenas 0.5 cM (<350 kb) do marcador encontrado por Hanna e colaboradores (82). Estudos relacionados ao gene SLC1A1 estão descritos na **tabela 3**.

Receptores do glutamato, ionotrópicos, kainatos 2 e 3 (GRIK2/EAA4 e GRIK3/EAA5)

Cromossomo: 6, localização: 6q16.3-q21; e cromossomo: 1, localização: 1p34-p33, respectivamente

GRIK2 e GRIK3 contribuem para a regulação da transmissão excitatória e inibitória e tem funções importantes na fisiologia e plasticidade das sinapses (90). Existe RNA mensageiro do GRIK2 em abundância em neurônios piramidais do caudado, que estão envolvidos na fisiopatologia do TOC. Estudos animais mostraram que ratos com deleção do GRIK2 tiveram redução importante da memória do medo, menos comportamentos de ansiedade, mais exposição ao risco e agressividade (340). Genes dos GRIK2 e GRIK3 foram investigados em um estudo com 156 pacientes com TOC, 141 controles e 124 trios, encontraram que o alelo SNP rs2238076 do GRIK2 foi menos transmitido que o esperado para portadores de TOC ($p < 0,03$). Sampaio e colaboradores também encontraram associação significativa entre o SNP rs1556995 do GRIK2 ($p = 0,03$), e entre o haplótipo rs1556995/rs1417182 ($p = 0,01$) e TOC (92).

GENES RELACIONADOS AO ÁCIDO GAMA-AMINOBUTÍRICO (GABA)

Receptor do GABA (GABRR1)

Cromossomo: 6; Localização: 6q13-q16.3

No único estudo avaliando este gene no TOC, Zai e colaboradores avaliaram cinco polimorfismos no gene do receptor do GABA tipo 1 (GABRR1) em 159 famílias e encontraram maior transmissão do alelo A do polimorfismo A-7265G no TOC (341).

OUTROS GENES

Fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF)

Cromossomo: 11; Localização: 11p13

O fator neurotrófico derivado do cérebro (Brain derived neurotrophic factor - BDNF) promove regeneração cerebral, proliferação e conectividade durante o desenvolvimento e participa da manutenção e plasticidade dos neurônios mesmo durante a fase adulta (105). Hall e colaboradores avaliaram o gene do BDNF em 164 trios de probandos com TOC e encontraram que o alelo Met66, que altera a sequência da pro-proteína BDNF foi pouco transmitido, podendo conferir efeito protetor contra o TOC (110). Alonso e colaboradores avaliaram SNPs no BDNF em 215 pacientes com TOC e 342 controles, e encontraram uma associação significativa com um haplótipo de cinco marcadores que continha o polimorfismo Val66Met (*permuted* $p=0,006$) (108). Hemmings e colaboradores encontraram que o alelo Met66 estava associado ao TOC em homens e ao TOC de início precoce também em homens, contudo o genótipo Val66/Val66 estava associado com TOC mais grave em mulheres (107). Dickel e colaboradores não encontraram associação de polimorfismo dos genes SLC6A4, HTR1B, HTR2A, e BDNF em 54 trios de probandos com início precoce de TOC (228). Karterberg e colaboradores tentando replicar esses achados, avaliaram 419 pacientes com TOC e 650 controles, mas não encontraram associação significativa entre o polimorfismo Val66Met (rs6265) e o TOC, ou qualquer dimensão de sintomas do TOC (106). Os estudos de Mossner e colaboradores, e Wendland e colaboradores também foram negativos (48, 109).

Receptor Neurotrófico da Tirosinocinase (NTRK) Tipos 1, 2 e 3

Cromossomo: 1; Localização: 1q21-q22 /Cromossomo: 9 Localização: 9q22.1 / Cromossomo: 15; Localização: 15q25 (respectivamente)

Receptor Neurotrófico da Tirosinocinase tipo 3 (NTRK3), receptor de alta afinidade para a neurotrofina 3 (NT-3), foi avaliado por Alonso e colaboradores em 120 pacientes com TOC e 342 controles, eles encontraram associação entre o SNP rs7176429 ($p=0,0001$) e colecionismo (342). Alonso e colaboradores também estudaram o Receptor Neurotrófico da Tirosinocinase tipo 2(NTRK2) em 215 pacientes com TOC e 342 controles, e encontraram um haplótipo intrônico com efeito protetor contra o TOC ($p=0,001$) e também que um SNP intrônico do NTRK2 (rs2378672) estava associado ao TOC em mulheres ($p<0,0001$) (108).

Monoamino oxidase A (MAO A)

Cromossomo: X; Localização: Xp11.3

A monoamino oxidase (MAO) é uma enzima mitocondrial que tem a função de degradar várias aminas biogênicas, incluindo serotonina, adrenalina, noradrenalina e dopamina. Dois polimorfismos funcionais foram estudados no TOC. Um dos polimorfismos consiste em um VNTR de 30pb localizado 1.2kb acima das sequências codificantes do MAO-A (MAO-Au VNTR) e o outro é uma substituição de T por C (EcoRV), com o alelo T relacionado a menor atividade enzimática (112). Estudos sobre o gene da MAO-A estão descritos na **Tabela 4**.

Catecol O-metiltransferase (COMT)

Cromossomo: 22; Localização: 22q11.21

A Catecol O-metiltransferase (COMT) é uma enzima que metaboliza catecolaminas, incluindo os neurotransmissores norepinefrina, epinefrina e dopamina (115). O polimorfismo mais estudado no gene COMT é uma troca de único nucleotídeo (SNP) (Val158Met ou rs4680) G por A, que leva a uma substituição do aminoácido valina por metionina no códon 158 da enzima. Essa variação está associada com a forma termolábil (baixa atividade – alelo 158met, alelo A ou alelo L) ou termoestável (alta atividade – val158, alelo G ou alelo H) da enzima (125, 126, 129). Um estudo recente mostrou que portadores de TOC com o alelo 158met do COMT apresentam baixos níveis de 3-O-Metil-Dopa, que resulta da metilação da levodopa, no plasma (130), mostrando que há uma diminuição na atividade da enzima COMT em pacientes com TOC portadores do polimorfismo de baixa atividade.

A homozigotidade do alelo L do polimorfismo rs4680 do COMT resulta em um decréscimo à metade da atividade enzimática e catabolismo da dopamina (131, 132), com subsequente aumento da disponibilidade de dopamina (131, 133, 134), especialmente em córtex pré-frontal.

Quatro meta-análises de estudos de associação entre o polimorfismo rs4680 e o TOC tiveram resultados discordantes. A primeira, feita em 2003 (194) incluiu estudos tipo caso-controle e baseados em famílias e não encontrou associação significativa. A segunda, feita em 2007, apenas com estudos caso-controle (n=1908 indivíduos), encontrou associação entre TOC e o alelo 158met em homens, mas não em mulheres (182). Este achado foi replicado na terceira meta-análise que incluiu estudos publicados tipo caso-controle e baseados em famílias(200). Porém, uma quarta meta-

análise, apenas com estudos baseados em famílias, também não encontrou associação com TOC (183). Os estudos relacionados com a COMT estão descritos na **tabela 5**.

GENES RELACIONADOS À SUBSTÂNCIA BRANCA

Fator de transcrição da linhagem oligodendrocítica (OLIG2; BHLHB1, OLIGO2, PRKCBP2, RACK17)

Cromossomo: 21; Localização: 21q22.11

O TOC está associado com diminuição do volume e anormalidades estruturais da substância branca (152, 153), refletindo-se numa diminuição da anisotropia fracional (343). O fator de transcrição da linhagem oligodendrocítica 2 (OLIG2) participa da mielinização e neurogênese e é essencial na regulação do desenvolvimento de células produtoras de substância branca (mielina) (344). OLIG2 está altamente expresso em amígdala, tálamo e núcleo caudado, regiões envolvidas no TOC (345, 346). Stewart e colaboradores avaliaram 66 famílias com TOC associado ou não a transtornos de tiques (TT) e 33 famílias de probandos com transtornos de tiques sem TOC. Eles encontraram associação entre TOC sem tiques em 3 SNP: rs762178 ($p < 0,001$), rs1059004 ($p = 0,005$) e rs9653711 ($p = 0,004$) além da associação com um haplótipo de 5 marcadores ($permutedp = 0,008$) (156). Esses achados ainda não foram replicados.

Glicoproteína oligodendrocítica da mielina (MOG)

Cromossomo: 6; Localização: 6p22.1

O TOC pode ter relação com processos auto-imunes como o que ocorre com crianças que tem início dos sintomas após infecção estreptocócica. Além disso, anormalidades em substância branca foram descritas em pacientes com TOC. Um dos genes candidatos envolvidos em resposta imune é o da glicoproteína oligodendrítica da mielina (MOG), que é mediador da cascata do complemento e também tem uma função importante na formação da substância branca. Zai e colaboradores encontraram uma transmissão preferencial do alelo de 459-pb (alelo 2: $\chi^2 = 5.255$, $p = 0.022$) da MOG4 e do haplótipo C1334T.MOG2.C10991T.MOG4: 1.13.2.2 ($\chi^2 = 6.426$, $p = 0,011$) (347). Atmaca e colaboradores avaliaram genótipos da MOG

G511C (Val142Leu) e ressonância magnética em 30 pacientes com TOC e 30 controles, encontrando que o volume de substância branca total foi maior em portadores de TOC que possuíam genótipo Val/Val do MOG G511C (Val142Leu) (155).

GENES RELACIONADOS AO SISTEMA IMUNE

Existem evidências que apoiam o envolvimento do sistema imune no TOC, como o surgimento do TOC associado à febre reumática (93-95), à Doença Neuropsiquiátrica Pediátrica Autoimune Associada ao Streptococcus (PANDAS) (96, 97) e às evidências de que transtornos do espectro obsessivo-compulsivo agregam-se em famílias de portadores de febre reumática (98).

Fator de necrose tumoral alfa (Tumor Necrosis Factor alpha -TNF-alpha)

Cromossomo: 6; Localização: 6p21.3

TNF-alfa é uma citocina pró-inflamatória envolvida em doenças autoimunes tais como a febre reumática. Polimorfismos na região promotora desse gene foram associados a formas clínicas de febre (99). Hounie e colaboradores avaliaram 111 pacientes com TOC e 250 controles e encontraram associação entre o TOC e o alelo A do polimorfismo rs361525 G/A ($\chi^2=12,05$, $P=0,0005$), o alelo A do polimorfismo -rs1800629 G/A ($\chi^2=7,09$, $P=0,007$) e o haplótipo A-A destes dois marcadores ($P=0,0099$) (100). Cappi e colaboradores avaliaram os mesmos polimorfismos na amostra de 83 trios de probandos com TOC, e encontraram que o alelo G do *TNFA* rs361525 foi mais transmitido para probandos com TOC ($P=0,007$) (101). Contudo, Zai e colaboradores não encontraram associação entre *TNFA* e TOC (102).

Gene do Fator Nuclear Ativador do Polipeptídeo Leve Kappa em Células-B, semelhante a inibidor 1 (NFKBIL1)

Cromossomo: 6; Localização: 6p21.3

Cordeiro e colaboradores avaliaram o polimorfismo rs2071592 do *NFKBIL1* em 111 pacientes com TOC e 272 controles e não encontraram associação significativa (103).

Interleucina-6

Cromossomo: 1; Localização: 1q21

Cappi e colaboradores avaliaram 83 trios com TOC quanto ao polimorfismo rs1800795 na região promotora do IL-6 e não encontraram associação (101).

GENES RELACIONADOS A HORMÔNIOS

Gene do receptor de estrógeno - alfa

Cromossomo: 6; Localização: 6q25.1

Existe a hipótese de que genes relacionados ao estrógeno influenciam na apresentação clínica do TOC. Diversos estudos clínicos e genéticos em TOC mostraram resultados diferentes para os dois gêneros. Entre os esteroides sexuais existem evidências de que os estrógenos modulam monoaminas e neuropeptídios (incluindo aqueles mais relacionados ao TOC tais como a serotonina, dopamina, glutamato e GABA), regulam respostas emocionais e promovem efeito neuroprotetor e de melhora cognitiva (348). Alonso e colaboradores avaliaram o gene do Receptor de Estrógeno 1 e 2 (ER1 e ER2) em 236 casos com TOC e 296 controles saudáveis, eles encontraram que o SNP rs34535804 e ESR1 foram significativamente associados com dimensão de contaminação/limpeza ($p= 0,0001$) e a frequência do haplótipo de cinco SNPs rs34535804*A/rs488133*C/rs9478245*C/rs2234693*C/rs9340799*G foi significativamente menor em pacientes com TOC com dimensão de contaminação/limpeza ($p=0,018$) (349).

DISCUSSÃO

Existe um conjunto de evidências que fatores biológicos/genéticos são importantes na expressão do TOC. O modelo de segregação genética que melhor explica o TOC é o modelo complexo, no qual as influências de diversos genes com pequeno efeito estão em interação com fatores ambientais. Diversos estudos com genes candidatos já foram realizados e por várias razões seus achados são inconsistentes.

É preciso ter em mente que o TOC é um transtorno heterogêneo. Existe a hipótese de que diferentes subgrupos de TOC possam receber influência de diferentes genes. Os subtipos do TOC podem ser organizados por gênero, idade de início dos sintomas e comorbidade com tiques (282, 283). Existe também uma tentativa de subdividir o TOC de acordo com a dimensão de sintomas, pois eles estariam relacionados com

um substrato neurobiológico diferente. O colecionismo, por exemplo, tem características específicas na epidemiologia, na resposta ao tratamento, em achados de neuroimagem (172, 286-288) e achados genéticos (289). Quanto à comorbidade com tiques, existe evidência de envolvimento do sistema dopaminérgico no TOC (244) e ainda foram encontrados achados positivos de associação entre alguns genes relacionados à dopamina e TOC com comorbidade com transtorno de tiques (65, 66, 69). O TOC também é geneticamente ligado à Síndrome de Tourette (350, 351) a qual foi associada a genes relacionados à dopamina, tais como o gene do receptor da dopamina D2 (DRD2) (87, 296, 297), receptor da dopamina D4 (DRD4) (298), transportador da dopamina (DAT) (299), e monoamino oxidase A (MAO-A) (298). É possível que o TOC em comorbidade com transtornos de tiques configure um subgrupo separado com susceptibilidade associada a polimorfismos em genes relacionados à dopamina. O TOC também pode ser heterogêneo entre os gêneros. Diversos estudos mostraram associação genética diferente quando houve análise separada por sexo (67, 85, 86, 88, 107, 114, 174, 177, 181, 182, 268-272). O mesmo é visto quando a amostra é dividida de acordo com a idade de início do TOC (62, 63, 71, 78, 85, 228, 285). Estas duas características são usadas para agrupar indivíduos com TOC em subgrupos mais homogêneos (282).

O uso de traços quantitativos (como escores de gravidade da YBOCS), endofenótipos, estudos de interação gene-ambiente e estudos de epigenética são os próximos passos em estudos de associação no TOC. Possíveis investigações de interação entre genes e ambiente no TOC incluem o papel de polimorfismos no desenvolvimento de TOC após eventos traumáticos, ou infecção por streptococcus, ou a influência de polimorfismos no desenvolvimento de traços de personalidade de risco para o TOC (352). A definição de endofenótipos através de estudos de neuroimagem, neuropsicologia e neurofisiologia são fundamentais para guiar os estudos em genética (352).

CONCLUSÃO

O montante de dados até o momento é típico de estudos de associação, que envolvem traços complexos conduzidos em diferentes populações: não há associação conclusiva. A baixa taxa de replicação pode ser explicada pela definição fenotípica

ainda imprecisa e pelo poder estatístico pequeno de cada um dos estudos. Estabelecer grupos com fenótipos mais homogêneos pode melhorar a acurácia dos resultados. No entanto, dividir a amostra em grupos menores e mais homogêneos pode ter o efeito colateral da perda de poder estatístico. Estudos de associação com grande tamanho amostral, algumas vezes conseguidos através de consórcios, e meta-análises ainda são necessários.

AGRADECIMENTOS

Os autores receberam financiamento do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq: 573974/2008-0 – Dr. E.C.Miguel e 474869/2010-5 - Dr. L.C.Quarantini), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP: 2005/55628-08 e 2008/57896-8 – DR. E.C.Miguel), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – Dra. A.S.Sampaio) e do Fundo de Aprimoramento Acadêmico (FUAA- Dra. A.S.Sampaio), Departamento de Psiquiatria da Universidade de São Paulo.

8.2 – Anexo B: Artigo referente à tese, submetido ao

American Journal of Epidemiology

COMT and Obsessive-Compulsive Disorder: new data, HuGE

review and meta-analysis.

COMT and Obsessive-Compulsive Disorder: new data, HuGE review and meta-analysis.

Aline Santos Sampaio^{1,2}, Ana Gabriela Hounie¹, Carolina Cappi¹, Lucas de C. Quarantini², Carlos Teles², Kátia Petribú³, Ivanil A. Morais¹, Renato Daltro-Oliveira², Roseli G. Shavitt¹, S. Evelyn Stewart^{4,5}, Carol A. Mathews⁶, Paul Arnold⁷, Gregory L. Hanna⁸, David L. Pauls⁵, Eurípedes Constantino Miguel¹

1. Department and Institute of Psychiatry, *Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo*, São Paulo, Brazil
2. *Universidade Federal da Bahia* (UFBA- Federal University of Bahia), *Faculdade de Medicina*, Salvador, Brazil
3. *Universidade de Pernambuco* (UPE, University of Pernambuco) *Faculdade de Ciências Médicas*, Recife, Brazil
4. University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada
5. Psychiatric and Neurodevelopmental Genetics Unit (PNGU), Massachusetts General Hospital, Boston, MA, USA
6. University of California, San Francisco, CA, USA.
7. University of Toronto, Toronto, ON, Canada
8. University of Michigan, Ann Harbor, MI, USA



**COMT and Obsessive-Compulsive Disorder: new data, HuGE
review and meta-analysis.**

Journal:	<i>American Journal of Epidemiology</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	HuGE (Human Genome Project)
Key Words:	Catechol O-Methyltransferase, Obsessive-Compulsive Disorder, Single Nucleotide Polymorphism, Meta-Analysis, Genetics

SCHOLARONE™
Manuscripts

Review

ABSTRACT

Catechol-O-methyltransferase (COMT) is responsible for dopamine metabolism and has been thought to play a role in obsessive-compulsive disorder (OCD)-related pathways by influencing dopamine levels. However, the genetic association between COMT polymorphisms and OCD has not consistent across studies; this may, in part, be due to population stratification. Here, we performed an original, family-based association study with 83 OCD probands and their parents (83 trios). Additionally, a systematic review and meta-analysis was performed, according Human Genome Epidemiology Network (HuGE) guidelines for family-based association studies, of the COMT Val158Met polymorphism and OCD. This meta-analysis included nine studies, and no association was found between the COMT Val158Met polymorphism and OCD. The original association study and subsequent meta-analysis added to the accumulated evidence suggesting a lack of association between variants in the COMT Val158Met polymorphism and OCD.

KEYWORDS: Catechol O-Methyltransferase, Obsessive-Compulsive Disorder, Single Nucleotide Polymorphism, Meta-Analysis, Genetics

Abbreviations: CI, confidence interval; COMT, catechol-*O*-methyltransferase; HuGE, Human Genome Epidemiology Network; OCD, obsessive-compulsive disorder; OR, odds ratio; SNP: single nucleotide polymorphism; Val158Met: valine to methionine substitution polymorphism at codon 158.

1
2
3 Obsessions and compulsions that result in time-consumption, marked anxiety and
4 significant impairment of functioning define obsessive-compulsive disorder (OCD) (1). The
5 heritability rate of OCD is in the range of 27-65% (2).
6
7

8
9
10 The genetic contribution in OCD etiology appears to follow a complex combination
11 of common and rare variants (3). Among the common polymorphisms investigated in
12 OCD, polymorphisms in proteins involved in serotonin and dopamine regulation are
13 particularly relevant, given the efficacy of pharmacological agents that target these systems
14 currently used as treatment for OCD (4). This study focuses on polymorphisms in
15 catechol-*O*-methyltransferase (*COMT*). *COMT* is an enzyme involved in the inactivation of
16 catecholamines (norepinephrine, epinephrine, and dopamine). The most studied
17 polymorphism in *COMT* (chromosome 22; location 22q11.21) is a single-nucleotide
18 polymorphism (SNP) with a guanine (G) as the major allele and an adenine (A) as the
19 minor allele. This polymorphism results in an amino acid substitution from a valine to a
20 methionine at codon 158 (Val158Met); this residue is associated with the enzyme's
21 thermostabile form (Val allele) or its thermolabile form (Met allele) (5).
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38

39 The frequency of the allele distribution differs between populations. The minor allele
40 (Met allele) frequency in each population is as follows: 0.478 in Caucasians (CEU), 0.39 in
41 Hispanics from North America (MEX), 0.285 in Asians from Japan (JPT), 0.314 in Yoruba
42 Africans (YRI) and 0.366 in Asians from China (CHB) (6).
43
44
45
46
47

48 *COMT* enzyme activity, which is reflected in increments of dopamine availability (7-
49 9), is less than half in Val allele homozygotes compared with the Met allele homozygotes
50 (5, 7). Because the prefrontal cortex lacks a dopamine transporter, *COMT* enzymatic
51 activity is the primary factor that determines the concentration of dopamine in this region
52 (10, 11). Therefore, the prefrontal cortex exhibits the greatest alteration in dopamine
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 function as a result of this SNP (10, 11).
4

5
6 In neuropsychological studies, carriers of the Met allele have been found to show
7
8 cognitive inflexibility (12-14) and higher harm avoidance and neuroticism (15, 16)
9
10 compared to carriers of the Val allele. These psychological patterns are common features of
11
12 OCD presentation (17).
13

14
15 Despite the large number of genetic studies investigating the role of *COMT* gene in
16
17 OCD (18, 19), the findings of these studies are inconsistent. Different methodologies,
18
19 phenotype heterogeneity, small sample sizes and different ethnic backgrounds used are
20
21 some of the possible sources of bias contributing to the inconclusive results in previous
22
23 studies.
24
25

26
27 By combining samples from different studies, meta-analyses can increase statistical
28
29 power and allow for more precise and accurate estimates. Three previous meta-analyses
30
31 (20-22) have investigated the role of *COMT* in OCD, with divergent findings.
32
33

34
35 None of these meta-analyses, however, followed the Human Genome Epidemiology
36
37 Network (HuGE) (23) guidelines. The HuGE network is an initiative from The Office of
38
39 Public Health Genomics of the Centers for Disease Control and Prevention. The HuGE
40
41 network developed guidelines for the systematic review and meta-analysis of gene-disease
42
43 association studies methods. Because most association studies have small effect sizes, their
44
45 credibility is dependent on their bias control. These guidelines help to establish a systematic
46
47 method in review and minimize bias.
48
49

50
51 Considering that *COMT* allele distributions can be different dependent on ethnicity,
52
53 this present review focuses on family-based association studies to control for population
54
55 stratification. First, a family-based association study of OCD and the *COMT* gene using a
56
57 Brazilian sample of 83 simplex OCD trios was performed. These data were used, in
58
59

1
2
3 conjunction with the studies selected by a systematic review, to perform a meta-analysis of
4 family-based association studies with the Val158Met polymorphism in *COMT* using the
5 HuGE protocol (23). In addition, it was also included in this paper, and in the subsequent
6 meta-analysis, an original family-based association study of OCD and the *COMT* gene with
7 a Brazilian sample of 83 simplex OCD trios.
8
9

10
11
12
13
14
15 Potential sources of heterogeneity and publication bias were investigated in the meta-
16 analysis. Sensitivity analysis and meta-regression were also performed.
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

MATERIAL AND METHODS

Original association study

Eight-three trios were recruited from 2 psychiatric services of the University Hospitals (Recife and São Paulo, Brazil) and gave their informed consent. OCD criteria were assessed with the Structured Clinical Interview for Diagnostic and Statistic Manual for mental disorders (DSM-IV) Axis I Disorders, Clinician Version (SCID) (24) for subjects up to 16 years old or the Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia for School-age Children (24) plus the Yale-Brown Obsessive Compulsive Scale (25) as previously reported (26).

DNA was extracted from blood using the 'salting out' protocol (27). Eleven *COMT* SNPs, including Val158Met (rs4680), were genotyped at the Psychiatric and Neurodevelopmental Genetics Unit of Massachusetts General Hospital, a teaching hospital associated with Harvard University as part of an international consortium for genetic studies in OCD (28). Genotyping was performed by laboratory workers blind to affection status in 384-well plates with the Sequenom MassARRAY platform (29). Three markers (rs2239393, rs13306281, rs1544325) were excluded because of quality control issues. Using the Haploview software (30), SNPs and haplotypes were selected on the basis of the quality control criteria, and linkage disequilibrium was defined.

Transmission disequilibrium of the eight remaining SNPs (Figure 1) was analyzed under the additive model using PLINK software (31, 32) and haplotype TDT analysis was performed using Haploview 3.32 (30).

Systematic review

A systematic review and meta-analysis was conducted according to the HuGE review guidelines (23).

Search Strategy. Electronic searches were performed using the Medical Subject Headings terms for obsessive-compulsive disorder, gene and catechol-*O*-methyltransferase, or their associated terms or synonymous terms; these terms were used for all databases. The Pubmed, ISI Web of Knowledge, BIOSIS preview, EMBASE, PsychInfo, and Biomed central databases were searched from the first date available in each database to June 3, 2012. A pilot study was conducted to establish whether these terms were sufficiently comprehensive or needed modification. The term “gene” was chosen instead of “gene*” or “genetics” because it retrieved more results. All the Medical Subject Headings synonyms were combined using “OR” for “obsessive-compulsive disorder” and “catechol-*O*-methyltransferase”. Citations were merged in Endnote X1®, resulting in the retrieval of 313 references: 54 from Pubmed, 118 from ISI Web of Knowledge, 46 from BIOSIS Preview, 53 from EMBASE, 20 from PsychInfo, and 19 from Biomed Central (Web material 1). Duplicates were discarded, resulting in 177 references. Abstracts of posters presented at scientific meetings were discarded if they were identical to abstracts of papers; this resulted in 85 references.

All relevant articles, posters, or presentations at scientific meetings or conferences identified through the search were scanned by two investigators on the basis of title, keywords, and abstract (if available); discordances were evaluated by a third investigator. Titles were rejected if, at the initial screening, they clearly did not meet the inclusion criteria; this resulted in 50 titles or abstracts that could not be rejected with certainty. The full text and supplementary data of these 50 studies were obtained for evaluation. In this

1
2
3 step, case-control studies were excluded. Two references were excluded due to lack of
4
5 information (33, 34).
6

7
8 Reviews and reference lists of all retrieved articles were scrutinized to find additional
9
10 relevant studies or citations.
11

12
13 When two or more works had overlapping sample sets, only the work with the larger
14
15 sample was included. Authors were contacted by e-mail to clarify overlapping samples or
16
17 to provide additional study details, including unpublished data on this subject. Two
18
19 different study groups authorized the inclusion of their unpublished data in the meta-
20
21 analysis (35, 36).
22
23

24
25 **Inclusion and exclusion criteria.** All family-based association studies involving the
26
27 Val158Met (rs4680) polymorphism of the *COMT* gene and OCD were included; no
28
29 language limitations were set. OCD probands fulfilled the DSM III, DSM III-R, DSM IV,
30
31 DSM IV TR, ICD 9 or ICD 10 criteria for OCD. Studies were excluded when OCD was not
32
33 the main phenotype evaluated, when it was not the main diagnosis of the sample (such as
34
35 Velocardiofacial Syndrome or schizophrenia with comorbid OCD), or when the only OCD
36
37 phenotype evaluated was hoarding.
38
39

40
41 **Data extraction.** Data from the selected seven published studies (37-43) and three
42
43 unpublished studies ones (35, 36), including the data from the current association study,
44
45 were extracted by two independent investigators using a data extraction form. The data
46
47 extraction form consisted of the following: genotype frequencies, Hardy-Weinberg
48
49 equilibrium, frequencies of transmitted and untransmitted alleles, the mean ages of
50
51 probands, proportions of males and females, whether an association was independently
52
53 calculated for each gender, whether the transmitted and non-transmitted allele counts for
54
55 each gender were assessed, the geographic origin of the sample, ethnic subgroups (defined
56
57
58
59
60

1
2
3 as people of Caucasian, Asian, African, Hispanic or mixed backgrounds), genotyping
4
5 methods and whether the laboratory workers were blinded to the participant's affection
6
7 status. At the same time, the investigators verified the eligibility of these studies for
8
9 inclusion in the meta-analysis. Extracted data were compared to check for reliability.
10
11 Finally, consensus was achieved by discussion.
12
13

14
15 Allele frequencies from studies that presented data on all 3 genotype groups were
16
17 calculated, assuming Hardy-Weinberg equilibrium where appropriate.
18
19

20 **Study quality and validation of study.** Methodological quality was independently
21
22 assessed by two reviewers, according to a set of predefined criteria (Web material 2) based
23
24 on previous meta-analyses (44, 45). Disagreements were resolved by consensus. Scores
25
26 ranged from 0 (lowest) to 10 (highest). A quality score was used as a covariate in meta-
27
28 regression.
29
30

31
32 To interpret the number of genetic association studies between *COMT* and OCD
33
34 available in the literature, the Venice Interim Guidelines (46) was established for
35
36 determining the credibility of the related cumulative evidence. Briefly, these guidelines use
37
38 3 major criteria:
39
40

41 1) Amount of evidence: Thresholds for A, B or C grades are defined based on sample
42
43 size, taking into account the frequency of the less frequent genotype. In this case, minimal
44
45 genotype sample is defined by the frequency of the Met/Met subjects (Frequency= 0.2)
46
47 multiplied by the pooled sample (total number in cases and controls assuming 1:1 ratio).
48
49 Category A requires a minor genotype sample over 1000 of Met homozygous subjects; B
50
51 corresponds to a minor genotype sample of 100–1000, and C corresponds to a minor
52
53 genotype sample <100 evaluated in this group.
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 2) Replication of results: Grade A requires extensive replication, including at least
4 one well-conducted meta-analysis with little between-study inconsistency. Grade B requires
5 replication with at least one well-conducted meta-analysis with some methodological
6 limitations or moderate between-study inconsistency. Grade C requires a lack of association
7 ($P \geq 0.05$) and independent replication, failed replication, scattered studies, flawed meta-
8 analysis or a large inconsistency between studies.
9

10
11
12
13
14
15
16
17 3) Protection from bias: The A grade is given when bias due to phenotype
18 measurement, genotype measurement, confounding factors (such as population
19 stratification), selective reporting (for meta-analyses) or other sources of bias is not high or
20 does not invalidate the presence of association. The B grade is given when there is no
21 obvious bias that may affect the presence of the association, but when there is considerable
22 missing information on the generation of evidence. The C grade is given when there is a
23 high chance or demonstrable bias that can affect the presence or absence of the association.
24 Guidelines can be accessed in more detail in a previously published paper (46).
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40

41 **Meta-analysis**

42
43 Nine studies were included in the meta-analysis; overall, the meta-analysis was
44 comprised of 958 trios (2874 subjects). Data regarding the selected works were entered in
45 an Excel[®] sheet and further analyzed using the STATA 11th version software (47).
46
47 Individual subject data were available from one study and from the original data presented
48 here (35, 48).
49
50
51
52

53
54 There is a major obstacle to performing a meta-analysis of family-based studies: the
55 transmission disequilibrium test requires a chi-squared test to provide a statistical analysis,
56 whereas the odds ratio, relative risk or risk difference is usually needed to calculate meta-
57
58
59
60

1
2
3 analysis. Additionally, converting a family-based study into a case-control study where the
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

analysis. Additionally, converting a family-based study into a case-control study where the parents are considered controls is not recommended because they are related to the “cases”.

In the present study, the odds ratio was calculated using the data of allele transmission from a heterozygous parent to an affected proband. All odds ratios (OR) and 95% confidence intervals were recalculated from raw data, using the information from the extraction sheet or from data sent by the contacted authors. Odds ratio logarithms were estimated using the expression: $\log OR = (t_{met}/t_{val}) / (u_{met}/u_{val})$, where t_{met} and t_{val} represents respectively and the number of transmitted Met and Val alleles from heterozygous parents to an affected proband, and u_{met} and u_{val} represents respectively untransmitted Met and Val alleles from heterozygous parents to an affected proband. Standard error was calculated using Woolf’s method: $se \log OR = \sqrt{(1/t_{met}) + (1/t_{val}) + (1/u_{met}) + (1/u_{val})}$.

For the meta-analysis, we included information from the Val158Met polymorphism using both fixed- and random-effects models. Pooled estimates of the odds ratio and 95% confidence interval were calculated, using the log odds ratio and the corresponding standard errors. Two-sided P-values were presented. Heterogeneity was investigated using the Cochran’s Q Test (49). The Begg’s and Egger tests were used to investigate publication bias (50). A sensitivity analysis was performed, in which a single study was removed from the meta-analysis in each iteration; the meta-analysis was run nine times.

The *COMT* gene influences estrogen metabolism (51) and *COMT* expression is lower in OCD women when compared to OCD men (52). Additionally, OCD presents differently in each gender (54). Some results from *COMT* and OCD association studies have shown sexual dimorphism (53). Considering these issues, meta-analysis was also performed separately in the female and male subgroups.

1
2
3 Meta-regression was performed with the defined covariates: proportion of female
4 probands in sample, population ethnicity (Caucasian, Italian or Hispanic), year of
5 publication (for unpublished studies the year of the genetic analysis was used instead), and
6 the given study quality score.
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review

RESULTS

Original association study

OCD was not found to be associated with any of the eleven *COMT* polymorphisms or haplotypes (Figure 1) evaluated in the 83 trio sample, even when female and male proband trios were evaluated separately.

Systematic review

The review resulted in the selection of ten studies, including the original results presented here (Web Material 3). One of these studies was not included in the meta-analysis due to a lack of information (43).

Regarding the study quality score, two studies were given a score of 8 (35, 48), one study was given a score of 5 (42); and six studies were given a score of 4 (36-41).

Meta-analysis

No association was found between the *COMT* Val158Met polymorphism and OCD in the pooled analysis of nine studies (pooled estimate: logOR=0.107 IC95% [-0.068; 0.282, $P=0.23$]) for both fixed and random effects. The moment-based estimate for between study variance was 0.000, and there was no evidence for heterogeneity bias ($Q=6.183$ on 8 degrees of freedom; $P=0.627$), as depicted in the Galbraith plot (Figure 2). Additionally, there was no evidence of publication bias (Begg's Test=0.754 and Egger test=0.937). A sensitivity analysis was performed to estimate the influence of the individual studies upon the meta-analysis effect estimate. None of the studies had a major influence on the meta-analysis results (Figure 2).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
Meta-analysis with trios of male probands. A meta-analysis was performed by including only the male proband data. Because one of the studies had no gender information (42), it was not included in this secondary analysis; therefore, eight studies were included in this analysis. There was no significant association in the pooled analysis of *COMT* Val158Met polymorphism and the male OCD subjects in both the fixed- (logOR=0.130 95% CI[-0.106; 0.366, $P=0.280$]) and random-effect (logOR=0.135 95%CI[-0.111; 0.381, $P=0.283$]) methods. There was no evidence of between-study heterogeneity ($Q=7.378$ on 7 degrees of freedom, $P=0.391$), as depicted in the Galbraith plot (Figure 3). The moment-based estimate of between-study variance was 0.007. There was also no evidence of publication bias in both Begg's test ($P=0.711$) and the Egger test ($P=0.487$). Sensitivity analysis was performed to examine the influence of the individual studies (Figure 3). There was a major influence of the OCFMINI study; when this study was omitted, but no association between *COMT* and OCD was found.

34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
Meta-analysis with trios of female probands. A meta-analysis was performed including only the female proband data; this analysis was also performed with eight studies (one was excluded due to lack of gender information; see above). There was no significant association in the pooled analysis between *COMT* and OCD in the female subjects in both the fixed- (logOR=0.175; 95% CI[-0.095; 0.444, $P=0.204$]) and random-effect (logOR=0.156; 95% CI[-0.271; 0.583, $P=0.475$]) methods. Assuming that $P\leq 0.10$ indicates heterogeneity, significant evidence of heterogeneity was found between studies ($Q= 15.487$ on 7 degrees of freedom, $P=0.030$; $I^2=54.8\%$), and the moment-based estimate of between study variance was 0.194. The Galbraith plot indicates that the OCFMINI study is more than two standard deviations from the mean, suggesting a higher contribution to the heterogeneity (Figure 4). There was no evidence for publication bias in both the Begg's

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

($P=1.0$) and Egger ($P=0.632$) tests (Figure 4). In the sensitivity analysis, the results were different when either the OCFMINI study or the Karayiorgou et al., 1999 study were omitted; these omissions lead to a trend to protective factor or a risk factor, respectively, but not to an association (Figure 4).

Meta-regression. Multivariate meta-regression was performed with the female subsample to evaluate the sources of heterogeneity. Ethnic background (Italian X Caucasian and Hispanic X Caucasian), year of publication (for the unpublished studies, the year of genetic analysis was used), study quality grade and the proportion of female probands in the study sample were used as independent variables. In this meta-regression, the year of publication ($P=0.005$) and the Caucasian X Hispanic ethnicity were found to explain the heterogeneity in the female subsample ($P=0.002$) (Web Material 4).

Another meta-analysis regression was performed to evaluate the interference of the female proportion in studies samples. The female proportion was not found to be a confounder in this analysis ($\log OR=0.455$, 95% CI[-0.027; 0.010, $P=0.345$]).

Cumulative Evidence Score

After evaluating all the association studies of *COMT* and OCD, including the present work, a score for the cumulative evidence of association was assigned, as proposed by the Venice Interim Guidelines (46). Considering the frequency of the Met/Met genotype to be 0.2 and the pooled sample of this meta-analysis to be 2874 subjects, the minor genotype sample was 574.8. Taylor's (22) included 3113 subjects with a minor genotype sample of 622.6. Because both minor genotype samples are lower than 1000, the *Amount of Evidence* is scored as a B. *Replication* is scored as a C because two meta-analyses found no association between *COMT* and OCD. *Protection Against Bias* is scored as a B because

1
2
3 bias control information is incomplete in most of the studies. The final score, according to
4
5 the Venice Interim Guidelines (46), would be BCB, which means there is weak evidence of
6
7 association.
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review

DISCUSSION

COMT polymorphisms have been extensively studied in OCD. Of the association studies that were carefully selected for this systematic review, only ten were family-based association studies. Most studies consisted of small to medium sized sample sets, and few of them had controlled for multiple analysis. Therefore, spurious association could not be excluded.

In the original association study of 83 Brazilian trios, comprehensive genotyping of eight SNPs along the *COMT* gene was performed. No association was found between the *COMT* Val158Met polymorphism and OCD, even when each gender was analyzed separately. Haplotype analysis was also performed and yielded negative results. This sample size does not give enough power to reject the null hypothesis, and a meta-analysis was the next step in our investigation. Despite the reduced number of family-based association studies selected for systematic review, the authors chose to focus on family-based association studies to control for population stratification.

The meta-analysis found no association between the *COMT* Val158Met polymorphism and OCD. Analysis with the female only sample set shows heterogeneity between studies. Inconsistencies among the studies included in the meta-analysis were evaluated with heterogeneity test I^2 . According to the I^2 finding, 54.8% of the observed variance may reflect differences in effect size, which means that there are high levels of between-study inconsistencies (54). The OCFMINI study was found to be the greatest contributor to the heterogeneity in the Galbraith plot. In fact, this study used genotyping and quality control methods that differ from those used in others studies, except from the original data presented here. The effect size is used to calculate heterogeneity and the

1
2
3 OCFMINI study has the highest effect size among the included works. Because the
4
5 OCFMINI study had one of the largest sample sets of the studies included in the meta-
6
7 analysis, it was the greatest contributor to the meta-analytic results. The OCFMINI study is
8
9 also a recent study (not yet published), thereby contributing to the influence that the 'year
10
11 of study' had on heterogeneity in the meta-regression analysis. Despite these issues, the
12
13 OCFMINI study raises the power of this meta-analysis rather than increasing the bias.
14
15

16
17 Ethnicity (Caucasian X Hispanic) also explained the heterogeneity ($P=0.002$) in the
18
19 female subsample. The influence of ethnicity in the results is extremely important, even in a
20
21 meta-analysis including only family-based studies; thus, it is possible that the ethnic
22
23 subgroups are a source of heterogeneity.
24
25

26
27 The large within-study variance and heterogeneity of a meta-analysis (54) could be
28
29 increased due to the inclusion of studies with small sample sizes. Additionally, the
30
31 inclusion of a small number of studies increases the influence of each study in the total
32
33 result, and it can contribute to heterogeneity between studies.
34
35

36
37 A previous meta-analysis performed by Azzam et al. (2003) (20) included seven
38
39 studies, including both family-based and case-control designs. This meta-analysis also did
40
41 not find an association between *COMT* and OCD, even when genders were analyzed
42
43 separately. Their review was performed after searching only the MEDLINE database, the
44
45 reference list of retrieved papers and included one unpublished study. The authors
46
47 described the collected information about the allele frequency in OCD probands and
48
49 parental controls, as well as the allele transmission information from the trios, but there was
50
51 no information regarding which data were used to calculate the odds ratio.
52
53
54

55
56 The findings of the present study are different from those of the previous meta-
57
58 analysis performed by Pooley et al. (21) and Taylor (22) who found an association in the
59
60

1
2
3 male sub-sample. It is interesting to note that Pooley et al. (21) included only case-control
4
5 studies, whereas the present meta-analysis included only family-based studies. Because
6
7 *COMT* Val158Met alleles have different distributions among the ethnic subgroups, the risk
8
9 of population stratification bias should be carefully controlled. The studies included in the
10
11 Pooley et al. (21) meta-analysis used samples from different geographic locations (German,
12
13 Israeli, Turkish, Brazilian, Japanese, Afrikaner, American and English). Among the eight
14
15 studies included in the Pooley et al. (21) meta-analysis, only the Brazilian study genotyped
16
17 ethnic markers. Meta-analysis is a tool to minimize the population stratification bias, but
18
19 the small sample size (eight studies) included in the Pooley et al. (21) meta-analysis might
20
21 not be enough to control this bias.
22
23
24
25
26

27 The third meta-analysis (22) included nine studies (both case-control and family-
28
29 based designs) and found an association between *COMT* and OCD in the male subsample.
30
31 That meta-analysis did not include unpublished studies. In the present study, three
32
33 unpublished works were included, adding 454 trios to the pooled sample.
34
35

36 To date, there are four meta-analyses on this subject. Two of these analyses found an
37
38 association between *COMT* and OCD in men, and the other two analyses found no genetic
39
40 association. The influence of study design (case-control or family-based) and inclusion of
41
42 gray literature must be noted.
43
44

45 The discrepancy in these findings may also reflect the clinical diversity of OCD. Age
46
47 of onset, comorbidity, and specific OCD symptoms can produce OCD subgroups that have
48
49 different clinical presentations, epidemiological features (55, 56) and, possibly, different
50
51 genetic influences. However, the present meta-analysis has not evaluated these specific
52
53 subgroups (57).
54
55

56 Another possibility is that *COMT* activity is more closely related to other conditions
57
58
59
60

1
2
3 associated with obsessive-compulsive symptoms rather than with the DSM-IV-defined
4 OCD. In fact, the COMT enzyme metabolizes a number of important neurotransmitters in
5 the limbic pathways, and impairment of their function could lead to various intermediate
6 phenotypic presentations. For instance, the *COMT* Met allele has been associated with the
7 modulation of anxiety and of the stress response (58-62), higher anxiety (63), pain
8 sensitivity (64) and a higher affective and endocrine response to (65). These features are
9 related with neuroticism, which is also associated with OCD (68).

10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20 The most accepted etiological model for OCD is that of a complex disorder, which
21 involves the interaction of several genes, each with small effects in the interaction with the
22 environment; therefore, genetic epistasis should be investigated. Additionally, dividing
23 OCD into more homogeneous subgroups regarding co-morbidity patterns, symptom
24 dimensions, and age at onset and investigating the association of *COMT* and intermediate
25 phenotypes along the OCD spectrum could help generate more conclusive results about the
26 genetic influence of *COMT* in OCD.

27
28
29
30
31
32
33
34
35
36 In summary, this is the first HuGE review of the association between *COMT* and OCD.
37
38 The original data presented and the subsequent meta-analysis added to accumulating
39 evidence suggesting that there is no association between the *COMT* Val158Met
40 polymorphism and OCD. Overall, the cumulative evidence of association between *COMT*
41 and OCD is classified as weak. Further studies must aim for better bias control, such as a
42 selection of more homogeneous OCD subgroups and control for population stratification.
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

REFERENCES

1. American-Psychiatric-Association ed. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. Washington D.C.: American Psychiatic Press, 2000.
2. van Grootheest DS, Cath DC, Beekman AT, et al. Twin studies on obsessive-compulsive disorder: a review. *Twin Res Hum Genet* 2005;8:450-8.
3. Pauls DL. The genetics of obsessive compulsive disorder: a review of the evidence. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2008;148:133-9.
4. Denys D, Zohar J, Westenberg HG. The role of dopamine in obsessive-compulsive disorder: preclinical and clinical evidence. *J Clin Psychiatry* 2004;65 Suppl 14:11-7.
5. Lachman HM, Papolos DF, Saito T, et al. Human catechol-O-methyltransferase pharmacogenetics: Description of a functional polymorphism and its potential application to neuropsychiatric disorders. *Pharmacogenetics* 1996;6:243-50.
6. HapMap. rs4608 genotype distribution - ss76883807.
7. Chen J, Lipska BK, Halim N, et al. Functional analysis of genetic variation in catechol-O-methyltransferase (COMT): effects on mRNA, protein, and enzyme activity in postmortem human brain. *Am J Hum Genet* 2004;75:807-21.
8. Tenhunen J, Salminen M, Lundstrom K, et al. Genomic organization of the human catechol O-methyltransferase gene and its expression from two distinct promoters. *Eur J Biochem* 1994;223:1049-59.
9. Tunbridge E, Burnet PW, Sodhi MS, et al. Catechol-o-methyltransferase (COMT) and proline dehydrogenase (PRODH) mRNAs in the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia, bipolar disorder, and major depression. *Synapse* 2004;51:112-8.
10. Garris PA, Wightman RM. Different kinetics govern dopaminergic transmission in the amygdala, prefrontal cortex, and striatum: an in vivo voltammetric study. *J Neurosci* 1994;14:442-50.
11. Karoum F, Egan MF, Wyatt RJ. Selective reduction in dopamine turnover in the rat frontal cortex and hypothalamus during withdrawal from repeated cocaine exposure. *Eur J Pharmacol* 1994;254:127-32.
12. Nolan KA, Bilder RM, Lachman HM, et al. Catechol O-methyltransferase Val158Met polymorphism in schizophrenia: differential effects of Val and Met alleles on cognitive stability and flexibility. *Am J Psychiatry* 2004;161:359-61.
13. Drabant EM, Hariri AR, Meyer-Lindenberg A, et al. Catechol O-methyltransferase val158met genotype and neural mechanisms related to affective arousal and regulation. *Arch Gen Psychiatry* 2006;63:1396-406.
14. Han DH, Kee BS, Min KJ, et al. Effects of catechol-O-methyltransferase Val158Met polymorphism on the cognitive stability and aggression in the first-onset schizophrenic patients. *Neuroreport* 2006;17:95-9.
15. Enoch MA, Xu K, Ferro E, et al. Genetic origins of anxiety in women: a role for a functional catechol-O-methyltransferase polymorphism. *Psychiatr Genet* 2003;13:33-41.
16. Stein MB, Fallin MD, Schork NJ, et al. COMT polymorphisms and anxiety-related personality traits. *Neuropsychopharmacology* 2005;30:2092-102.
17. Grados MA. The genetics of obsessive-compulsive disorder and Tourette syndrome: an epidemiological and pathway-based approach for gene discovery. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 2010;49:810-9, 9 e1-2.
18. Hamilton SP. LINKAGE AND ASSOCIATION STUDIES OF ANXIETY DISORDERS. *Depression and Anxiety* 2009;26:976-83.
19. Nicolini H, Arnold P, Nestadt G, et al. Overview of genetics and obsessive-compulsive disorder. *Psychiatry Research* 2009;170:7-14.

- 1
- 2
- 3
- 4 20. Azzam A, Mathews CA. Meta-analysis of the association between the catecholamine-O-methyltransferase gene and obsessive-compulsive disorder. *Am J Med Genet B* 2003;123B:64-9.
- 5
- 6 21. Pooley EC, Fineberg N, Harrison PJ. The met(158) allele of catechol-O-methyltransferase (COMT) is associated with obsessive-compulsive disorder in men: case-control study and meta-analysis. *Mol Psychiatry* 2007;12:556-61.
- 7
- 8
- 9 22. Taylor S. Molecular genetics of obsessive-compulsive disorder: a comprehensive meta-analysis of genetic association studies. *Mol Psychiatry* 2012.
- 10
- 11 23. Little J, Higgins J. The HuGENet™ HuGE Review Handbook.
- 12 , <http://www.hugenet.ca>. (<http://www.cdc.gov/genomics/hugenet/participate.htm>).
- 13
- 14 24. Kaufman J BB, Brent D, Rao U, Flynn C, Moreci P, Williamson D, Ryan N. . Schedule for affective disorders and schizophrenia for school age children – Present and lifetime version (KSADS-PL): initial reliability and validity data. . *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 1997;36:980-8.
- 15
- 16 25. Goodman WK, Price LH, Rasmussen SA, et al. The Yale-Brown Obsessive Compulsive Scale. I. Development, use, and reliability. *Arch Gen Psychiatry* 1989;46:1006-11.
- 17
- 18 26. Miguel EC, Ferrao YA, do Rosario MC, et al. The Brazilian Research Consortium on Obsessive-Compulsive Spectrum Disorders: recruitment, assessment instruments, methods for the development of multicenter collaborative studies and preliminary results. *Rev Bras Psiquiatr* 2008;30:185-96.
- 19
- 20 27. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16:1215.
- 21
- 22 28. Stewart SE, Yu D, Scharf JM, et al. Genome-wide Association Study of Obsessive-Compulsive Disorder. *Molecular Psychiatry* in press.
- 23
- 24 29. Sequenom. Sequenom hME platform (San Francisco, CA, USA), 2005.
- 25 (http://www.sequenom.com/Assets/pdfs/appnotes/Multiplexing_hME_App_Note.pdf).
- 26
- 27 30. Barrett JC FB, Maller J, Daly MJ. . Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. . *Bioinformatics* 2005;21:263-5.
- 28
- 29 31. Purcell S. PLINK v. 1.06. Software. URL:<http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/>.
- 30
- 31 32. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, et al. PLINK: a toolset for whole-genome association and population-based linkage analysis. *Am J Hum Genet* 2007;81.
- 32
- 33 33. Tot S, Erdal ME, Yazici K, et al. Catechol-O-methyltransferase gene polymorphism in Turkish patients with obsessive-compulsive disorder. *European Neuropsychopharmacology* 2002;12:S406-S.
- 34
- 35 34. Waldman ID, Wolff M, Stever C, et al. Sex differences in association and linkage between COMT and symptoms of OCD and tics in children. *Am J Med Genet* 2000;96:471.
- 36
- 37 35. OCF-MINI-subgroup, Mathews C, Hanna G, et al. Obsessive-Compulsive Foundation Mini Genetics Collaborative Subgroup OCF-MINI.
- 38
- 39 36. Veenstra-VanderWeele J. personal communication. .
- 40
- 41 37. Alsobrook JP, Zohar AH, Leboyer M, et al. Association between the COMT locus and obsessive-compulsive disorder in females but not males. *Am J Med Genet* 2002;114:116-20.
- 42
- 43 38. Camarena B, Aguilar A, Loyzaga C, et al. Family based association study between COMT gene and obsessive compulsive disorder. *Am J Med Genet* 2005;138B:46-7.
- 44
- 45 39. Di Bella D, Cavallini MC, Henin M, et al. Association between obsessive compulsive disorder and the COMT gene. *Am J Med Genet* 1998;81:516-.
- 46
- 47 40. Karayiorgou M, Sobin C, Blundell ML, et al. Family-based association studies support a sexually dimorphic effect of COMT and MAOA on genetic susceptibility to obsessive-compulsive disorder. *Biol Psychiatry* 1999;45:1178-89.
- 48
- 49 41. Schindler KM, Richter MA, Kennedy JL, et al. Association between homozygosity at the COMT gene locus and obsessive compulsive disorder. *Am J Med Genet* 2000;96:721-4.
- 50
- 51
- 52
- 53
- 54
- 55
- 56
- 57
- 58
- 59
- 60

- 1
- 2
- 3
- 4 42. Liu W, Zhao N, Xiong J, et al. Association analysis of serotonin and catecholamine system
- 5 candidate genes in obsessive-compulsive disorder in the Chinese population. *Psychiatry*
- 6 *Research* 2011;188:170-2.
- 7 43. Wray NR, James MR, Dumenil T, et al. Association Study of Candidate Variants of COMT With
- 8 Neuroticism, Anxiety and Depression. *Am J Med Genet B* 2008;147B:1314-8.
- 9 44. Thakkestian A, D'Este C, Eisman J, et al. Meta-analysis of molecular association studies: vitamin
- 10 D receptor gene polymorphisms and BMD as a case study. *J Bone Miner Res* 2004;19:419-28.
- 11 45. Camargo MC, Mera R, Correa P, et al. Interleukin-1beta and interleukin-1 receptor antagonist
- 12 gene polymorphisms and gastric cancer: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*
- 13 *2006;15:1674-87.*
- 14 46. Ioannidis JP, Boffetta P, Little J, et al. Assessment of cumulative evidence on genetic
- 15 associations: interim guidelines. *Int J Epidemiol* 2008;37:120-32.
- 16 47. Stata-Corporation. STATA. College Station, TX.
- 17 48. Sampaio AS, Stewart SE, Fargeness J, et al. MAO-A and COMT polymorphisms and OCD: A
- 18 brazilian family-based association study. *Biological Psychiatry* 2010;67:114S-5S.
- 19 49. Jackson D. The power of the standard test for the presence of heterogeneity in meta-analysis.
- 20 *Stat Med* 2006;25:2688-99.
- 21 50. Sterne JA, Gavaghan D, Egger M. Publication and related bias in meta-analysis: power of
- 22 statistical tests and prevalence in the literature. *J Clin Epidemiol* 2000;53:1119-29.
- 23 51. Dawling S, Roodi N, Mernaugh RL, et al. Catechol-O-methyltransferase (COMT)-mediated
- 24 metabolism of catechol estrogens: comparison of wild-type and variant COMT isoforms. *Cancer*
- 25 *Res* 2001;61:6716-22.
- 26 52. Wang Z, Xiao Z, Inslicht SS, et al. Low expression of catecholamine-O-methyl-transferase gene in
- 27 obsessive-compulsive disorder. *J Anxiety Disord* 2009.
- 28 53. de Mathis MA, de Alvarenga P, Funaro G, et al. Gender differences in obsessive-compulsive
- 29 disorder: a literature review. *Rev Bras Psiquiatr* 2011;33:390-9.
- 30 54. Borenstein M, Hedges LV, Higgins JPT, et al. Introduction to meta-analysis. Chichester: Wiley,
- 31 2009.
- 32 55. Li T, Chen CK, Hu X, et al. Association analysis of the DRD4 and COMT genes in
- 33 methamphetamine abuse. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2004;129B:120-4.
- 34 56. Shiels MS, Huang HY, Hoffman SC, et al. A community-based study of cigarette smoking behavior
- 35 in relation to variation in three genes involved in dopamine metabolism: Catechol-O-
- 36 methyltransferase (COMT), dopamine beta-hydroxylase (DBH) and monoamine oxidase-A (MAO-
- 37 A). *Prev Med* 2008;47:116-22.
- 38 57. Massat I, Souery D, Del-Favero J, et al. Association between COMT (Val158Met) functional
- 39 polymorphism and early onset in patients with major depressive disorder in a European
- 40 multicenter genetic association study. *Mol Psychiatry* 2005;10:598-605.
- 41 58. Jabbi M, Korf J, Kema IP, et al. Convergent genetic modulation of the endocrine stress response
- 42 involves polymorphic variations of 5-HTT, COMT and MAOA. *Mol Psychiatry* 2007;12:483-90.
- 43 59. Montag C, Buckholtz JW, Hartmann P, et al. COMT genetic variation affects fear processing:
- 44 psychophysiological evidence. *Behav Neurosci* 2008;122:901-9.
- 45 60. Olsson CA, Anney RJ, Lotfi-Miri M, et al. Association between the COMT Val158Met
- 46 polymorphism and propensity to anxiety in an Australian population-based longitudinal study of
- 47 adolescent health. *Psychiatr Genet* 2005;15:109-15.
- 48 61. Olsson CA, Byrnes GB, Anney RJ, et al. COMT Val(158)Met and 5HTTLPR functional loci interact
- 49 to predict persistence of anxiety across adolescence: results from the Victorian Adolescent
- 50 Health Cohort Study. *Genes Brain Behav* 2007;6:647-52.
- 51
- 52
- 53
- 54
- 55
- 56
- 57
- 58
- 59
- 60

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
62. Savitz JB, van der Merwe L, Newman TK, et al. The relationship between childhood abuse and dissociation. Is it influenced by catechol-O-methyltransferase (COMT) activity? *Int J Neuropsychopharmacol* 2008;11:149-61.
63. Woo JM, Yoon KS, Choi YH, et al. The association between panic disorder and the L/L genotype of catechol-O-methyltransferase. *J Psychiatr Res* 2004;38:365-70.
64. Zubieta JK, Heitzeg MM, Smith YR, et al. COMT val158met genotype affects mu-opioid neurotransmitter responses to a pain stressor. *Science* 2003;299:1240-3.
65. Jabbi M, Kema IR, van der Pompe GD, et al. Catechol-o-methyltransferase polymorphism and susceptibility to major depressive disorder modulates psychological stress response. *Psychiatric Genetics* 2007;17:183-93.
66. Dickel DE, Veenstra-VanderWeele J, Bivens NC, et al. Association studies of serotonin system candidate genes in early-onset obsessive-compulsive disorder. *Biol Psychiatry* 2007;61:322-9.
67. Lahiri DK, Nurnberger JI, Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 1991;19:5444.

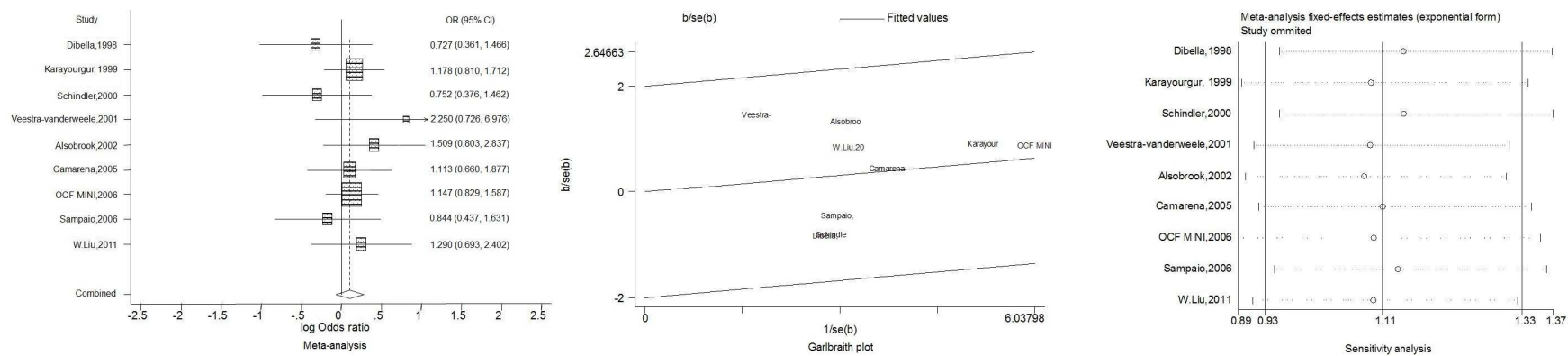


Figure 2. Meta-analysis of *COMT* Val158Met and OCD family-based studies. CI, confidence interval; OR, odds ratio.

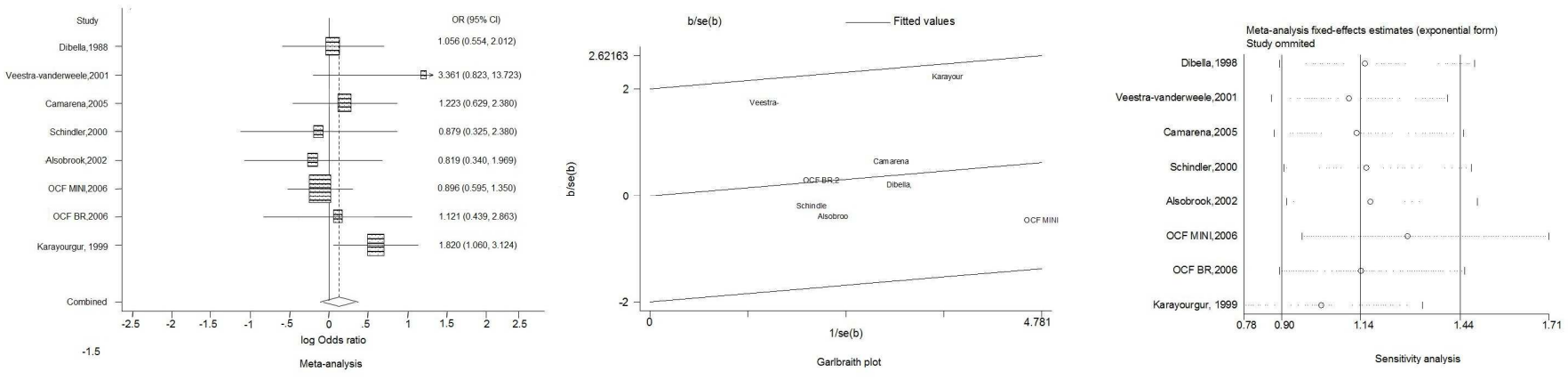


Figure 3. Meta-analysis with the male subsample. CI, confidence interval; OR, odds ratio.

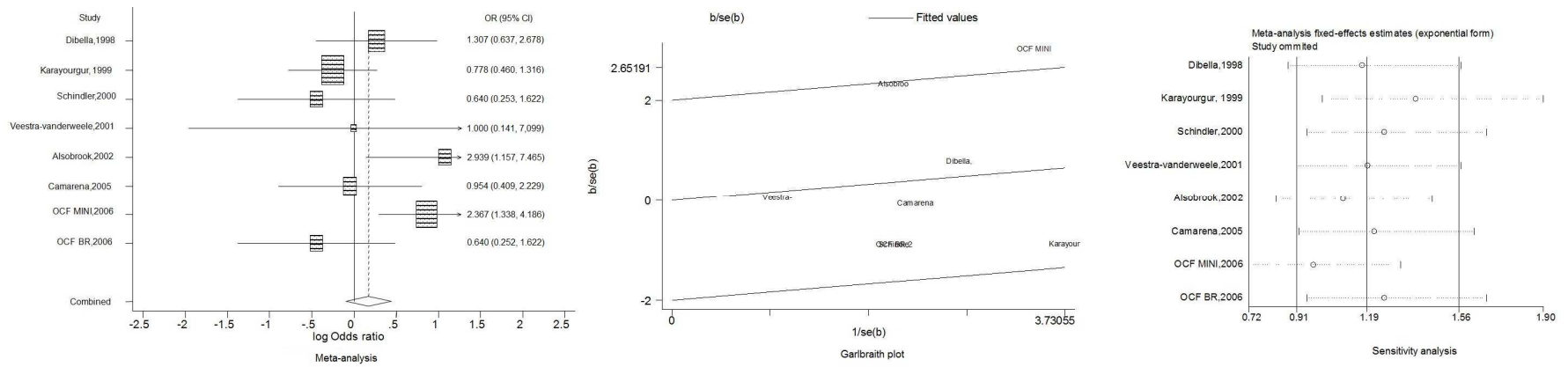
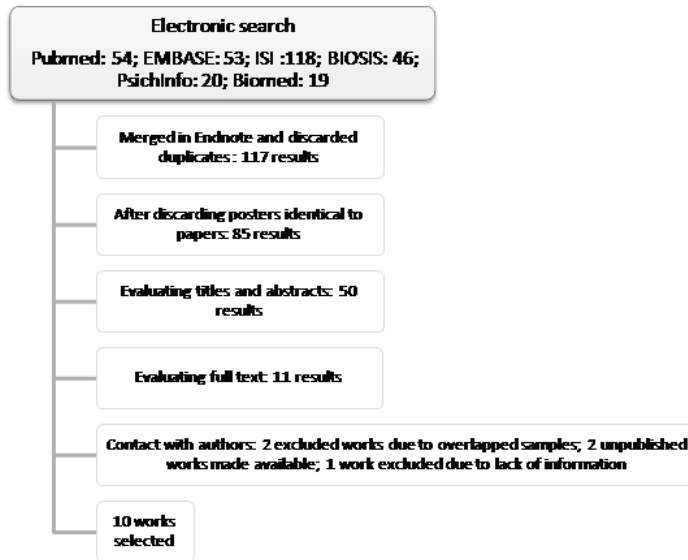


Figure 4. Meta-analysis with the female subsample. CI, confidence interval; OR, odds ratio.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Web Materials

Web Material 1: Systematic Review Algorithm



Web material 2. Scale for Quality Assessment

Criteria Score

Representativeness of subjects

Consecutively/randomly selected from population with clearly defined sampling frame	2
Consecutively/randomly selected from population without clearly defined sampling frame	1
Not described	0

Ascertainment of OCD

Ascertainment of OCD diagnosis clearly described with standardized interview, for example, SCID, CIDI or MINI.	2
Described standard method of OCD diagnosis, for example, using DSM IV criteria, without details about interview	1
Not described	0

HWE

Evaluated goodness of fit of HWE with appropriate statistics	2
Evaluated goodness of fit of HWE with inappropriate statistics	1
Not mentioned	0

Genotyping examination

Genotyping performed under “blinded” conditions	1
Unblinded or not mentioned	0

Association assessment

Appropriate statistics used, for example, TDT, with automated genotyping reading, procedures for minimizing multiple testing bias, exclusion of samples that did not achieve a minimal genotyping rate of 75%, a minor allele frequency higher than 0.02, or those with Mendelian errors.	3
Appropriate statistics used, for example, TDT, with procedures for minimizing multiple testing bias	2
Appropriate statistics used, for example, TDT	1
Inappropriate statistics used, for example, pairwise comparison using <i>t</i> -test or not mentioned	0

OCD: Obsessive-Compulsive Disorder; MINI: Mini-International Neuropsychiatric Interview; SCID: Structured Clinical Interview for DSM-IV; HWE: Hardy-Weinberg equilibrium; TDT: Transmission disequilibrium test.

Web Material 3: Description of studies included in meta-analysis.

Reference	Alsobrook JP 2nd et al., 2002 (37)	Karayorgou et al., 1999 (40)	Schindler et al., 2000 (41)	Wray et al., 2008 (43)	DiBella et al., 1998 (39)	Camarena et al., 2005 (38)	Veenstra-VanderWeele, personal communication (36). Methods in (66)	OCF-MINI, personal communication (35)	Sampaio et al., presented here	W.Liu et al., 2011 (42)
Population	Israel; Paris (France), New Haven (E.U.A.)	USA	Buffalo (USA), Toronto (Canada)	Australia	Italy	Mexico	Michigan (USA)	Toronto (Canada); San Francisco, Michigan e Connecticut (USA)	Sao Paulo and Recife (Brazil);	China (Han)
Ethnic subgroup	European Caucasian	Not informed	European Caucasian	European Caucasian (95%) confirmed by genotyping	European Caucasian. All Italian ancestry	Hispanic	European Caucasian	European Caucasian	Hispanic	Asian
Phenotype	OCD as DSM III or DSM IV	OCD as DSM IV	OCD as DSM IV	OCD as DSM IV	OCD as DSM IV	OCD as DSM IV	OCD as DSM III-R	OCD as DSM IV	OCD as DSM IV	OCD as DSM IV
Phenotype evaluation	Expert evaluation + STOBS	DIGS +YBOCS	DIGS +YBOCS (Buffalo), SCID +YBOCS (Toronto).	CIDI	Expert evaluation + YBOCS	DIS + YBOCS	SCID or KSAD S-E, STOBS + YBOCS, FISC - 90% reliability between interviewers	Direct interview according DSM IV +YBOCS	SCID/K-SADS +YBOCS	DSM IV criteria +YBOCS
Sample number	56 probands: 26 male/30 female	110 probands: 54 male/56 female	72 probands: 29 male/43 female	110 probands: 49 male/61 female	67 probands: 31 male/36 female	71 probands: 45 male/26 female	28 probands	420 probands: 204 male/117 female	83 probands: 44 male/ 39 female	103 probands: 62 male/41 female
Age	Not informed	Not informed	Not informed	Not informed	Men (26.82+-6.39); Women (31.11+-7.07); (p=0.016)	Not informed	42.7 +- 20.3	Not informed	Not informed	Not informed

Recruitment place	OCD clinics. Convenience sample.	Advertisement (84.5%) or private offices (15.5%)	Psychiatric outpatient services	Population – Australian Twin registry	Consecutive recruitment from Anxiety disorders outpatient service at San Raffaele Hospital, Milan	Not informed	OCD outpatient clinics and patient group support (OCF)	Psychiatric clinics.	OCD outpatient clinics	Probands recruited for genetic study.
Biological sample	Blood or buccal swab	Blood	Blood	Blood or buccal swab	Blood	Blood	Blood or saliva	Blood	Blood	Not informed
DNA extraction method	Blood: Lahiri and Nurnberger Protocol (67). Buccal swabs: Puregen kit (Gentra Systems, Minneapolis, EUA)	Lymphocytes were isolated using Epstein-Barr virus isolation and permanent lineage establishment	ethanol Tris-EDTA protocol	Not informed	Salting out method (67)	Saltin g out method (67)	Puregen Kit for DNA isolation (Gentra Systems, Minneapolis, EUA)	Salting out method (67)	Salting out method (67)	Not informed
Genotyping	PCR with restriction digest (5)	PCR with restriction digest	PCR with restriction digest	PCR	PCR with restriction digest	PCR (5)	Not informed	PCR multiplex and single base extension at MassARRAY platform Sequenom (29) Yes	PCR multiplex and single base extension at MassARRAY platform Sequenom (29) Yes	PCR (5)
Blindness of laboratory workers	Not informed	Not informed	Not informed	Not informed	Not informed	Not informed	Not informed	Yes	Yes	Not informed
Genotype reading	Direct reading from gel plate	Overnight autoradiography of dry gel plate.	Direct reading through ultraviolet light of gel plate with ethidium bromide.	MALDI-TOF Mass spectrometry	Direct reading through ultraviolet light of gel plate with ethidium bromide.	Direct reading through ultraviolet light of gel plate with ethidium bromide.	Not informed	MassARRAY RT	MassARRAY RT	Not informed

Hardy-Weinberg Equilibrium	Not informed. Lacking data for calculation.	Not informed. Calculated =0.97	Not informed. Calculated=0.51	Equilibrium. P=0.57. Excluded Mendel errors.	Equilibrium. P= 0.73	Not informed. Calculated =1	Not informed.	Equilibrium. Excluded Mendel errors.	Equilibrium. Excluded Mendel errors.	Equilibrium
Statistical analysis	HRR - Fisher exact test TDT – SPSS 9.0	TDT/McNemar and HHRR	HRR and TDT (Java TDT/S-TDT v1.1)	Logistic Regression (UNPHASED v3.10)	HRR (79) and TDT (ETDT)	TDT (FBA T v 1.4.1)	TDT	TDT (PLINK)	TDT (PLINK)	TDT (SAS 9.14)
Year	2002	1999	2000	2008	1998	2005	2001	2006	2006	2011

Legends: OCD: obsessive-compulsive disorder; DSM = Diagnostic and statistic manual for mental disorders; STOBBS= Schedule for Tourette and other Behavioral Syndromes; HRR= Haplotype relative risk test; TDT= Transmission disequilibrium test; PCR = Polymerase chain reaction; SPSS = Statistical package for social sciences; DIGS= Diagnostic interview for genetic studies; YBOCS= Yale-Brown obsessive-compulsive scale; SCID= Structured clinical interview for the DSM-IV; EDTA = Ethylenediaminetetraacetic acid; CIDI= The world mental health composite international diagnostic interview; UNPHASED= software for genetic association analysis; NaCl = Sodium chloride; DIS= Diagnostic Interview schedule; FBAT= Family-based association tests; OCF = Obsessive-compulsive Foundation; K-SADS= Schedule for affective disorders and schizophrenia for school aged children; FISC: Family informant schedule and criteria; OCF-MINI= Obsessive-Compulsive Foundation Genetics Subgroup ; PLINK= whole-genome association toolset; SAS 9.14 =Statistic Analysis Software, 9.14 version.

Web Material 4. Meta-analysis regression for the female subsample

Variables	Coef.	[95% CI]	P
Caucasian*			
Italian	0.889	[-0.059; 1.837]	0.066
Hispanic	-1.488	[-2.448;-0.528]	0.002
Quality score	-0.237	[-0.547; 0.072]	0.132
Year of study	0.310	[0.093; 0.527]	0.005
Intercept	0.328	[-0.729; 1.385]	0.543

*:Reference group; 95% CI:95% confidence interval

8.3 Anexo C – Sampaio et al. 2012 – Pôster na íntegra com estudo original de associação apresentado no encontro anual da Society of Biological Society 2010

Sampaio, A. S., S. E. Stewart, et al. (2010). "MAO-A and COMT polymorphisms and OCD: A Brazilian family-based association study." *Biological Psychiatry* 67(9): 114S-115S.



MAO-A and COMT polymorphisms and OCD: A Brazilian family-based association study



DEPARTMENT & INSTITUTE OF PSYCHIATRY - UNIVERSITY OF SÃO PAULO MEDICAL SCHOOL

Aline S. Sampaio M.D.; Evelyn Stewart, M.D.; Jesen Fargeness, B.S.; Carol Mathews, M.D.; Paul Arnold, M.D.; Gregory Hanna, M.D.; Margaret Richter, M.D.; James Kennedy, M.D.; Carolina Cappi B.S., MSc.; Katia Petribu, M.D., PhD; Ivanli Moraes, B.A.; Homero P. Vallada, M.D., PhD; Maria da Conceição do Rosário, M.D., Ph.D.; Helena Brentani, M.D., PhD; Carlos de B. Pereira, PhD; Roseli G. Shavitt, M.D., PhD; Ana G. Hounie, M.D., PhD; Eurípedes Miguel, M.D., PhD; David Pauls, PhD.

Background: There is a complex interaction between serotonin, dopamine, and other neurotransmitters that can influence OCD development. Genes involved in the inactivation of neurotransmitters, such as Catechol-O-Methyltransferase (COMT) and Monoamino-oxidase-A (MAO-A) genes, have been associated with OCD in genetic studies [2]. Studies had reported association between COMT and other psychiatric conditions such as schizophrenia [9, 29-36], bipolar disorder [33, 36, 37]; alcoholism [38, 39] and other substance use disorders [40, 41]; depression [16, 42]; anorexia nervosa [43]. MAO-A as well, was associated with ADHD [44], anxiety disorders [45], MDD [46] and other psychiatric conditions. Few studies with non-caucasian samples had been performed. This study performed a family-based association study, between MAOA and COMT polymorphisms and OCD, in a Brazilian sample

Methods: After provide their signed consent, 73 OCD patients and their parents were interviewed using SCID, YBOC and YGTSS and had a sample of blood collected. Eight COMT and six MAO-A single nucleotide polymorphisms (SNPs) were chosen to be analyzed on trios in this study. The genotyping was performed with Sequenom® MassARRAY platform and the statistical analysis were performed using Haploview and PLINK software.

Results: No association was found between COMT or MAO-A polymorphisms/haplotypes and OCD in our sample

F1: COMT haplotype blocks F2: MAOA haplotype blocks



Discussion: The lack of specificity of the phenotypes associated with COMT and MAO-A genes could be related to their function. As they metabolize a number of important neurotransmitters in limbic pathways, it is possible that impairment on their function could lead to different psychophenomenological presentations. Moreover, OCD is a heterogeneous disorder. Clinical and genetic studies have shown that age of onset, comorbidity and symptoms dimension can present different characteristics [47-52]. It is possible that COMT and MAO-A are more related with endophenotypes that predispose to obsessive-compulsive symptoms than with DSM-IV criteria OCD diagnosis. More studies with larger samples and OCD subgroups are still required

Acknowledgement: CAPES/Brazil; FUA/CEIP – Department & Institute of Psychiatry, HCFMUSP, Brazil; Obsessive-Compulsive Genetics Collaborative Subgroup – Obsessive-Compulsive Foundation.

References:

1. First, M.B., et al. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 4th edition, Text Revision ed. 2000. American Psychiatric Press: Washington, DC.
2. Pauls, D.L. The genetics of obsessive compulsive disorder: a review of the evidence. *Am J Med Genet*. 2008; 148(2): p. 133-9.
3. Sanders, A.R., et al. Haplotype association spanning the 22q11.21 genes COMT and ARVCF with schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 2005; 10(6): p. 552-65.
4. Witt, M., et al. Association study of candidate variants of COMT with mood disorder, anxiety and depression. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr*. 2008; 149(7): p. 317-9.
5. Faraone, S.V., et al. Structural/clinical interview for DSM-IV Axis I disorders. Clinician Version. 1996. American Psychiatric Press, Inc.: Washington, DC.
6. Kulkarni, B.S., Bost, D., Rao, U., Flynn, C., Moresi, P., Williamson, D., Ryan, N., Schedule for affective disorders and schizophrenia for school age children - Present and lifetime version (K-SADS-PL): initial reliability and acceptability. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 1997; 36: p. 580-88.
7. Goodman, W.K., Rasmussen, S., Mazure, C., Pilowsky, P., Heninger, G., Charney, D., The Yale-Brown Obsessive Compulsive Scale: I. Behavioral assessment and acceptability. *Arch Gen Psychiatry*. 1989; 46: p. 1073-1075.
8. Lichner, J.R., Nestle, M., O'S, S., Swartz, K., DeWitt, J., Cohen, D., The Yale Global Tic Severity Scale: Initial testing of a clinician-rated scale of tic severity. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 1992; 31: p. 560-67.
9. Miguel, E.C., et al. The Brazilian Research Consortium on Obsessive-Compulsive Spectrum Disorders: recruitment assessment instruments, methods for the development of endophenotype candidate genes and preliminary results. *Rev Bras Psiquiatr*. 2008; 30(2): p. 163-68.
10. Sequenom. Sequenom iPLEX platform. [cited 2007 July]. Available from: http://www.sequenom.com/tech/sequenom/technology/IMM_ARRAY.html
11. Haploview. Haploview. [cited 2007 July]. Available from: <http://www.broadinstitute.org/haploview/>
12. PLINK. PLINK: a simple but powerful association analysis. *American Journal of Human Genetics*. 2007; 81: p. 226-31.
13. Faraone, S.V., et al. COMT genotype moderates the effect of MAO-A genotype on adult ADHD: molecular genetic association study. *Am J Psychiatry*. 2005; 162(12): p. 1564-72.
14. Faraone, S.V., et al. Association of MAO-A genotype with COMT genotype and the risk of schizophrenia in humans. *Hum Genet*. 2005; 116(4): p. 319-28.
15. Li, T., et al. Preferential transmission of the high-activity allele of COMT in schizophrenia. *Psychiatr Genet*. 1998; 6(3): p. 131-5.
16. Faraone, S.V., et al. Effects of genetic expression between catechol-O-methyltransferase (COMT) and polymorphisms in FKBP4, C72 (24024), GRM3 and DISC1: influence on risk of schizophrenia. *Hum Genet*. 2007; 122(6): p. 689-98.
17. Faraone, S.V., et al. COMT haplotype moderates 5-HTT genotype in schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 2004; 161(9): p. 1570-75.
18. Sillman, S., et al. COMT: a common susceptibility gene in bipolar disorder and schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr*. 2004; 128(1): p. 6-8.
19. Dittmann, S., et al. A highly significant association between a COMT haplotype and schizophrenia. *Am J Hum Genet*. 2002; 71(6): p. 1290-302.
20. Vassilios, I., et al. Association between rs10765684 polymorphism of the COMT gene and schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr*. 2006; 139(3): p. 47-50.
21. Gogos, A.G., et al. Hypomethylation of MB-COMT promoter: a major risk factor for schizophrenia and bipolar disorder. *Mol Cell Biol*. 2005; 25(12): p. 3124-31.
22. Risk association between bipolar disorder and alleles at a functional polymorphism in the COMT gene. *Bornet European Bipolar Collaborative Group*. *Am J Psychiatry*. 2007; 164(9): p. 520-4.
23. Sany, D., et al. The association between high-activity COMT allele and alcoholism. *Neuro Endocrinol Lett*. 2008; 29(1-2): p. 23-6.
24. Tashiro, L., et al. Association between the functional variant of the catechol-O-methyltransferase (COMT) gene and 5-HT(2A) receptor. *Behav Psychiatry*. 1999; 4(3): p. 286-9.
25. Li, T., et al. Association analysis of the DRD4 and COMT genes in methamphetamine abuse. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr*. 2004; 128(1): p. 12-4.
26. Chiles, M.S., et al. A community-based study of cigarette smoking behavior in relation to variation in three genes involved in dopamine metabolism: Catechol-O-methyltransferase (COMT), serotonin transporter (5-HTT) and monoamine oxidase A (MAO-A). *Hum Genet*. 2005; 117(1): p. 119-23.
27. Mulsant, E., et al. Association between COMT (rs736434) functional polymorphism and early onset of patients with major depressive disorder in a European outbred genetic association study. *Mol Psychiatry*. 2005; 10(5): p. 556-65.
28. Machiavola, E., et al. Haplotype analysis of the COMT-ARVCF gene region in breast anorexia nervosa family trio. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr*. 2005; 138(1): p. 83-9.
29. Mowry, L., et al. Family-based and association studies of monoamine oxidase A and attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD) polymorphisms of the long promoter region: repeat and its association with impaired performance on a continuous performance test (CPT-IV). *Mol Psychiatry*. 2002; 7(8): p. 776-84.
30. Mowry, L., et al. The optimal size of a candidate gene region for association studies. *Hum Genet*. 2005; 115(2): p. 173-8.
31. Faraone, S.V., et al. The differential association of monoamine oxidase A genotype and treatment resistance. *Am J Psychiatry*. 2001; 158: p. 6-10.
32. Faraone, S.V., et al. A family study of early-onset obsessive-compulsive disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr*. 2005; 2005: p. 67-70.
33. Mattay, V.S., et al. M.A.O.A. A multidimensional model of obsessive-compulsive disorder. *Am J Psychiatry*. 2005; 162(2): p. 20-28.
34. Miguel, E.C., et al. Obsessive-compulsive disorder phenotypes: implications for genetic studies. *Mol Psychiatry*. 2005; 10(7): p. 725-735.

Table: COMT (8) and MAO-A (5) single markers association with OCD in the Brazilian sample. : COMT: catechol-O-methyltransferase, MAO-A: monoamino oxidase-A , SNP: Single Nucleotide Polymorphism, A1:Major Allele, A2:Minor Allele , T: transmitted, U: Untransmitted, OR: TDT Odds Ratio, CHISQ: TDT Chi-squared value, P: TDT p-value

Gene	SNP	A1	A2	T	U	OR	CHISQ	P
COMT	rs737866	2	4	25	31	0.8065	0.6429	0.4227
	rs933271	2	4	34	30	1.133	0.25	0.6171
	rs5993883	4	3	24	21	1.143	0.2	0.6547
	rs740603	1	3	26	34	0.7647	1.067	0.3017
	rs4680	1	3	34	37	0.9189	0.1268	0.7218
	rs4646316	4	2	31	22	1.409	1.528	0.2164
	rs165774	1	3	36	32	1.125	0.2353	0.6276
	rs9332377	4	2	19	28	0.6786	1.723	0.1893
rs1465107	1	3	19	13	1.462	1.125	0.2888	
MAO-A	rs1465108	1	3	19	13	1.462	1.125	0.2888
	rs6323	3	4	19	13	1.462	1.125	0.2888
	rs979606	2	4	19	13	1.462	1.125	0.2888
	rs979605	1	3	21	13	1.615	1.882	0.1701
	rs979605	1	3	21	13	1.615	1.882	0.1701

8.4 Anexo D - Análises secundárias do estudo original de associação entre catecol O-metiltransferase e o transtorno obsessivo-compulsivo

Como parte do estudo original de associação entre catecol O-metiltransferase e o transtorno obsessivo-compulsivo (Anexos B e C), foram realizadas análises secundárias com a amostra brasileira de 83 trios. Estas análises foram preparadas em inglês mas ainda não foram submetidas a publicação. A descrição abaixo refere-se especificamente aos métodos e resultados das análises secundárias, pois trata-se de complementação do estudo apresentado nos anexos B e C.

We conducted an exploratory investigation of the *COMT* associations in our sample. First, we grouped the probands into sex-matched trios in order to evaluate the influence of sex in results. This approach was based on the knowledge that *COMT* has influence in estrogens. Also, previous sexually dichotomic results of association between *COMT*, and OCD motivated a sex-based secondary analysis.

Another analysis was performed hypothesizing that OCD phenomenology, and not severity, could be influenced by and *COMT* genes. We analyzed association of *COMT* polymorphisms and a broadly-defined OCD, which includes cases meeting the DSM-IV criteria, as well as cases of subclinical OCD, in which the subject meets only 75% of the criteria.

Some studies suggested that OCD can be grouped based on tic disorders comorbidity (282, 283). Exploratory analysis was performed comparing trios with

OCD with tic disorders (Tourette syndrome or chronic tic disorder) probands and OCD without tic disorder probands.

Hypothesizing that OCD is part of a spectrum (19, 353) that includes other anxiety disorders (354, 355), body dysmorphic disorder, and pathological grooming disorders (skin picking and trichotillomania)(355), association analysis was performed joining all these conditions as affected status. The term ‘OCD spectrum disorders’ included DSM-IV-defined and subclinical OCD, together with DSM-IV-defined anxiety disorders, body dysmorphic disorder, and pathological grooming disorders (skin picking and trichotillomania).

Results

OCD with comorbid tic disorders

When the patients with comorbid OCD and tic disorders (Tourette syndrome or chronic tic disorders; N = 19 trios) were analyzed separately, OCD with comorbid tic disorder was not found to be significantly associated with any *COMT* or *MAO-A* SNP.

Broadly-defined OCD phenotype

In subjects meeting at least 75% of OCD DSM-IV criteria (subclinical OCD plus OCD), there was preferential transmission of the A allele of the *MAO-A* SNP rs1465108 (p=0.0469).

OCD spectrum disorders

Subjects with DSM-IV-defined or subclinical OCD, as well as those with DSM-IV-defined impulse control disorders, body dysmorphic disorder, or DSM-IV-defined anxiety disorders, were classified as being affected by OCD spectrum disorders. The

A allele of the *MAO-A* SNP rs979605 was associated with OCD spectrum disorders ($p=0.027$) (Tables 4, 5 and 6).

Table 1: Characteristics of the eleven catechol-*O*-methyltransferase single-nucleotide polymorphisms genotyped from the study sample.

Name	HWE	%Geno	FamTrio	MendErr	MAF	Alelos
rs737866	0.263	98.2	67	1	0.301	T:C
rs933271	0.4028	98.2	65	0	0.371	T:C
rs1544325	0.0421*	98.7	67	0	0.298	G:A
rs5993883	0.1319	86.1	49	0	0.419	G:T
rs740603	0.0703	99.1	68	0	0.38	G:A
rs13306281	1	99.1	67	0	0*	G:G
rs2239393	0.0002*	28.7*	2	0	0.369	A:G
rs4680	0.8182	99.1	67	0	0.444	G:A
rs4646316	0.2983	100	69	0	0.241	C:T
rs165774	1	99.1	68	0	0.303	G:A
rs9332377	1	99.1	67	0	0.155	C:T

ObsHET: observed heterozygosity; PredHET: predicted heterozygosity; HWpval: Hardy-Weinberg equilibrium p value; %Geno: percentage of non-missing genotypes; FamTrio: number of fully genotyped family trios; MendErr: number of observed Mendelian inheritance errors; MAF: minor allele frequency; * results lower than required to pass quality control.

Table 2: Analysis of OCD association with catechol-*O*-methyltransferase single-nucleotide polymorphisms in female proband trios.

Gene	SNP	T	U	OR	qui ²	P
<i>COMT</i>	rs737866	12	16	0.75	0.5714	0.4497
	rs933271	16	15	1.067	0.03226	0.8575
	rs5993883	11	8	1.375	0.4737	0.4913
	rs740603	13	13	1	0	1
	rs4680	16	20	0.8	0.4444	0.505
	rs4646316	18	10	1.8	2.286	0.1306
	rs165774	15	18	0.8333	0.2727	0.6015
	rs9332377	10	12	0.8333	0.1818	0.6698

SNP: single-nucleotide polymorphism; T: transmitted; U: Untransmitted; TDT: transmission/disequilibrium test; OR: TDT odds ratio; CHISQ: TDT chi-square value; P: TDT p value; *COMT*: catechol-*O*-methyltransferase

Table 3: Analysis of OCD association with catechol-*O*-methyltransferase and monoamine oxidase A single-nucleotide polymorphisms in male proband trios

Gene	SNP	A1	A2	T	U	OR	CHISQ	P
<i>COMT</i>	rs737866	2	4	13	15	0.8667	0.1429	0.7055
	rs933271	2	4	18	15	1.2	0.2727	0.6015
	rs5993883	4	3	13	13	1	0	1
	rs740603	1	3	13	21	0.619	1.882	0.1701
	rs4680	1	3	18	17	1.059	0.02857	0.8658
	rs4646316	4	2	13	12	1.083	0.04	0.8415
	rs165774	1	3	21	14	1.5	1.4	0.2367
	rs9332377	4	2	9	16	0.5625	1.96	0.1615

SNP: single-nucleotide polymorphism; T: transmitted; U: Untransmitted; TDT: transmission/disequilibrium test; OR: TDT odds ratio; CHISQ: TDT chi-square value; P: TDT p value; *COMT*: catechol-*O*-methyltransferase

Table 4: Association of OCD + tic disorders with catechol-*O*-methyltransferase and monoamine oxidase A single-nucleotide polymorphisms.

Gene	SNP	BP	A1	A2	T	U	OR	CHISQ	P
<i>COMT</i>	rs7378	183046	2	4	1	7	1.429	0.5294	0.466
	rs9332	183059	2	4	9	1	0.9	0.0526	0.818
	rs59938	183121	4	3	2	5	0.4	1.286	0.256
	rs74060	183197	1	3	4	8	0.5	1.333	0.248
	rs4680	183258	1	3	1	8	1.375	0.4737	0.491
	rs46463	183266	4	2	4	7	0.57	0.8182	0.365
	rs1657	183271	1	3	1	6	2.167	2.579	0.108
	rs93323	183302	4	2	4	8	0.5	1.333	0.248

SNP: single-nucleotide polymorphism; BP: base pair; A1: Major Allele; A2: Minor Allele; T: transmitted; U: Untransmitted; TDT: transmission/disequilibrium test; OR: TDT odds ratio; CHISQ: TDT chi-square value; P: TDT p value; *COMT*: catechol-*O*-methyltransferase

Table 5: Association of the broadly-defined OCD phenotype with catechol-*O*-methyltransferase single-nucleotide polymorphisms.

Gene	SNP	BP	A1	A2	T	U	OR	CHISQ	P
<i>COMT</i>	rs73786	183046	2	4	2	31	0.80	0.6429	0.422
	rs93327	183059	2	4	3	30	1.13	0.25	0.617
	rs59938	183121	4	3	2	21	1.09	0.0909	0.763
	rs74060	183197	1	3	2	33	0.78	0.8305	0.362
	rs4680	183258	1	3	3	36	0.91	0.1304	0.718
	rs46463	183266	4	2	2	19	1.52	2.083	0.148
	rs16577	183271	1	3	3	31	1.12	0.2424	0.622
	rs93323	183302	4	2	1	28	0.67	1.723	0.189

SNP: single-nucleotide polymorphism; BP: base pair; A1: Major Allele; A2: Minor Allele; T: transmitted; U: Untransmitted; TDT: transmission/disequilibrium test; OR: TDT odds ratio; CHISQ: TDT chi-square value; P: TDT p value; *COMT*: catechol-*O*-methyltransferase;

Table 6: Association between OCD spectrum disorders and catechol-*O*-methyltransferase and monoamine oxidase A single-nucleotide polymorphisms.

Gene	SNP	BP	A1	A2	T	U	OR	CHISQ	P
<i>COMT</i>	rs7378	183046	2	4	25	30	0.83	0.454	0.500
	rs9332	183059	2	4	33	30	1.1	0.142	0.705
	rs5993	183121	4	3	24	21	1.14	0.2	0.654
	rs7406	183197	1	3	25	33	0.75	1.10	0.293
	rs4680	183258	1	3	33	36	0.91	0.130	0.718
	rs4646	183266	4	2	30	21	1.42	1.58	0.207
	rs1657	183271	1	3	35	31	1.12	0.242	0.622
	rs9332	183302	4	2	18	28	0.64	2.17	0.140

SNP: single-nucleotide polymorphism; BP: base pair; A1: Major Allele; A2: Minor Allele; T: transmitted; U: Untransmitted; TDT: transmission/disequilibrium test; OR: TDT odds ratio; CHISQ: TDT chi-square value; P: TDT p value; *COMT*: catechol-*O*-methyltransferase;

8.5 Anexo E: Amostra de Correspondência Eletrônica aos Autores

1. Jeremy Veenstra-Vanderweele – comunicação pessoal

“about your data on Azzam and Mathews, 2003”

Aline Sampaio 

para jeremy.veenstr.

Dear Dr. VanderWeele

I am a brazilian psychiatrist and I am currently working on a meta-analysis on family-based association studies with OCD and COMT gene.

I am contacting you in regard of your OCD trio data that was included, as a personal communication, on a previous metanalysis published by Amin Azzam and Carol Mathews in 2003. Has this data been published to date?

If it has, could you, please, send the paper to me, so that I can include it on the meta-analysis I am currently performing?

If it hasn't, is it possible to include the same data you've sent to Amin Azzam on this meta-analysis?

Enclosed is the -Azzam and Mathews, 2003- paper.

I much appreciate your attention.

--

Aline S. Sampaio, M.D.

University of São Paulo, Brazil

Jeremy Veenstra-VanderWeele 

para mim

Hi Dr. Sampaio,

Thank you for your email. This data has never been published in a paper, but I'd appreciate you citing the following reference, which describes the sample in detail:

Association studies of serotonin system candidate genes in early-onset obsessive-compulsive disorder.

Dickel DE, Veenstra-VanderWeele J, Bivens NC, Wu X, Fischer DJ, Van Etten-Lee M, Himle JA, Leventhal BL, Cook EH Jr, Hanna GL.

Biol Psychiatry. 2007 Feb 1;61(3):322-9.

PMID: 17241828

You are welcome to include the data as described by Azzam and Mathews.

Thanks,

Jeremy

Aline Sampaio ©

para Jeremy

Dear Dr. Veenstra-VanderWeele

I had contacted you a while ago regarding the inclusion of your data in a metanalysis. Your data was cited by Amin Azzam as personal communication in a previous study and you have already authorized me to include this data in a new metanalysis.

However, I have some questions about sample number:

The reference that describes your sample: "Dickel DE, et al. Biol Psychiatry. 2007 Feb 1;61(3):322-9." includes 2 different group sample:

"The first group was recruited as part of a family study (Hanna et al 2005) that yielded subjects for a genomelinkage scan reported elsewhere (Hanna et al 2002), as well as a candidate-gene association study reported elsewhere (Veenstra-VanderWeele et al 2001). This study population and its ascertainment have been described elsewhere (Veenstra-VanderWeele et al 2001). In brief, the population from the first study used here consists of 21 parent– child trios from singleplex families, as well as 7 parent– child trios from multiplex families."

"A second group of subjects was recruited for the purpose of an expanded genome-scan study and candidate-gene studies. The probands in the second group were recruited from clinics in the University of Michigan Health System and local chapters of the Obsessive Compulsive Foundation. Table 1 describes the demographic and clinical characteristics of the second group of probands that consisted of 11 males and 15 females with early-onset OCD. "

The second group also included second degree relatives, comprising "31 complete trios consisting of an affected child and two parents from among the 26 families in the second group of subjects were

used for the association studies described in this report."

So, my question is: what is the sample number regarding the data sent to Azzam (table below)? Do you have the number of male probands and female probands in this sample?


	Transmitted	Non-transmitted
Low	Males: 11 Females: 4 TOTAL: 15	Males: 6 Female: 4 TOTAL: 10
High	Males: 6 Females: 4 TOTAL: 10	Males: 11 Females: 4 TOTAL: 15

Thank you for your attention;

My Very Best;

Aline Sampaio

Veenstra-Vander Weele,

Jeremy M 

para mim

Hi Aline,

Sorry for the delay in responding. This seems like a simple question, but I have moved cities and labs since providing these data. I can say that this genotyping was only done in the first group of subjects (not the second). This means that there were 25 informative transmissions (transmissions from heterozygous parents) among the 28 trios.

Are you asking how many total males and females there are in the 28 trios? I can track down that information, but it seems to me that the relevant information is already contained in the data table below, since you really only care about the informative subjects.

Thanks,

Jeremy

2. OCF-MINI – Comunicação Pessoal

“MINI-Collaborative data for COMT metanalysis”

Aline Sampaio 

para Paul, Ed, Gregory, Ana, James, Carol, Euripedes, Peggy.Richter, Evelyn, Dianne, Lisa

Dear colleagues

I am performing a metanalysis of trio association studies regarding COMT and OCD.

In this metanalysis, I have included published and unpublished results.

I would like to ask the group if is it possible to include the COMT rs4680 polymorphism data of Mini-Collaborative in my metanalysis? If yes, what would be the best way to cite this study (as unpublished results? personal communication?)

My aim is to submit the manuscript in about 2 months from now.

I much appreciate your attention.

My Best;

--

Aline S. Sampaio, M.D.

University of São Paulo, Brazil

Carol Mathews 

para **Carol**, mim, Paul, Ed, Gregory, Ana, James, Euripedes, Peggy.Richter, Evelyn, Dianne, Lisa

My thought would be that it is fine to include it, and I would include it as unpublished data, personal communication. Do others agree or disagree?

Carol A Mathews MD

Program for Genetics and Epidemiology of Neuropsychiatric Symptoms

Department of Psychiatry

University of California, San Francisco

401 Parnassus Ave, Box F-0984

San Francisco, CA 94143

phone: 415-476-7702

fax: 415-476-7389

Gregory Hanna ©

para mim, Carol, James', Carol, Dianne, Lisa, Evelyn', Ana', Paul', Peggy.Richter, Gregory', Euripedes',

Ed'

I agree with your suggestion, Carol.

Paul Arnold ©

para Gregory, mim, Carol, James', Carol, Dianne, Lisa, Evelyn', Ana', Peggy.Richter, Gregory', Euripedes', Ed'

Hello everyone

I also agree with Carol's suggestion re authorship. Aline, you will also need to account for fact that many of the Toronto samples were previously genotyped for this polymorphism. I am not sure exactly how you would like to do this, but happy to provide more information on these samples if helpful. I am having a hard time accessing the article at the moment, but am pasting below the citation for this paper written some years ago which included an earlier subset of our Toronto families (Peggy and Jim were authors on this)

Best regards

Paul

Schindler KM, Richter MA, Kennedy JL, Pato MT, Pato CN. Association between homozygosity at the COMT gene locus and obsessive compulsive disorder. Am J Med Genet. 2000 Dec 4;96(6):721-4. PubMed PMID: 11121168.

James Kennedy ©

para paul.arnold, ghanna, mim, cmathews, CarolM, dhezel, osiecki, stewart, anah, peggy.richter, ghanna, ecmiguel, ed

Sounds like a good idea to me to have a meta analysis done on COMT. Note the other markers and haplotye effects described in the paper in Science by Nackley et al in 2006.

Jim


S. Evelyn Stewart ©

para James, paul.arnold, ghanna, mim, cmathews, CarolM, dhezel, osiecki, anah, peggy.richter, ghanna, ecmiguel, ed

agreed as well.

thanks,

evelyn

Richter, Dr. Peggy 

para stewart, James, paul.arnold, ghanna, mim, cmathews, CarolM, dhezel, osiecki, anah,
ghanna, ecmiguel, ed

Hi Aline,

Paul –thanks for reminding us of this. We had published on this years ago, however it will be a relatively small subset of our current dataset – likely no more than 30% of this sample. We can get you the numbers a little later.

Regards,

Peggy

8.6 Anexo F: Ficha de coleta de dados

Referência	
Número de sujeitos incluídos nas análises	
Seleção se sujeitos do estudo	
Local de recrutamento	
Métodos de determinação do diagnóstico	
Potencial estratificação populacional	
Área geográfica	
Subgrupos étnicos	
Critérios de exclusão	
age (mean or range)	
Número de probandos de cada sexo	
Semelhanças sociodemográficas	
Tipo da amostra biológica	
Técnica de extração do DNA	
Taxa de sucesso na extração de DNA	
Definição do genótipo investigado	
Método de genotipagem	
Taxa de sucesso na genotipagem	
Medidas de controle de qualidade	
Modelo de transmissão assumido	
Cegamento dos profissionais do laboratório quanto ao estado de portador de TOC	
Frequência do alelo L (amostra total, probandos ou pais)	
Número de alelos L transmitidos e não transmitidos, qui-quadrado e valor de p para amostra total e cada sexo	
Existe possível sobreposição de amostras?	
Equilíbrio de Hardy-Weinberg	
Método de análise estatística com referência e programa usado	
Validade analítica – poder da amostra	
Presença de múltiplos testes	
Utilização de métodos para controlar erro tipo I	
Inclusão na metanálise?	
Necessidade de contato com o autor?	

8.7 Anexo G: Escala para avaliação de qualidade dos estudos

Crítérios	Pontuação
Representatividade dos sujeitos	
Consecutivo/selecionado aleatoriamente da população com base de amostragem claramente definida	2
Consecutivo/selecionado aleatoriamente da população sem base de amostragem claramente definida	1
Não descrita	0
Diagnóstico do TOC	
Dianóstico do TOC claramente descrito com entrevista padronizada, por ex. SCID, CIDI ou MINI	2
Dianóstico do TOC padronizado por ex. DSM, mas sem detalhes da entrevista	1
Não descrito	0
Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE)	
Checagem da adequação do ajuste do HWE com estatística apropriada	2
Checagem da adequação do ajuste do HWE com estatística inapropriada	1
Não mencionada	0
Exame da Genotipagem	
Genotipagem feita sob condições de cegamento	1
Sem cegamento ou não mencionado	0
Avaliação da associação	
Estatística utilizada apropriada, por ex. TDT, com leitura de genotipagem automatizada, procedimentos para minimizar vies de múltiplas análises, exclusão de amostras que não alcançaram percentual mínimo de 75% de genotipagem ou que tiveram erro mendeliano	3
Estatística utilizada apropriada, por ex. TDT, procedimentos para minimizar viés de múltiplas análises	2
Estatística utilizada apropriada, por ex. TDT	1
Estatística inapropriada, por exemplo, comparação por teste <i>t</i> pareado ou não descrita	0

**8.8. Anexo H: Di Bella et al, 1998 - Pôster na íntegra
apresentado no IV Congresso Mundial de Psiquiatria
Genética, ocorrido em Bonn, Alemanha, em Outubro de
1998.**

**NO ASSOCIATION BETWEEN OBSESSIVE COMPULSIVE DISORDER
AND COMT GENE**

Di Bella D, Cavallini MC, Henin M, Catalano M, Bellodi L
IRCCS H S Raffaele, Dept of Neuropsychiatric Sciences. University of Milan
Medical School. Milan, Italy.

Supported by Telethon grant E 529

ABSTRACT

Obsessive Compulsive Disorder (OCD) is a clinical condition characterized by persistent, unwanted thoughts and ritualistic behaviours. Data from families and segregation studies strongly support the hypothesis of a genetic liability.

Catechol-O-methyltransferase (COMT) is a key modulator of catecholaminergic neurotransmission. Recently, a significant association between a common functional polymorphism (Met 158 Val) in the coding sequence of COMT gene, resulting in a three to fourfold reduction in enzyme activity, and susceptibility for OCD was found, particularly in males.

We decided to investigate a sample of OCD patients, diagnosed according to DSM-IV criteria, for a possible association with COMT alleles using a Haplotype Relative Risk (HRR) strategy. We collected 67 nuclear families of OCD probands (36 males, 31 females) of Italian descent.

The distribution of both genotypes and alleles was not significantly different between males and females OCD patients. Furthermore, allele frequencies in the OCD sample (high activity allele=0.52; low activity allele= 0.48) are not different from those reported in the literature for caucasians.

HRR analysis yielded negative results in the total sample as well as subdividing the sample according to the sex of the proband. The transmission Disequilibrium Test (TDT) confirmed the same negative results.

Our study failed to confirm the previous finding of an association between the COMT low activity allele and males OCD.

INTRODUCTION

Recent familial studies of Obsessive-Compulsive Disorder (OCD) highlighted a familial aggregation of this disorder; in fact, the risk for OCD in first degree relatives of probands has been demonstrated to be greater than that in the relatives of controls (Pauls et al. 1995). Segregation analysis of OCD families supports the hypothesis of a major gene accounting for OCD liability in families (Cavallini et al. in press). Recently, Karayiorgou et al (1997) reported an association between a common functional polymorphism within the catechol-O-methyltransferase (COMT) gene and susceptibility to OCD, particularly in males. The gene for COMT is involved in the inactivation of catecholamines including dopamine, maps to the 22q11 region and is frequently deleted in patients with 22q11 microdeletions. It has been described that these patients have an increased prevalence of psychiatric disorders, including schizophrenia and OCD (Karayorgou et al, 1995). COMT activity is regulated by a common functional polymorphism, resulting in a three to fourfold reduction in enzyme activity. These differences are due to a G→A transition at codon 158 of the protein, which corresponds to codon 108 of cytoplasmic COMT, leading to a Valine/Methionine substitution (Lachman et al 1996). The Valine and Methionine forms correspond to the High (H) and Low (L) COMT enzyme activity variants, respectively.

Following the evidence of a possible involvement of the COMT gene in the genetic predisposition to OCD, we decided to perform a familial-based association study in a sample of Italian OCD trios, using Haplotype Relative Risk (HRR) and Transmission Disequilibrium test (TDT) strategies.

MATERIALS AND METHODS

We recruited a sample of 67 OCD patients, fulfilling DSM-IV (American Psychiatric Association, 1994) diagnostic criteria, with their parents. Demographic characteristics are summarized in table 1. Patients were sequentially admitted at the Anxiety Disorder Clinic and Research Unit at San Raffaele University Hospital, Milan. Diagnoses and family history were assessed by senior psychiatrists. The severity of obsessive-compulsive symptoms was rated using the Y-BOCS (Goodman et al. 1989). All probands were investigated for presence/absence of chronic motor tic disorder (CMT), according to the questionnaire proposed by Black et al. (1992) and for positive/negative history of OCD or tic disorder in first degree relatives.

No differences have been found between male and female OCD patients for age at onset, presence of tic, tic familiarity, OCD familiarity. Females showed an higher actual age than males (t-test= 2.480, df=1, p=0.016).

Informed consent was obtained from all probands and their parents, who were all unrelated and of Italian descent, with antecedents from all parts of the country.

Laboratory Method

Twenty cc of anticoagulated blood, have been collected from probands and controls for DNA extraction. An aliquot has been used to extract genomic DNA by NaCl precipitation method (Lahiri et Nurnberger 1991).

The following primers were used to amplify a 96 bp fragment of the COMT gene containing the *NlaIII* polymorphism in codon 158: forward primer 5'-TCACCATCGAGATCAACCCC-3' and reverse primer 5'-ACAACGGGTCAGGCATGCA-3'. Twenty-five microliter PCR reaction were performed according to standard PCR protocols. After initial denaturation at 95°C for 5 minutes, 35 cycles were carried out at 94°C for 1 min, 64°C for 1 min, 72°C for 1 min. 10 µl of PCR reaction were digested with 5U *NlaIII* (New England Biolabs) in a 20 µl reaction, according to the manufacturer's specifications. Digested products were electrophoresed on 14% polyacrylamide gel, stained with ethidium bromide, allowing differentiation of several fragments (polymorphic: 64bp+18bp+13 bp, constant band; wild type: 83bp+13bp, constant band).

Statistical methods

Comparisons between groups have been made with Student's t tests and with chi square statistics using BDMP statistical package (Dixon 1991). The HRR strategies will be applied as described by Ott and Terwilliger (1992), the TDT will be performed using the ETDT program (Curtis D. 1996).

RESULTS

Genotypes counts and allele frequencies are shown in the following table.

	H/H	H/L	L/L	L%
MALES OCD (N=36)	9	19	8	48.6
FEMALES OCD (N=31)	10	13	8	46.8
TOTAL OCD (N=67)	19	32	16	47.8

The genotypic distribution was not significantly different from the distribution expected according to Hardy-Weinberg Equilibrium in male and female subsamples in OCD. No male/female difference in distribution of alleles and genotypes of COMT has been observed.

No male/female difference in distribution of alleles and genotypes of COMT has been observed.

HRR Analysis

HRR analysis showed no association between COMT polymorphism and OCD, even dividing the sample according to the sex.

GLOBAL OCD SAMPLE (N=67)	H	H*
TRANSMITTED	64	70
NOT TRANSMITTED	69	65

$\chi^2 = 0.497$ with 1 df and $p = 0.480$

MALE OCD SAMPLE (N=36)	H	H*
TRANSMITTED	35	39

NOT TRANSMITTED	36	38
------------------------	-----------	-----------

$\chi^2 = 0.027$ with 1 df and $p = 0.869$

FEMALE OCD SAMPLE (N=31)	H	H*
TRANSMITTED	29	31
NOT TRANSMITTED	33	27

$\chi^2 = 0.533$ with 1 df and $p = 0.465$

We also performed the Transmission Disequilibrium Test; of 63 heterozygous parents, 34 transmitted the high activity COMT allele and 29 transmitted the low activity allele, with negative results. (Table 2). The same negative results were found dividing the sample according to the proband sex.

	MALES (N=36)	FEMALES (N=31)
ACTUAL AGE (Yrs)	26.82±6.39	31.11±7.07
AGE AT ONSET (Yrs)	15.89±6.125	15.93±6.234
CMT CO-DIAGNOSIS	5%	
FAMILIALITY FOR TIC	10.8%	18.9%
FAMILIALITY FOR OCD	33.3%	40%

Table 1. Demographic features

TDT Analysis

63 heterozygote parents

	HIGH	LOW
PASSED	34	29
NOT PASSED	29	34

Table 2. χ^2 allele wise TDT=0.397,1df, $p=0.528$
 χ^2 genotype wise TDT=0.397, 1df, $p=0.528$

CONCLUSION

Our data do not confirm the data from Karayorgou et al (1997) of an involvement of the COMT polymorphism in conferring susceptibility to OCD.

Dysregulation in different neurotransmitter systems has been invoked as factors involved in the etiopathogenesis of OCD. Eventhough, due to pharmacological evidences, the serotonin (5-HT) system is a main candidate for a possible role in OCD etiology, other data support the involvement of different neurotransmitters. Some data regarding the efficacy of neuroleptics in the treatment of OCD patients who do not respond to Serotonin Selective Reuptake Inhibitors (SSRIs) alone (McDougle et al 1994), suggest a possible role of dopamine. Furthermore, COMT appears to be a key enzyme in terminating the action of dopamine. Following this evidence and the data from Karayorgou et al (1997) the COMT gene can be considered a good candidate gene for OCD.

The reasons of the contrasting results could be explained by the different strategy adopted in our study or, alternatively, by the small size of our sample which do not allow us to exclude a false negative.

REFERENCE

- American Psychiatric Association (1994): DSMIV: Diagnostic and statistical manual of mental disorders. Washington DC, the Association.
- Black DW, Noyes R, Goldstein RB, Blum NA. A family study of obsessive compulsive disorder. *Arch Gen Psychiatry* 49: 362-368, 1992.
- Cavallini MC, Perna G, Caldirola D, Bellodi L. A segregation study of panic disorder in families of panic patients responsive to a 35% CO₂ challenge. *Neuropsychiatric Genetics*, in press.
- Curtis D.& Sham P.C. Model-free linkage analysis using likelihoods. *Am J Hum Genet* 57:703-716, 1996.
- Goodman WK, Price LH, Rasmussen SA, Mazure C, Fleishmann RL, Hill CL, Heninger GR, Charney DS. The Yale-Brown Obsessive Compulsive Scale, I: development, use and reliability. *Arch Gen Psychiatry* 46: 1006-1011, 1989.
- Karayorgou M et al. *PNAS* 92: 7612-7616, 1995.
- Karayorgou M., Altemus M., Galke B.L., Goldman D., Murphy D.L., Ott Jurg., and Gogos J.A. Genotype determining low catechol-O-methyltransferase activity as a risk factor for obsessive-compulsive disorder. *PNAS* 94, 4572-4575, 1997.
- Lachman HM et al. *Pharmacogenetics* 6: 243-250, 1996.
- Lahiri DK and Nurnberger JI. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *NAR* 19: 5444, 1991
- McDougle CJ et al. *Archives of General Psychiatry* 51:302-308, 1994.
- Terwilliger J.D., Ott J. (1992). A haplotype based "haplotype-relative risk" approach to detecting allelic associations. *Hum Hered* 42: 337-346.

**8.8 Anexo I: Camarena et al. 2005 – Poster na íntegra
apresentado no XIII Congresso Mundial em Psiquiatria
Genética e publicado como resumo na revista *American
Journal of Medical Genetics.***



FAMILY BASED ASSOCIATION STUDY BETWEEN COMT GENE AND OBSESSIVE COMPULSIVE DISORDER.

Beatriz Camarena¹, Alejandro Aguilar¹, Cristina Loyzaga¹, and Humberto Nicolini².

¹Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente, México, D.F., México; and ²Mexico City Autonomous University, México, D.F., México.

INTRODUCTION

Family and twin studies suggest a genetic component in the etiology of obsessive compulsive disorder (OCD). Serotonin neural dysfunction has been suggested by pharmacological data, showing the efficacy of selective serotonin reuptake inhibitors in the treatment of this disorder. Also, pharmacological data shows in resistant OCD patients that the addition of a dopaminergic antagonist seems to be effective. In addition, evidence obtained from neuroanatomical studies and animal models confirm this hypothesis. Therefore, it has been proposed a dysregulation of the dopaminergic neurotransmission as well in OCD.

It has been reported that patients with 22q11 microdeletions manifest OC symptoms, thus providing evidence that genes located in this region predisposing to OCD. In this region is located the catechol-O-methyltransferase (COMT) gene. COMT is involved in the inactivation of catecholamines including the neurotransmitter dopamine. It has been reported, a functional polymorphism is associated with a three to four fold variation in COMT enzyme activity. This polymorphism is characterized to a G → A transition at codon 158 of the COMT gene that results in a valine (high activity allele, V158) to methionine (low activity allele, M158) substitution.

A sexually dimorphic effect of COMT gene has been reported in OCD. Therefore, we decided to analyze this polymorphism in a sample of OCD patients using a family-based association method.

MATERIALS AND METHODS

Sample:

93 families: 71 trios (proband, mother and father): 26 Females
45 Males
22 diadas (proband and father or mother): 11 Females
11 Males

Assessments Procedure:

DSM-IV
DIS-Spanish version
YBOCS
HAM-D

Molecular analysis:

Peripheral blood was collected and genomic DNA was extracted by a standard procedure.

Analysis of V158M polymorphism was performed with the conditions suggested by Lachman et al. (1996).

PCR products were resolved on 8% PAGE and visualized by UV after ethidium bromide staining.

Statistical analysis:

FBAT program, version 1.4.1.

Affection traits: OCD diagnosis

Tics
Inheritance model: additive

Quantitative analysis: Mean centered variable of the YBOC obsession, compulsion and total scores, age of onset, and HAM-D scores (Horvath et al., 2001).

RESULTS

Table 1. FBAT analysis considering OCD diagnosis as the affection trait.

Marker	Allele	Freq. p	Families S	E(S)	Z
V158M	V158 0.496906	0.608	57	62.000 65.000	-0.679
V158M	M158 0.496906	0.392	57	52.000 49.000	0.679

Table 2. FBAT analysis by gender in OCD probands.

Marker	Allele	Freq.	Families S	E(S)	Z
Males					
V158M	V158	0.642	35	36.000 39.500	-1.000 0.317311
V158M	M158	0.358	35	34.000 30.500	1.000 0.317311
Females					
V158M	V158	0.557	22	26.000 25.500	0.186 0.852684
V158M	M158	0.443	22	18.000 18.500	-0.186 0.852684

Table 3b. FBAT quantitative analysis of V158M polymorphism of COMT gene in the OCD probands.

Marker	Allele Z	Freq. p	Families S	E(S)	Z
YBOCS obsessions					
V158M	V158 0.601288	0.608	41	-66.000 -58.500	-0.523
V158M	M158 0.601288	0.392	41	-35.000 -42.500	0.523
YBOCS compulsions					
V158M	V158 0.787260	0.608	41	-54.500 -58.700	0.270
V158M	M158 p 0.787260	0.392	41	-52.400 -47.700	-0.270
Age of onset					
V158M	V158 0.814932	0.608	39	58.000 51.800	0.234
V158M	M158 0.814932	0.392	39	24.600 30.800	-0.234
HAM-D					
V158M	V158 0.374360	0.608	31	24.500 49.000	-0.888
V158M	M158 0.374360	0.392	31	20.000 -5.000	0.888

CONCLUSIONS

1. We did not observe association between COMT gene and OCD.
2. We did not replicate the findings of a sexually dimorphic effect of COMT gene in OCD.
3. FBAT analysis did not find a preferential transmission of the low-activity allele (M158) from the heterozygous parents of male or female probands.
4. FBAT quantitative analysis of presence of tics, YBOCS total, obsession and compulsions scores, age of onset and HAM-D scores did not show a preferential transmission of a particular allele.

8.9 Anexo J – Associação entre COMT e TOC na amostra combinada *OCF MINI Collaborative Genetic Study*

Apresentamos uma descrição breve dos métodos e resultados do estudo não publicado, incluído nesta tese (356)

Desenho do Estudo

Estudo de associação baseado em família entre polimorfismos de troca de única base no gene da COMT e a presença de Transtorno Obsessivo-Compulsivo.

O acordo de colaboração internacional foi proposto em abril de 2006, em um encontro *Obsessive-Compulsive Foundation*, em Amelia Island, EUA. Os centros participantes desta colaboração internacional (Genetics Collaborative Subgroup) são os seguintes grupos de pesquisa:

Universidade de Harvard (EUA): David Pauls, Evelyn Stewart.

Universidade da Califórnia – San Francisco(EUA): Carol Mathews.

Universidades de Michigan e Illinois – Chicago (EUA): Gregory Hanna, Edwin Cook.

Universidade de Toronto (Canadá): Paul Arnold, James Kennedy, Margareth Richter.

Universidade de São Paulo (Brasil): Ana Hounie, Aline S. Sampaio, Maria Conceição do Rosário, Quirino Cordeiro, Euripedes Miguel, Homero Vallada

Este estudo conta com a colaboração do centro da Universidade Federal de Pernambuco, coordenado por Dra. Kátia Petribu, que participa do consórcio nacional para estudos dos transtornos do espectro obsessivo-compulsivo (CTOC).

Participantes

Foram incluídos no estudo 420 probandos diagnosticados com TOC, segundo critérios do DSM-IV, e seus pais biológicos. As famílias foram captadas em clínicas especializadas em TOC nos Estados Unidos (Boston, MA, Michigan, IL and San Francisco, CA), Canadá (Toronto), França (Paris), e Brasil (São Paulo e Recife).

IV.4- Seleção da Amostra

Crítérios de inclusão para probandos

- Diagnóstico de TOC segundo os critérios do DSM-IV
- Ter TOC como principal transtorno psiquiátrico
- Aceitar participar da pesquisa
- Disponibilidade de ambos os pais biológicos para coleta de sangue e entrevista
- Aceitar que seus pais sejam contatados e convidados para o estudo

Crítérios de exclusão para probandos

- Qualquer doença médica que apresente algum potencial para se expressar com manifestações clínicas do TOC (por exemplo, doenças da tireóide, doenças neurológicas incluindo antecedente de traumatismo crânio-encefálico com amnésia pós-traumática e epilepsia)
- Transtorno psiquiátrico de maior gravidade, por exemplo, retardo mental, transtorno bipolar tipo 1, psicoses, transtornos globais do desenvolvimento.

Avaliação Genotípica

Foram coletadas amostras de sangue dos probandos e de seus pais. Cerca de 10ml de sangue venoso periférico foi coletado, por punção venocubital, em tubos com o anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Após a coleta, os tubos serão devidamente armazenados a -4°C até o momento da extração. O

ácido desoxirribonucléico (DNA) genômico foi extraído utilizando-se a técnica de *salting out* (Miller *et al.*, 1988). Após a extração de DNA, a concentração obtida foi mensurada por leitura em espectrofotômetro Gene Quant (Pharmacia Biotech) e normalizada para a concentração de 50ug/ul. A genotipagem foi realizada de forma semelhante, em todos os centros. A vantagem de usar centros diferentes inclui a detecção de erros sistemáticos de genotipagem, além da possibilidade de fazer o estudo com um número amostral grande e da possibilidade de ter representação de diversas etnias. Inicialmente, 1% das amostras foi aleatoriamente analisada para controle de qualidade. A genotipagem foi conduzida com marcadores idênticos em amostras de trios (probandos portadores de TOC e seus pais biológicos), de forma cega para o fenótipo ou relação parental do sujeito. Os polimorfismos analisados foram escolhidos com base em achados prévios da literatura e combinados com SNPs selecionados pelo programa TAGGER, a fim de cobrir a extensão do gene com SNPs representativos de outras regiões que com ele se encontram em ligação.

Os polimorfismos de troca de base única (*single nucleotide polymorphism*: SNP) avaliados estão descritos no anexo 1.

A genotipagem foi realizada na Unidade de Genética Psiquiátrica e do Neurodesenvolvimento (Psychiatric and Neurodevelopmental Genetics Unit - PNGU), Massachusetts General Hospital, Harvard University, EUA. A genotipagem dos SNPs foi realizada em placas de 384 poços, na plataforma *Sequenom MassARRAY platform* (Sequenom, San Diego, California, USA, http://www.sequenom.com/seq_genotyping.html) (234). *Primers* para a amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) e ensaio de

extensão de base única (SBE) foram desenhados usando o programa Assay Design 3.1 software (Sequenom, San Diego, California, USA) baseados nas sequências FASTA em volta dos SNPs selecionados pelo SNPper [Riva and Kohane, 2002]. A genotipagem dos SNPs foi realizada usando múltiplas PCRs seguidos por uma reação pooled de SBE usando iPLEX® Gold SBE chemistry [Sequenom, 2009]. As amostras foram analisadas automaticamente pelo espectrômetro de massa MassARRAY RT. Os espectros resultantes foram analisados pelo programa *SpectroAnalyzer* depois da correção da linha de base e identificação dos picos.

Banco de dados e análises estatísticas

As análises foram realizadas utilizando os programas PLINK e *Haploview* 3.32 (Barrett et al, 2005). O *Haploview* foi utilizado para selecionar os SNPs, baseado em critérios previamente estabelecidos de qualidade, e para a identificação de blocos haplotípicos, para posterior análise estatística.

Polimorfismos com uma taxa de sucesso de genotipagem menor que 75%, Equilíbrio de Hardy-Weinberg p -valor $< 0,001$; Número de Erros mendelianos > 4 ; Frequência mínima de um dos alelos $< 0,01$; foram excluídos das análises. O PLINK foi usado para avaliar se houve desequilíbrio de transmissão de marcadores únicos ou de haplótipos (sequência de alelos de um ou mais loci adjacentes na mesma região cromossômica) calculando o valor de p para SNPs individuais e seus haplótipos associados. O *Haploview* irá definir o desequilíbrio de ligação na região. Usando o programa FBAT serão calculados valores de p

haplótipo-específicos e globalmente combinados para os haplótipos selecionados pelo *Haploview*. Valores de p foram corrigidos para múltiplas análises (Bonferroni e teste de Permutações.)

Resultados

Baseado nos critérios de qualidade descritos anteriormente, quatro SNPs não foram incluídos na análise. Todos os indivíduos da amostra foram homocigotos para o polimorfismo rs13306281 (MAF=0). Por este motivo, este polimorfismo não foi analisado. O SNP rs2239393 foi excluído pelo seu baixo sucesso de genotipagem (71%). Os SNPs rs933271 e rs165774 foram excluídos, por apresentarem cinco ou mais erros mendelianos na amostra.

Os resultados das análises dos polimorfismos restantes estão descritos na tabela 1.

O SNP número 1, rs737866, foi significativamente associado com TOC pelo teste de desequilíbrio de transmissão ($p=0,013$) bem como no teste de desequilíbrio de transmissão combinado ao teste de discordância parental ($p=0,005$). O menor alelo deste SNP tem uma frequência de 30,7%, com os alelos maior e menor sendo T e C, respectivamente. O alelo T foi preferencialmente transmitido em 180 trios informativos. Após a correção de Bonferroni, o p-valor combinado continuou significativo (0,035), mas o p-valor para o teste de desequilíbrio de ligação obteve apenas uma tendência à significância (0,091). O p-valor obtido pelo teste combinado também manteve significância após análise de 681 permutações (0,027).

Tabela 1: Associação entre polimorfismos do catecol O-metiltransferase e o transtorno obsessivo-compulsivo

SNP	T	N	OR	CHI	P	A:N_ PAR	CHI _PAR	P_ _PAR	CHI _COM	P_ COM
rs737866	136	180	0.756	6.127	0.013	6:14	2.286	0.131	7.86	0.005
rs1544325	181	168	1.087	0.484	0.487	13:10	0.290	0.590	0.674	0.412
rs5993883	192	165	1.164	2.042	0.153	16:08	1.882	0.170	3.133	0.077

rs740603	194	200	0.97	0.091	0.762	21:10	2.574	0.109	0.057	0.812
rs4680	184	178	1.034	0.099	0.753	7:12	1	0.318	0.003	0.960
rs4646316	126	148	0.851	1.766	0.184	11:09	0.143	0.706	1.325	0.250
rs9332377	95	108	0.880	0.833	0.362	5:08	0.6	0.439	1.174	0.279

Legenda: SNP: *polimorfismo de troca de nucleotídeo único*; N: não-transmitido; OR: razão de chances do TDT, QUI: valor do Qui-quadrado no TDT, P: p-valor no TDT
 A:N : razão entre pai Afetado: Não-afetado, QUI_PAR: Valor do Qui-quadrado para o teste de discordância parental, P_PAR: P-valor do teste de discordância parental, QUI_COMB: Valor do Qui-quadrado do teste combinado, P_COMB: P-valor do teste combinado

Haplótipos

Um bloco haplotípico contendo os marcadores #1/#2/#3: rs737866/rs1544325/rs5993883 foi delimitado (Figura 1). Neste haplótipo, os alelos C/G/G foram significativamente associados com o TOC ($p=0.015$; Tabela 2). Esta associação continuou significativa após 100,000 permutações ($p\text{-valor}=0.04$)

Figura 1: Bloco haplotípico dos polimorfismos avaliados no catecol O-metiltransferase

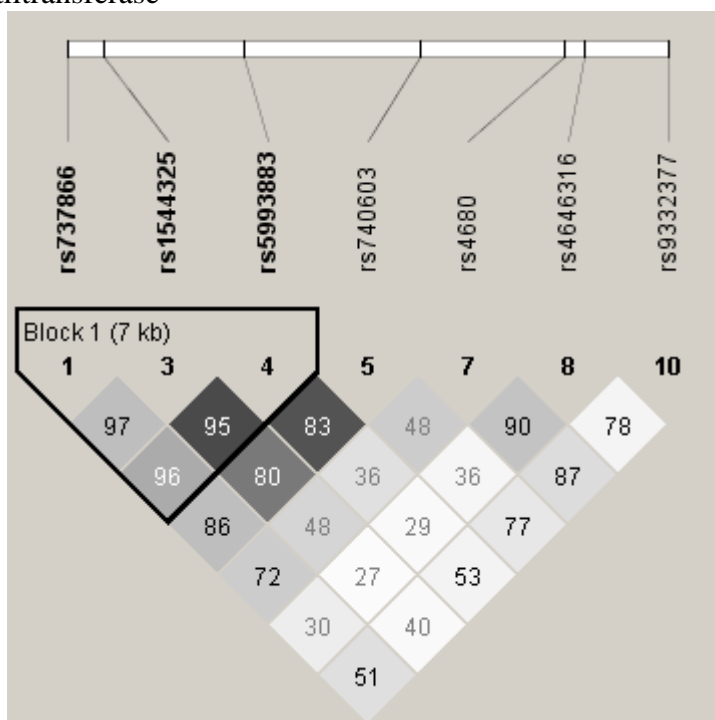


Tabela 2: Associação entre haplótipos formados pelos polimorfismos estudados na catecol O-metiltransferase e o TOC

	Haplótipo	T:U	Qui ²	P
Bloco				
	TAT	0.368 185.9 : 166.9	1.03	0.310
	CGG	0.298 136.4 : 179.6	5.905	0.015
	TGG	0.249 162.9 : 139.8	1.764	0.184
	TGT	0.07 56.9 : 54.1	0.068	0.794

Legenda:T:U: Transmitted:Untransmitted

Os SNPs #1: rs737866 (p=0,01), #3: rs5993883 (p=0,009) e #4: rs740603(p= 0,03) foram associados com TOC quando considerados apenas os trios com probandos do sexo feminino (Tabela 3). Não foi encontrada associação quando as análises dos sete SNPs foram realizadas apenas com trios com probandos do sexo masculino (Tabela 4).

Tabela 3: Associação entre polimorfismos do catecol O-metiltransferase e o transtorno obsessivo-compulsivo em mulheres

SNP	T	U	OR	CHISQ	P	A:U_PAR	CHISQ_PAR	P_PAR	CHISQ_COM	P_COM
rs737866	48	74	0.6486	5.541	0.01858	3:05	0.4	0.5271	5.939	0.01481
rs1544325	70	53	1.321	2.35	0.1253	8:04	1	0.3173	3.173	0.07488
rs5993883	79	54	1.463	4.699	0.03018	10:03	2.579	0.1083	6.737	0.009444
rs740603	79	61	1.295	2.314	0.1282	13:03	4.167	0.04123	4.78	0.02878
rs4680	75	58	1.293	2.173	0.1405	3:05	0.4	0.5271	1.573	0.2097
rs4646316	50	56	0.8929	0.3396	0.56	5:05	0	1	0.3	0.5839
rs9332377	36	46	0.7826	1.22	0.2695	4:03	0.1111	0.7389	0.8901	0.3454

Legenda: SNP: polimorfismo de troca de base única; N: não-transmitido; OR: razão de chances do TDT, QUI: valor do Qui-quadrado no TDT, P: p-valor no TDT; A:N : razão entre pai Afetado: Não-afetado, QUI_PAR: Valor do Qui-quadrado para o teste de discordância parental, P_PAR: P-valor do teste de discordância parental, QUI_COMB: Valor do Qui-quadrado do teste combinado, P_COMB: P-valor do teste combinado

Tabela 4: Associação entre polimorfismos do COMT e TOC em homens

SNP	T	U	OR	CHISQ	P	A:U_PAR	CHISQ_PAR	P_PAR	CHISQ_COM	P_COM
rs737866	86	104	0.8269	1.705	0.1916	4:08	0.8889	0.3458	2.327	0.1272
rs1544325	108	111	0.973	0.0411	0.8394	5:05	0	1	0.03863	0.8442
rs5993883	111	107	1.037	0.07339	0.7865	6:05	0.06667	0.7963	0.1073	0.7432
rs740603	114	134	0.8507	1.613	0.2041	8:07	0.04348	0.8348	1.332	0.2484
rs4680	107	112	0.9554	0.1142	0.7355	4:08	1	0.3173	0.3447	0.5571
rs4646316	75	92	0.8152	1.731	0.1883	8:04	0.8889	0.3458	0.9135	0.3392

rs9332377	56	61	0.918	0.2137	0.6439	1:05	2.667	0.1025	0.6585	0.4171
-----------	----	----	-------	--------	--------	------	-------	--------	--------	--------

SNP: *Single Nucleotide Polymorphism* { *polimorfismo de nucleotídeo único*};; N: não-transmitido; OR: *Odds Ratio*[razão de chances] do TDT, QUI: valor do Qui-quadrado no TDT, P: p-valor no TDT; A:N : razão entre pai Afetado: Não-afetado, QUI_PAR: Valor do Qui-quadrado para o teste de discordância parental, P_PAR: P-valor do teste de discordância parental, QUI_COMB: Valor do Qui-quadrado do teste combinado, P_COMB: P-valor do teste combinado

9. REFERÊNCIAS

1. Torres AR, Prince MJ, Bebbington PE, Bhugra D, Brugha TS, Farrell M, et al. Obsessive-compulsive disorder: prevalence, comorbidity, impact, and help-seeking in the British National Psychiatric Morbidity Survey of 2000. *Am J Psychiatry*. 2006 Nov;163(11):1978-85.
2. American-Psychiatric-Association, editor. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. 4th edition, Text Revision ed. Washington D.C.: American Psychiatric Press; 2000.
3. Matsunaga H, Seedat S. Obsessive-compulsive spectrum disorders: cross-national and ethnic issues. *CNS Spectr*. 2007 May;12(5):392-400.
4. Hoexter MQ. Neuroimagem estrutural e molecular do transportador dopaminérgico em pacientes com transtorno obsessivo-compulsivo: um ensaio clínico randomizado entre fluoxetina e terapia cognitivo-comportamental. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina.; 2010.
5. Saxena S, Rauch SL. Functional neuroimaging and the neuroanatomy of obsessive-compulsive disorder. *Psychiatr Clin North Am*. 2000 Sep;23(3):563-86.
6. Rauch SL, Jenike MA, Alpert NM, Baer L, Breiter HC, Savage CR, et al. Regional cerebral blood flow measured during symptom provocation in obsessive-compulsive disorder using oxygen 15-labeled carbon dioxide and positron emission tomography. *Arch Gen Psychiatry*. 1994 Jan;51(1):62-70.
7. Rauch SL. Neuroimaging and neurocircuitry models pertaining to the neurosurgical treatment of psychiatric disorders. *Neurosurg Clin N Am*. 2003 Apr;14(2):213-23, vii-viii.
8. Menzies L, Chamberlain SR, Laird AR, Thelen SM, Sahakian BJ, Bullmore ET. Integrating evidence from neuroimaging and neuropsychological studies of obsessive-compulsive disorder: the orbitofronto-striatal model revisited. *Neurosci Biobehav Rev*. 2008;32(3):525-49.
9. Stein D. The neurobiology of obsessive-compulsive disorder. *Neuroscientist*. 1996;51 suppl:36-43; discussion 55-8.
10. Carlsson ML. On the role of cortical glutamate in obsessive-compulsive disorder and attention-deficit hyperactivity disorder, two phenomenologically antithetical conditions. *Acta Psychiatr Scand*. 2000 Dec;102(6):401-13.
11. Yucel M, Wood SJ, Wellard RM, Harrison BJ, Fornito A, Pujol J, et al. Anterior cingulate glutamate-glutamine levels predict symptom severity in women with obsessive-compulsive disorder. *Aust N Z J Psychiatry*. 2008 Jun;42(6):467-77.
12. Rosenberg DR, Mirza Y, Russell A, Tang J, Smith JM, Banerjee SP, et al. Reduced anterior cingulate glutamatergic concentrations in childhood OCD and major depression versus healthy controls. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2004 Sep;43(9):1146-53.
13. Goodman WK, McDougle CJ, Price LH, Riddle MA, Pauls DL, Leckman JF. Beyond the serotonin hypothesis: a role for dopamine in some forms of obsessive compulsive disorder? *J Clin Psychiatry*. 1990 Aug;51 Suppl:36-43; discussion 55-8.
14. Denys D, Zohar J, Westenberg HG. The role of dopamine in obsessive-compulsive disorder: preclinical and clinical evidence. *J Clin Psychiatry*. 2004;65 Suppl 14:11-7.
15. Tizabi Y, Louis VA, Taylor CT, Waxman D, Culver KE, Szechtman H. Effect of nicotine on quinpirole-induced checking behavior in rats: implications for obsessive-compulsive disorder. *Biol Psychiatry*. 2002 Jan 15;51(2):164-71.
16. Diniz JB, Shavitt RG, Pereira CA, Hounie AG, Pimentel I, Koran LM, et al. Quetiapine versus clomipramine in the augmentation of selective serotonin reuptake

- inhibitors for the treatment of obsessive-compulsive disorder: a randomized, open-label trial. *J Psychopharmacol*. 2009 Mar;24(3):297-307.
17. Carmin CN, Wiegartz PS, Yunus U, Gillock KL. Treatment of late-onset OCD following basal ganglia infarct. *Depress Anxiety*. 2002;15(2):87-90.
 18. Rushing EJ, Sandberg GD, Judkins AR, Vezina G, Kadom N, Myseros JS, et al. Germinoma: unusual imaging and pathological characteristics. Report of two cases. *J Neurosurg*. 2006 Feb;104(2 Suppl):143-8.
 19. Pallanti S, Hollander E. Obsessive-compulsive disorder spectrum as a scientific "metaphor". *CNS Spectr*. 2008 Sep;13(9 Suppl 14):6-15.
 20. Di Giovanni G, Di Matteo V, Di Mascio M. Preferential modulation of mesolimbic vs. nigrostriatal dopaminergic function by serotonin(2C/2B) receptor agonists: a combined in vivo electrophysiological and microdialysis study. *Synapse*. 2000;35(1):53-61.
 21. Dewey SL, Smith GS, Logan J, Alexoff D, Ding YS, King P, et al. Serotonergic modulation of striatal dopamine measured with positron emission tomography (PET) and in vivo microdialysis. *J Neurosci*. 1995 Jan;15(1 Pt 2):821-9.
 22. Alexander GE, Crutcher MD. Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci*. 1990 Jul;13(7):266-71.
 23. Ferre S, Ciruela F, Canals M, Marcellino D, Burgueno J, Casado V, et al. Adenosine A2A-dopamine D2 receptor-receptor heteromers. Targets for neuro-psychiatric disorders. *Parkinsonism Relat Disord*. 2004 Jul;10(5):265-71.
 24. Garris PA, Wightman RM. Different kinetics govern dopaminergic transmission in the amygdala, prefrontal cortex, and striatum: an in vivo voltammetric study. *J Neurosci*. 1994 Jan;14(1):442-50.
 25. Karoum F, Egan MF, Wyatt RJ. Selective reduction in dopamine turnover in the rat frontal cortex and hypothalamus during withdrawal from repeated cocaine exposure. *Eur J Pharmacol*. 1994 Mar 11;254(1-2):127-32.
 26. Freud S. O Homem dos Ratos. Coleção Obras Completas de Freud: Imago; 1909.
 27. Pitman RK. Pierre Janet on obsessive-compulsive disorder (1903). Review and commentary. *Arch Gen Psychiatry*. 1987 Mar;44(3):226-32.
 28. Pauls DL, Alsobrook JP, 2nd, Goodman W, Rasmussen S, Leckman JF. A family study of obsessive-compulsive disorder. *Am J Psychiatry*. 1995 Jan;152(1):76-84.
 29. Nestadt G, Samuels J, Riddle M, Bienvenu OJ, 3rd, Liang KY, LaBuda M, et al. A family study of obsessive-compulsive disorder. *Arch Gen Psychiatry*. 2000 Apr;57(4):358-63.
 30. do Rosario-Campos MC, Leckman JF, Curi M, Quatrano S, Katsovitch L, Miguel EC, et al. A family study of early-onset obsessive-compulsive disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2005 Jul 5;136B(1):92-7.
 31. Gonzalez CH. Estudo de famílias no transtorno obsessivo-compulsivo. . São Paulo: Escola Paulista de Medicina. Universidade Federal de São Paulo; 2003.
 32. Hettema JM, Neale MC, Kendler KS. A review and meta-analysis of the genetic epidemiology of anxiety disorders. *Am J Psychiatry*. 2001 Oct;158(10):1568-78.
 33. Rasmussen SA, Tsuang MT. The epidemiology of obsessive compulsive disorder. *J Clin Psychiatry*. 1984 Nov;45(11):450-7.
 34. Carey G, LL G. Twin and family studies of anxiety, phobic and obsessive disorders. In: Klien DF, Rabkin J, editors. *Anxiety: New research and changing concepts* New York: Raven Press; 1981. p. 117-36.
 35. Faraone SV, Tsuang MT, Tsuang DW. *Genetics of mental disorders: a guide for students, clinicians, and researchers*. New York, NY: The Guilford Press; 1999.
 36. Nicolini H, Hanna G, Jr LB, al. e. Segregation analysis of obsessive compulsive and associated disorders: preliminary results. . *Ursus Medicus*. 1991;1:25-8.
 37. Hanna GL, Himle JA, Curtis GC, Gillespie BW. A family study of obsessive-compulsive disorder with pediatric probands. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2005 Apr 5;134B(1):13-9.

38. Pato MT, Pato CN, Pauls DL. Recent findings in the genetics of OCD. *J Clin Psychiatry*. 2002;63 Suppl 6:30-3.
39. Sampaio AS, Lins RMP, Daltro-Oliveira R, Quarantini LdC, Hounie AG, Miguel EC. Systematic Review of Genetic Association Studies in Obsessive-Compulsive Disorder. *Revista de Psiquiatria Clínica*. submetido.
40. Cavallini MC, Di Bella D, Siliprandi F, Malchiodi F, Bellodi L. Exploratory factor analysis of obsessive-compulsive patients and association with 5-HTTLPR polymorphism. *Am J Med Genet*. 2002 Apr;114(3):347-53.
41. Meira-Lima I, Shavitt RG, Miguita K, Ikenaga E, Miguel EC, Vallada H. Association analysis of the catechol-o-methyltransferase (COMT), serotonin transporter (5-HTT) and serotonin 2A receptor (5HT2A) gene polymorphisms with obsessive-compulsive disorder. *Genes Brain and Behavior*. [Article]. 2004 April;3(2):75-9.
42. Chabane N, Millet B, Delorme R, Lichtermann D, Mathieu F, Laplanche JL, et al. Lack of evidence for association between serotonin transporter gene (5-HTTLPR) and obsessive-compulsive disorder by case control and family association study in humans. *Neurosci Lett*. 2004 Jun 10;363(2):154-6.
43. Camarena B, Rinetti G, Cruz C, Hernández S, Ramón de la Fuente J, Nicolini H. Association study of the serotonin transporter gene polymorphism in obsessive-compulsive disorder. *International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2001;4(3):269-72.
44. Walitza S, Wewetzer C, Gerlach M, Klampfl K, Geller F, Barth N, et al. Transmission disequilibrium studies in children and adolescents with obsessive-compulsive disorders pertaining to polymorphisms of genes of the serotonergic pathway. *Journal of Neural Transmission*. 2004;111(7):817-25.
45. Tibrewal P, Kumar HB, Shubha GN, Subhashree D, Purushottam M, Thennarasu K, et al. Association of serotonin transporter gene polymorphisms with obsessive-compulsive disorder (OCD) in a south Indian population. *Indian J Med Res*. 2010 Dec;132(6):690-5.
46. Jung HRC, J.Y. Chung, J.Y. Kim, J.R. Yu, K.S. Jang, I.J. Shin, S.G. , Lee KJY, S.Y. Kim, E. Kwon, J.S. No associations between 5-HTT, 5-HT2A gene polymorphisms and obsessive-compulsive disorder in a Korean population. *Psychiatry Investigation* 2006;3:1:78-86.
47. Dickel DE, Veenstra-VanderWeele J, Bivens NC, Wu X, Fischer DJ, Van Etten-Lee M, et al. Association studies of serotonin system candidate genes in early-onset obsessive-compulsive disorder. *Biol Psychiatry*. 2007 Feb 1;61(3):322-9.
48. Wendland JR, Kruse MR, Cromer KR, Murphy DL. A large case-control study of common functional SLC6A4 and BDNF variants in obsessive-compulsive disorder. *Neuropsychopharmacology*. 2007 Dec;32(12):2543-51.
49. Baca-Garcia E, Vaquero-Lorenzo C, Diaz-Hernandez M, Rodriguez-Salgado B, Dolengevich-Segal H, Arrojo-Romero M, et al. Association between obsessive-compulsive disorder and a variable number of tandem repeats polymorphism in intron 2 of the serotonin transporter gene. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. 2007 Mar;31(2):416-20.
50. Saiz PA, Garcia-Portilla MP, Arango C, Morales B, Bascaran MT, Martinez-Barrondo S, et al. Association study between obsessive-compulsive disorder and serotonergic candidate genes. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. 2008 Apr;32(3):765-70.
51. Liu SG, Zhang XH, Yin YY, Wang MJ, Che FY, Ma X. An association analysis between 5-HTTLPR polymorphism and obsessive-compulsive disorder, Tourette syndrome in a Chinese Han population. *CNS Neurosci Ther*. 2011 Dec;17(6):793-5.
52. Kim SJ, Lee HS, Kim CH. Obsessive-compulsive disorder, factor-analyzed symptom dimensions and serotonin transporter polymorphism. *Neuropsychobiology*. 2005;52(4):176-82.

53. Voyiaziakis E, Evgrafov O, Li D, Yoon HJ, Tabares P, Samuels J, et al. Association of SLC6A4 variants with obsessive-compulsive disorder in a large multicenter US family study. *Mol Psychiatry*. 2009 Oct 6.
54. Mossner R, Walitza S, Geller F, Scherag A, Gutknecht L, Jacob C, et al. Transmission disequilibrium of polymorphic variants in the tryptophan hydroxylase-2 gene in children and adolescents with obsessive-compulsive disorder. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2006 Aug;9(4):437-42.
55. Szechtman H, Sulis W, Eilam D. Quinpirole induces compulsive checking behavior in rats: a potential animal model of obsessive-compulsive disorder (OCD). *Behav Neurosci*. 1998 Dec;112(6):1475-85.
56. Lykouras L, Alevizos B, Michalopoulou P, Rabavilas A. Obsessive-compulsive symptoms induced by atypical antipsychotics. A review of the reported cases. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2003 May;27(3):333-46.
57. MacCabe JH, Travis M. Clozapine-induced obsessive-compulsive symptoms. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2004 Nov;28(7):1209; author reply 11.
58. Billett EA, Richter MA, Sam F, Swinson RP, Dai XY, King N, et al. Investigation of dopamine system genes in obsessive-compulsive disorder. *Psychiatric Genetics*. 1998 Feb;8(3):163-9.
59. Hemmings SM, Kinnear CJ, Niehaus DJH, Moolman-Smook JC, Lochner C, Knowles JA, et al. Investigating the role of dopaminergic and serotonergic candidate genes in obsessive-compulsive disorder. *European Neuropsychopharmacology*. 2003 Mar;13(2):93-8.
60. Frisch A, Michaelovsky E, Rockah R, Amir I, Hermesh H, Laor N, et al. Association between obsessive-compulsive disorder and polymorphisms of genes encoding components of the serotonergic and dopaminergic pathways. *European Neuropsychopharmacology*. 2000 May;10(3):205-9.
61. Millet B, Chabane N, Delorme R, Leboyer M, Leroy S, Poirier MF, et al. Association between the dopamine receptor D4 (DRD4) gene and obsessive-compulsive disorder. *Am J Med Genet B*. 2003 Jan;116B(1):55-9.
62. Hemmings SaMJ, Kinnear CJ, Lochner C, Niehaus DJH, Knowles JA, Moolman-Smook JC, et al. Early- versus late-onset obsessive-compulsive disorder: Investigating genetic and clinical correlates. *Psychiatry Research*. 2004;128(2):175-82.
63. Kim S, Yoo S, Nam Y, Kim C. Association between Obsessive-Compulsive Disorder and Dopamine Receptor D4 Gene. *Korean J Psychopharmacol*. 2005;16(6):513-20.
64. Cruz C, Camarena B, King N, Paez F, Sidenberg D, de la Fuente JR, et al. Increased prevalence of the seven-repeat variant of the dopamine D4 receptor gene in patients with obsessive-compulsive disorder with tics. *Neurosci Lett*. 1997 Aug 1;231(1):1-4.
65. Nicolini H, Cruz C, Paez F, Camarena B. [Dopamine D2 and D4 receptor genes distinguish the clinical presence of tics in obsessive-compulsive disorder]. *Gac Med Mex*. 1998 Sep-Oct;134(5):521-7.
66. Nicolini H, Cruz C, Camarena B, Orozco B, Kennedy JL, King N, et al. DRD2, DRD3 and 5HT2A receptor genes polymorphisms in Obsessive-Compulsive Disorder. *Molecular Psychiatry*. 1996 Dec;1(6):461-5.
67. Denys D, Van Nieuwerburgh F, Deforce D, Westenberg H. Association between the dopamine D2 receptor TaqI A2 allele and low activity COMT allele with obsessive-compulsive disorder in males. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2006 Aug;16(6):446-50.
68. Catalano M, Sciuto G, Di Bella D, Novelli E, Nobile M, Bellodi L. Lack of association between obsessive-compulsive disorder and the dopamine D3 receptor gene: some preliminary considerations. *Am J Med Genet*. 1994 Sep 15;54(3):253-5.
69. Camarena B, Loyzaga C, Aguilar A, Weissbecker K, Nicolini H. Association study between the dopamine receptor D(4) gene and obsessive-compulsive disorder. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2007 May-Jun;17(6-7):406-9.

70. Walitza S, Scherag A, Renner TJ, Hinney A, Remschmidt H, Herpertz-Dahlmann B, et al. Transmission disequilibrium studies in early onset of obsessive-compulsive disorder for polymorphisms in genes of the dopaminergic system. *Journal of Neural Transmission*. [Article]. 2008 Jul;115(7):1071-8.
71. Liu W, Zhao N, Xiong J, Shi M, Hu J. Association analysis of serotonin and catecholamine system candidate genes in obsessive-compulsive disorder in the Chinese population. *Psychiatry Research*. 2011;188(1):170-2.
72. Chakrabarty K, Bhattacharyya S, Christopher R, Khanna S. Glutamatergic dysfunction in OCD. *Neuropsychopharmacology*. 2005 Sep;30(9):1735-40.
73. Bhattacharyya S, Chakraborty K. Glutamatergic dysfunction--newer targets for anti-obsessional drugs. *Recent Patents CNS Drug Discov*. 2007 Jan;2(1):47-55.
74. Pittenger C, Krystal JH, Coric V. Glutamate-modulating drugs as novel pharmacotherapeutic agents in the treatment of obsessive-compulsive disorder. *NeuroRx*. 2006 Jan;3(1):69-81.
75. Grant P, Lougee L, Hirschtritt M, Swedo SE. An open-label trial of riluzole, a glutamate antagonist, in children with treatment-resistant obsessive-compulsive disorder. *J Child Adolesc Psychopharmacol*. 2007 Dec;17(6):761-7.
76. Stewart SE, Yu D, Scharf JM, Neale BM, Fagerness JA, Mathews CA, et al. Genome-wide Association Study of Obsessive-Compulsive Disorder. *Molecular Psychiatry*. in press.
77. Welch JM, Lu J, Rodriguiz RM, Trotta NC, Peca J, Ding JD, et al. Cortico-striatal synaptic defects and OCD-like behaviours in Sapap3-mutant mice. *Nature*. 2007 Aug 23;448(7156):894-900.
78. Boardman L, van der Merwe L, Lochner C, Kinnear CJ, Seedat S, Stein DJ, et al. Investigating SAPAP3 variants in the etiology of obsessive-compulsive disorder and trichotillomania in the South African white population. *Compr Psychiatry*. 2011 Mar-Apr;52(2):181-7.
79. Bienvenu OJ, Wang Y, Shugart YY, Welch JM, Grados MA, Fyer AJ, et al. Sapap3 and Pathological Grooming in Humans: Results From the OCD Collaborative Genetics Study. *Am J Med Genet B*. 2009 Jul;150B(5):710-20.
80. Zuchner S, Wendland JR, Ashley-Koch AE, Collins AL, Tran-Viet KN, Quinn K, et al. Multiple rare SAPAP3 missense variants in trichotillomania and OCD. *Mol Psychiatry*. 2009 Jan;14(1):6-9.
81. Stewart SE, Yu D, Scharf JM, Neale BM, Fagerness JA, Mathews CA, et al. Genome-wide Association Study of Obsessive-Compulsive Disorder. *Molecular Psychiatry*. 2012;Aug 14.
82. Hanna GL, Veenstra-VanderWeele J, Cox NJ, Boehnke M, Himle JA, Curtis GC, et al. Genome-wide linkage analysis of families with obsessive-compulsive disorder ascertained through pediatric probands. *Am J Med Genet*. 2002 Jul 8;114(5):541-52.
83. Willour VL, Shugart YY, Samuels J, Grados M, Cullen B, Bienvenu Iii OJ, et al. Replication study supports evidence for linkage to 9p24 in obsessive-compulsive disorder. *Am J Hum Genet*. 2004;75(3):508-13.
84. Veenstra-VanderWeele J, Kim SJ, Gonen D, Hanna GL, Leventhal BL, Cook EH. Genomic organization of the SLC1A1/EAAC1 gene and mutation screening in early-onset obsessive-compulsive disorder. *Molecular Psychiatry*. 2001 Mar;6(2):160-7.
85. Dickel DE, Veenstra-VanderWeele J, Cox NJ, Wu X, Fischer DJ, Van Etten-Lee M, et al. Association Testing of the Positional and Functional Candidate Gene SLC1A1/EAAC1 in Early-Onset Obsessive-compulsive Disorder. *Arch Gen Psychiatry*. 2006;63(7):778-85.
86. Arnold PD, Sicard T, Burroughs E, Richter MA, Kennedy JL. Glutamate transporter gene SLC1A1 associated with obsessive-compulsive disorder. *Arch Gen Psychiatry*. 2006;63(7):769-76.

87. Stewart SE, Fagerness JA, Platko J, Smoller JW, Scharf JM, Illmann C, et al. Association of the SLC1A1 glutamate transporter gene and obsessive-compulsive disorder. *Am J Med Genet B*. 2007 Dec;144B(8):1027-33.
88. Shugart YY, Wang Y, Samuels JF, Grados MA, Greenberg BD, Knowles JA, et al. A family-based association study of the glutamate transporter gene SLC1A1 in obsessive-compulsive disorder in 378 families. *American Journal of Medical Genetics, Part B: Neuropsychiatric Genetics*. 2009;150(6):886-92.
89. Wendland JR, Moya PR, Timpano KR, Anavitarte AP, Kruse MR, Wheaton MG, et al. A Haplotype Containing Quantitative Trait Loci for SLC1A1 Gene Expression and Its Association With Obsessive-Compulsive Disorder. *Arch Gen Psychiatry*. 2009 Apr;66(4):408-16.
90. Barbon A, Vallini I, Barlati S. Genomic organization of the human GRIK2 gene and evidence for multiple splicing variants. *Gene*. 2001 Aug 22;274(1-2):187-97.
91. Delorme R, Krebs MO, Chabane N, Roy I, Millet B, Mouren-Simeoni MC, et al. Frequency and transmission of glutamate receptors GRIK2 and GRIK3 polymorphisms in patients with obsessive compulsive disorder. *Neuroreport*. 2004 Mar 22;15(4):699-702.
92. Sampaio AS, Fagerness J, Crane J, Leboyer M, Delorme R, Pauls DL, et al. Association Between Polymorphisms in GRIK2 Gene and Obsessive-Compulsive Disorder: A Family-Based Study. *Cns Neuroscience & Therapeutics*. 2011;17(3):141-7.
93. Alvarenga PG, Flores AC, Hounie AG, Petribu K, Franca MF. Obsessive-compulsive symptoms in non-active rheumatic fever. *Rev Bras Psiquiatr*. 2006 Jun;28(2):161.
94. Alvarenga PG, Hounie AG, Flores AC, Petribu K, Miguel EC. Obsessive-compulsive symptoms in adults with rheumatic fever. *Acta Psychiatr Scand*. 2006 Jul;114(1):67; author reply -8.
95. Alvarenga PG, Hounie AG, Mercadante MT, Diniz JB, Salem M, Spina G, et al. Obsessive-compulsive symptoms in heart disease patients with and without history of rheumatic fever. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 2006 Summer;18(3):405-8.
96. Swedo SE, Leonard HL, Rapoport JL. The pediatric autoimmune neuropsychiatric disorders associated with streptococcal infection (PANDAS) subgroup: separating fact from fiction. *Pediatrics*. 2004 Apr;113(4):907-11.
97. Swedo SE. Pediatric autoimmune neuropsychiatric disorders associated with streptococcal infections (PANDAS). *Mol Psychiatry*. 2002;7 Suppl 2:S24-5.
98. Hounie AG, Pauls DL, do Rosario-Campos MC, Mercadante MT, Diniz JB, De Mathis MA, et al. Obsessive-compulsive spectrum disorders and rheumatic fever: a family study. *Biol Psychiatry*. 2007 Feb 1;61(3):266-72.
99. Ramasawmy R, Fae KC, Spina G, Victora GD, Tanaka AC, Palacios SA, et al. Association of polymorphisms within the promoter region of the tumor necrosis factor-alpha with clinical outcomes of rheumatic fever. *Mol Immunol*. 2007 Mar;44(8):1873-8.
100. Hounie AG, Cappi C, Cordeiro Q, Sampaio AS, Moraes I, Rosario MC, et al. TNF-alpha polymorphisms are associated with obsessive-compulsive disorder. *Neurosci Lett*. 2008 Sep 12;442(2):86-90.
101. Cappi C, Mariani D, Aderbal RT, Shavitt RG, Miguel EC, Brentani HP. Identification of genomic copy number variations (CNVs) in obsessive compulsive disorder (OCD). *Biological Psychiatry*. 69(9):57S.
102. Zai G, Arnold PD, Burroughs E, Richter MA, Kennedy JL. Tumor necrosis factor-alpha gene is not associated with obsessive-compulsive disorder. *Psychiatric Genetics*. 2006 Feb;16(1):43-5.
103. Cordeiro Q, Cappi C, Sampaio AS, Palacios SA, Pereira CA, Shavitt RG, et al. Association study between the -62A/T NFKBIL1 polymorphism and obsessive-compulsive disorder. *Rev Bras Psiquiatr*. 2009 Jun;31(2):131-5.

104. Cappi C, Muniz RK, Sampaio AS, Cordeiro Q, Brentani H, Palácios SA, et al. Study of functional polymorphisms in the interleukin 6 gene in obsessive-compulsive disorder comunicação pessoal.
105. Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci.* 2001;24:677-736.
106. Katerberg H, Lochner C, Cath DC, de Jonge P, Bochdanovits Z, Moolman-Smook JC, et al. The Role of the Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) val66met Variant in the Phenotypic Expression of Obsessive-Compulsive Disorder (OCD). *Am J Med Genet B.* 2008 Dec;150B(8):1050-62.
107. Hemmings SMJ, Kinnear CJ, Van Der Merwe L, Lochner C, Corfield VA, Moolman-Smook JC, et al. Investigating the role of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) val66met variant in obsessive-compulsive disorder (OCD). *World Journal of Biological Psychiatry.* 2008;9(2):126-34.
108. Alonso P, Gratacos M, Menchon JM, Saiz-Ruiz J, Segalas C, Baca-Garcia E, et al. Extensive genotyping of the BDNF and NTRK2 genes define protective haplotypes against obsessive-compulsive disorder. *Biological Psychiatry.* 2008 Mar;63(6):619-28.
109. Mossner R, Walitza S, Lesch KP, Geller F, Barth N, Remschmidt H, et al. Brain-derived neurotrophic factor V66M polymorphism in childhood-onset obsessive-compulsive disorder. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2005 Mar;8(1):133-6.
110. Hall D, Dhilla A, Charalambous A, Gogos JA, Karayiorgou M. Sequence variants of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene are strongly associated with obsessive-compulsive disorder. *Am J Hum Genet.* 2003 Aug;73(2):370-6.
111. Zai G, Arnold P, Strauss J, King N, Burroughs E, Richter MA, et al. No association between brain-derived neurotrophic factor gene and obsessive-compulsive disorder. *Psychiatr Genet.* 2005 Dec;15(4):235.
112. Kim SJ, Kim CH. The genetic studies of obsessive-compulsive disorder and its future directions. *Yonsei Medical Journal.* 2006 Aug;47(4):443-54.
113. Sampaio AS, Hounie AG, Petribú K, Cappi C, Morais IA, Quarantini LdC, et al. MAO-A and Obsessive-Compulsive Disorder family-based association study. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* submetido.
114. Karayiorgou M, Sobin C, Blundell ML, Galke BL, Malinova L, Goldberg P, et al. Family-based association studies support a sexually dimorphic effect of COMT and MAOA on genetic susceptibility to obsessive-compulsive disorder. *Biological Psychiatry.* 1999 May;45(9):1178-89.
115. Shield AJ, Thomae BA, Eckloff BW, Wieben ED, Weinshilboum RM. Human catechol O-methyltransferase genetic variation: gene resequencing and functional characterization of variant allozymes. *Molecular Psychiatry.* 2004 Feb;9(2):151-60.
116. Gulberg HC, Marsden CA. Catechol-O-methyl transferase: pharmacological aspects and physiological role. *Pharmacol Rev.* 1975 Jun;27(2):135-206.
117. Kern C, Bernards CM. Ascorbic acid inhibits spinal meningeal catechol-o-methyl transferase in vitro, markedly increasing epinephrine bioavailability. *Anesthesiology.* 1997 Feb;86(2):405-9.
118. Tenhunen J, Salminen M, Jalanko A, Ukkonen S, Ulmanen I. Structure of the rat catechol-O-methyltransferase gene: separate promoters are used to produce mRNAs for soluble and membrane-bound forms of the enzyme. *DNA Cell Biol.* 1993 Apr;12(3):253-63.
119. Vidgren J, Svensson L, Liljas A. Crystal structure of catechol O-methyltransferase.: *Nature.*
120. Zhu BT. Catechol-O-Methyltransferase (COMT)-mediated methylation metabolism of endogenous bioactive catechols and modulation by endobiotics and xenobiotics: importance in pathophysiology and pathogenesis. *Curr Drug Metab.* 2002 Jun;3(3):321-49.
121. Wood PL, Altar CA. Dopamine release in vivo from nigrostriatal, mesolimbic, and mesocortical neurons: utility of 3-methoxytyramine measurements. *Pharmacol Rev.* 1988 Sep;40(3):163-87.

122. Gogos JA, Morgan M, Luine V, Santha M, Ogawa S, Pfaff D, et al. Catechol-O-methyltransferase-deficient mice exhibit sexually dimorphic changes in catecholamine levels and behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. [Article]. 1998 Aug;95(17):9991-6.
123. Klabunde RE. Norepinephrine, Epinephrine and Acetylcholine - Synthesis, Storage, Release and Metabolism. In: Figure, editor.
124. <http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/laa/biola/vk/reenila/review.html>. Simplified scheme of the striatal localization of COMT and MAO with respect to dopamine metabolism. Presynaptic neurons arise from substantia nigra and the postsynaptic neurons are intrastriatal neurons or striatal output neurons. The glial cells presumably contain more S-COMT than MB-COMT whereas in postsynaptic neurons both COMT isoforms are thought to be equally present.
125. Rutherford K, Alphantery E, McMillan A, Daggett V, Parson WW. The V108M mutation decreases the structural stability of catechol O-methyltransferase. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*. 2008 Jul-Aug;1784(7-8):1098-105.
126. Rutherford K, Bennion BJ, Parson WW, Daggett V. The 108M polymorph of human catechol o-methyltransferase is prone to deformation at physiological temperatures. *Biochemistry*. 2006 Feb;45(7):2178-88.
127. NCBI-Entrez-Gene. Sequência de aminoácidos da enzima catecol O-metiltransferase humana: destaque para posição 158, onde ocorre a troca da valina (V) por metionina (M). URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1312>; (Acesso em 06 de dezembro de 2010).
128. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=4680. Distribuição dos alelos e genótipos do polimorfismo rs4680 do gene da Catecol-O-metiltransferase entre os subgrupos populacionais.; Data de acesso: 13 de Fevereiro de 2012 [updated Data de acesso: 13 de Fevereiro de 2012; cited 2012 Fevereiro 13]; Available from.
129. Hemmings SMJ, Stein DJ. The Current Status of Association Studies in Obsessive-Compulsive Disorder. *Psychiatric Clinics of North America*. 2006;29(2):411-44.
130. Delorme R, Betancur C, Chaste P, Kerneis S, Stopin A, Mouren MC, et al. Reduced 3-O-Methyl-Dopa Levels in OCD Patients and Their Unaffected Parents Is Associated With the Low Activity M158 COMT Allele. *American Journal of Medical Genetics Part B-Neuropsychiatric Genetics*. Mar;153B(2):542-8.
131. Chen J, Lipska BK, Halim N, Ma QD, Matsumoto M, Melhem S, et al. Functional analysis of genetic variation in catechol-O-methyltransferase (COMT): effects on mRNA, protein, and enzyme activity in postmortem human brain. *Am J Hum Genet*. 2004 Nov;75(5):807-21.
132. Lachman HM, Papolos DF, Saito T, Yu YM, Szumlanski CL, Weinshilboum RM. Human catechol-O-methyltransferase pharmacogenetics: Description of a functional polymorphism and its potential application to neuropsychiatric disorders. *Pharmacogenetics*. [Article]. 1996 Jun;6(3):243-50.
133. Tenhunen J, Salminen M, Lundstrom K, Kiviluoto T, Savolainen R, Ulmanen I. Genomic organization of the human catechol O-methyltransferase gene and its expression from two distinct promoters. *Eur J Biochem*. 1994 Aug 1;223(3):1049-59.
134. Tunbridge E, Burnet PW, Sodhi MS, Harrison PJ. Catechol-o-methyltransferase (COMT) and proline dehydrogenase (PRODH) mRNAs in the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia, bipolar disorder, and major depression. *Synapse*. 2004 Feb;51(2):112-8.
135. Kaenmaki M, Tammimaki A, Myohanen T, Pakarinen K, Amberg C, Karayiorgou M, et al. Quantitative role of COMT in dopamine clearance in the prefrontal cortex of freely moving mice. *J Neurochem*. Sep;114(6):1745-55.
136. Gogos JA, Morgan M, Luine V, Santha M, Ogawa S, Pfaff D, et al. Catechol-O-methyltransferase-deficient mice exhibit sexually dimorphic changes in catecholamine levels and behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Aug 18;95(17):9991-6.

137. Gothelf D, Michaelovsky E, Frisch A, Zohar AH, Presburger G, Burg M, et al. Association of the low-activity COMT 158Met allele with ADHD and OCD in subjects with velocardiofacial syndrome. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2007 Jun;10(3):301-8.
138. Gothelf D, Aharonovsky O, Horesh N, Carty T, Apter A. Life events and personality factors in children and adolescents with obsessive-compulsive disorder and other anxiety disorders. *Compr Psychiatry*. 2004 May-Jun;45(3):192-8.
139. Britton JC, Rauch SL, Rosso IM, Killgore WD, Price LM, Ragan J, et al. Cognitive inflexibility and frontal-cortical activation in pediatric obsessive-compulsive disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2010 Sep;49(9):944-53.
140. Gu BM, Park JY, Kang DH, Lee SJ, Yoo SY, Jo HJ, et al. Neural correlates of cognitive inflexibility during task-switching in obsessive-compulsive disorder. *Brain*. 2008 Jan;131(Pt 1):155-64.
141. Drabant EM, Hariri AR, Meyer-Lindenberg A, Munoz KE, Mattay VS, Kolachana BS, et al. Catechol O-methyltransferase val158met genotype and neural mechanisms related to affective arousal and regulation. *Arch Gen Psychiatry*. 2006 Dec;63(12):1396-406.
142. Nolan KA, Bilder RM, Lachman HM, Volavka J. Catechol O-methyltransferase Val158Met polymorphism in schizophrenia: differential effects of Val and Met alleles on cognitive stability and flexibility. *Am J Psychiatry*. 2004 Feb;161(2):359-61.
143. Han DH, Kee BS, Min KJ, Lee YS, Na C, Park DB, et al. Effects of catechol-O-methyltransferase Val158Met polymorphism on the cognitive stability and aggression in the first-onset schizophrenic patients. *Neuroreport*. 2006 Jan 23;17(1):95-9.
144. Borkowska A, Rybakowski JK. Neuropsychological frontal lobe tests indicate that bipolar depressed patients are more impaired than unipolar. *Bipolar Disord*. 2001 Apr;3(2):88-94.
145. Versace M, Zorzi M. The role of dopamine in the maintenance of working memory in prefrontal cortex neurons: input-driven versus internally-driven networks. *Int J Neural Syst*. Aug;20(4):249-65.
146. Wilkosc M, Hauser J, Tomaszewska M, Dmitrzak-Weglarz M, Skibinska M, Szczepankiewicz A, et al. Influence of dopaminergic and serotonergic genes on working memory in healthy subjects. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2010;70(1):86-94.
147. Jaafari N, Frasca M, Rigalleau F, Rachid F, Gil R, Olie JP, et al. Forgetting what you have checked: A link between working memory impairment and checking behaviors in obsessive-compulsive disorder. *Eur Psychiatry*. Sep 15.
148. Nakao T, Nakagawa A, Nakatani E, Nabeyama M, Sanematsu H, Yoshiura T, et al. Working memory dysfunction in obsessive-compulsive disorder: a neuropsychological and functional MRI study. *J Psychiatr Res*. 2009 May;43(8):784-91.
149. Goldberg MP, Ransom BR. New light on white matter. *Stroke*. 2003 Feb;34(2):330-2.
150. Thomason ME, Dougherty RF, Colich NL, Perry LM, Rykhlevskaia EI, Louro HM, et al. COMT genotype affects prefrontal white matter pathways in children and adolescents. *Neuroimage*. Nov 15;53(3):926-34.
151. Diaz-Asper CM, Goldberg TE, Kolachana BS, Straub RE, Egan MF, Weinberger DR. Genetic variation in catechol-O-methyltransferase: effects on working memory in schizophrenic patients, their siblings, and healthy controls. *Biol Psychiatry*. 2008 Jan 1;63(1):72-9.
152. Jenike MA, Breiter HC, Baer L, Kennedy DN, Savage CR, Olivares MJ, et al. Cerebral structural abnormalities in obsessive-compulsive disorder. A quantitative morphometric magnetic resonance imaging study. *Arch Gen Psychiatry*. 1996 Jul;53(7):625-32.
153. Breiter HC, Filipek PA, Kennedy DN, Baer L, Pitcher DA, Olivares MJ, et al. Retrocallosal white matter abnormalities in patients with obsessive-compulsive disorder. *Arch Gen Psychiatry*. 1994 Aug;51(8):663-4.

154. Leckman JF, Kim YS. A primary candidate gene for obsessive-compulsive disorder. *Arch Gen Psychiatry*. 2006 Jul;63(7):717-20.
155. Atmaca M, Onalan E, Yildirim H, Yuce H, Koc M, Korkmaz S. The association of myelin oligodendrocyte glycoprotein gene and white matter volume in obsessive-compulsive disorder. *J Affect Disord*. 2010 Aug;124(3):309-13.
156. Stewart SE, Platko J, Fagerness J, Birns J, Jenike E, Smoller JW, et al. A genetic family-based association study of OLIG2 in obsessive-compulsive disorder. *Arch Gen Psychiatry*. 2007 Feb;64(2):209-15.
157. Jylha P, Melartin T, Isometsa E. Relationships of neuroticism and extraversion with axis I and II comorbidity among patients with DSM-IV major depressive disorder. *J Affect Disord*. 2009 Apr;114(1-3):110-21.
158. Hur YM. Genetic and environmental covariations among obsessive-compulsive symptoms, neuroticism, and extraversion in South Korean adolescent and young adult twins. *Twin Res Hum Genet*. 2009 Apr;12(2):142-8.
159. Enoch MA, Xu K, Ferro E, Harris CR, Goldman D. Genetic origins of anxiety in women: a role for a functional catechol-O-methyltransferase polymorphism. *Psychiatr Genet*. 2003 Mar;13(1):33-41.
160. Stein MB, Fallin MD, Schork NJ, Gelernter J. COMT polymorphisms and anxiety-related personality traits. *Neuropsychopharmacology*. 2005 Nov;30(11):2092-102.
161. O'Sullivan SS, Evans AH, Lees AJ. Dopamine dysregulation syndrome: An overview of its epidemiology, mechanisms and management. *CNS Drugs*. 2009;23(2):157-70.
162. Lee SG, Joo Y, Kim B, Chung S, Kim HL, Lee I, et al. Association of Ala72Ser polymorphism with COMT enzyme activity and the risk of schizophrenia in Koreans. *Hum Genet*. 2005 Mar;116(4):319-28.
163. Palmatier MA, Pakstis AJ, Speed W, Paschou P, Goldman D, Odunsi A, et al. COMT haplotypes suggest P2 promoter region relevance for schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 2004 Sep;9(9):859-70.
164. Shifman S, Bronstein M, Sternfeld M, Pisante-Shalom A, Lev-Lehman E, Weizman A, et al. A highly significant association between a COMT haplotype and schizophrenia. *Am J Hum Genet*. 2002 Dec;71(6):1296-302.
165. Frisch A, Laufer N, Danziger Y, Michaelovsky E, Leor S, Carel C, et al. Association of anorexia nervosa with the high activity allele of the COMT gene: a family-based study in Israeli patients. *Mol Psychiatry*. 2001 Mar;6(2):243-5.
166. Michaelovsky E, Frisch A, Leor S, Stein D, Danziger Y, Carel C, et al. Haplotype analysis of the COMT-ARVCF gene region in Israeli anorexia nervosa family trios. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2005 Nov 5;139B(1):45-50.
167. Sweet RA, Devlin B, Pollock BG, Sukonick DL, Kastango KB, Bacanu SA, et al. Catechol-O-methyltransferase haplotypes are associated with psychosis in Alzheimer disease. *Mol Psychiatry*. 2005 Nov;10(11):1026-36.
168. Lachman HM, Nolan KA, Mohr P, Saito T, Volavka J. Association between catechol O-methyltransferase genotype and violence in schizophrenia and schizoaffective disorder. *Am J Psychiatry*. 1998 Jun;155(6):835-7.
169. Rujescu D, Giegling I, Gietl A, Hartmann AM, Moller HJ. A functional single nucleotide polymorphism (V158M) in the COMT gene is associated with aggressive personality traits. *Biol Psychiatry*. 2003 Jul 1;54(1):34-9.
170. Zubieta JK, Heitzeg MM, Smith YR, Bueller JA, Xu K, Xu Y, et al. COMT val158met genotype affects mu-opioid neurotransmitter responses to a pain stressor. *Science*. 2003 Feb 21;299(5610):1240-3.
171. Vulink NC, Westenbergh HG, Nieuwerburgh FV, Deforce D, Fluitman SB, Meinardi JS, et al. Catechol-O-methyltransferase gene expression is associated with response to citalopram in obsessive-compulsive disorder. *Int J Psychiatry Clin Pract*. 2012 Mar 13.

172. Lochner C, Kinnear CJ, Hemmings SM, Seller C, Niehaus DJ, Knowles JA, et al. Hoarding in obsessive-compulsive disorder: clinical and genetic correlates. *J Clin Psychiatry*. 2005 Sep;66(9):1155-60.
173. Poyurovsky M, Michaelovsky E, Frisch A, Knoll G, Amir I, Finkel B, et al. COMT Val(158) Met polymorphism in schizophrenia with obsessive-compulsive disorder: A case-control study. *Neuroscience Letters*. 2005 Nov;389(1):21-4.
174. Karayiorgou M, Altemus M, Galke BL, Goldman D, Murphy DL, Ott J, et al. Genotype determining low catechol-O-methyltransferase activity as a risk factor for obsessive-compulsive disorder. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997 Apr;94(9):4572-5.
175. Schindler KM, Richter MA, Kennedy JL, Pato MT, Pato CN. Association between homozygosity at the COMT gene locus and obsessive compulsive disorder. *Am J Med Genet*. 2000 Dec;96(6):721-4.
176. Niehaus DJ, Kinnear CJ, Corfield VA, du Toit PL, van Kradenburg J, Moolman-Smook JC, et al. Association between a catechol-o-methyltransferase polymorphism and obsessive-compulsive disorder in the Afrikaner population. *J Affect Disord*. 2001 Jun;65(1):61-5.
177. Alsobrook JP, Zohar AH, Leboyer M, Chabane N, Ebstein RP, Pauls DL. Association between the COMT locus and obsessive-compulsive disorder in females but not males. *Am J Med Genet*. 2002 Jan;114(1):116-20.
178. Ohara K, Nagai M, Suzuki Y, Ochiai M. No association between anxiety disorders and catechol-O- methyltransferase polymorphism. *Psychiatry Research*. 1998;80(2):145-8.
179. Erdal ME, Tot S, Yazici K, Yazici A, Herken H, Erdem P, et al. Lack of association of catechol-O-methyltransferase gene polymorphism in obsessive-compulsive disorder. *Depression and Anxiety*. 2003;18(1):41-5.
180. Katerberg H, Cath D, Denys D, al e, editors. An association study of the COMT Val158Met polymorphism wit factor-analyzed YBOCS symptom category cores: preliminary findings. *Proceedings of the Forth OCF Genetics Collaborative Meeting; 2007 February Amelia Island, FL*.
181. Katerberg H, Cath DC, Denys DAJP, Heutink P, Polman A, Van Nieuwerburgh FCW, et al. The role of the COMT Val158 met polymorphism in the phenotypic expression of obsessive-compulsive disorder. *American Journal of Medical Genetics, Part B: Neuropsychiatric Genetics*. 2010;153(1):167-76.
182. Pooley EC, Fineberg N, Harrison PJ. The met(158) allele of catechol-O-methyltransferase (COMT) is associated with obsessive-compulsive disorder in men: case-control study and meta-analysis. *Mol Psychiatry*. 2007 Jun;12(6):556-61.
183. Sampaio AS, Hounie AG, Cappi C, Quarantini LdC, Teles C, Petribú K, et al. COMT and Obsessive-Compulsive Disorder: new data, HuGE review and meta-analysis. *comunicação pessoal*.
184. Miguel EC, Ferrao YA, do Rosario MC, de Mathis MA, Torres AR, Fontenelle LF, et al. The Brazilian Research Consortium on Obsessive-Compulsive Spectrum Disorders: recruitment, assessment instruments, methods for the development of multicenter collaborative studies and preliminary results. *Rev Bras Psiquiatr*. 2008 Sep;30(3):185-96.
185. First M SR, Gibbon M, Williams J, editor. *Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders, Clinician Version* . . Washington, DC: American Psychiatric Press, Inc; 1996.
186. Kaufman J BB, Brent D, Rao U, Flynn C, Moreci P, Williamson D, Ryan N. . Schedule for affective disorders and schizophrenia for school age children – Present and lifetime version (KSADS-PL): initial reliability and validity data. . *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 1997;36:980-8.
187. Goodman W PL, Rasmussen S, Mazure C, Fleischman R, Hill C, Heninger G, Charney D. . The Yale-Brown Obsessive Compulsive Scale: I. Development use and reliability. *Arch Gen Psychiatry*. 1989;46:1006-11.

188. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988 Feb 11;16(3):1215.
189. Purcell S. PLINK v. 1.06. 1.06 ed. p. Software. URL:<http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/>.
190. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MAR, Bender D, et al. PLINK: a toolset for whole-genome association and population-based linkage analysis. *American Journal of Human Genetics.* 2007;81.
191. Barrett JC FB, Maller J, Daly MJ. . Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. . *Bioinformatics.* 2005;21(2):263-5.
192. Sampaio AS, Stewart SE, Fargeness J, Mathews C, Arnold P, Hannah G, et al. MAO-A and COMT polymorphisms and OCD: A brazilian family-based association study. *Biological Psychiatry.* 2010;67(9):114S-5S.
193. Little J, Higgins J, editors. The HuGENet™ HuGE Review Handbook. : <http://www.hugenet.ca>; (accessed 28 February 2006).
194. Azzam A, Mathews CA. Meta-analysis of the association between the catecholamine-O-methyl-transferase gene and obsessive-compulsive disorder. *American Journal of Medical Genetics Part B-Neuropsychiatric Genetics.* 2003 Nov;123B(1):64-9.
195. Niehaus DJH, Kinnear CJ, Corfield VA, du Toit PL, van Kradenburg J, Moolman-Smook JC, et al. Association between a catechol-o-methyltransferase polymorphism and obsessive-compulsive disorder in the Afrikaner population. *Journal of Affective Disorders.* [Article]. 2001 Jun;65(1):61-5.
196. Ohara K, Nagai M, Suzuki Y, Ochiai M. No association between anxiety disorders and catechol-O-methyltransferase polymorphism. *Psychiatry Research.* 1998 Aug;80(2):145-8.
197. Alsobrook JP, 2nd, Zohar AH, Leboyer M, Chabane N, Ebstein RP, Pauls DL. Association between the COMT locus and obsessive-compulsive disorder in females but not males. *Am J Med Genet.* 2002 Jan 8;114(1):116-20.
198. Karayiorgou M, Sobin C, Blundell ML, Galke BL, Malinova L, Goldberg P, et al. Family-based association studies support a sexually dimorphic effect of COMT and MAOA on genetic susceptibility to obsessive-compulsive disorder. *Biol Psychiatry.* 1999 May 1;45(9):1178-89.
199. Veenstra-VanderWeele J. personal communication. In press
200. Taylor S. Molecular genetics of obsessive-compulsive disorder: a comprehensive meta-analysis of genetic association studies. *Mol Psychiatry.* 2012 Jun 5.
201. Ioannidis JP, Boffetta P, Little J, O'Brien TR, Uitterlinden AG, Vineis P, et al. Assessment of cumulative evidence on genetic associations: interim guidelines. *Int J Epidemiol.* 2008 Feb;37(1):120-32.
202. Little J, Higgins J. The HuGENet™ HuGE Review Handbook. . (accessed 28 February 2006): <http://www.hugenet.ca>; [cited.
203. Laufer M. O que fazer com a literatura cinza? *Interciência.* 2007;32(1).
204. Nicodemus KK. Catmap: case-control and TDT meta-analysis package. *BMC Bioinformatics.* 2008;9:130.
205. Wray NR, James MR, Dumenil T, Handoko HY, Lind PA, Montgomery GW, et al. Association Study of Candidate Variants of COMT With Neuroticism, Anxiety and Depression. *American Journal of Medical Genetics Part B-Neuropsychiatric Genetics.* [Article]. 2008 Oct;147B(7):1314-8.
206. Congdon P. The Basis for, and Advantages of, Bayesian Model Estimation via Repeated Sampling. In: Congdon P, editor. *Applied Bayesian Modelling*; John Wiley & Sons; 2003. p. 1-30.
207. Congdon P. META-ANALYSIS: ESTABLISHING CONSISTENT ASSOCIATIONS. In: Congdon P, editor. *Applied Bayesian Modelling*; Wiley; 2003. p. 429-43.

208. Alsobrook JP, Zohar AH, Leboyer M, Chabane N, Ebstein RP, Pauls DL. COMT is not associated with Obsessive Compulsive Disorder: Family-based vs. population-based designs. *American Journal of Human Genetics*. [Meeting]. 1999 Oct.;65(4):A263.
209. Camarena B, Aguilar A, Loyzaga C, Nicolini H. Family based association study between COMT gene and obsessive compulsive disorder. *American Journal of Medical Genetics*. [Meeting]. 2005 Sep 5;138B(1):46-7.
210. Di Bella D, Cavallini MC, Henin M, Catalano M, Bellodi L. Association between obsessive compulsive disorder and the COMT gene. *American Journal of Medical Genetics*. 1998 Nov;81(6):516-.
211. Hosak L. Role of the COMT gene Va1158Met polymorphism in mental disorders: A review. *Eur Psychiat*. [Review]. 2007 Jul;22(5):276-81.
212. Michaelovsky E, Gothelf D, Korostishevsky M, Frisch A, Burg M, Carmel M, et al. Association between a common haplotype in the COMT gene region and psychiatric disorders in individuals with 22q11.2DS. *International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2008;11(3):351-63.
213. Schindler KM, Richter MA, Kennedy JL, Pato MT, Pato CN. Association between homozygosity at the COMT gene locus and obsessive compulsive disorder. *Am J Med Genet*. 2000 Dec 4;96(6):721-4.
214. Tot S, Erdal ME, Yazici K, Herken H, Yazici A, Bal N. Catechol-O-methyltransferase gene polymorphism in Turkish patients with obsessive-compulsive disorder. *European Neuropsychopharmacology*. [Meeting Abstract]. 2002 Oct;12:S406-S.
215. Waldman ID, Wolff M, Stever C, Ciedinghagen LN, Chase D, Sherman S, et al. Sex differences in association and linkage between COMT and symptoms of OCD and tics in children. *American Journal of Medical Genetics*. [Meeting]. 2000 August 7;96(4):471.
216. Walitza S, Scherag A, Renner TJ, Hinney A, Remschmidt H, Herpertz-Dahlmann B, et al. Transmission disequilibrium studies in early onset of obsessive-compulsive disorder for polymorphisms in genes of the dopaminergic system. *J Neural Transm*. 2008 Jul;115(7):1071-8.
217. Wang Z, Xiao ZP, Inslicht SS, Tong HQ, Jiang WH, Wang X, et al. Low expression of catecholamine-O-methyl-transferase gene in obsessive-compulsive disorder. *Journal of Anxiety Disorders*. 2009 Jun;23(5):660-4.
218. Liu W, Zhao N, Xiong J, Shi M, Hu J. Association analysis of serotonin and catecholamine system candidate genes in obsessive-compulsive disorder in the Chinese population. *Psychiatry Research*.188(1):170-2.
219. OCF-MINI-subgroup, Mathews C, Hanna G, Cook E, Arnold P, Kennedy J, et al. Obsessive-Compulsive Foundation Mini Genetics Collaborative Subgroup OCF-MINI. In.
220. Thakkinstian A, D'Este C, Eisman J, Nguyen T, Attia J. Meta-analysis of molecular association studies: vitamin D receptor gene polymorphisms and BMD as a case study. *J Bone Miner Res*. 2004 Mar;19(3):419-28.
221. Camargo MC, Mera R, Correa P, Peek RM, Jr., Fontham ET, Goodman KJ, et al. Interleukin-1beta and interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms and gastric cancer: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006 Sep;15(9):1674-87.
222. Woolf B. Rapid calculation of standard deviations. *Nature*. 1949 Aug 27;164(4165):360.
223. Begg CB, Mazumdar M. Operating characteristics of a rank correlation test for publication bias. *Biometrics*. 1994 Dec;50(4):1088-101.
224. Egger M, Davey Smith G, Schneider M, Minder C. Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test. *BMJ*. 1997 Sep 13;315(7109):629-34.
225. Steichen T. Test for Publication Bias in Meta-analysis. . *Stata Technical Bulletin*. 1998.
226. Borenstein M, Hedged LV, Higgins JPT, Rothstein HR. Introduction to meta-analysis. Chichester: Wiley; 2009.

227. Schindler KM. Molecular genetic analyses of neurotransmitter systems in psychiatric disorders [Ph.D.]. United States -- New York: State University of New York at Buffalo; 2000.
228. Dickel DE, Veenstra-VanderWeele J, Bivens NC, Wu X, Fischer DJ, Van Etten-Lee M, et al. Association Studies of Serotonin System Candidate Genes in Early-onset Obsessive-Compulsive Disorder. *Biological Psychiatry*. 2007;61(3):322-9.
229. Purcell S CS, Sham PC. . Genetic Power Calculator: design of linkage and association genetic mapping studies of complex traits. . *Bioinformatics*. 2003;19(1):149-50.
230. Liu W, Zhao N, Xiong J, Shi M, Hu J. Association analysis of serotonin and catecholamine system candidate genes in obsessive-compulsive disorder in the Chinese population. *Psychiatry Res*. Jun 30;188(1):170-2.
231. Lahiri DK, Nurnberger JI, Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res*. 1991 Oct 11;19(19):5444.
232. Palmatier MA, Kang AM, Kidd KK. Global variation in the frequencies of functionally different catechol-O-methyltransferase alleles. *Biol Psychiatry*. 1999 Aug 15;46(4):557-67.
233. Lachman HM, Papolos DF, Saito T, Yu Y-M, Sumlanski CL, Weinshilboum RM. Human catechol-O-methyltransferase pharmacogenetics: Description of a functional polymorphism and its potential application to neuropsychiatric disorders. *Pharmacogenetics*. [Article]. 1996 1996;6(3):243-50.
234. Sequenom. Sequenom hME platform. [cited 2005 July]; Available from: http://www.sequenom.com/Assets/pdfs/appnotes/Multiplexing_hME_App_Note.pdf.
235. Terwilliger JD, Ott J. A haplotype-based 'haplotype relative risk' approach to detecting allelic associations. *Hum Hered*. 1992;42(6):337-46.
236. Lao O, Lu T, Nothnagel M, Junge O, Freitag-Wolf S, Caliebe A, et al. Correlation between genetic and geographic structure in Europe. *Current Biology*. 2008;18(16):1241-8.
237. Kaenmaki M, Tammimaki A, Myohanen T, Pakarinen K, Amberg C, Karayiorgou M, et al. Quantitative role of COMT in dopamine clearance in the prefrontal cortex of freely moving mice. *Journal of Neurochemistry*. Sep;114(6):1745-55.
238. Slifstein M, Kolachana B, Simpson EH, Tabares P, Cheng B, Duvall M, et al. COMT genotype predicts cortical-limbic D1 receptor availability measured with [¹¹C]NNC112 and PET. *Mol Psychiatry*. 2008 Aug;13(8):821-7.
239. De Luca V, Tharmalingam S, Muller DJ, Wong G, de Bartolomeis A, Kennedy JL. Gene-gene interaction between MAOA and COMT in suicidal behavior: analysis in schizophrenia. *Brain Res*. 2006 Jun 30;1097(1):26-30.
240. Hansson E, Sellstrom A. MAO COMT, and GABA-T activities in primary astroglial cultures. *J Neurochem*. 1983 Jan;40(1):220-5.
241. Caldu X, Vendrell P, Bartres-Faz D, Clemente I, Bargallo N, Jurado MA, et al. Impact of the COMT Val108/158 Met and DAT genotypes on prefrontal function in healthy subjects. *Neuroimage*. 2007 Oct 1;37(4):1437-44.
242. Biggs CS, Starr MS. Dopamine and glutamate control each other's release in the basal ganglia: a microdialysis study of the entopeduncular nucleus and substantia nigra. *Neurosci Biobehav Rev*. 1997 Jul;21(4):497-504.
243. Carlsson ML. On the role of prefrontal cortex glutamate for the antithetical phenomenology of obsessive compulsive disorder and attention deficit hyperactivity disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2001 Jan;25(1):5-26.
244. Harsanyi A, Csigo K, Demeter G, Nemeth A. New approach to obsessive-compulsive disorder: dopaminergic theories. *Psychiatria Hungarica : A Magyar Pszichiatricai Tarsasag tudományos folyoirata*. 2007;22(4):248-58.
245. Rolls ET, Loh M, Deco G. An attractor hypothesis of obsessive-compulsive disorder. *Eur J Neurosci*. 2008 Aug;28(4):782-93.

246. Henquet C, Rosa A, Delespaul P, Papiol S, Fananas L, van Os J, et al. COMT Val(158)Met moderation of cannabis-induced psychosis: a momentary assessment study of 'switching on' hallucinations in the flow of daily life. *Acta Psychiatr Scand*. 2008 Sep 18.
247. Stefanis NC, Henquet C, Avramopoulos D, Smyrnis N, Evdokimidis I, Myin-Germeys I, et al. COMT Val158Met moderation of stress-induced psychosis. *Psychol Med*. 2007 Nov;37(11):1651-6.
248. Kia-Keating BM, Glatt SJ, Tsuang MT. Meta-analyses suggest association between COMT, but not HTR1B, alleles, and suicidal behavior. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2007 Dec 5;144B(8):1048-53.
249. Li T, Sham PC, Vallada H, Xie T, Tang X, Murray RM, et al. Preferential transmission of the high activity allele of COMT in schizophrenia. *Psychiatr Genet*. 1996 Fall;6(3):131-3.
250. Nicodemus KK, Kolachana BS, Vakkalanka R, Straub RE, Giegling I, Egan MF, et al. 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 Feb;120(6):889-906.
251. Sanders AR, Rusu I, Duan J, Vander Molen JE, Hou C, Schwab SG, et al. Haplotypic association spanning the 22q11.21 genes COMT and ARVCF with schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 2005 Apr;10(4):353-65.
252. Shifman S, Bronstein M, Sternfeld M, Pisante A, Weizman A, Reznik I, et al. COMT: a common susceptibility gene in bipolar disorder and schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2004 Jul 1;128B(1):61-4.
253. Wonodi I, Stine OC, Mitchell BD, Buchanan RW, Thaker GK. Association between Val108/158 Met polymorphism of the COMT gene and schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2003 Jul 1;120B(1):47-50.
254. Abdolmaleky HM, Cheng KH, Faraone SV, Wilcox M, Glatt SJ, Gao F, et al. Hypomethylation of MB-COMT promoter is a major risk factor for schizophrenia and bipolar disorder. *Hum Mol Genet*. 2006 Nov 1;15(21):3132-45.
255. No association between bipolar disorder and alleles at a functional polymorphism in the COMT gene. Biomed European Bipolar Collaborative Group. *Br J Psychiatry*. 1997 Jun;170:526-8.
256. Sery O, Didden W, Mikes V, Pitelova R, Znojil V, Zvolsky P. The association between high-activity COMT allele and alcoholism. *Neuro Endocrinol Lett*. 2006 Feb-Apr;27(1-2):231-5.
257. Tiitonen J, Hallikainen T, Lachman H, Saito T, Volavka J, Kauhanen J, et al. Association between the functional variant of the catechol-O-methyltransferase (COMT) gene and type 1 alcoholism. *Mol Psychiatry*. 1999 May;4(3):286-9.
258. Li T, Chen CK, Hu X, Ball D, Lin SK, Chen W, et al. Association analysis of the DRD4 and COMT genes in methamphetamine abuse. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2004 Aug 15;129B(1):120-4.
259. Shiels MS, Huang HY, Hoffman SC, Shugart YY, Bolton JH, Platz EA, et al. A community-based study of cigarette smoking behavior in relation to variation in three genes involved in dopamine metabolism: Catechol-O-methyltransferase (COMT), dopamine beta-hydroxylase (DBH) and monoamine oxidase-A (MAO-A). *Prev Med*. 2008 Jul;47(1):116-22.
260. Massat I, Souery D, Del-Favero J, Nothen M, Blackwood D, Muir W, et al. Association between COMT (Val158Met) functional polymorphism and early onset in patients with major depressive disorder in a European multicenter genetic association study. *Mol Psychiatry*. 2005 Jun;10(6):598-605.
261. Wray NR, James MR, Dumenil T, Handoko HY, Lind PA, Montgomery GW, et al. Association study of candidate variants of COMT with neuroticism, anxiety and depression. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2008 Oct 5;147B(7):1314-8.

262. Frauscher B, Hogl B, Maret S, Wolf E, Brandauer E, Wenning GK, et al. Association of daytime sleepiness with COMT polymorphism in patients with parkinson disease: a pilot study. *Sleep*. 2004 Jun 15;27(4):733-6.
263. Funke B, Malhotra A, Finn C, Plocik A, Lake S, Lencz T, et al. COMT genetic variation confers risk for psychotic and affective disorders: a case control study. *Behavioral and Brain Functions*. 2005;1(1):19.
264. George SZ, Wallace MR, Wright TW, Moser MW, Greenfield WH, 3rd, Sack BK, et al. Evidence for a biopsychosocial influence on shoulder pain: pain catastrophizing and catechol-O-methyltransferase (COMT) diplotype predict clinical pain ratings. *Pain*. 2008 May;136(1-2):53-61.
265. Goghari VM, Sponheim SR. Differential association of the COMT Val158Met polymorphism with clinical phenotypes in schizophrenia and bipolar disorder. *Schizophr Res*. 2008 Aug;103(1-3):186-91.
266. Hamilton SP, Slager SL, Heiman GA, Deng ZM, Haghghi F, Klein DF, et al., editors. Evidence for a susceptibility locus for panic disorder near the catechol-O-methyltransferase gene on chromosome 22; 2002. Elsevier Science Inc.
267. Karayiorgou M, Gogos JA, Galke BL, Wolynec PS, Nestadt G, Antonarakis SE, et al. Identification of sequence variants and analysis of the role of the catechol-O-methyltransferase gene in schizophrenia susceptibility. *Biological Psychiatry*. 1998 Mar;43(6):425-31.
268. Liu W, Zhao N, Xiong JD, Shi M, Hu J. Association analysis of serotonin and catecholamine system candidate genes in obsessive-compulsive disorder in the Chinese population. *Psychiatry Research*. 2011 Jun;188(1):170-2.
269. Vallada H, Shavitt RG, Meira-Lima IV, Ikenaga E, Miguita K, Belloto C, et al., editors. Lack of association between clomipramine response to obsessive compulsive disorder and allelic variation in the 5-HT2A receptor and COMT gene; 2002. Wiley-Liss.
270. Voyiaziakis E, Evgrafov O, Li D, Yoon HJ, Tabares P, Samuels J, et al. Association of SLC6A4 variants with obsessive-compulsive disorder in a large multicenter US family study. *Molecular Psychiatry*. 2007;16(1):108-20.
271. Enoch MA, Kaye WH, Rotondo A, Greenberg BD, Murphy DL, Goldman D. 5-HT2A promoter polymorphism -1438G/A, anorexia nervosa, and obsessive-compulsive disorder. *Lancet*. 1998 Jun 13;351(9118):1785-6.
272. Enoch MA, Greenberg BD, Murphy DL, Goldman D. Sexually dimorphic relationship of a 5-HT2A promoter polymorphism with obsessive-compulsive disorder. *Biological Psychiatry*. 2001 Feb;49(4):385-8.
273. Boudikova B, Szumlanski C, Maidak B, Weinsilboum R. Human liver catechol-O-methyltransferase pharmacogenetics. *Clin Pharmacol Ther*. 1990 Oct;48(4):381-9.
274. Cohn CK, Axelrod J. The effect of estradiol on catechol-O-methyltransferase activity in rat liver. *Life Sci I*. 1971 Dec 1;10(23):1351-4.
275. Ladosky W, Schneider HT. Changes in hypothalamic catechol-O-methyl-transferase during sexual differentiation of the brain. *Braz J Med Biol Res*. 1981 Dec;14(6):409-13.
276. Kates WR, Antshel KM, Abdulsabur N, Colgan D, Funke B, Fremont W, et al. A gender-moderated effect of a functional COMT polymorphism on prefrontal brain morphology and function in velo-cardio-facial syndrome (22q11.2 deletion syndrome). *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2006 Apr 5;141B(3):274-80.
277. Wang Z, Xiao Z, Inslicht SS, Tong H, Jiang W, Wang X, et al. Low expression of catecholamine-O-methyl-transferase gene in obsessive-compulsive disorder. *J Anxiety Disord*. 2009 Feb 11.
278. Eriksson AL, Suuriniemi M, Mahonen A, Cheng S, Ohlsson C. The COMT val158met polymorphism is associated with early pubertal development, height and cortical bone mass in girls. *Pediatr Res*. 2005 Jul;58(1):71-7.

279. Harrison PJ, Tunbridge EM. Catechol-O-Methyltransferase (COMT): A Gene Contributing to Sex Differences in Brain Function, and to Sexual Dimorphism in the Predisposition to Psychiatric Disorders. *Neuropsychopharmacology*. 2007 Sep 5.
280. O'Hara R, Miller E, Liao CP, Way N, Lin X, Hallmayer J. COMT genotype, gender and cognition in community-dwelling, older adults. *Neurosci Lett*. 2006 Dec 6;409(3):205-9.
281. de Mathis MA, de Alvarenga P, Funaro G, Torresan RC, Moraes I, Torres AR, et al. Gender differences in obsessive-compulsive disorder: a literature review. *Rev Bras Psiquiatr*. 2011 Dec;33(4):390-9.
282. de Mathis MA, Diniz JB, do Rosario MC, Torres AR, Hoexter M, Hasler G, et al. What is the optimal way to subdivide obsessive-compulsive disorder? *CNS Spectr*. 2006 Oct;11(10):762-8, 71-4, 76-9.
283. de Mathis MA, do Rosario MC, Diniz JB, Torres AR, Shavitt RG, Ferrao YA, et al. Obsessive-compulsive disorder: influence of age at onset on comorbidity patterns. *Eur Psychiatry*. 2008 Apr;23(3):187-94.
284. Preston GA, Weinberger DR. Intermediate phenotypes in schizophrenia: a selective review. *Dialogues Clin Neurosci*. 2005;7(2):165-79.
285. Walitza S, Wewetzer C, Warnke A, Gerlach M, Geller F, Gerber G, et al. 5-HT2A promoter polymorphism -1438G/A in children and adolescents with obsessive-compulsive disorders. *Mol Psychiatry*. 2002;7(10):1054-7.
286. Zhang H, Leckman JF, Pauls DL, Tsai CP, Kidd KK, Campos MR. Genomewide scan of hoarding in sib pairs in which both sibs have Gilles de la Tourette syndrome. *Am J Hum Genet*. 2002 Apr;70(4):896-904.
287. Samuels J, Shugart YY, Grados MA, Willour VL, Bienvenu OJ, Greenberg BD, et al. Significant linkage to compulsive hoarding on chromosome 14 in families with obsessive-compulsive disorder: results from the OCD Collaborative Genetics Study. *Am J Psychiatry*. 2007 Mar;164(3):493-9.
288. Mathews CA, Nievergelt CM, Azzam A, Garrido H, Chavira DA, Wessel J, et al. Heritability and clinical features of multigenerational families with obsessive-compulsive disorder and hoarding. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2007 Mar 5;144B(2):174-82.
289. Liang KY, Wang Y, Shugart YY, Grados M, Fyer AJ, Rauch S, et al. Evidence for potential relationship between SLC1A1 and a putative genetic linkage region on chromosome 14q to obsessive-compulsive disorder with compulsive hoarding. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2008 Sep 5;147B(6):1000-2.
290. Katerberg H, Cath D, Denys D, al. e, editors. An association study of the COMT Val158Met polymorphism wit factor-analyzed YBOCS symptom category cores: preliminary findings. . IVth OCF Genetics Collaborative Meeting; 2007; Amelia Island, FL, USA Obsessive Compulsive Foundation.
291. Mataix-Cols D, Wooderson S, Lawrence N, Brammer MJ, Speckens A, Phillips ML. Distinct neural correlates of washing, checking, and hoarding symptom dimensions in obsessive-compulsive disorder. *Arch Gen Psychiatry*. 2004 Jun;61(6):564-76.
292. Mathews CA, Grados MA. Familiality of Tourette syndrome, obsessive-compulsive disorder, and attention-deficit/hyperactivity disorder: heritability analysis in a large sib-pair sample. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. Jan;50(1):46-54.
293. Goodman WK, Storch EA, Geffken GR, Murphy TK. Obsessive-compulsive disorder in Tourette syndrome. *J Child Neurol*. 2006 Aug;21(8):704-14.
294. Kano Y, Ohta M, Nagai Y, Pauls DL, Leckman JF. Obsessive-compulsive symptoms in parents of Tourette syndrome probands and autism spectrum disorder probands. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2004 Aug;58(4):348-52.
295. Hebebrand J, Klug B, Fimmers R, Seuchter SA, Wettke-Schafer R, Deget F, et al. Rates for tic disorders and obsessive compulsive symptomatology in families of children and adolescents with Gilles de la Tourette syndrome. *J Psychiatr Res*. 1997 Sep-Oct;31(5):519-30.

296. Herzberg I, Valencia-Duarte AV, Kay VA, White DJ, Muller H, Rivas IC, et al. Association of DRD2 variants and Gilles de la Tourette syndrome in a family-based sample from a South American population isolate. *Psychiatr Genet*. 2010 Aug;20(4):179-83.
297. Lee CC, Chou IC, Tsai CH, Wang TR, Li TC, Tsai FJ. Dopamine receptor D2 gene polymorphisms are associated in Taiwanese children with Tourette syndrome. *Pediatr Neurol*. 2005 Oct;33(4):272-6.
298. Diaz-Anzaldúa A, Joobor R, Riviere JB, Dion Y, Lesperance P, Richer F, et al. Tourette syndrome and dopaminergic genes: a family-based association study in the French Canadian founder population. *Mol Psychiatry*. 2004 Mar;9(3):272-7.
299. Yoon DY, Rippel CA, Kobets AJ, Morris CM, Lee JE, Williams PN, et al. Dopaminergic polymorphisms in Tourette syndrome: association with the DAT gene (SLC6A3). *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2007 Jul 5;144B(5):605-10.
300. Liu S, Yi M, Qi F, Sun Y, Che F, Ma X. No significant association between Catechol-O-methyl transferase (COMT) -287A/G gene polymorphism and Tourette's syndrome in family-based association study in Chinese Han population. *Eur Child Adolesc Psychiatry*. 2011 Dec;20(11-12):593-6.
301. Nemoda Z, Szekely A, Sasvari-Szekely M. Psychopathological aspects of dopaminergic gene polymorphisms in adolescence and young adulthood. *Neurosci Biobehav Rev*. 2011 Aug;35(8):1665-86.
302. Tarnok Z, Ronai Z, Gervai J, Kereszturi E, Gadoros J, Sasvari-Szekely M, et al. Dopaminergic candidate genes in Tourette syndrome: association between tic severity and 3' UTR polymorphism of the dopamine transporter gene. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2007 Oct 5;144B(7):900-5.
303. Cavallini MC, Di Bella D, Catalano M, Bellodi L. An association study between 5-HTTLPR polymorphism, COMT polymorphism, and Tourette's syndrome. *Psychiatry Res*. 2000 Dec 27;97(2-3):93-100.
304. Kumari V, Kaviani H, Raven PW, Gray JA, Checkley SA. Enhanced startle reactions to acoustic stimuli in patients with obsessive-compulsive disorder. *Am J Psychiatry*. 2001 Jan;158(1):134-6.
305. Diniz JB, Miguel EC, Oliveira AR, Reimer AE, Brandao ML, Mathis MA, et al. Outlining new frontiers for the comprehension of obsessive-compulsive disorder: a review of its relationship with fear and anxiety. *Rev Bras Psiquiatr*. 2012 Jun;34 Suppl 1:81-91.
306. Montag C, Buckholtz JW, Hartmann P, Merz M, Burk C, Hennig J, et al. COMT genetic variation affects fear processing: psychophysiological evidence. *Behav Neurosci*. 2008 Aug;122(4):901-9.
307. Klauke B, Winter B, Gajewska A, Zwanzger P, Reif A, Herrmann MJ, et al. Affect-Modulated Startle: Interactive Influence of Catechol-O-Methyltransferase Val158Met Genotype and Childhood Trauma. *PLoS One*. 2012;7(6):e39709.
308. Caspi A, Moffitt TE, Cannon M, McClay J, Murray R, Harrington H, et al. Moderation of the effect of adolescent-onset cannabis use on adult psychosis by a functional polymorphism in the catechol-O-methyltransferase gene: longitudinal evidence of a gene X environment interaction. *Biol Psychiatry*. 2005 May 15;57(10):1117-27.
309. Mehler MF. Epigenetic principles and mechanisms underlying nervous system functions in health and disease. *Prog Neurobiol*. 2008 Dec 11;86(4):305-41.
310. Vasconcelos MS, Sampaio AS, Hounie AG, Akkerman F, Curi M, Lopes AC, et al. Prenatal, perinatal, and postnatal risk factors in obsessive-compulsive disorder. *Biol Psychiatry*. 2007 Feb 1;61(3):301-7.
311. Maina G, Albert U, Bogetto F, Vaschetto P, Ravizza L. Recent life events and obsessive-compulsive disorder (OCD): the role of pregnancy/delivery. *Psychiatry Res*. 1999 Dec 13;89(1):49-58.
312. Uguz F, Akman C, Kaya N, Cilli AS. Postpartum-onset obsessive-compulsive disorder: incidence, clinical features, and related factors. *J Clin Psychiatry*. 2007 Jan;68(1):132-8.

313. Albert U, Maina G, Bogetto F, Ravizza L. The role of recent life events in the onset of obsessive-compulsive disorder. *CNS Spectr*. 2000 Dec;5(12):44-50.
314. Mercadante MT, Diniz JB, Hounie AG, Ferrao Y, Alvarenga P, Brotto S, et al. Obsessive-compulsive spectrum disorders in rheumatic fever patients. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 2005 Fall;17(4):544-7.
315. Foley DL, Craig JM, Morley R, Olsson CA, Dwyer T, Smith K, et al. Prospects for epigenetic epidemiology. *Am J Epidemiol*. 2009 Feb 15;169(4):389-400.
316. Barnett JH, Scoriels L, Munafo MR. Meta-analysis of the cognitive effects of the catechol-O-methyltransferase gene val158/108Met polymorphism. *Biological Psychiatry*. [Article]. 2008 Jul;64(2):137-44.
317. Hanna GL, Himle JA, Curtis GC, Koram DQ, Veenstra-VanderWeele J, Leventhal BL, et al. Serotonin transporter and seasonal variation in blood serotonin in families with obsessive-compulsive disorder. *Neuropsychopharmacology*. 1998 Feb;18(2):102-11.
318. McDougle CJ, Epperson CN, Price LH, Gelernter J. Evidence for linkage disequilibrium between serotonin transporter protein gene (SLC6A4) and obsessive compulsive disorder. *Mol Psychiatry*. 1998 May;3(3):270-3.
319. Hu XZ, Lipsky RH, Zhu GS, Akhtar LA, Taubman J, Greenberg BD, et al. Serotonin transporter promoter gain-of-function genotypes are linked to obsessive-compulsive disorder. *American Journal of Human Genetics*. 2006 May;78(5):815-26.
320. MacKenzie A, Quinn J. A serotonin transporter gene intron 2 polymorphic region, correlated with affective disorders, has allele-dependent differential enhancer-like properties in the mouse embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Dec 21;96(26):15251-5.
321. Hemmings SMJ, Stein DJ. The current status of association studies in obsessive-compulsive disorder. *Psychiatric Clinics of North America*. 2006 Jun;29(2):411-+.
322. Tot S, Erdal ME, Yazici K, Yazici AE, Metin O. T102C and -1438 G/A polymorphisms of the 5-HT_{2A} receptor gene in Turkish patients with obsessive-compulsive disorder. *Eur Psychiatry*. 2003 Aug;18(5):249-54.
323. Mundo E, Richter MA, Sam F, Macciardi F, Kennedy JL. Is the 5-HT_{1D} beta receptor gene implicated in the pathogenesis of obsessive-compulsive disorder? *American Journal of Psychiatry*. 2000 Jul;157(7):1160-1.
324. Mundo E, Richter MA, Zai G, Sam F, McBride J, Macciardi F, et al. 5HT_{1D} beta Receptor gene implicated in the pathogenesis of Obsessive-Compulsive Disorder: further evidence from a family-based association study. *Molecular Psychiatry*. 2002;7(7):805-9.
325. Camarena B, Aguilar A, Loyzaga C, Nicolini H. A family-based association study of the 5-HT_{1D}beta receptor gene in obsessive-compulsive disorder. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2004 Mar;7(1):49-53.
326. Di Bella D, Cavallini MC, Bellodi L. No association between obsessive-compulsive disorder and the 5-HT_{1D}beta receptor gene. *Am J Psychiatry*. 2002 Oct;159(10):1783-5.
327. Arnold PD, Rosenberg DR, Mundo E, Tharmalingam S, Kennedy JL, Richter MA. Association of a glutamate (NMDA) subunit receptor gene (GRIN2B) with obsessive-compulsive disorder: a preliminary study. *Psychopharmacology (Berl)*. 2004 Aug;174(4):530-8.
328. Prisco S, Esposito E. Differential effects of acute and chronic fluoxetine administration on the spontaneous activity of dopaminergic neurones in the ventral tegmental area. *Br J Pharmacol*. 1995 Sep;116(2):1923-31.
329. Di Maria V, Pierucci M, Esposito E. Selective stimulation of serotonin_{2c} receptors blocks the enhancement of striatal and accumbal dopamine release induced by nicotine administration. *J Neurochem* 2004;89(2):418-29.
330. Chou-Green JM, Holscher TD, Dallman MF, Akana SF. Compulsive behavior in the 5-HT_{2C} receptor knockout mouse. *Physiol Behav*. 2003 Apr;78(4-5):641-9.
331. Tsaltas E, Kontis D, Chrysikakou S, Giannou H, Biba A, Pallidi S, et al. Reinforced spatial alternation as an animal model of obsessive-compulsive disorder (OCD):

investigation of 5-HT_{2C} and 5-HT_{1D} receptor involvement in OCD pathophysiology. *Biol Psychiatry*. 2005 May 15;57(10):1176-85.

332. Lappalainen J, Zhang L, Dean M, Oz M, Ozaki N, Yu DH, et al. Identification, expression, and pharmacology of a Cys23-Ser23 substitution in the human 5-HT_{2c} receptor gene (HTR2C). *Genomics*. 1995 May 20;27(2):274-9.

333. Cavallini MC, Di Bella D, Pasquale L, Henin M, Bellodi L. 5HT_{2C} CYS23/SER23 polymorphism is not associated with obsessive-compulsive disorder. *Psychiatry Research*. 1998 Feb;77(2):97-104.

334. Mossner R, Walitza S, Geller F, Scherag A, Gutknecht L, Jacob C, et al. Transmission disequilibrium of polymorphic variants in the tryptophan hydroxylase-2 gene in children and adolescents with obsessive-compulsive disorder. *International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2006 Aug;9(4):437-42.

335. Thakker DR, Natt F, Husken D, Maier R, Muller M, van der Putten H, et al. Neurochemical and behavioral consequences of widespread gene knockdown in the adult mouse brain by using nonviral RNA interference. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Dec 7;101(49):17270-5.

336. Miller G, Madras B. Polymorphisms in the 3'-untranslated region of human and monkey dopamine transporter genes affect reporter gene expression. *Mol Psychiatry*

2002;7(1)

:44-55.

337. Miguita K, Cordeiro Q, Siqueira-Roberto J, Shavitt RG, Ramos Castillo JC, Castillo AR, et al. Association analysis between a VNTR intron 8 polymorphism of the dopamine transporter gene (SLC6A3) and obsessive-compulsive disorder in a Brazilian sample. *Arq Neuro-Psiquiatr*. 2007 Dec;65(4A):936-41.

338. Van Tol H, Wu C, Guan H, Ohara K, Bunzow J, Civelli O, et al. Multiple dopamine D₄ receptor variants in the human population *Nature*. 1992;358(6382):149-52. .

339. Mandich P, Schito AM, Bellone E, Antonacci R, Finelli P, Rocchi M, et al. Mapping of the human NMDAR2B receptor subunit gene (GRIN2B) to chromosome 12p12. *Genomics*. 1994 Jul 1;22(1):216-8.

340. Ko S, Zhao MG, Toyoda H, Qiu CS, Zhuo M. Altered behavioral responses to noxious stimuli and fear in glutamate receptor 5 (GluR5)- or GluR6-deficient mice. *J Neurosci*. 2005 Jan 26;25(4):977-84.

341. Zai G, Arnold P, Burroughs E, Barr CL, Richter MA, Kennedy JL. Evidence for the gamma-amino-butyric acid type B receptor 1 (GABBR1) gene as a susceptibility factor in obsessive-compulsive disorder. *Am J Med Genet B*. 2005 Apr;134B(1):25-9.

342. Alonso P, Gratacos M, Menchon JM, Segalas C, Gonzalez JR, Labad J, et al. Genetic susceptibility to obsessive-compulsive hoarding: the contribution of neurotrophic tyrosine kinase receptor type 3 gene. *Genes Brain and Behavior*. 2008 Oct;7(7):778-85.

343. Szeszko PR, Ardekani BA, Ashtari M, Malhotra AK, Robinson DG, Bilder RM, et al. White matter abnormalities in obsessive-compulsive disorder: a diffusion tensor imaging study. *Arch Gen Psychiatry*. 2005 Jul;62(7):782-90.

344. Takebayashi H, Ohtsuki T, Uchida T, Kawamoto S, Okubo K, Ikenaka K, et al. Non-overlapping expression of Olig3 and Olig2 in the embryonic neural tube. *Mech Dev*. 2002 May;113(2):169-74.

345. Saxena S, Brody AL, Schwartz JM, Baxter LR. Neuroimaging and frontal-subcortical circuitry in obsessive-compulsive disorder. *British Journal of Psychiatry* 1998; 173 Suppl 35:26-37.

346. Rauch SL, Savage CR. Neuroimaging and neuropsychology of the striatum. Bridging basic science and clinical practice. *Psychiatr Clin North Am*. 1997 Dec;20(4):741-68.

347. Zai G, Bezchlibnyk YB, Richter MA, Arnold P, Burroughs E, Barr CL, et al. Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) gene is associated with obsessive-compulsive disorder. *Am J Med Genet B*. 2004 Aug;129B(1):64-8.
348. McEwen BS, Alves SE. Estrogen actions in the central nervous system. *Endocr Rev*. 1999 Jun;20(3):279-307.
349. Alonso P, Gratacos M, Segalas C, Escaramis G, Real E, Bayes M, et al. Variants in estrogen receptor alpha gene are associated with phenotypical expression of obsessive-compulsive disorder. *Psychoneuroendocrinology*. 2011;36(4):473-83.
350. Grados MA, Riddle MA, Samuels JF, Liang KY, Hoehn-Saric R, Bienvenu OJ, et al. The familial phenotype of obsessive-compulsive disorder in relation to tic disorders: the Hopkins OCD family study. *Biol Psychiatry*. 2001 Oct 15;50(8):559-65.
351. Pauls DL, Raymond CL, Stevenson JM, Leckman JF. A family study of Gilles de la Tourette syndrome. *Am J Hum Genet*. 1991 Jan;48(1):154-63.
352. Walitza S, Renner J, Lange KW, Lesch KP, Warnke A. Genetics of early onset in OCD. *European Neuropsychopharmacology*. 2008;18(S4):S165-S6.
353. Nestadt G, Addington A, Samuels J, Liang KY, Bienvenu OJ, Riddle M, et al. The identification of OCD-related subgroups based on comorbidity. *Biol Psychiatry*. 2003 May 15;53(10):914-20.
354. Seixas AA, Hounie AG, Fossaluza V, Curi M, Alvarenga PG, De Mathis MA, et al. Anxiety disorders and rheumatic Fever: is there an association? *CNS Spectr*. 2008 Dec;13(12):1039-46.
355. Bienvenu OJ, Samuels JF, Wuyek LA, Liang KY, Wang Y, Grados MA, et al. Is obsessive-compulsive disorder an anxiety disorder, and what, if any, are spectrum conditions? A family study perspective. *Psychol Med*. May 13:1-13.
356. OCF-MINI-subgroup, Mathews C, Hanna G, Cook E, Arnold P, Kennedy J, et al. Obsessive-Compulsive Foundation Mini Genetics Collaborative Subgroup OCF-MINI. In press comunicação pessoal.