

Combinación de genotipos DRD4 y DAT1 constituye importante factor de riesgo en miembros de familias de Santiago de Chile con déficit atencional

Hugo Henríquez B^{1,2,3}, Marcela Henríquez H², Ximena Carrasco Ch^{4,5}, Paula Rothhammer A⁴, Elena Llop R², Francisco Aboitiz D⁴, Francisco Rothhammer E^{1,2}.

Combination of DRD4 and DAT1 genotypes is an important risk factor for attention deficit disorder with hyperactivity families living in Santiago, Chile

Background: Attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD) is a common, highly heritable neurobiological disorder of childhood onset, characterized by hyperactivity, impulsiveness, and/or inattentiveness. **Aim:** To search for possible associations between dopamine receptor D4 (DRD4) and dopamine transporter 1 (DAT1) polymorphisms and ADHD in Chilean families. **Material and methods:** We extended a previous family-based discordant sib pair analysis that included 26 cases diagnosed according to DSM-IV criteria and 25 controls (healthy siblings of cases), adding 14 cases and 11 controls. **Results:** Both loci, individually classified as homozygotes or heterozygotes for the DRD4 7-repeat and DAT1 10-repeat alleles, did not exhibit genotype frequency differences between affected children and their healthy siblings. However, the simultaneous presence of both DRD4 7-repeat heterozygosity and DAT1 10 allele homozygosity was significantly higher (22.5%) in cases (40), compared with (2.8%) unaffected siblings (36), with an odds-ratio of 10.16. **Conclusions:** The genotype combination DRD4/7 heterozygotes and DAT 1/10 homozygotes is a high risk factors in Chilean families for ADHD. Increased density of dopamine transporters in ADHD brains, along with abundance of 7-repeat D4 receptors in prefrontal cortex, which is impaired in ADHD patients, make the observed gene-gene interaction worthy of studies to understand the functional basis of ADHD (Rev Méd Chile 2008; 136: 719-24).

(Key words: Attention deficit disorder with hyperactivity; DAT1 protein; DRD4 protein, human)

Recibido el 26 de septiembre, 2007. Aceptado el 10 de marzo, 2008.

Este trabajo fue financiado a través de fondos otorgados por el Proyecto Fondecyt N° 1080219. ¹Centro de Alta Investigación, Universidad de Tarapacá. Arica, Chile. ²Programa de Genética Humana, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Santiago, Chile. ³Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Diego Portales. Santiago, Chile. ⁴Departamento de Psiquiatría y Centro de Investigaciones Médicas, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. ⁵Servicio de Neurología y Psiquiatría, Hospital Luis Calvo Mackenna. Santiago, Chile.

Correspondencia a: Prof. Dr. Francisco Rothhammer. Programa de Genética Humana, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Av Independencia 1027. Casilla 70061, Santiago 7, Chile. E mail: frothham@med.uchile.cl

El síndrome de déficit atencional (SDA) es una de las condiciones neuropsiquiátricas infantiles de mayor prevalencia, afectando en poblaciones europeas entre 3% y 7,5% de los niños de edad escolar. Los estudios indican que la base del SDA se encuentra en una disfunción de la neurotransmisión dopaminérgica hacia la corteza prefrontal y los ganglios basales, y el tratamiento psicoestimulante (primera línea en SDA) se basa en la facilitación de la liberación o inhibición de la recaptación de dopamina. El componente genético es relevante, alcanzando su heredabilidad alrededor de 80%, según estudios comparativos de gemelos mono y dicigóticos. Esto ha llevado al estudio de genes dopaminérgicos como factores de riesgo de SDA¹.

Estudios recientes han revelado que al menos dos polimorfismos genéticos del sistema dopaminérgico, un receptor y un transportador (DRD4/7 y DAT1/10), están asociados al síndrome de déficit atencional con hiperactividad (SDAH)¹⁻³. La frecuencia de presentación de estos alelos en Santiago de Chile es intermedia entre los valores obtenidos en poblaciones europeas e indígenas, como era de esperar considerando su composición genética⁴. El gen DRD4/7 exhibe una frecuencia de 0,27, mientras que el gen DAT1/10 se presenta con una frecuencia de 0,74 en esta ciudad. Las frecuencias en poblaciones europeas e indígenas son para DRD4/7 de 0,15 y 0,61 y para DAT1/10 de 0,52 y 1,00, respectivamente⁵. A su vez, debido a la asociación entre genes indígenas y estrato socioeconómico, la frecuencia de presentación de estos genotipos debe ser mayor en los grupos socioeconómicos más bajos⁴.

En un trabajo previo utilizando el método de hermandades discordantes con base familiar (*discordant sibpair method*) encontramos que el primero de estos alelos se encontraba levemente asociado al SDAH ($p < 0,05$) en la población de Santiago, sin embargo, la asociación con el gen DAT1/10 no alcanzó niveles de significación⁶. Posteriormente, en un análisis diferente, que comprendió el estudio de la asociación conjunta de genotipos de los mismos genes con el SDAH, obtuvimos como resultado una asociación altamente significativa de los genotipos heterocigoto del gen DRD4/7 y homocigoto del gen DAT1/10. La probabilidad (prueba exacta de Fisher) de que esta asociación ocurriera al azar fue de 0,0096 lo

que se tradujo en una razón de desigualdad (*odds ratio*) $OR = 12,71$ ⁷. Con la finalidad de validar estos resultados, que sin duda eran importantes, puesto que abrían la posibilidad de realizar un diagnóstico precoz de riesgo de SDAH en la población de Santiago, aumentamos el número de familias estudiadas. Esta comunicación tiene por objetivo dar a conocer y discutir los nuevos resultados.

MATERIAL Y MÉTODO

La evaluación clínica, de los contextos familiar y escolar, de los antecedentes mórbidos perinatales y del desarrollo psicomotor de los pacientes con SDAH que fueron referidos para estudio desde los centros asistenciales Hospital Calvo Mackenna, Hospital San Borja Arriarán y Clínica Las Condes, se encuentra descrita en Carrasco y cols⁶. Brevemente, el diagnóstico de SDAH se realizó según DSM IV en la sección "Trastorno con déficit atencional y comportamiento perturbador". El comportamiento social se evaluó a través de la prueba de Conners para padres. A todos los pacientes se les realizó la prueba de Wechsler revisada (WISC-R) y se evaluó cualitativamente su conducta. Previo a su inclusión en este estudio, los padres de los *propositi* firmaron un consentimiento informado. El protocolo correspondiente a esta investigación fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

El método estadístico utilizado para determinar la asociación entre los genotipos DRD4/7 y DAT1/10 por una parte, y el SDAH por otra, fue el de hermandades discordantes con base familiar descrito previamente⁶. Este método, consiste en comparar conjuntamente los genotipos de los casos con los de hermanos no afectados que les antecedan o le sigan en edad que son tomados como controles. De esta manera se evita obtener resultados espúreos debido a estratificación poblacional y se controlan factores distorsionadores tales como nivel socioeconómico, nutrición y aspectos psicosociales, entre otros, debido a que casos y controles comparten el medio ambiente familiar.

La tipificación genético-molecular de la nueva muestra incluyó la toma de una alícuota de sangre periférica por punción venosa estandarizada, el

aislamiento de linfocitos y la posterior extracción del ADN genómico de cada paciente. Se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación de regiones polimórficas conteniendo los VNTR (*variable number of tandem repeats*) de los genes para el receptor de dopamina DRD4 y el transportador DAT1. Este procedimiento se llevó a cabo utilizando el protocolo descrito por Nanko y cols⁸. La genotipificación de cada paciente se realizó en forma directa, según la visualización en un gel de agarosa 2,5% teñido con bromuro de etidio de los productos de la amplificación anteriormente señalados (Figura 1).

RESULTADOS

En la Tabla 1 se señalan los resultados correspondientes a la muestra previamente reportada, es decir 26 casos y 25 controles^{6,7}, más 14 casos y 11 controles incorporados en el presente análisis, lo

que da un total de 40 casos y 36 controles. Los 4 controles faltantes no se presentaron para la obtención de una muestra de sangre.

Al comparar las frecuencias genotípicas de DRD4/7 en casos y controles se observa un leve incremento en los casos (52% vs 48%), aunque esta diferencia no alcanza significación estadística. Una situación semejante ocurre con DAT1/10, aunque en este caso las diferencias son algo mayores (59% vs 41%) lo que podría indicar que la contribución del alelo DAT1/10 en combinación homocigoto es más

Tabla 1. Comparación de frecuencias de genotipos dopaminérgicos entre casos y controles

| Genotipos | Casos | Controles |
|-----------------------------|-------|-----------|
| DRD4/7 + DAT1/10 | 9 | 1 |
| Otros genotipos DRD4 y DAT1 | 31 | 35 |
| Totales | 40 | 36 |

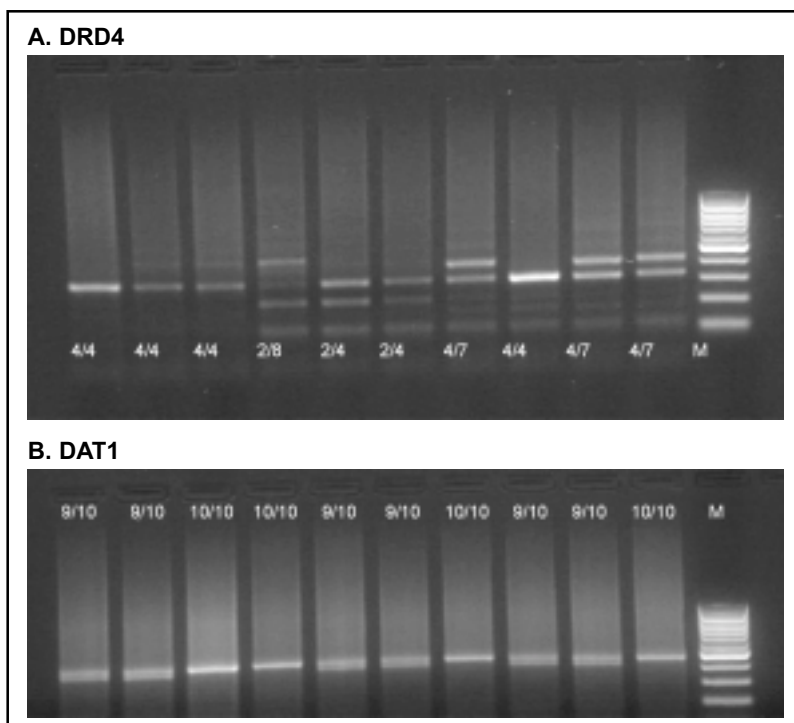


Figura 1. Genotipificación para el receptor de dopamina tipo 4 (DRD4) y para el transportador de dopamina tipo 1 (DAT1). La combinatoria numérica señalada en cada carril representa el genotipo de cada individuo, expresado en el número de repeticiones tipo VNTR. M: Ladder 100 pb.

relevante. No obstante, al comparar las frecuencias conjuntas de DRD4/7 y DAT1/10 en casos y controles, se obtiene una diferencia altamente significativa (prueba exacta de Fisher, $p=0,0112$). Esta diferencia se traduce en una razón de desigualdad (OR =10,16) (95% IC =1,19-226,32) (Tabla 1).

DISCUSIÓN

Nuestros resultados concuerdan con los hallazgos informados en numerosos trabajos a nivel internacional en lo que respecta a una leve asociación entre DRD4/7 y DAT1/10 con SDAH¹⁻³. En nuestra investigación, estas asociaciones no alcanzaron significación estadística posiblemente debido al tamaño muestral o a la composición genética de la población. No obstante, estamos en condiciones de ratificar la existencia en Santiago de una fuerte asociación (razón de desigualdad, OR =10,16) entre la frecuencia de presentación del genotipo combinado DRD4/7; DAT1/10 y SDAH. Esta asociación es suficientemente fuerte como para constituir un importante factor de riesgo de desarrollar SDAH. Hacemos notar que en nuestro estudio previo⁷ la razón la desigualdad (OR) era aún mayor. Esta asociación, hasta donde sabemos, ha sido descrita a nivel familiar por primera vez por nuestro grupo. De acuerdo a nuestros resultados, la probabilidad de presentar SDAH en miembros de familias con este síndrome, portadores de los genotipos heterocigoto DRD4/7 y homocigoto DAT1/10 en Santiago sería de 90%, en circunstancias que la misma probabilidad en caso de ser portador de otros genotipos, correspondientes a los mismos genes, sería de 47%, lo que implica que el ser portador de la combinación de genotipos descrita aumenta en familias con SDAH en cerca de 100% la probabilidad de padecer este síndrome neuropsiquiátrico.

Aproximaciones conductuales y fisiológicas a la señalización dopaminérgica sugieren la existencia de dos modos de funcionamiento de este neurotransmisor⁹. Por una parte se presenta un alto pero transitorio (fásico) incremento de dopamina (DA) a nivel sináptico asociado a estímulos sensoriales, causado por una respuesta explosiva de las neuronas dopaminérgicas. Este modo de respuesta está gatillado por estímulos conductuales relevantes y en cuanto a su respuesta es muy específica. La respuesta dopaminérgica fásica es

impulsada por la activación de las proteínas Gs asociadas a los receptores D1/D5, que activan interneuronas inhibitorias corticales como también neuronas piramidales excitatorias. El resultado neto es una inhibición cortical generalizada en circunstancias que simultáneamente se produce una fuerte activación de conjuntos neuronales específicos. De este modo, ocurre un incremento de la razón señal-ruido y conjuntos activados se hacen más presentes. La señalización dopaminérgica fásica corresponde a estados conductuales altamente focalizados en los cuales está presente en forma importante la motivación.

Otro modo de transmisión consiste en la liberación tónica, extrasináptica de DA por parte de neuronas dopaminérgicas aisladas o bien a la estimulación presináptica de terminales por aferentes corticales. Este tipo de neurotransmisión es mediada por los receptores de alta afinidad D2/D4 ligados a Gi, que actúan predominantemente inhibiendo interneuronas. En consecuencia, se produce una activación generalizada de circuitos corticales y una disminución de la razón señal-ruido.

En el SDAH podría existir un desbalance a favor del "estado tónico" en donde predomina la DA tónica, y representaciones múltiples se podrían activar a expensas de la actividad focalizada que ocurre en la conducta motivada ("estado fásico"). La medicación con estimulantes podría producir un incremento de DA fásico y estabilizar mecanismos inhibitorios potenciando sólo algunos circuitos de la memoria de trabajo. Sin embargo, esta posibilidad está en desacuerdo con el hallazgo que el alelo DRD4/7, ligado al SDAH, como hemos visto, codifica para un receptor hipofuncional¹⁰. Un receptor DRD4 defectuoso disminuiría el "estado tónico", favoreciendo inhibición general y concentración. Es posible que en estas condiciones existan mecanismos compensatorios generadores de una transmisión tónica y un "estado tónico" exacerbados. Esta posibilidad debe ser explorada en trabajos futuros.

El transportador DAT1 está concentrado en el mesencéfalo y en el *corpus striatum*, y participa en la recaptación intrasináptica de DA, regulando los niveles de DA durante la señalización fásica. El alelo DAT1/10 asociado al SDAH codifica para un alelo hiperfuncional, que modula positivamente el nivel de expresión génica del receptor. Esto podría resultar en una captación más eficiente de

DA en la sinapsis disminuyendo la prominencia de la señalización fásica.

En trabajos anteriores habíamos sugerido que de acuerdo con el modelo de Volkow y cols¹¹, los alelos DRD4/7 y DAT1/10 podrían participar en aspectos diferentes de un malfuncionamiento dopaminérgico, en el sentido que uno, el alelo DRD4/7 del receptor DRD4, podría inducir una respuesta subóptima y el otro, el alelo DAT1/10 del transportador DAT1/10, una respuesta excesivamente eficiente, provocando de esta manera una depleción de dopamina en la región perisináptica. Esta hipótesis ha sido expuesta en el presente trabajo en forma actualizada, dando un sustento teórico a nuestros hallazgos.

En las familias estudiadas no encontramos el fenotipo homocigoto DRD4/7 debido, probablemente, a la baja frecuencia de presentación del alelo DRD4/7. Sin embargo, llamamos la atención sobre el hecho que los dobles homocigotos DRD4/7; DAT 1/10, cuya frecuencia esperada sería de 4%, podrían constituir un factor de riesgo igual o mayor para desarrollar SDAH.

La frecuencia conjunta de los genotipos DRD4/7 y DAT1/10 en la población de Santiago (área norte), debería ser de 21% de acuerdo a datos previos obtenidos por nuestro grupo⁵. La misma frecuencia en poblaciones europeas es bastante menor, alcanzando sólo 7%⁵. En nuestra muestra de familias con SDAH la frecuencia de la combinación es de 13%, indicando su origen más europeo (Tabla 2).

Hemos señalado previamente que las frecuencias en poblaciones europeas e indígenas son para DRD4/7 de 0,15 y 0,61 y para DAT1/10 de

0,52 y 1,00, respectivamente⁵. En consecuencia, en Chile la frecuencia de presentación de los genotipos debería ser mayor en los grupos socioeconómicos más bajos debido a la asociación entre genes indígenas y estrato socioeconómico en la población chilena⁴.

En consecuencia, el SDAH es probablemente un problema de importancia en los estratos bajos de Santiago, situación que posiblemente pase inadvertida debido a que el síndrome se diagnostica con mayor frecuencia en niños de estratos socioeconómicos medio-alto y alto. La comorbilidad que existe entre el SDAH y conductas adictivas es particularmente preocupante, ya que si éste no es tratado oportunamente puede dar origen a problemas adictivos y conductas antisociales.

Desde el punto de vista microevolutivo, cabe mencionar que existe asociación entre el SDAH y el temperamento de tediofobia (*novelty seeking*)¹²⁻¹⁵. Este temperamento, que también estaría asociado al polimorfismo DRD4/7¹⁶ ha sido igualmente vinculado con conductas adictivas y antisociales¹⁵. No obstante, cabe destacar que se caracteriza principalmente por una inclinación hacia conductas de alto riesgo, por una fuerte tendencia al liderazgo y una cierta inestabilidad en la mantención de relaciones de pareja, que podría traducirse, desde el punto de vista estrictamente biológico, en un mayor éxito reproductivo¹⁷. Cabría preguntarse, en el caso que nuestras consideraciones tuvieran validez, si la alta frecuencia en las etnias originarias de América de los genes estudiados asociados al SDAH no estaría relacionada con este supuesto éxito reproductivo.

Tabla 2. Comparación de la frecuencia conjunta de heterocigotos DRD4/7 y homocigotos DAT1/10 en diferentes poblaciones a nivel mundial

| Población en riesgo | Frecuencia conjunta de heterocigotos DRD4/7 y homocigotos DAT1/10 |
|----------------------|---|
| Europea | 0,07 |
| Muestra analizada | 0,13 |
| Santiago norte | 0,21 |
| Indígenas americanos | 0,48 |

REFERENCIAS

1. FARAONE SV, DOYLE AE. The nature and heritability of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am* 2001; 10: 299-316.
2. MILL J, CURRAN S, KENT L, RICHARDS S, GOULD A, VIRDEE V ET AL. Attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) and the dopamine D4 receptor gene: Evidence of association but no linkage in a UK sample. *Mol Psychiatry* 2001; 6: 440-4.
3. BOBB AJ, CASTELLANOS FX, ADDINGTON AM, RAPOPORT JL. Molecular genetic studies of ADHD: 1991 to 2004. *Am J Med Genet Part B (Neuro Psychiatr Genet)* 2005; 132: 109-25.
4. ROTHHAMMER F, CRUZ-COKE R. *Curso Básico de Genética Humana*. Ediciones de la Universidad de Chile. Segunda edición corregida, 1983.
5. VIEYRA G, MORAGA M, HENRÍQUEZ H, ABOITIZ F, ROTHHAMMER F. Distribución de alelos de los genes DRD4 y DAT1 del sistema dopaminérgico en la población mixta de Santiago de Chile. *Rev Méd Chile* 2003; 131: 135-43.
6. CARRASCO X, ROTHHAMMER P, MORAGA M, HENRÍQUEZ H, ABOITIZ F, ROTHHAMMER F. [Presence of DRD4/7R and DAT1/10R allele in Chilean family members with attention deficit hyperactivity disorder]. *Rev Méd Chile* 2004 132: 1047-52.
7. CARRASCO X, ROTHHAMMER P, MORAGA M, HENRÍQUEZ H, CHAKRABORTY R, ABOITIZ F, ROTHHAMMER F. Genotypic interaction between DRD4 and DAT1 loci is a high risk factor for attention-deficit/hyperactivity disorder in Chilean families. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2006; 141: 51-4.
8. NANKO S, HATTORI M, IKEDA K, SASAKI T, KAZAMATSURI H, KUWATA S. Dopamine D4 receptor polymorphism and schizophrenia. *Lancet* 1993; 341: 689-90.
9. GRACE AA, FLORESCO SB, GOTO Y, LODGE DJ. Regulation of firing of dopaminergic neurons and control of goal-directed behaviors. *Trends Neurosci* 2007; 30: 220-7.
10. MISSALE C, NASH SR, ROBINSON SW, JABER M, CARON MG. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 1998; 78: 189-225.
11. VOLKOW ND, WANG GJ, FOWLER JS, TELANG F, MAYNARD L, LOGAN J ET AL. Evidence that methylphenidate enhances the saliency of a mathematical task by increasing dopamine in the human brain. *Am J Psychiatry* 2004; 161: 1173-80.
12. CLONINGER CR. A unified biosocial theory of personality and its role in the development of anxiety states. *Psychiatr Dev* 1986; 4: 167-226.
13. CLONINGER CR. Neurogenetic adaptive mechanisms in alcoholism. *Science* 1987; 236: 410-6.
14. CLONINGER CR, SWAKIC DM, PRZYBECK TR. A psychological model of temperament and character. *Arch Gen Psychiatry* 1993; 50: 991-9.
15. GELERNTER J, KRANZLER H, COCCARO E, SIEVES L, NEW A, MULGREW CL. D4 dopamine-receptor (DRD4) alleles and novelty seeking in substance- dependant, personality- disorder and control subjects. *Am J Hum Genet* 1997; 61: 1144-52.
16. REIST C, OZDEMIR V, WANG E, HASHEMZADEH M, MEE S, MOYZIS R. Novelty seeking and the dopamine D4 receptor gene (DRD4) revisited in Asian haplotype characterization and relevance of the 2-repeat allele. *Am J Med Genet Neuropsychiatr Genet* 2007; 144: 453-7.
17. BEN ZION IZ, TESSLER R, COHEN L, LERER E, RAZ Y, BACHNER-MELMAN R ET AL. Polymorphisms in the dopamine D4 receptor gene (DRD4) contribute to individual differences in human sexual behavior: desire, arousal and sexual function. *Mol Psychiatry* 2006; 11: 782-6.