

# ESTUDIO DE ASOCIACIÓN ENTRE GENOTIPO DE *DATI* Y TRANSTORNO POR DÉFICIT DE ATENCIÓN / HIPERACTIVIDAD.

- Grupo(s) de Investigación: Grupo de Investigación en Neurociencias (NEUROS).  
Línea de Investigación en Neurociencia cognitiva
- Grupo de investigación en Genética (GENIUIROS). Línea de Investigación en Genética Humana
  - Alberto Vélez van Meerbeke. MD, MSc
    - Claudia Talero Gutiérrez. MD
  - Dora Janeth Fonseca. Biól. MSc. PhD (a)
    - Heidi Eliana Mateus. MD. MSc
    - Jorge Andrés Agudelo. MD.
    - Marcela Galvez. MD. MSc.

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE NUESTRA SEÑORA DEL ROSARIO

ESCUELA DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE NUESTRA SEÑORA DEL ROSARIO

ESCUELA DE MEDICINACIENCIAS DE LA SALUD

GRUPOS DE INVESTIGACION NeURos, GeniURos

ESTUDIO DE ASOCIACIÓN ENTRE GENOTIPO DE *DATI* Y TRANSTORNO POR DÉFICIT DE ATENCIÓN / HIPERACTIVIDAD. TESIS DE GRADO ESPECIALIZACION EN PSIQUIATRIA DE JORGE ANDRÉS AGUDELO BENDEK. MD.

- INVESTIGADOR PRINCIPAL ALBERTO VÉLEZ VAN MEERBEKE. MD, MSc.
- INVESTIGADORES ASOCIADOS CLAUDIA TALERO GUTIÉRREZ. MD Y DORA JANETH FONSECA. BIÓL. MSc. PhD (a)
  - TUTOR METODOLOGICO MARCELA GALVEZ. MD. MSc
  - TUTOR TEMATICO HEIDI ELIANA MATEUS. MD. MSc

“La Universidad del Rosario no se hace responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico, y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia”

**Agradecimientos:**

A los docentes y personal de la unidad de genética de la escuela de medicina y ciencias de la salud de la Universidad del Rosario.

**Hoja dedicatoria:**

*A mis padres por su amor y confianza.*

*A mis pacientes.*

## **Tabla de Contenido**

• <b>Resumen</b>	<b>8</b>
• <b>Abstract</b>	<b>8</b>
• <b>Introducción</b>	<b>9</b>
• <b>Marco teórico</b>	<b>10</b>
• <b>Justificación</b>	<b>16</b>
• <b>Problema</b>	<b>17</b>
• <b>Objetivos</b>	<b>17</b>
• <b>Aspectos Metodológicos</b>	<b>18</b>
a) <b>Tipo de estudio</b>	<b>18</b>
b) <b>Población de referencia y muestra</b>	<b>18</b>
c) <b>Cálculo de la muestra</b>	<b>20</b>
d) <b>Variables</b>	<b>21</b>
e) <b>Hipótesis</b>	<b>22</b>
f) <b>Técnicas e instrumentos de recolección</b>	<b>23</b>
g) <b>Control de sesgos</b>	<b>23</b>
h) <b>Implicaciones éticas</b>	<b>24</b>
i) <b>Cronograma</b>	<b>25</b>

j) Presupuesto	25
• Materiales y métodos	26
• Plan de análisis estadístico	28
• Resultados	28
• Discusión	31
• Conclusiones	37
• Perspectivas	37
• Bibliografía	38

### Índice de tablas y gráficas

1. Ilustración 1. Criterios Diagnósticos del TDAH	Pág 11.
2. Ilustración 2. Polimorfismo VNTR-3'UTR gen transportador de dopamina ( <i>DAT1</i> )	Pág 27.
3. Tabla 1. Estudios de Asociación de genes candidatos para TDAH	Pág 13.
4. Tabla 2. Operacionalización de variables	Pág 22.
5. Tabla 3. Cronograma general del estudio.	Pág 25.
6. Tabla 4. Presupuesto	Pág 25.
7. Tabla 5. Composición sociodemográfica de la muestra	Pág 26.
8. Tabla 6. Frecuencias alélicas y frecuencias genotípicas de casos y controles	Pág 29

## ESTUDIO DE ASOCIACIÓN ENTRE GENOTIPO DE (*DATI*) Y TRANSTORNO POR DÉFICIT DE ATENCIÓN / HIPERACTIVIDAD.

### 1. Resumen

*Introducción:* El TDAH tiene un componente genético importante; el gen de transportador de Dopamina (*DATI*) se ha asociado con susceptibilidad al TDAH y con sus endofenotipos. El VNTR de 40pb en la región 3'UTR aumenta la expresión del *DATI*. En Colombia no hay ningún estudio previo que indique evidencia de la asociación genética entre TDAH y el gen *DATI*. *Objetivo:* Determinar asociación entre el VNTR del *DATI* y el fenotipo y/o endofenotipos del TDAH. *Métodos:* Se seleccionaron 73 pacientes con TDAH y 75 controles, se valoró en los casos inteligencia y funciones ejecutivas. Mediante (PCR) se amplificó el VNTR *DATI*. Se establecieron estadísticos genético-

poblacionales, análisis de asociación y de regresión logística entre las pruebas neuropsicológicas y genotipo. *Resultado:* El polimorfismo del *DAT1* no mostró asociación con TDAH, ni con alteraciones en las funciones ejecutivas. El genotipo 10/10 del VNTR *DAT1* se encontró asociado con el índice de velocidad de procesamiento ( $p < 0,05$ ). En el subgrupo hiperactividad hubo asociación con algunas subpruebas de flexibilidad cognitiva, número de respuestas correctas, total de errores, número de respuestas perseverativas ( $p \leq 0.01$ ). En el subgrupo mixto se asoció con índice de comprensión verbal ( $p < 0,05$ ). *Conclusiones:* No hubo asociación entre el polimorfismo VNTR (*DAT1*) y el fenotipo de TDAH. Se encontraron asociaciones entre genotipo y algunos test de flexibilidad cognitiva e índice de comprensión verbal. Se establecieron los estadísticos genético poblacionales de este polimorfismo para la población analizada, el cual corresponde al primer reporte de una muestra de nuestro país.

**Palabras clave:** Trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH); VNTR; *DAT1*; genética; funciones ejecutivas.

Introduction: ADHD has a strong genetic component. The dopamine transporter gene (*DAT1*) has been associated with susceptibility to ADHD and its endophenotypes. 40pb VNTR region in the 3'UTR of *DAT1* increases its expression. In Colombia there are no previous studies showing evidence of genetic association between ADHD and *DAT1* gene. Objective: To determine the association between the *DAT1* VNTR and the phenotype and / or endophenotypes of ADHD. Methods: We selected 73 patients with ADHD and 75 controls. Cases were assessed for intelligence and executive functions. The VNTR in *DAT1* was PCR-amplified. Population genetic and statistical analyses were performed. Logistic regression between genotype and neuropsychological testing was run. Results: The *DAT1* polymorphism was not associated with ADHD, or disturbances in executive functions. The 10/10 genotype of the *DAT1* VNTR was associated with the processing speed index ( $p < 0.05$ ). In patients with hyperactivity subgroup the genotype was associated to some subtests of cognitive flexibility, number of correct responses, total errors and perseverative response rate ( $p \leq 0.01$ ). In mixed subgroup it was associated with verbal comprehension index ( $p < 0.05$ ). Conclusions: There was no association between the VNTR polymorphism of *DAT1* and ADHD. Associations were found between genotype and some test of cognitive flexibility and verbal comprehension index. Population genetic statistics of this genetic polymorphism were established for the study population, which corresponds to the first report in our country.

**Keywords:** attention deficit disorder and hyperactivity disorder (ADHD), VNTR, *DAT1*; genetics; executive functions.

## 2. Introducción

El trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH) es el trastorno más frecuente en la edad escolar, tiene una prevalencia mundial que oscila entre el 4 – 19% (1, 2) y ocupa gran parte de la consulta de psiquiatría infantil en centros especializados. Afecta principalmente al género masculino con una proporción de 3:1 y produce alteraciones importantes en el rendimiento académico del individuo, en su forma de relacionarse con sus pares y en su vida futura, continuando con síntomas hasta su edad adulta.

Se han descrito varios factores que contribuyen en la etiología del trastorno, entre los cuales se destacan factores de tipo ambiental, psicológico y genético, constituyéndose en una entidad de origen multifactorial. En cuanto a la influencia de los genes en el trastorno se han realizado múltiples estudios que incluyen como candidatos a aquellos relacionados con los sistemas dopaminérgico, acetilcolinérgico, serotoninérgico, hasta genes que codifican para proteínas transmembranales.

Debido a que la influencia genética puede estar mediada por múltiples genes se han propuesto modelos de aproximación como los endofenotipos, los cuales representan alteraciones en la función bioquímica, neurofisiológica o cognitiva y que indirectamente son muestra de los procesos fisiopatológicos de la enfermedad, estos al estar presentes confieren un riesgo de padecer el trastorno (3). Los endofenotipos pueden estar asociados con un gen en particular, teniendo en cuenta que las alteraciones en la función ejecutiva son frecuentes en los pacientes con TDAH (4) se podría llegar a considerar esta disfunción, como un posible endofenotipo del trastorno.

Dentro de los genes candidatos, uno de los más estudiados es el gen *DAT1*. Su importancia radica en que muchos de los medicamentos usados para el tratamiento del TDAH actúan antagonizando la acción del transportador de dopamina 1, lo que aumenta la disponibilidad de dicho neurotransmisor en la hendidura sináptica y contribuye en la mejoría de los síntomas del TDAH (5). Este hallazgo lo convierte en un gen candidato para la etiología de la enfermedad, varios estudios han demostrado que polimorfismos en el extremo 3'UTR del gen *DAT1* (alelo 10) pueden ser considerados como un factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad Sin embargo, esta asociación no se ha replicado en otros estudios.

En Colombia, se han realizado estudios de asociación particularmente en la población de Antioquia, pero hasta la fecha no hay reportes de otras regiones del país ni de la asociación de variantes genéticas con endofenotipos del TDAH.

El objetivo del presente trabajo es establecer si existe asociación entre el genotipo del VNTR situado en el extremo 3'UTR del gen *DAT1*, con el TDAH o con sus endofenotipos en una muestra de pacientes de la ciudad de Bogotá.

### 3. Marco teórico

El trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH), es la patología psiquiátrica más frecuente en la edad escolar. Se caracteriza por el inicio temprano de los síntomas que consisten en hiperactividad inapropiada, inatención, bajos logros escolares y comportamiento impulsivo. Existen dos clasificaciones diagnósticas para este trastorno: la clasificación internacional de enfermedades 10ª edición (CIE-10) y el manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales IV edición Revisada (DSM-IV-TR), que fue la guía de clasificación utilizada. (Ilustración 1).

## Ilustración Criterios Diagnósticos de TDAH

### Criterios diagnósticos del TDAH, según DSM-IV<sup>48</sup>

#### A. Cualquiera (1) o (2):

1. Seis (o más) de los siguientes síntomas de inatención han estado presentes por al menos 6 meses, llegando a ser mal adaptativos e inconsistentes con el nivel de desarrollo:

##### **Inatención**

- a. A menudo fracasa poniendo atención a los detalles o comete errores por descuido en las tareas escolares, en el trabajo, o en otras actividades.
- b. Frecuentemente tiene dificultad para sostener la atención en tareas o en juegos.
- c. Con frecuencia parece no escuchar cuando se le habla directamente.
- d. A menudo no sigue las instrucciones y no termina sus tareas, oficios o responsabilidades en el lugar de trabajo (no explicable por presencia de comportamiento desafiante o por dificultades para comprender las instrucciones).
- e. Frecuentemente tiene dificultades para organizar tareas y otras actividades.
- f. A menudo evita, le disgusta, o rechaza el comprometerse en tareas que requieran concentración o esfuerzo mental sostenido (como actividades académicas en la escuela o en casa).
- g. Con frecuencia pierde los materiales necesarios para realizar una tarea o actividad (Ej., juguetes, tareas escolares, lápices, libros o herramientas).
- h. Se distrae fácilmente con estímulos irrelevantes.
- i. Es frecuentemente olvidadizo en las actividades de la vida diaria.

2. Seis (o más) de los siguientes síntomas de hiperactividad-impulsividad han persistido por lo menos durante 6 meses, hasta el punto de ser mal adaptativos o inconsistentes con el nivel de desarrollo:

##### **Hiperactividad**

- a. Molesta moviendo las manos y los pies mientras está sentado.
- b. Se levanta del puesto en la clase o en otras situaciones donde debe estar sentado.
- c. Corretea y trepa en situaciones inadecuadas (en adolescentes o adultos, podría ser sensación subjetiva de inquietud).
- d. Dificultades para relajarse o practicar juegos donde deba permanecer quieto.
- e. Está permanentemente en marcha, como si tuviera un motor por dentro.
- f. Habla demasiado.

##### **Impulsividad**

- g. Contesta o actúa antes que se le terminen de hacer las preguntas.
- h. Tiene dificultades para hacer filas o esperar turnos en los juegos.
- i. Interrumpe las conversaciones o los juegos de los demás.

- B. Algunos de los síntomas de hiperactividad-impulsividad o de inatención causantes de deterioro estuvieron presentes antes de los 7 años de edad.

- C. Los problemas causados por los síntomas están presentes en dos o más ambientes (Ej., en la escuela [o en el trabajo] y en casa).

- D. Existe evidencia clara de alteración clínica significativa en el funcionamiento social, académico u ocupacional.

- E. Los síntomas no ocurren exclusivamente en el curso de un trastorno pervasivo del desarrollo, esquizofrenia u otro desorden psicótico, y no pueden ser explicados por la presencia de otro desorden mental (Ej., desorden del estado de ánimo, trastorno por ansiedad, trastorno disociativo de la conducta, o un desorden de la personalidad).

Tomada y modificada de Colomb. Med. 2007; 38: 433-439 (6)

El TDAH se asocia con una alteración de la función ejecutiva que afecta las capacidades necesarias para atender a un estímulo, planificar y organizar una acción, reflexionar sobre las posibles consecuencias de las acciones e inhibir la primera respuesta automática cambiándola por otra más apropiada (7) (8), características que son evaluadas mediante las llamadas pruebas de función ejecutivas. Debido a que este trastorno se ha relacionado además con la aparición de otras psicopatologías tanto en la niñez como en la adolescencia, es necesario iniciar su tratamiento de forma temprana.

En los Estados Unidos de América según el DSM-IV-TR, el TDAH afecta a 1 de cada 20 (5%) de los niños (7). Faraone y cols encontraron una prevalencia mundial que se encuentra entre el 8-12%, en un estudio en el que revisaron las prevalencias de otras investigaciones con criterios DSM III, DSMIII-R y DSM IV encontrando algunas variaciones entre poblaciones según los criterios diagnósticos utilizados (9). En una revisión sistemática en 2007, Polanczyk y cols encontraron una prevalencia de 5% a nivel mundial (10), la cual es cercana a la reportada por Vélez y cols. en Bogotá, Colombia quienes al analizar una muestra de 1010 niños de 5 – 12 años en búsqueda de la prevalencia de este trastorno, encontraron que 584 niños (57.8%) cumplieron con los criterios diagnósticos de TDAH para una prevalencia poblacional total de 5.7% (0.8% hiperactividad, 2.5% inatención, 2.4% mixto (1). En consulta externa en centros de referencia pediátricos el porcentaje de consultas con diagnóstico de TDAH fue de 28.69% (11). En otro estudio realizado en Colombia por Pineda y cols. la prevalencia de casos de TDAH fue de 11.5%, distribuida en subtipos así: 0.3% hiperactivo-impulsivo, 4.8% inatento, 6.4% mixto (2). Según el estudio nacional de salud mental de Colombia de 2003, la prevalencia en adultos para el TDAH fue de 0.1 % (12).

El TDAH es una entidad multifactorial en la que se han visto implicados factores ambientales, orgánicos y genéticos (13). Se consideran como factores de riesgo: el uso de tabaco y alcohol durante el embarazo, bajo peso al nacer, alta adversidad psicosocial y tener padres con TDAH (14) (13). Adicionalmente, se han observado algunas alteraciones orgánicas cerebrales como la disminución en el tamaño cerebral que puede ser global con un cerebro más pequeño, o en áreas específicas como la corteza prefrontal, cuerpo caloso, ganglios basales y cerebelo. La corteza prefrontal es la región responsable principal de la función ejecutiva y los ganglios basales se encargan del control de los impulsos, coordinan o filtran la información que llega de otras regiones e inhiben las respuestas automáticas (8),(13).

Se han propuesto tres modelos neuropsicológicos para explicar el TDAH: el modelo energético el cual postula que la alteración base del TDAH es el déficit de vigilancia o nivel de alerta. Toma como base la desregulación en los ciclos sueño y vigilia que suelen presentar estos niños. En este modelo el hipotálamo podría jugar un papel clave. En el modelo de descontrol inhibitorio la alteración nuclear es el déficit de inhibición o autocontrol, que conlleva a la alteración de otras funciones ejecutivas como la memoria de trabajo, el análisis y la síntesis conductual, etc. Por último, el modelo de déficit motivacional en el cual la alteración nuclear se encuentra en la falta de asociación de los

comportamientos adaptativos a una recompensa y de los comportamientos no adaptativos a un castigo lo que estaría relacionado con los comportamientos hiperactivos e impulsivos (8).

Existe una fuerte evidencia de la contribución de la genética en el TDAH (13), (14), (15), observándose una heredabilidad del 76% (13), que se relaciona con el carácter multifactorial de esta entidad. Por tanto, se han realizado esfuerzos en la búsqueda de los genes relacionados con un incremento en la susceptibilidad para esta entidad (15). Así, se han postulado genes relacionados con los sistemas dopaminérgico, acetilcolinérgico, serotoninérgico, y genes que codifican para proteínas transmembranales. Se ha demostrado que receptores para el transportador de dopamina DAT1, variantes en DRD2, DRD3, DRD4 y DRD5, el transportador de serotonina 5HTT, los receptores 1B y 2A para serotonina, la enzima COMT, la enzima MAOA o el SNAP25 pueden relacionarse con una mayor susceptibilidad a la enfermedad (14).

Faraone y cols. en un revisión de la literatura sobre la genética del TDAH, examinaron los intervalos de confianza para varios genes encontrados en estudios de familias y en estudios de casos y controles que podrían estar asociados como genes de susceptibilidad para TDAH. (9) La tabla 1 muestra un resumen de los resultados obtenidos por Faraone y col.

Tabla . Estudios de Asociación (por TDT o estudios caso-control) de genes candidatos para TDAH

<b>Gen</b>	<b>diseño del estudio</b>	<b>OR agrupados</b>	<b>IC 95%</b>	
Receptor de dopamina D4 (exón III VNTR, 7-R)	familia	1.16	1.03-1.31	Faraone y cols, 2001
Receptor de dopamina D4 (exón III VNTR, 7-R)	casos y controles	1.45	1.27-1.65	Faraone y cols 2001
Receptor de dopamina D5 (CA repetido, 148 pb)	familia	1.24	1.12-1.38	Lowe y cols 2004
Transportador de dopamina ( VNTR , 10-R)	familia	1.13	1.03-1.24	Todd y cols 2001, Chen y cols, Payton y cols 2001,
Dopamina Beta-hidroxilasa (TaqI A)	casos y controles	1.33	1.11-1.59	Daly y cols 1999, Roman y cols 2002, Wigg y cols 2002, Payton y cols 2001.
SNAP-25 (T1065G)	familia	1.19	1.03-1.38	Barr y cols 2000, Brophy y cols 2002, Kustanovich y cols 2003, Mill y cols 2004.
Transportador de serotonina (5-HTTLPR largo)	casos y controles	1.31	1.09-1.59	Seeger y cols 2001, Retz y cols 2002, Zoroglu y cols 2002, Beitchman y cols 2003.

HTR1B (G861C)	familia	1.44	1.14-1.83	Hawi y cols 2002, Quist y cols 2003
---------------	---------	------	-----------	--

OR, Odds Ratio; IC, intervalo de confianza; VNTR variable number of tandem repeats. Tomada y modificada de Faraone SV, 2005.

En cuanto al gen *DAT1* varios estudios han relacionado este gen con el desarrollo del TDAH. Este gen codifica para una proteína soluble, miembro de los canales dependientes de cloro y sodio. Está conformada por 12 dominios transmembrana y es la encargada de la recaptación de la dopamina desde el bucle sináptico (16). En la región 3'UTR del gen *DAT1* se encuentra un VNTR (3'untranslated región variable number tandem repeats), cuyas variantes pueden afectar significativamente la expresión del transportador de dopamina (17). El VNTR tiene varios números de repeticiones cuya secuencia es de 40 pb en tamaño; estas son equivalentes a alelos y van desde 3 (~200pb) a 13 (~600pb) repeticiones, los alelos de más bajo número de pares de bases son los menos frecuentes (18).

Las razones por las cuales se ha considerado importante el efecto del gen *DAT1* en el TDAH son dadas por la importancia de los psico-estimulantes en el tratamiento del TDAH, cuyo mecanismo de acción a través del bloqueo del transportador de dopamina hace que logren su efecto terapéutico (19). Se han realizado estudios en ratones *knockout* en los que se ha eliminado la función del gen *DAT1* (también llamado *SLC6A3*) y en los cuales se encuentran características sugestivas de TDAH (hiperactividad y déficit en el comportamiento inhibitorio), que al ser tratados con medicamentos psico-estimulantes reducen su hiperactividad (5). Otro estudio que soporta esta hipótesis, es el realizado por Dougherty y cols. quienes estudiaron adultos con TDAH, a través de tomografía computarizada con emisión de fotón único, y en el que encontraron que la actividad del transportador de dopamina estaba elevada en un 70% en estas personas, por lo que el bloqueo del receptor por medio de los psico-estimulantes mejora los síntomas del TDAH (20).

El primer estudio que probó la asociación entre el VNTR en el *DAT1* 3'UTR y el TDAH fue conducido por Cook y cols con una muestra de 57 niños con TDAH y un análisis de tipo HHRR (Haplotype-based Haplotype relative risk) encontrando que el alelo de 10 repeticiones era preferencialmente transmitido a los probandos con TDAH (21).

Desde este estudio varios grupos han replicado los resultados positivos obtenidos por Cook y cols entre ellos Gill y cols, Waldman y cols, Daly y cols, Barr y cols, Curran y cols, Chen y cols. (22) (23, 24), (25), (26), (27). Sin embargo otros grupos no han encontrado asociación entre este alelo y el trastorno, Palmer y cols, Holmes y cols, Swanson y cols, Todd y cols (28-31). Los conflictos en los resultados pueden deberse a diferentes poderes estadísticos, sesgos muestrales, diversos diseños metodológicos y heterogeneidad del TDAH acorde con la población estudiada en cada caso (16).

En el meta-análisis realizado por Gizer y cols en el cual tomaron varios polimorfismos localizados en el gen *DAT1* entre ellos el VNTR de la región 3'UTR, el VNTR localizado en el intrón 8, el SNP rs6347 localizado en el exón 8, el SNP rs27072 y rs40184 localizados en el 3'UTR de *DAT1* entre otros, el único que mostró asociación con TDAH fue el VNTR localizado en la región 3'UTR, indicando una significativa pero modesta asociación (OR=1.10, IC95%1.03-1.17 p=0.002) (14).

Los hallazgos de estos grupos que han buscado una asociación directa del gen *DAT1* con el TDAH han generado discusión debido a los diferentes resultados tanto positivos como negativos.

Teniendo en cuenta que en la asociación del gen *DAT1* con el TDAH se han encontrado efectos pequeños, pero significativos, se ha buscado la asociación con endofenotipos (14), definidos como fenotipos intermedios o rasgos subclínicos asociados al fenotipo principal. Los estudios que han intentado aproximaciones desde esta hipótesis han encontrado que la presencia del alelo 10 podría ser determinante y verse reflejada en los resultados que obtienen estos niños en algunos test diseñados para medir atención; por ejemplo el estudio desarrollado por Oh y cols en el cual se estudió el VNTR de la región 3'UTR para examinar si existían diferencias entre los individuos con genotipo 10/10 y 10/\*, en el que se encontró que los individuos con el genotipo 10/10 cometían menos errores de omisión en el primer cuarto del test (32). Algunos modelos neuropsicológicos han sido propuestos como posibles endofenotipos, como el déficit en la inhibición de respuesta en el cual el individuo no puede mantener una respuesta cuando se compromete con una tarea u otros de las funciones ejecutivas como la memoria de trabajo, alteraciones en la planeación y la organización, cambios de escenario y velocidad de procesamiento (33).

Las alteraciones en las Pruebas neuropsicológicas (PN) y los endofenotipos propuestos se encuentran en los individuos afectados y en sus familiares cercanos aunque en menor grado, como lo muestra el estudio conducido por Bidwell y cols quienes compararon gemelos dizigotos entre los cuales uno de ellos se encontraba afectado por TDAH y el otro no, con un grupo control de gemelos de los cuales ninguno padecía TDAH; con la hipótesis que el gemelo del grupo de casos que no padecía el desorden tendría una susceptibilidad en los hallazgos neuropsicológicos comparado con los controles. Ellos encontraron que las pruebas neuropsicológicas que evalúan velocidad de procesamiento y medidas de variabilidad de respuesta se encuentran comprometidas en los sujetos con TDAH y en sus gemelos no afectados en comparación al grupo control (34).

Las aproximaciones que se han realizado en poblaciones latinoamericanas buscando encontrar alteraciones en las PN en individuos que padecen TDAH han encontrado que los niños con este

desorden presentan mayores problemas en pruebas que miden las funciones ejecutivas especialmente en planeación, inhibición, memoria de trabajo y control cognitivo (4). Las asociaciones existentes entre variantes del gen *DATI* y test neuropsicológicos no se han realizado en población latinoamericana.

De aquí surge la inquietud por buscar posibles asociaciones entre la función ejecutiva y el genotipo de *DATI* que como hemos visto tiene efectos divergentes en varios estudios, con lo que se plantea si podría tener un efecto modulador de las funciones ejecutivas. Este trabajo pretende determinar una asociación entre el genotipo del VNTR localizado en la región 3'UTR del gen *DATI*, en TDAH y sus subtipos y además de posibles endofenotipos del trastorno y alteraciones de la función ejecutiva, mediante la valoración de las funciones ejecutivas de un grupo de escolares.

#### **4. Justificación**

Teniendo en cuenta la alta prevalencia mundial del trastorno la cual oscila entre 5 – 19%(1, 2) (9), las alteraciones que el trastorno puede generar en los individuos que lo padecen entre ellas bajo rendimiento escolar, mayor asociación con alteraciones en las relaciones familiares y en ocasiones desarrollo de conductas riesgosas y delictivas (35), surge la inquietud por encontrar variables, que siendo detectadas tempranamente en los pacientes, permitan identificar a aquellos individuos en riesgo de desarrollar el THDA y así establecer un modelo de intervención temprana que permita prevenir o modificar el desarrollo de los síntomas que generan mayor compromiso de las funciones académicas, sociales y en el futuro laborales del individuo que como se concluye en el estudio de Barkley y cols continúan acompañando al individuo hasta su adultez llevándolo a tener peor rendimiento laboral (35).

Adicionalmente, si es posible establecer una asociación entre las variantes en el gen con alteraciones particulares en la función ejecutiva, su determinación en los pacientes con el trastorno permitirá un tratamiento enfocado en la corrección de estos déficit, incluso de manera presintomática, logrando una medicina personalizada según el componente genético del paciente. De igual manera, el conocer el polimorfismo del paciente y de esta manera la actividad del DAT1 podría ayudar a predecir los efectos terapéuticos de los medicamentos en los síntomas del TDAH.

#### **5. Problema**

El trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH) es una entidad nosológica que ocupa un lugar preponderante dentro del campo de interés de salud pública y psiquiatría, así como del ámbito educativo por su elevada prevalencia, morbilidad e importante impacto desde el punto de vista socio-

económico. Su manifestación se da como consecuencia de alteraciones en la maduración del sistema nervioso central de etiologías diversas, que incluyen factores ambientales y genéticos. Con respecto a este último se han encontrado datos de heredabilidad de hasta un 90% (33), por lo cual es necesario realizar estudios que permitan identificar asociación con genes candidatos, para delinear perfiles genéticos de susceptibilidad que identifiquen de manera temprana afectados. Es importante entonces, determinar, si para nuestra población de análisis, el gen *DATI* previamente identificado realmente está asociado al desarrollo del fenotipo o más aún a la susceptibilidad de desarrollar endofenotipos específicos del trastorno. Esto teniendo en cuenta varios estudios en los cuales se ha encontrado que variantes en este gen podrían asociarse con el fenotipo TDAH, así como con algunas características sintomáticas como alteraciones en la atención sostenida, en las funciones ejecutivas. El acervo genético colombiano, que corresponde a mezcla de genes caucásicos, amerindios y africanos ha determinado una constitución genética con rasgos propios para nuestra población, que puede determinar características específicas para nuestro país que pueden confirmar o refutar hallazgos previos de la literatura. La pregunta a desarrollar en esta investigación es: ¿Está el Gen *DATI* asociado al fenotipo del déficit de atención e hiperactividad y/o a un endofenotipo como la alteración en las funciones ejecutivas, en pacientes con trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH)?

## I. Objetivos

### A. General

- Determinar si existe asociación entre el VNTR de la región 3'UTR del gen *DATI* y el fenotipo del Trastorno por Déficit de Atención e Hiperactividad, sus subtipos y endofenotipos (función ejecutiva).

### B. Específicos

- Determinar frecuencias alélicas y genotípicas del VNTR de la región 3'UTR del gen *DATI* en casos con TDAH y controles en pacientes colombianos.
- Comparar la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas entre casos y controles.
- Determinar la presencia o no de asociación entre los alelos y/o genotipos presentes en los casos y los subtipos de TDAH, las pruebas de inteligencia y pruebas de función ejecutiva.

- Establecer riesgos basados en la presencia de alelos específicos del VNTR en la población de casos.

## 6. Aspectos metodológicos

### a) *Tipo de estudio*

El tipo de estudio corresponde a un estudio de asociación Caso-Control

### b) *Población de referencia*

La población de referencia corresponde a niños en edad escolar provenientes de varios colegios públicos y privados de Bogotá, Colombia de estratos socio económicos bajo y medio (tabla 5) (Vélez y cols).

Los casos fueron seleccionados en un estudio previo del grupo neUROS (Vélez y cols) y habían sido evaluados utilizando la lista de chequeo del DSM IV y la escala BASC (sistema de evaluación de la conducta de niños y adolescentes). Posteriormente se aplicó la prueba WISC-R (escala Weschler de inteligencia para niños-revisada). Durante la valoración por neuropediatría se evaluó la presencia de síndromes comportamentales mayores (síndrome de Tourette), patologías del espectro autista, retardo mental, enfermedad bipolar o depresión unipolar.

Luego, según los resultados, fueron clasificados en subtipos de TDAH mixto, hiperactivo/impulsivo e inatento. Esta muestra fue previamente seleccionada por Vélez y cols.

### *Criterios para el diagnóstico de TDAH*

- Niño escolar con lista de chequeo aplicada a padres con  $\geq 6$  criterios de los 9 para Inatención y un percentil  $\geq 85$  en el dominio de atención en la Escala de atención BASC aplicada a padres, ó

- Niño escolar con lista de chequeo aplicada a padres con  $\geq 6$  criterios de los 9 para Hiperactividad y un percentil  $\geq 85$  en el dominio de Hiperactividad en la Escala de BASC aplicada a padres, ó
- Niño escolar con lista de chequeo aplicada a maestros con  $\geq 6$  criterios de los 9 para Inatención y un percentil  $\geq 85$  en el dominio de atención en la Escala de BASC aplicada a maestros, ó
- Niño escolar con lista de chequeo aplicada a maestros con  $\geq 6$  criterios de los 9 para Hiperactividad y un percentil  $\geq 85$  en el dominio de Hiperactividad en la Escala de BASC aplicada a maestros.

#### *Criterios de Inclusión Casos*

- Paciente que cumpla alguno de los criterios para el diagnóstico de THDA enunciado previamente.
- Que los niños asientan participar en el estudio
- Que se firme y acepte el consentimiento informado para participar en el estudio por parte de los padres.
- Que la muestra de ADN se encuentre en el banco de ADN y tenga una calidad y cantidad adecuada.

#### *Criterios de exclusión Casos*

- Pacientes con resultados en la prueba de prueba WISC- inferiores a 70.
- Pacientes con comorbilidades como presencia de síndromes comportamentales mayores (síndrome de Tourette), patologías del espectro autista, retardo mental, enfermedad bipolar o depresión unipolar.
- Niños sin familiares o acudientes conocidos.
- Que la muestra no se encuentre en el banco de ADN o sea insuficiente o de mala calidad.

### *Criterios de inclusión Controles*

- Niño en edad escolar que no cumpla los criterios para el diagnóstico de TDAH.
- Que los niños asientan participar en el estudio
- Que se firme y acepte el consentimiento informado para participar en el estudio por parte de los padres.
- Que la muestra de ADN se encuentre en el banco de ADN y tenga una calidad y cantidad adecuada.

### *Criterios de exclusión Controles*

- Niños con resultados en la prueba de prueba WISC- inferiores a 70.
- Niños sin familiares o acudientes conocidos.
- Que la muestra no se encuentre en el banco de ADN o sea insuficiente o de mala calidad.

### *c) Cálculo de la muestra*

El cálculo del tamaño de muestra se realizó utilizando la siguiente fórmula:

$$n = \frac{Z_{\alpha}^2 * p * q}{d^2}$$

Dónde:

- $Z_{\alpha}^2 = 1.96^2$  (ya que el nivel de confianza es del 95%)
- $p$  = proporción esperada (prevalencia reportada)
- $q = 1 - p$
- $d$  = precisión

Teniendo en cuenta la prevalencia de TDAH reportada por Velez y col en la ciudad de Bogotá de 5.7% y una precisión del 5%, el tamaño de muestra calculado fue de 82 pacientes.

d) *Variables* (ver tabla 2):

Definiciones operacionales:

- Alelos *DATI*: Los alelos son las formas alternativas de un gen. El alelo numérico para este polimorfismo se refiere el número de repeticiones en tándem en la región 3'UTR del gen *DATI* que le individuo ha heredado de su padre y de su madre. Todos los individuos tienen dos alelos. Los alelos para esta variante pueden ser de 3 a 13 repeticiones.
- Genotipo *DATI*: Se refiere a la información genética de un individuo para su gen *DATI*, con respecto al VNTR de la región 3'UTR de este gen. El genotipo está dado por dos alelos numéricos (un alelo paterno y un alelo materno)
- Funciones Ejecutivas: El concepto de FE define a un conjunto de habilidades cognitivas que permiten la anticipación y el establecimiento de metas, la formación de planes y programas, el inicio de las actividades y operaciones mentales, la autorregulación de las tareas y la habilidad de llevarlas a cabo eficientemente. Este concepto define la actividad de un conjunto de procesos cognitivos vinculada al funcionamiento de los lóbulos frontales cerebrales del ser humano.
- Coeficiente intelectual: Es el resultado de un test de inteligencia, la puntuación de los test empleados hoy día, como el Wechsler Intelligence Scale for Children (WISC-R) proyección del rango medido del sujeto en una campana de Gauss formada por la distribución de los valores posibles para su grupo de edad, con un valor central (inteligencia media) de 100 y una desviación estándar de 15. Los valores por encima de 100 están por encima de la media; los valores por debajo de 100 están por debajo de la media. Distintos test pueden tener distintas desviaciones estándar.

Tabla operacionalización de Variables

Variable	Definición conceptual de la variable	Naturaleza	Escala de medición	Categoría	Definición de la categoría
<b>Genero</b>	Característica biológica que determina la diferencia entre hombre y mujer	Cualitativa	Nominal	Femenino masculino	Definición de sexo aplicada a la mujer definición de sexo aplicada al hombre
<b>Alelo</b>	Formas alternativas de un gen	Cualitativa	Ordinal	3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13	Número de repeticiones en tándem en la región 3' UTR del gen DAT1
<b>Genotipo</b>	Se refiere a la información genética de un individuo para su gen DAT1, la cual expresa un determinado fenotipo	Cualitativa	Polifónica	9/9 = 1, 9/10 = 2, 10/10 = 3.	Resultado de la combinación de alelos del gen <i>DAT1</i> .
<b>Evaluación neuropsicológica infantil</b>	Escala para evaluar funciones neuropsicológicas	Cualitativa	Dicotómica	Sí No	Presencia de alteración de las funciones neuropsicológicas Ausencia de alteración de las funciones neuropsicológicas
<b>Hiperactividad</b>	Se define como el paciente que cumple con los criterios DSM IV TR	Cualitativa	Dicotómica	Sí No	Cumple con 6 o más criterios en los subtipos de hiperactividad o inatención.
<b>Coefficiente intelectual</b>	Calificación de la inteligencia de un individuo basado en la escala Weschler	Cualitativa	Dicotómica	Retraso mental : Sí No	Puntaje menor o igual a 70 o mayor de 70.

e) *Hipótesis*

*Hipótesis nula:*

El VNTR de la región 3'UTR del gen DAT1 no se asocia con el desarrollo de TDAH o alguno de sus subtipos o endofenotipos (pruebas de función ejecutiva e inteligencia).

*Hipótesis alterna:*

El VNTR de la región 3'UTR del gen DAT1 (su genotipo o alelos) se asocia con el aumento en la susceptibilidad de desarrollar TDAH o alguno de sus subtipos o endofenotipos (pruebas de función ejecutiva e inteligencia). Esta asociación está dada por el aumento en la actividad del transportador de dopamina 1.

*f) Técnicas e instrumentos de recolección*

Las escalas utilizadas en la valoración de los pacientes por el grupo investigador fueron evaluaciones que van desde el diagnóstico del trastorno hasta la evaluación del compromiso en áreas como inteligencia, funciones ejecutivas, desempeño social y familiar y algunas funciones neurológicas. Para el diagnóstico se utilizaron los criterios del DSM-IV-TR, para el diagnóstico de otras áreas como el estado de ánimo, problemas conductuales, trastornos de ansiedad, etc; se utilizó el sistema de valoración del comportamiento de niños y adolescentes (BASC). Este fue aplicado a padres y educadores de los niños valorados. En cuanto a la valoración de presencia de alteraciones de la inteligencia para cumplir con los criterios de exclusión planteados se aplicó el WISC obteniendo la medición del cociente intelectual. El diagnóstico neuropsicológico fue realizado utilizando la evaluación neuropsicológica infantil, la cual explora múltiples funciones mentales superiores, dentro de ellas las funciones ejecutivas. Esta evaluación se encuentra traducida y fue normativizada y validada por Roselli-Cock y cols para Colombia (36). Los datos obtenidos de estas evaluaciones fueron compiladas por el grupo investigador en una base de datos revisada por más de un investigador.

La obtención de los genotipos fue realizada en el laboratorio de biología celular y molecular mediante Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR). La información fue recolectada en una base de datos, obteniendo como resultados las frecuencias alélicas y genotípicas de la muestra de pacientes.

*g) Control de Sesgos*

Los investigadores son conscientes del posible sesgo de muestreo introducido en el estudio debido a la inclusión de algunos pacientes en el grupo de casos a pesar de la discrepancia en las calificaciones dadas por padres y maestros en la lista de chequeo DSM-IV y la escala BASC. Sin embargo esta medida permitió una aproximación al tamaño de muestra deseado.

Se descartó la introducción de sesgos de información con la utilización de escalas reconocidas mundialmente y validadas en nuestro idioma y país que permitieron una toma de datos precisa y objetiva. También se descartaron sesgos de análisis e interpretación de resultados por medio de la verificación de la base de datos por más de un observador. Los resultados fueron analizados con pruebas estadísticas que se ajustaban a las características de los datos obtenidos. El sesgo de estratificación poblacional presente en estudios de tipo caso-control fue evitado por medio del uso de controles de características demográficas similares provenientes de los mismos colegios en donde se obtuvieron las muestras. Sin embargo, los investigadores conocen que la inclusión de controles de edad adulta puede haber generado un sesgo de muestreo.

Se trataron de evitar otro tipo de sesgos de la siguiente manera:

- Del examinador: Las personas encargadas de la recolección de datos fueron entrenados en esta función previo inicio del estudio. Para el investigador que analizó las muestras de ADN se realizó un proceso de inducción a las técnicas de laboratorio y a la realización de la PCR, con aproximadamente 5 ensayos previos a la realización de las reacciones de las muestras de los individuos participantes; además siempre se contó con la asesoría de personal del laboratorio de biología molecular.
- Del examinado: Se contó con el uso de escalas previamente validadas que permitieron una caracterización objetiva de los participantes. A nivel de laboratorio las muestras fueron evaluadas en el Nanodrop® para evaluar la

concentración y calidad de ADN con el fin de realizar los ensayos de PCR con base en estas condiciones.

- De la prueba: Los geles obtenidos de la PCR fueron evaluados y genotipificados por el investigador, por los tutores y por uno de los investigadores asociados. Se realizó luego genotipificación de muestras al azar confirmando los alelos obtenidos en la primera genotipificación.

#### h) Implicaciones Éticas

Se siguieron las normas éticas acordes con la declaración de Helsinki y la Resolución No. 008430 de 1993 para Colombia. Este estudio se considera de *riesgo mínimo* debido a la toma de una muestra de sangre que no excedió los 10 cc. El protocolo del estudio fue evaluado y aprobado por el Comité de Ética en Investigaciones de la Universidad del Rosario. Todos los pacientes asintieron participar en el estudio y sus padres firmaron consentimiento informado para la recolección y uso de sus muestras de ADN.

#### i) Cronograma

Tabla Cronograma general del estudio

Año	2012						2013		
Mes	julio	agosto	sept	oct	nov	dic	ene	feb	mar
Escogencia y planteamiento del problema	Residente y tutores metodológico, temático y autor asociado Biol. Dora Fonseca								
Revisión de literatura existente	Residente psiquiatría, autor asociado Biol. Dora Fonseca								
Realización del protocolo	Residente y tutores								
Entrenamiento en laboratorio		Residente y tutores							
Fase de laboratorio		Residente y tutor metodológico							
Recopilación de información en base de datos				Residente y tutor metodológico					
Análisis estadístico					Residente y tutor metodológico				

Publicación de resultados							Tutores y residente
artículo para publicación indexada				Grupo de investigación.			

j) *Presupuesto*

Tabla Presupuesto de la fase de laboratorio del estudio.

Recurso	Cantida d	Unidad de medida	Valor Unidad	Total
Master mix	1	Frasco	1.300.000	1.300.000
Agua ultrapura	1	Frasco	72.000	72.000
Cebadores	1	Frasco	64.000	64.000
Puntas de pipeta	200	Paquete	1.800	7.200
Agarosa	1	Frasco	230.000	230.000
Guantes	15	Par	1.500	22.500
Programa manejo de referencias bibliográficas	1	Programa	170.000	170.000
Tubos para PCR	200	Paquete	340.000	340.000
Personal de investigadores	4	Personas	250.000	1.000.000
Procesamiento de las muestras	50	Muestras	25.000	1.250.000
<b>TOTAL</b>				<b>4.455.700</b>

**7. Materiales y métodos**

*Análisis de la muestra de ADN*

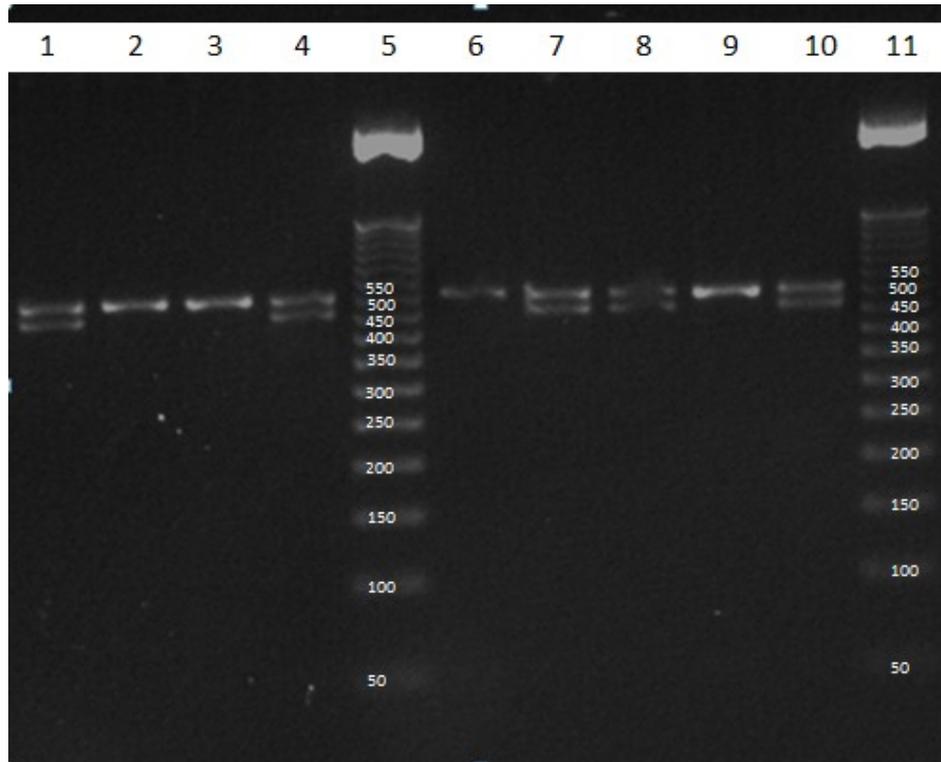
El ADN de los casos y de los controles almacenado en el banco de ADN de la unidad de genética de la universidad del Rosario fue cuantificado utilizando un Nanodrop® y su calidad fue verificada a través de geles de agarosa al 1.2% teñidos con Bromuro de Etidio.

### *Determinación del VNTR*

Para el análisis del polimorfismo de 40 pb del VNTR situado en el extremo 3'UTR del gen *DATI* se realizó en primera instancia una Reacción en Cadena De la Polimerasa (PCR), con Primers específicos previamente reportados que amplificaban un fragmento de entre 160 y 600 pb, según el número de repeticiones del VNTR que tuviese cada caso o control (21).

La PCR fue estandarizada por el grupo Investigador, utilizando las siguientes condiciones: Master Mix (6.25µL Promega), Primers forward 0.5µL y reverse 0.5µL, DNA 150 ng, agua ultrapura 5.25µL, DMSO (Dimetil sulfoxido) al 10% 2µL. El programa de PCR utilizado fue: desnaturalización a 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de: desnaturalización a 94°C por 45 segundos, anillamiento a 61°C por 45 segundos y extensión a 72°C por 45 segundos, seguidos por una extensión final de 10 minutos a 72°C. En cada montaje de PCR se utilizó un control negativo de amplificación para verificar posibles contaminaciones y como controles positivos se usaron muestras previamente tipificadas en la región 3'UTR del gen *DATI*. Todos los productos amplificados se analizaron en geles de agarosa al 3%, teñidos con bromuro de etidio al 3%, utilizando un marcador de peso molecular de 50 pb. La genotipificación fue realizada mediante visualización directa del producto amplificado en el gel, por conteo de los alelos y por dos co-investigadores en evaluaciones independientes. La asignación del genotipo fue realizada por comparación de la banda de amplificación obtenida con el patrón de peso molecular, teniendo en cuenta que el alelo de menor número de repeticiones (2 repeticiones) tiene un peso de 160 pb. La Ilustración 2 muestra la genotipificación de algunos individuos a través de la visualización directa de los productos de PCR en un gel de agarosa al 3%.

Ilustración Gel de agarosa que muestra el polimorfismo VNTR-3'UTR del gen transportador de dopamina (*DAT1*)



(Carril 2, 3, 6, 9: Homocigoto 10/10; Carril 1, 4, 7, 8, 10: Heterocigoto 9/10; Carril 5 y 11: patrón de peso molecular de 50 pb).

## 8. Plan de Análisis

Con los genotipos observados para casos y controles en los geles de agarosa y usando el paquete estadístico SNPStats se determinaron los estadísticos genético poblacionales de frecuencias alélicas genotípicas y equilibrio de Hardy-Weinberg. Con el mismo programa se calcularon los Odds Ratio (OR) del genotipo vs fenotipo y endofenotipos (por subtipos de TDAH). Se realizaron análisis bivariados mediante pruebas estadísticas de regresión lineal simple usando el programa estadístico SPSS® versión 20, en búsqueda de asociación entre el genotipo del VNTR situado en el extremo 3'UTR del gen *DAT1* y: pruebas que evalúan inteligencia (WISC), la evaluación neuropsicológica infantil en sus subpruebas que evalúan funciones ejecutivas (fluidez, fluidez gráfica, flexibilidad

cognitiva, planificación y organización) y pruebas de memoria, y test de figura humana. Las pruebas estadísticas se evaluaron con una tasa de error del 5% ( $p < 0.05$ )

### 9. Resultados

Se analizaron 73 muestras de pacientes con diagnóstico de TDAH cuyas edades se encontraban entre 6 y 10 años ( $DS=2.311$ ) y 75 muestras de controles sanos, de los cuales 55 eran niños con edades entre los 6 y los 13 años y 20 eran adultos con edades entre los 26 y los 83. Las características demográficas de la población de estudio se encuentran descritas en la tabla 5.

Tabla Composición sociodemográfica de la muestra

Variable	Casos (n=73)	Controles (n=75)
Edad*	6-11( $DS=2.311$ )	6-83 ( $DS=26.35$ )
Genero		
Femenino	15	33
Masculino	58	42

\*Rango

Los casos fueron clasificados en 3 diferentes subtipos de acuerdo a los resultados en la clasificación DSM-IV y el BASC. El 50.7% ( $n=37$ ) de los casos correspondieron al subtipo mixto, el 13.7% ( $n=10$ ) fueron clasificados como subtipo hiperactivo/impulsivo, y como subtipo inatento se encontró un 35.6% ( $n=26$ ). La relación entre hombres y mujeres en el grupo de casos fue de ~ 4:1.

No fue posible la genotipificación de cinco de las muestras obtenidas (debido a bajas concentraciones de ADN disponible), correspondientes a dos controles y tres casos, dos de ellos del subtipo inatento y uno del subtipo hiperactivo.

Las frecuencias alélicas y las frecuencias genotípicas obtenidas se ilustran en la tabla 4. No hubo diferencias significativas en frecuencias alélicas y genotípicas de casos y controles. La población se encontró en Equilibrio de Hardy Weinberg. El genotipo más frecuente tanto en los casos como en los controles fue 10/10, con frecuencias de 63 y 64% respectivamente. El genotipo 9/10 se presentó en 32% de los casos y en 33% de los controles. En dos de los controles se obtuvo un genotipo poco frecuente 10/13, el cual se agrupó como genotipo 10/\* en los análisis estadísticos.

Tabla frecuencias alélicas y frecuencias genotípicas de casos y controles.

	Frecuencia Alélica		Frecuencia Genotípica			NA	$\chi^2$ (HWE)	OR (IC95%)
	Alelo 9 n (proporción)	Alelo 10 n (proporción)	9/9 n (proporción)	9/10 n (proporción)	10/10 n (proporción)			

<b>Controles (n=75)</b>	30	(0.20)	116 (0.80)	3 (0.04)	23 (0.32)	47 (0.64)	2	1	0.94 (0.47-1.85)
<b>Total TDAH (n=73)</b>	30	(0.21)	110 (0.79)	3 (0.04)	23 (0.33)	44 (0.63)	3	1	0.94 (0.47-1.85)
<b>Inatención (n=26)</b>	10	(0.19)	38 (0.81)	1 (0.04)	7 (0.29)	16 (0.67)	2	0.76	1.11 (0.42-2.93)
<b>Hiperactividad- impulsividad (n=10)</b>	2	(0.11)	16 (0.89)	0	2 (0.22)	7 (0.78)	1	1	1.94 (0.37-10.01)
<b>Mixto (n=37)</b>	18	(0.24)	56 (0.76)	2 (0.05)	14 (0.38)	21 (0.57)	0	1	0.73 (0.32-1.63)

NA: no amplificó PCR

OR: Odds Ratio

HWE: Equilibrio de Hardy Weinberg

El análisis de la correlación genotipo-fenotipo se realizó en dos partes. Inicialmente se hizo un análisis teniendo en cuenta la totalidad de los casos genotipificados (n=70) y posteriormente se hizo un análisis por subtipos de TDAH (inatento, mixto, hiperactivo/impulsivo). No se encontró asociación entre el genotipo del VNTR del 3'UTR del gen *DAT1* y el fenotipo de TDAH (p=0.85). Tampoco se encontró asociación con los subtipos de inatención, hiperactividad/impulsividad, mixto (p=0.83, 0.4, 0.44 respectivamente).

Además se analizaron las pruebas que evalúan inteligencia (WISC), la evaluación neuropsicológica infantil en sus subpruebas que evalúan funciones ejecutivas, pruebas de memoria, y test de figura humana en relación con el genotipo del VNTR del 3'UTR del gen *DAT1*, el cual se realizó también en la totalidad de los casos y por subtipos de TDAH. En relación con los casos de TDAH encontramos una correlación estadísticamente significativa entre el genotipo 10/10 y el índice de velocidad de procesamiento del WISC (p=0.043). Las demás pruebas analizadas en este grupo no alcanzaron una significancia estadística.

Con respecto al análisis por subgrupos, en el subgrupo de inatención no se evidenció correlación entre el genotipo y las pruebas analizadas, sin embargo en algunas pruebas como la fluidez verbal fonémica total y la fluidez gráfica semántica se encontraron valores de p cercanos a la significancia (p=0.062 y 0.084 respectivamente). Con respecto al subgrupo de hiperactividad, el genotipo de *DAT1* se encontró relacionado significativamente con algunas subpruebas de flexibilidad cognitiva como el número de respuestas correctas (p=0.011) y el total de errores (p=0.015). También en este subtipo se encontró relación del genotipo de *DAT1* con el número de respuestas perseverativas (p=0.001). En el subgrupo

mixto solo la subprueba índice de comprensión verbal del WISC se relacionó significativamente con el genotipo ( $p=0.037$ ).

Con base en previos reportes de la literatura donde se encontró relación con el alelo de 9 repeticiones (32, 37), decidimos agrupar los genotipos en aquellos que contenían el alelo de 9 repeticiones (es decir, el genotipo 9/9 y el 9/10) versus aquellos genotipos sin el alelo de 9 repeticiones (genotipo 10/10) para realizar un análisis más preciso teniendo en cuenta el alelo 9. Mediante este análisis se encontró una relación con la subprueba índice de velocidad de procesamiento del WISC ( $p=0.033$ ), la cual también se encontró asociada al realizar el análisis con todos los genotipos independientemente. No se encontraron otras correlaciones con este análisis.

La tabla 7 muestra los valores de  $R^2$  y los valores de  $p$  para aquellas pruebas neuropsicológicas, de inteligencia, de memoria y figura humana que se encontraron correlacionadas con el genotipo de *DAT1*.

Tabla Regresión lineal simple de variable fenotípica Vs. genotipo

Fenotipo	Prueba	$R^2$ ajustado	Valor de $p$
TDAH	Índice de velocidad de procesamiento WISC	0.046	0.043
TDAH: Subgrupo hiperactivo	Percentil respuestas correctas flexibilidad cognitiva	0.623	0.011
	Percentil errores flexibilidad cognitiva	0.596	0.015
	Respuestas perseverativas escala Flexibilidad cognitiva	0.711	0.003
	Respuestas perseverativas percentil Flexibilidad cognitiva	0.753	0.001
TDAH: Subgrupo mixto	Índice de velocidad de comprensión WISC	0.096	0.037

Las demás variables fenotípicas analizadas no tuvieron correlación estadísticamente significativa con el genotipo.

## 10. Discusión

El Trastorno por Déficit de Atención e Hiperactividad, constituye una entidad que afecta un importante porcentaje de la población infantil. Dada la alta heredabilidad del rasgo, que plantea una importante influencia de la varianza genética sobre el fenotipo, se han descrito hasta la fecha más de 1800 publicaciones sobre la genética de TDAH (38).

Mediante diferentes aproximaciones como estudios de ligamiento o GWAS (*Genome Wide Association Studies*) se han identificado varios genes involucrados en la susceptibilidad Genética al desarrollo del TDAH.

El Transportador de Dopamina (DAT1), localizado en la región presináptica en las neuronas dopaminérgicas, regula la recaptación de dopamina dentro de los terminales presinápticos (39). Este gen, han sido sujeto a numerosos estudios de asociación con TDAH, ya que exhibe varias características para ser un buen gen candidato: ratones “*knockout*” exhiben un incremento en la actividad motora con residuos de dopamina 100 veces mayores a lo normal en la hendidura sináptica, estudios de tomografía computarizada de emisión de fotones hechos en afectados revelan mayor disponibilidad de DAT1, es blanco del medicamento Metilfenidato, y los niños y adultos afectados demuestran mayor densidad del transportador en el *striatum* (39, 40).

Basándonos en la evidencia previa y en la implicación fisiológica claramente demostrada del gen *DAT1* en la etiología del TDAH, buscamos establecer asociación del polimorfismo más ampliamente descrito a nivel mundial desde 1995, cuando Cook et al describieron por primera vez dicha relación. Los hallazgos del presente estudio indicaron asociación estadísticamente significativa entre el TDAH y las pruebas de flexibilidad cognitiva y algunos de los componentes del WISC como el índice de velocidad de procesamiento e índice de comprensión verbal. Loo et al, 2003 reportó de manera similar a nuestros hallazgos una asociación entre el genotipo 10/10 del gen *DAT1* y aumento en total de errores, además de incremento en respuestas impulsivas y variabilidad en el tiempo de respuesta. (41). Esto confirma la alteración que produce el TDAH en las funciones ejecutivas y resalta la importancia de conocer el trasfondo genético de este desorden que afecta a un 5% de la población en edad escolar, su alta heredabilidad muestra la necesidad de realizar abordajes de la familia del afectado en búsqueda, si bien no del trastorno con todos sus criterios; si de algunas alteraciones neuropsicológicas que se podrían ver afectadas en sus parientes cercanos.

En cuanto a la asociación entre el genotipo del gen *DATI* y el WISC y las pruebas neuropsicológicas; esta fue significativa en relación con el índice de velocidad de procesamiento el cual da una medida de la capacidad de secuenciar, rastrear y discriminar información visual, también informa sobre la atención y la memoria visual a corto plazo. Lo que indica algunas posibilidades de síntomas en los cuales una investigación más profunda sobre estos aspectos mostraría posibles endofenotipos.

En el subtipo inatento el índice de comprensión verbal del WISC, y el total de errores en la prueba de las cartas tenían resultados significativos, estas pruebas en conjunto nos dan información sobre la memoria de largo plazo y la capacidad del individuo para adaptarse a los requerimientos del medio ambiente lo que indica la susceptibilidad de este subgrupo a la mal-adaptación a los medios cambiantes como podrían ser los de un salón de clases. No se encontró una asociación con el subtipo hiperactivo-impulsivo, lo cual está en concordancia con lo hallado por Bidwell C et al, que indica que la asociación del genotipo 10/10 del VNTR 3'UTR del gen *DATI* se da con síntomas de inatención más que hiperactividad e impulsividad (42). Etchepareborda y cols realizaron un estudio preliminar en el cual se evaluaba a los individuos con TDAH subtipo mixto vs controles con magneto-encefalografía (MEG) mientras realizaban tareas que valoraban flexibilidad cognitiva; encontraron que la principal diferencia entre los dos grupos se refería al número de perseverancias de los individuos con TDAH subtipo mixto comparado con los controles, esta diferencia no fue encontrada en los inatentos (43); en nuestros hallazgos en el subtipo inatento encontramos una asociación significativa con el total de errores cometido por los individuos en la prueba de las cartas, esto indica la cantidad de intentos que el individuo requiere para comprender que se ha cambiado de categoría clasificatoria, la adaptabilidad de estos individuos se ve alterada cuando se cambian las normas.

El VNTR en la región 3'UTR del gen *DATI* y su asociación con el TDAH y sus endofenotipos fue analizado en un estudio de cohorte encontrando asociaciones del genotipo 9/10 con mayor expresión de los síntomas de TDAH que los portadores del genotipo 10/10, además encontraron que los portadores de el genotipo 9/10 tenían peor rendimiento escolar, mayores alteraciones en la relación madre hijo y mayores alteraciones comportamentales, esto fue observado también en los controles que poseían el genotipo 9/10. Estos resultados persistían desde la niñez hasta la adultez del individuo (35).

En la mayoría de los estudios publicados, la asociación de TDAH se ha establecido con el genotipo 10/10, que además de ser el más prevalente en casi todas las poblaciones analizadas, ha demostrado una influencia sobre los niveles de dopamina. Mill et al, reportaron que los niveles de ARNm en el cerebro

humano eran dependientes del VNTR *DAT1*, con mayor expresión en los individuos portadores del alelo 10. Sin embargo el hecho que la asociación se da en los homocigotos, permite indicar un efecto aditivo del alelo, más que una dominancia de éste. La presencia del alelo 10, confiere entonces un aumento en la expresión mesolímbica del transportador. Es probable que fisiológicamente esta sobre activación de transportadores reduzca la dopamina extracelular, afectando los mecanismos cerebrales de desarrollo que modulan la atención relacionados con TDAH. (38, 39, 44). En otras poblaciones se han descrito otros alelos del mismo VNTR del gen *DAT1* asociados a TDAH, como el 7 y 9, estas observaciones pueden ser debidas a efectos de estratificación poblacional, o diferencias étnicas (40).

Teniendo en cuenta estos hallazgos se puede apreciar la importancia de conocer el genotipo del gen *DAT1*, ya que permitiría sospechar que un determinado individuo va a responder mejor que otro ante el tratamiento con estimulantes; de igual manera en los individuos que poseen los genotipos que se asocian con un peor desempeño en las pruebas neuropsicológicas podrían iniciarse tratamientos terapéuticos tempranos para evitar el compromiso de la función ejecutiva y por tanto mejorando el desempeño de estos individuos en sus labores de la vida diaria, en las etapas iniciales de su desarrollo y en las más tardías las cuales persistirían alteradas en el tiempo.

Comparado con estudios que se han realizado en Latinoamérica las frecuencias alélicas encontradas por Roman T y cols en Brasil son semejantes a las de este estudio; con el alelo de 10-repeticiones en el 74% de los probandos y 24% en los controles; de igual forma en su estudio la asociación por la metodología de casos y controles no fue significativa estadísticamente con el subtipo impulsividad, esto a pesar de haber realizado un análisis complementario de tipo *Haplotype relative risk* (HRR) en conjunto con el gen *DRD4* (45).

Algunos de los estudios que muestran asociación del VNTR en *DAT1* con el TDAH lo hacen principalmente con algunas características endofenotípicas (no con el fenotipo completo de TDAH) (46, 47) estas asociaciones tienen importancia para el desarrollo de futuras pruebas diagnósticas y en el esfuerzo por objetivar más el desorden. Kim y cols. Encontraron que el genotipo 9/10 era más frecuente en los sujetos con TDAH ( $X^2=13.45$ ,  $p=0.02$ ,  $OR=4.12$ , IC 95%: 2.21-12.34), también las frecuencias alélicas del alelo 9-repeticiones eran significativamente más alta en los sujetos con TDAH ( $X^2=11.55$ ,  $p=0.03$ ,  $OR=4.43$ , IC 95%: 1.55-11.78), por lo que los sujetos con el alelo de 9-repeticiones cometen más errores por comisión en las tareas de vigilancia continua (37). Oh y cols. Por ejemplo encontraron que los individuos con el genotipo 10/10 cometen menos errores de omisión en el test de variables de

atención (T.O.V.A. por sus siglas en ingles). Estos individuos cometían menos errores de omisión que los de genotipo 10/\* en el primer cuarto del test (32). Lo que indicaría un factor protector en el primer cuarto de la prueba para los individuos con el genotipo 10/10. La desventaja de este estudio es la falta de un grupo control. Los resultados de este estudio no muestran diferencias significativas entre casos y controles, la presencia del genotipo 9/10 se dio en 23 sujetos en cada uno de los grupos, tanto casos (33%) como controles (32%).

Lo anterior esboza la gran heterogeneidad genética existente, pero también muestra que los genes candidatos pueden estar implicados en modular fenotipos intermedios. Lo anterior se ha demostrado con estudios de nivel neuropsicológico que han revelado cuatro factores importantes: 1. Inhibición y ejecución de respuesta 2. Memoria de trabajo y de actualización 3. Cambio de escenarios y cambio de tareas, 4. Control de interferencias (44). Como lo muestran nuestros hallazgos esta población estudiada se encuentra relacionada con el factor 3 expuesto por Bellgrove y cols, ya que en la prueba de las cartas ellos tenían mayor dificultad en comprender cuando se había cambiado un escenario, que estaba dado por la capacidad de organizar las cartas de acuerdo a este nuevo requerimiento.

Otros grupos han encontrado asociación entre el genotipo 10/10 y alteración en las PN contrario a lo que hemos visto previamente. En un estudio de casos y controles con 22 casos con TDAH y 20 controles sanos se les aplicaron 2 test, el SART (*sustained attention to response task*) y el grey scales task. Dentro del grupo de TDAH se realizó una subdivisión en alto y bajo riesgo de acuerdo a la presencia o no del alelo de 10-repeticiones, siendo los homocigotos 10/10 los integrantes del grupo de alto riesgo. Se encontró que el grupo de alto riesgo (10/10) mostraba mayor variabilidad de respuesta en el SART que los de bajo riesgo. Estos resultados sugieren que el alelo de 10-repeticiones de *DAT1* puede mediar el compromiso neuropsicológico en TDAH (44). Obtuvimos resultados que muestran al genotipo 10/10 como el más frecuente y al alelo de 10-repeticiones como el más generalizado en esta población. En el subtipo hiperactivo la frecuencia para el alelo de 10-repeticiones fue, en los casos 81%, la frecuencia en los controles fue de 80%.

También hay estudios en los que no se encuentra ninguna asociación, como el realizado por Yaping W y cols. Aunque en este estudio la metodología era diferente a la de casos y controles, se replicaron los resultados obtenidos en otros dos estudios chinos y dos coreanos en los cuales se usaba análisis por test de transmisión de desequilibrio (TDT) (48). Se han visto diferencias en los resultados de las asociaciones con los diseños metodológicos utilizados para analizar la asociación del polimorfismo de

un gen con el fenotipo estudiado. Así lo muestran los resultados de un estudio meta-analítico en el cual Yang B y cols, compararon estudios que buscaban asociación entre el polimorfismo del alelo de 10-repeticiones de un VNTR, ubicado en la región 3'UTR del gen *DAT1* y el TDAH. Ellos reunieron 18 estudios con metodología (TDT por sus siglas en ingles), 7 estudios de riesgo relativo basado en Haplotipo (HHRR por sus siglas en ingles) y 6 estudios de casos y controles. Se obtuvo evidencia estadísticamente significativa para heterogeneidad de los odds ratios (OR) en los estudios (TDT) (OR=1.17, IC 95% = 1.05-1.30  $\chi^2$ =8.11, df=1,  $p$ = 0.004), no siendo así en los estudios de casos y controles y los estudios (HHRR) (49) (49) (49).

Las consideraciones descritas anteriormente indican que los resultados de los estudios de asociación presentan gran variabilidad de resultados, ya que mientras en algunas poblaciones se encuentra una diferencia estadísticamente significativa entre las frecuencias alélicas y genotípicas de casos y controles o pseudocontroles, que indican asociación, otras fallan en dar esta evidencia.

Para la población de análisis del presente estudio No se encontró que el genotipo de *DAT1* de susceptibilidad genética al fenotipo de TDAH.

Estos resultados dispares pueden ser debidos a varios aspectos: diferencias en el valor de Heredabilidad entre las poblaciones, impacto del ambiente psicosocial como factor importante de riesgo, desequilibrio de Ligamiento entre el polimorfismo del VNTR analizado y otros polimorfismos funcionalmente responsables del fenotipo, influencia de haplotipos más que de SNP únicos en la susceptibilidad al fenotipo, tipo de análisis hecho, ya que en estudios caso: control está la influencia de la estratificación población y en los análisis de Test de desequilibrio de transmisión puede afectar la homocigocidad de los padres y fenotipificación de pacientes (39, 41). Se ha también establecido que dada la cantidad de estudios que no demuestran asociación de *DAT1* con TDAH, a pesar de ser biológica y fisiológicamente un candidato óptimo, este gen podría corresponder a un modulador de fenotipo de acción dependiente de la interacción con otros polimorfismos de vías dopaminérgicas como DRD4 (42).

Es sin embargo muy importante resaltar que a pesar que no hallamos una asociación con el fenotipo TDAH, si encontramos relación entre el genotipo de *DAT1* y algunas de las pruebas de la evaluación neuropsicológica realizada a la población de estudio. Este hecho destaca la importancia del uso de los endofenotipos en el análisis genético de entidades, que como TDAH, constituyen un rasgo continuo

influenciado genéticamente por varios polimorfismos con efectos independientes, en donde muy probablemente cada uno contribuye de manera pequeña a la varianza genética total (50).

La asociación hallada de endofenotipos con el genotipo de *DATI* indica que estos componentes que fueron cuantificables y que son distintos a los síntomas clínicos, además facilitan el estudio genético de enfermedades complejas.

En cuanto a las limitaciones de nuestro estudio debemos mencionar un reducido tamaño de muestra, en parte debido a que algunas de las muestras del estudio de Vélez y cols no contaban con ADN disponible, por lo que no podían ser incluidas, este tamaño de muestra inferior al calculado influye en la generalización y validez externa de los resultados. Además, la muestra solo fue tomada de colegios ubicados en la ciudad de Bogotá, por lo que estos resultados deben ser tomados cuidadosamente en otras poblaciones del país. De igual manera para lograr parear el número de controles con los casos se usaron muestras de pacientes adultos quienes no tenían el diagnóstico, pero que diferían en otras características demográficas. En estudios futuros se recomienda ampliar el tamaño de la muestra, y evaluar otras variantes genéticas del gen *DATI* y otros genes implicados que podrían estar enmascarando relaciones reportadas en estudios previos. Además es importante tener en cuenta para próximas aproximaciones ampliar la muestra hacia otras regiones del país, algunas en las que se han encontrado datos de una mayor prevalencia de la enfermedad (2).

## 11. Conclusiones

El presente estudio de asociación entre el polimorfismo del VNTR (40 pb) situado en el 3'UTR del gen transportador de Dopamina (*DATI*) es el primer reporte realizado en una muestra de la población colombiana e indicó que para los sujetos del estudio no se dio asociación entre el polimorfismo y el fenotipo de TDAH o sus subtipos. A nivel mundial se han reportado asociaciones positivas y negativas, explicadas por varios factores étnicos, ambientales, de estratificación poblacional entre otros.

Se encontraron asociaciones entre el genotipo y los test que miden flexibilidad cognitiva y el índice de comprensión verbal del WISC, lo que podría asociarse con la importancia del genotipo del gen *DATI* en la aparición de endofenotipos descritos en pacientes afectados de TDAH.

Las pruebas que más se ven afectadas en los niños con TDAH son las que evalúan la capacidad para adaptarse a medios cambiantes; lo que explicaría en parte la dificultad de estos individuos para rendir en el medio escolar y resalta la importancia de objetivar más el diagnóstico teniendo siempre en cuenta

el compromiso de las funciones ejecutivas las cuales podrían ser utilizadas como test de tamizaje en la detección del trastorno.

Se describen por primera vez estadísticos genéticos de poblaciones del polimorfismo analizado en una muestra de la población colombiana.

## **12. Perspectivas**

La realización de nuevos estudios con tamaños de muestra más amplios en población colombiana y/o latinoamericana es necesaria para la replicación de los resultados obtenidos en este estudio. Estudios con mayores tamaños de muestra, además, permitirían la identificación de alelos de baja frecuencia en este polimorfismo que son difíciles de detectar en bajos tamaños poblacionales, como es el caso de nuestro estudio. Por otro lado, serán necesarios los estudios funcionales que permitan dilucidar con mayor claridad el papel biológico que cumple este polimorfismo en la alteración de las pruebas neuropsicológicas mencionadas, con el fin de proponer herramientas biológicas de prevención de este tipo de trastornos y/o nuevos blancos terapéuticos más precisos y eficaces.

Las pruebas neuropsicológicas desde el punto de vista que fueron enfocadas en este estudio, brindan la posibilidad de realizar un acercamiento valioso como test de tamizaje en la población escolar, si bien no todas muestran una correlación con el fenotipo del TDAH algunas tienen valor para lograr una aproximación inicial a las dificultades de estos escolares. Un abordaje temprano de este desorden podría aliviar la carga posterior que este genera a los sistemas escolares, médicos y familiares. Aunque aún dista la posibilidad de disponer de test genéticos en la práctica clínica psiquiátrica, en parte debido al carácter multifactorial de la mayoría de las entidades psiquiátricas, no es extraño pensar en que estos en próximos tiempos podrían llegar a formar parte integral de los intentos por objetivar los diagnósticos psiquiátricos los cuales aún se encuentran en búsqueda del arraigo biológico, si bien ahora se cuenta con la posibilidad de las entrevistas estructuradas los intentos por lograr encontrar marcadores biológicos, sin duda nos llevarán a buscar en la enciclopedia genética.

## **13. Bibliografía**

1. Velez-Van-Meerbeke A T-GC, Gonzalez-Reyes R, Ibañez-Pinilla M. prevalencia de trastorno por déficit de atención con hiperactividad en estudiantes de escuelas de Bogota, Colombia. Acta neurol colomb. 2008;24(1):6-12. es.

2. Pineda DA, Lopera F, Palacio JD, Ramirez D, Henao GC. Prevalence estimations of attention-deficit/hyperactivity disorder: differential diagnoses and comorbidities in a Colombian sample. *Int J Neurosci*. 2003 Jan;113(1):49-71. PubMed PMID: 12691001.
3. Cannon TD, Gasperoni TL, van Erp TG, Rosso IM. Quantitative neural indicators of liability to schizophrenia: implications for molecular genetic studies. *Am J Med Genet*. 2001 Jan 8;105(1):16-9. PubMed PMID: 11424984.
4. Velez-van-Meerbeke A, Zamora IP, Guzman G, Figueroa B, Lopez Cabra CA, Talero-Gutierrez C. Evaluating executive function in schoolchildren with symptoms of attention deficit hyperactivity disorder. *Neurologia*. 2012 Aug 17. PubMed PMID: 22906981. Evaluacion de la funcion ejecutiva en una poblacion escolar con sintomas de deficit de atencion e hiperactividad.
5. Gainetdinov RR, Jones SR, Caron MG. Functional hyperdopaminergia in dopamine transporter knock-out mice. *Biol Psychiatry*. 1999 Aug 1;46(3):303-11. PubMed PMID: 10435196.
6. Vera A RM, Ramirez LP. Características clínicas y neurobiológicas del trastorno por déficit de la atención e hiperactividad. *Colomb Med*. 2007;38(4):433 - 9. español.
7. Association AP. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders DSM-IV-TR 4Tth Edition: Text revision ed. Washington D.C.: American Psychaitric Association; 2000.
8. (AEPNYA) AEdPdNyDA. Manual de psiquiatria del niño y del adolescente. 1 edición ed. Sanz CSEMJM, editor. Madrid: Asociacion Española de Psiquiatría del Niño y del Adolescente; 2010. 438 p.
9. Faraone SV, Perlis RH, Doyle AE, Smoller JW, Goralnick JJ, Holmgren MA, et al. Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry*. 2005 Jun 1;57(11):1313-23. PubMed PMID: 15950004.
10. Polanczyk G, de Lima MS, Horta BL, Biederman J, Rohde LA. The worldwide prevalence of ADHD: a systematic review and metaregression analysis. *Am J Psychiatry*. 2007 Jun;164(6):942-8. PubMed PMID: 17541055.
11. Acero-Gonzalez A VR. Psiquiatria infantil en el hospital pediátrico rev colomb psiquiatr. 2007;36(3):460-70. es.
12. Posada-Villa J.A. A-GSA, Magaña C.G., Gómez L.C. Prevalencia de trastornos mentales y uso de servicios: resultados preliminares del Estudio nacional de salud mental. Colombia, 2003. rev colomb psiquiatr. 2004;33(3):241-62. es.
13. Biederman J, Faraone SV. Attention-deficit hyperactivity disorder. *Lancet*. 2005 Jul 16-22;366(9481):237-48. PubMed PMID: 16023516.
14. Gizer IR, Ficks C, Waldman ID. Candidate gene studies of ADHD: a meta-analytic review. *Hum Genet*. 2009 Jul;126(1):51-90. PubMed PMID: 19506906.
15. Sprich S, Biederman J, Crawford MH, Mundy E, Faraone SV. Adoptive and biological families of children and adolescents with ADHD. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2000 Nov;39(11):1432-7. PubMed PMID: 11068899.
16. Yang B, Chan RC, Jing J, Li T, Sham P, Chen RY. A meta-analysis of association studies between the 10-repeat allele of a VNTR polymorphism in the 3'-UTR of dopamine transporter gene and attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2007 Jun 5;144B(4):541-50. PubMed PMID: 17440978.
17. Fuke S, Suo S, Takahashi N, Koike H, Sasagawa N, Ishiura S. The VNTR polymorphism of the human dopamine transporter (DAT1) gene affects gene expression. *Pharmacogenomics J*. 2001;1(2):152-6. PubMed PMID: 11911442.

18. Mitchell RJ, Howlett S, Earl L, White NG, McComb J, Schanfield MS, et al. Distribution of the 3' VNTR polymorphism in the human dopamine transporter gene in world populations. *Hum Biol.* 2000 Apr;72(2):295-304. PubMed PMID: 10803661.
19. Spencer T, Biederman J, Wilens T. Pharmacotherapy of attention deficit hyperactivity disorder. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am.* 2000 Jan;9(1):77-97. PubMed PMID: 10674191.
20. Dougherty DD, Bonab AA, Spencer TJ, Rauch SL, Madras BK, Fischman AJ. Dopamine transporter density in patients with attention deficit hyperactivity disorder. *Lancet.* 1999 Dec 18-25;354(9196):2132-3. PubMed PMID: 10609822.
21. Cook EH, Jr., Stein MA, Krasowski MD, Cox NJ, Olkon DM, Kieffer JE, et al. Association of attention-deficit disorder and the dopamine transporter gene. *Am J Hum Genet.* 1995 Apr;56(4):993-8. PubMed PMID: 7717410. Pubmed Central PMCID: 1801209.
22. Gill M, Daly G, Heron S, Hawi Z, Fitzgerald M. Confirmation of association between attention deficit hyperactivity disorder and a dopamine transporter polymorphism. *Mol Psychiatry.* 1997 Jul;2(4):311-3. PubMed PMID: 9246671.
23. Waldman ID, Rowe DC, Abramowitz A, Kozel ST, Mohr JH, Sherman SL, et al. Association and linkage of the dopamine transporter gene and attention-deficit hyperactivity disorder in children: heterogeneity owing to diagnostic subtype and severity. *Am J Hum Genet.* 1998 Dec;63(6):1767-76. PubMed PMID: 9837830. Pubmed Central PMCID: 1377649.
24. Daly G, Hawi Z, Fitzgerald M, Gill M. Mapping susceptibility loci in attention deficit hyperactivity disorder: preferential transmission of parental alleles at DAT1, DBH and DRD5 to affected children. *Mol Psychiatry.* 1999 Mar;4(2):192-6. PubMed PMID: 10208453.
25. Barr CL, Xu C, Kroft J, Feng Y, Wigg K, Zai G, et al. Haplotype study of three polymorphisms at the dopamine transporter locus confirm linkage to attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry.* 2001 Feb 15;49(4):333-9. PubMed PMID: 11239904.
26. Curran S, Mill J, Tahir E, Kent L, Richards S, Gould A, et al. Association study of a dopamine transporter polymorphism and attention deficit hyperactivity disorder in UK and Turkish samples. *Mol Psychiatry.* 2001 Jul;6(4):425-8. PubMed PMID: 11443527.
27. Chen CK, Chen SL, Mill J, Huang YS, Lin SK, Curran S, et al. The dopamine transporter gene is associated with attention deficit hyperactivity disorder in a Taiwanese sample. *Mol Psychiatry.* 2003 Apr;8(4):393-6. PubMed PMID: 12740596.
28. Palmer CG, Bailey JN, Ramsey C, Cantwell D, Sinsheimer JS, Del'Homme M, et al. No evidence of linkage or linkage disequilibrium between DAT1 and attention deficit hyperactivity disorder in a large sample. *Psychiatr Genet.* 1999 Sep;9(3):157-60. PubMed PMID: 10551548.
29. Holmes J, Payton A, Barrett JH, Hever T, Fitzpatrick H, Trumper AL, et al. A family-based and case-control association study of the dopamine D4 receptor gene and dopamine transporter gene in attention deficit hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry.* 2000 Sep;5(5):523-30. PubMed PMID: 11032386.
30. Swanson JM, Flodman P, Kennedy J, Spence MA, Moyzis R, Schuck S, et al. Dopamine genes and ADHD. *Neurosci Biobehav Rev.* 2000 Jan;24(1):21-5. PubMed PMID: 10654656.
31. Todd RD, Jong YJ, Lobos EA, Reich W, Heath AC, Neuman RJ. No association of the dopamine transporter gene 3' VNTR polymorphism with ADHD subtypes in a population sample of twins. *Am J Med Genet.* 2001 Dec 8;105(8):745-8. PubMed PMID: 11803523.
32. Oh KS, Shin DW, Oh GT, Noh KS. Dopamine transporter genotype influences the attention deficit in Korean boys with ADHD. *Yonsei Med J.* 2003 Oct 30;44(5):787-92. PubMed PMID: 14584093.

33. Doyle AE, Willcutt EG, Seidman LJ, Biederman J, Chouinard VA, Silva J, et al. Attention-deficit/hyperactivity disorder endophenotypes. *Biol Psychiatry*. 2005 Jun 1;57(11):1324-35. PubMed PMID: 15950005.
34. Bidwell LC, Willcutt EG, Defries JC, Pennington BF. Testing for neuropsychological endophenotypes in siblings discordant for attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry*. 2007 Nov 1;62(9):991-8. PubMed PMID: 17585884. Pubmed Central PMCID: 2687149.
35. Barkley RA, Smith KM, Fischer M, Navia B. An examination of the behavioral and neuropsychological correlates of three ADHD candidate gene polymorphisms (DRD4 7+, DBH TaqI A2, and DAT1 40 bp VNTR) in hyperactive and normal children followed to adulthood. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2006 Jul 5;141B(5):487-98. PubMed PMID: 16741944. Pubmed Central PMCID: 2562041.
36. Rosselli Cock M, Matute Villasenor E, Ardila Ardila A, Botero Gomez VE, Tangarife Salazar GA, Echevarria Pulido SE, et al. [Neuropsychological Assessment of Children: a test battery for children between 5 and 16 years of age. A Colombian normative study]. *Revista de neurologia*. 2004 Apr 16-30;38(8):720-31. PubMed PMID: 15122541. Evaluacion Neuropsicologica Infantil (ENI): bateria para la evaluacion de ninos entre 5 y 16 anos de edad. Estudio normativo colombiano.
37. Kim JW, Kim BN, Cho SC. The dopamine transporter gene and the impulsivity phenotype in attention deficit hyperactivity disorder: a case-control association study in a Korean sample. *J Psychiatr Res*. 2006 Dec;40(8):730-7. PubMed PMID: 16368111.
38. Xu X, Mill J, Sun B, Chen CK, Huang YS, Wu YY, et al. Association study of promoter polymorphisms at the dopamine transporter gene in Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *BMC Psychiatry*. 2009;9:3. PubMed PMID: 19196467. Pubmed Central PMCID: 2644291.
39. Banaschewski T, Becker K, Scherag S, Franke B, Coghill D. Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder: an overview. *Eur Child Adolesc Psychiatry*. 2010 Mar;19(3):237-57. PubMed PMID: 20145962. Pubmed Central PMCID: 2839490.
40. El-Tarras AE, Alsulaimani AA, Awad NS, Mitwaly N, Said MM, Sabry AM. Association study between the dopamine-related candidate gene polymorphisms and ADHD among Saudi Arabia population via PCR technique. *Mol Biol Rep*. 2012 Dec;39(12):11081-6. PubMed PMID: 23076524.
41. Laucht M, Skowronek MH, Becker K, Schmidt MH, Esser G, Schulze TG, et al. Interacting effects of the dopamine transporter gene and psychosocial adversity on attention-deficit/hyperactivity disorder symptoms among 15-year-olds from a high-risk community sample. *Arch Gen Psychiatry*. 2007 May;64(5):585-90. PubMed PMID: 17485610.
42. Kebir O, Joobar R. Neuropsychological endophenotypes in attention-deficit/hyperactivity disorder: a review of genetic association studies. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2011 Dec;261(8):583-94. PubMed PMID: 21409419.
43. Capilla Gonzalez A, Etchepareborda MC, Fernandez Gonzalez S, Mulas F, Campo P, Maestu F, et al. [The neurofunctional foundation of cognitive rigidity in attention deficit hyperactivity disorder: some preliminary findings]. *Revista de neurologia*. 2004 Feb;38 Suppl 1:S145-8. PubMed PMID: 15011169. Sustrato neurofuncional de la rigidez cognitiva en el trastorno por deficit de atencion con hiperactividad: resultados preliminares.
44. Bellgrove MA, Hawi Z, Kirley A, Gill M, Robertson IH. Dissecting the attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) phenotype: sustained attention, response variability and spatial attentional asymmetries in relation to dopamine transporter (DAT1) genotype. *Neuropsychologia*. 2005;43(13):1847-57. PubMed PMID: 16168728.

45. Roman T, Schmitz M, Polanczyk G, Eizirik M, Rohde LA, Hutz MH. Attention-deficit hyperactivity disorder: a study of association with both the dopamine transporter gene and the dopamine D4 receptor gene. *Am J Med Genet.* 2001 Jul 8;105(5):471-8. PubMed PMID: 11449401.
46. Bellgrove MA, Barry E, Johnson KA, Cox M, Daibhis A, Daly M, et al. Spatial attentional bias as a marker of genetic risk, symptom severity, and stimulant response in ADHD. *Neuropsychopharmacology.* 2008 Sep;33(10):2536-45. PubMed PMID: 18046306.
47. Karama S, Grizenko N, Sonuga-Barke E, Doyle A, Biederman J, Mbekou V, et al. Dopamine transporter 3'UTR VNTR genotype is a marker of performance on executive function tasks in children with ADHD. *BMC Psychiatry.* 2008;8:45. PubMed PMID: 18559107. Pubmed Central PMCID: 2443797.
48. Wang Y, Wang Z, Yao K, Tanaka K, Yang Y, Shirakawa O, et al. Lack of association between the dopamine transporter gene 3' VNTR polymorphism and attention deficit hyperactivity disorder in Chinese Han children: case-control and family-based studies. *Kobe J Med Sci.* 2007;53(6):327-33. PubMed PMID: 18762727.
49. Yang B CR, Jing J, Li T, Sham P, Chen R. A Meta-Analysis of Association Studies Between the 10-repeat Allele of a VNTR Polymorphism in the 3'-UTR of dopamine Transporter Gene and Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *American Journal of Medical Genetics Part B (Neuropsychiatric Genetics).* 2007;144B:541-50.
50. Cornish KM, Manly T, Savage R, Swanson J, Morisano D, Butler N, et al. Association of the dopamine transporter (DAT1) 10/10-repeat genotype with ADHD symptoms and response inhibition in a general population sample. *Mol Psychiatry.* 2005 Jul;10(7):686-98. PubMed PMID: 15809660.