

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
Instituto de Biociências  
Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

DIFERENTES ABORDAGENS NA IDENTIFICAÇÃO DE GENES DE  
SUSCETIBILIDADE PARA O TRANSTORNO DE DÉFICIT DE  
ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE (TDAH)

ANA PAULA MIRANDA GUIMARÃES

Tese submetida ao Programa de Pós-  
Graduação em Genética e Biologia  
Molecular da Universidade Federal  
do Rio Grande do Sul como requisito  
parcial para obtenção do grau de  
Doutor em Ciências

ORIENTADORA: Profa. Dra. MARA HELENA HUTZ

Porto Alegre, Janeiro de 2009

---

## INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

---

As pesquisas realizadas no laboratório de DNA do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul foram subvencionadas pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Instituto do Milênio, Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX, Brasil) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS, Brasil).

A aluna recebeu bolsa de estudos concebida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

“O mais importante e bonito do mundo é isto;  
que as pessoas não estão sempre iguais, ainda não foram  
terminadas, mas que elas vão sempre mudando.  
Afinam ou desafinam. Verdade maior. É o que a vida me ensinou.”

João Guimarães Rosa

Dedico este trabalho a todas as  
famílias que aceitaram participar  
desta pesquisa por um motivo  
muito maior: a esperança por uma  
vida melhor para seus filhos.

---

## AGRADECIMENTOS

---

Ao longo deste percurso foram muitas as pessoas que me apoiaram e ajudaram. Devido a isso agradeço:

Primeiramente, a minha família, em especial a minha irmã, que sempre foi e é a luz do meu caminho, minha melhor amiga e conselheira. Ao meu pai por todo incentivo e apóio em todos os momentos da minha vida pessoal e acadêmica.

Ao Victor, que apenas um pequeno parágrafo não será suficiente, agradeço por todos os momentos compartilhados. Por ser tão especial na minha vida e por ter me ajudado em todos os passos deste longo percurso, sempre com muita paciência, principalmente, nos momentos difíceis. Obrigada, também, pelas dicas e configurações feitas nesta Tese.

Aos colegas dos Laboratórios de DNA e eletroforese 114 e 116 pela convivência e parceria.

Às amigas de Laboratório Verônica Contini, Marilu Fiegenbaum, Verônica Zembrzuski, Fabiana Kohlrausch, Silvana de Almeida, Angélica Oliveira, Tatiana Roman, Sandrine, Luciana e Tatiana Gonzalez pelo apoio e ajuda em diversos assuntos, tanto profissionais quanto pessoais. Alguns momentos especiais: pelas muitas e longas conversas com a Sandrine. Pelas festinhas e momentos divertidos com as Vês. Pelas brincadeiras com a Angélica que se tornou especial para mim. Enfim pela convivência com todas essas pessoas que fizeram a caminhada deste percurso menos cansativa.

Em especial, à amiga Janaína Jaeger, que mesmo com alguns tropeços e desvios neste percurso, não posso deixar de agradecer por toda ajuda, apoio e companheirismo ao longo deste tempo.

Outra amiga que também merece agradecimentos especiais é a Júlia Genro. Obrigada pelas conversas e conselhos indispensáveis. Pela companhia nos congressos e, principalmente, nas viagens por este mundão, que realmente foram especiais e ficarão na minha memória para sempre e tua companhia fez estas mais especiais ainda.

A toda equipe do PRODAH (Programa do Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade), em especial aos que participaram diretamente deste estudo com a coleta da amostra e avaliação clínica: Cristian Zeni, Guilherme Polanczyk, Marcelo Schmitz, Sílvia Martins, Silzá Tramontina, Cláudia Szobot, e a Clarissa Paim -secretária do programa- pela paciência, competência e carisma que trata os assuntos gerais do grupo.

Dentro ainda do grupo acima, um agradecimento especial ao prof. Luis Augusto Rohde por sempre ajudar e aconselhar em todas as etapas desta Tese que sempre a fez com boa vontade e disposição.

À profa. Mara Helena Hutz pela orientação e pela confiança, assim como por todos os ensinamentos que me proporcionou. Além disso, por ter também me proporcionado trabalhar neste grupo e neste projeto que, para mim, foram muito especiais e motivador.

Ao prof. Claiton Baú, pelo auxílio em assuntos científicos, por estar sempre disposto ajudar.

À profa. Sídia pelo auxílio nos assuntos estatísticos, por ser um exemplo de boa pessoa e acima de tudo boa professora.

Ao Elmo Cardoso e á Helen, pela ajuda e pela paciência em assuntos técnicos e burocráticos que sempre realizaram e realizam com muita boa vontade, bom humor e competência.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Unidades .....	07
Resumo .....	08
Abstract .....	10
Capítulo 1 Introdução.....	12
1.1. Histórico.....	13
1.2. Caracterização da Doença.....	13
1.3. Tratamento .....	19
1.4. Etiologia .....	20
1.5. Neurobiologia.....	24
1.6. Estudos Moleculares .....	27
1.6.1. Sistema Dopaminérgico.....	27
1.6.2. Sistema Noradrenérgico.....	28
1.6.3. Sistema Serotoninérgico .....	29
1.7. Estudos farmacogenéticos.....	33
Capítulo 2 Justificativas e Objetivos.....	35
Capítulo 3 Further Evidence for the Association between Attention Deficit / Hyperactivity Disorder and the Serotonin Receptor 1B Gene .....	38
Capítulo 4 Association study of six genes with attention deficit/hyperactivity disorder-predominantly inattentive type .....	55
Capítulo 5 MAOA Is Associated With Methylphenidate Improvement of Oppositional Symptoms in boys with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder .....	76
Capítulo 6 Discussão.....	90
Capítulo 7 Referências Bibliográficas .....	95
Capítulo 8 Anexos .....	118

---

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

---

3' UTR – Região 3' não traduzida

5-HT – Serotonina

5-HTT ou SLC6A4 – Transportador de serotonina

5-HTTLPR - Polimorfismo de inserção/deleção de 44pb localizado na região promotora do gene 5-HTT

ADRA2A – Gene do receptor adrenérgico tipo 2A

ADT - Antidepressivos tricíclicos

APA - American Psychiatric Association

COMT - Enzima catecol-O-metiltransferase

CPF – Córtex pré-frontal

DA – Dopamina

DAT – Transportador de dopamina

DAT1 ou SLC6A3 – Gene Transportador de dopamina

DBH – Enzima dopamina-beta-hidroxilase

DRD4 – Receptor de dopamina tipo 4

HTR1B – Gene do receptor de serotonina subtipo 1B

HTR2A - Gene do receptor de serotonina subtipo 2A

MAOA – Enzima monoamino oxidase A

MFD – Metilfenidato

NE – Noradrenalina

SLC6A2 – Transportador de noradrenalina

SNPs – Polimorfismos de base única

TC – Transtorno de Conduta

TDAH – Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade

TL – Transtorno de Leitura

TOD – Transtorno Opositor-Desafiante

TPH 1 – Enzima triptofano hidroxilase 1

TPH 2 – Enzima triptofano hidroxilase 2

VNTR – Número variável de repetições em tandem

O Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) está entre os transtornos mentais mais comuns na infância e na adolescência, afetando em torno de 5% das crianças em idade escolar no mundo. Esta patologia caracteriza-se por sintomas de desatenção, de hiperatividade e de impulsividade, causando significantes problemas sociais, educacionais e psicológicos. Embora sua etiologia ainda não esteja totalmente esclarecida, existem fortes evidências mostrando que fatores genéticos desempenham um papel importante na doença. Muitos genes são considerados como possíveis genes de suscetibilidade para este transtorno, principalmente aqueles do sistema dopaminérgico, que são alvos diretos dos agentes farmacológicos. Embora menos investigados, os genes do sistema serotoninérgico são potencialmente importantes na suscetibilidade ao TDAH devido à extensa relação que possui com o sistema dopaminérgico. Várias investigações sugerem que genes serotoninérgicos estão envolvidos em comportamentos impulsivos e hiperativos, que ocorrem no TDAH. No presente estudo foram analisados cinco genes do sistema serotoninérgico (*HTR1B*, *5HTT*, *HTR2A*, *TPH-2* e *MAOA*), dois genes do sistema dopaminérgico (*DAT* e *DRD4*) e um gene do sistema noradrenérgico (*DBH*). No gene *HTR1B* foram investigados três polimorfismos em uma amostra composta por 343 crianças com TDAH e seus pais biológicos. Destas, 143 eram exclusivamente do subtipo desatento. Na amostra total o haplótipo -261T/-161T/861G foi preferencialmente transmitido dos pais para as crianças com TDAH ( $p=0.014$ ), nenhuma associação específica foi observada quando a análise foi restrita ao subtipo desatento de TDAH. Os resultados deste estudo sugerem um papel do gene *HTR1B* na neurobiologia do transtorno em crianças. Os genes *5HTT*, *HTR2A*, *TPH-2*, *DAT*, *DRD4* e *DBH* foram analisados em uma amostra composta de 128 pacientes do subtipo desatento. Nenhuma associação significativa foi observada neste estudo. Esses resultados sugerem que estratificar as amostras de TDAH por subtipos clínicos da doença parecem não contribuir significativamente para a identificação de novos genes de suscetibilidade. Uma abordagem farmacogenética foi realizada utilizando o gene *MAOA* como marcador. Um polimorfismo na região promotora associado à atividade transcricional do gene (uVNTR) foi investigado em 85 meninos afetados com TDAH em uso de metilfenidato. Evidenciou-se uma interação significativa entre o alelo de alta



atividade do gene e melhora dos sintomas de oposição após três meses de tratamento com metilfenidato ( $p=0,009$ ). Esses resultados demonstram que a melhora de sintomas observada, após os três meses de tratamento, é influenciada pelo genótipo do paciente. Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que futuramente esses estudos poderão auxiliar no diagnóstico, aprimoramento e desenvolvimento de fármacos e conseqüentemente na melhoria de vida dos pacientes afetados pelo transtorno.

Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD) is among the most common childhood and adolescence psychiatric disorder, affecting around 5% of school-age children worldwide. This disease is characterized by inattentive, impulsive and hyperactive behavior, causing significant social, educational and psychological difficulties. Although its etiology remains unclear, there is strong evidence supporting the role of genes in the disorder. Many genes are considered as susceptibility genes for this disease, especially those from the dopaminergic system, that are the main targets for pharmacological agents. Although less investigated, serotonergic genes are potentially important on ADHD susceptibility due to their extensive relation with the dopaminergic system. Many investigations suggest that serotonergic genes are involved in ADHD impulsive and hyperactive behaviors. In the current study five genes from the serotonergic system (*HTR1B*, *5HTT*, *HTR2A*, *TPH-2* e *MAOA*), two genes from dopaminergic system (*DAT* e *DRD4*) and one gene from the noradrenergic system (*DBH*) have been investigated. Three polymorphisms *HTR1B* gene have been investigated in a samples of 343 children diagnosed with ADHD and their biological parents. From these, 143 presented the inattentive subtype. In the total sample haplotype -261T/-161T/861G has been preferentially transmitted from the parents to the children with ADHD ( $p=0.014$ ), no specific association has been observed when the analysis has been restricted to the inattentive subtype. The results from this study suggest a role for *HTR1B* gene at the neurobiology disorder in children. The *5HTT*, *HTR2A*, *TPH-2*, *DAT*, *DRD4* and *DBH* genes have been studied in a sample composed by 128 patients with the inattentive subtype. No significant association has been observed at this study. These results suggest that the sample stratification by clinical disease subtype does not seem to significantly contribute to the identification of new susceptibility genes. A pharmacogenetic approach has been performed using the *MAOA* gene as a marker. A polymorphism at the promoter region associated with gene transcriptional activity (uVNTR) has been investigated in 85 boys affected with ADHD and submitted to treatment with Methylphenidate. A significant interaction between the gene high activity allele and an improvement on the opposition symptoms has been evidenced after three months of treatment with Methylphenidate ( $p=0.009$ ). These results demonstrate that the improvement observed on the symptoms after three months of treatment is influenced by the patient genotype. The results obtained

suggest that this study could assist in the diagnosis, improvement and development of drugs in the future, improving life quality from patients affected by the disorder.

---

**Capítulo 1**  
INTRODUÇÃO

---

## **1.1. Histórico**

O Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) é conhecido há bastante tempo, porém não com essa denominação. As primeiras referências a esse transtorno na literatura não-médica datam da metade do século XIX (Hoffmann, 1854), enquanto que a primeira descrição clínica ocorreu em 1902 (Still, 1902). Primeiramente, foi chamado de “lesão cerebral mínima” e depois “disfunção cerebral mínima”, reconhecendo-se assim que as alterações características da síndrome se relacionam mais à disfunção em vias nervosas do que propriamente a lesões nas mesmas (Clements, 1966). Em 1950, o nome foi modificado para “síndrome da criança hiperativa”. Em 1967, na segunda edição do Manual de Diagnóstico e Estatística dos Transtornos Mentais (DSM-II, American Psychiatric Association, APA), o nome foi modificado novamente para “reação hipercinética da infância” (APA, 1967). As duas últimas designações demonstraram bem a maior ênfase dada para os sintomas de hiperatividade e impulsividade como marca principal da doença. O DSM-III representou um marco importante, pois se começou a enfatizar a desatenção como componente da doença, além da hiperatividade. Então, em 1980 no DSM-III foi publicado o novo nome para a doença, Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) (APA, 1980). No entanto, o maior foco na hiperatividade como principal característica da doença ainda ocorria. Em 1987, na revisão do DSM-III, foi dado finalmente igual peso para desatenção e para hiperatividade como características do transtorno (APA, 1987). Já, no DSM-IV, em 1994, foram definidos três principais subtipos para o TDAH: combinado, desatento e hiperativo (APA, 1994). Atualmente, utiliza-se o DSM-IV que, em 2000, foi revisado, mantendo os mesmos critérios para o TDAH (APA, 2000).

## **1.2. Caracterização da Doença**

O TDAH é uma das doenças mentais mais frequentes na psiquiatria infanto-juvenil (Smalley, 1997; Biederman, 1998). A sua prevalência mundial é estimada em cerca de 5% (Polanczyk e cols., 2007a).

A criança e o adolescente com TDAH caracterizam-se por um considerável grau de desatenção, acentuada distração, impulsividade e hiperatividade (Smalley, 1997; Rohde e cols., 1999a). Tanto os pais quanto os professores das crianças e adolescentes com TDAH descrevem-nas como se estivessem no “mundo da lua” ou como se

estivessem “ligadas em uma tomada de 220V”. Esses comportamentos seriam respectivamente causados pela acentuada desatenção e excessiva hiperatividade (Teixeira, 2006). Essas características causam prejuízos significantes na família, nos relacionamentos e no sucesso escolar, além de aumentar o risco de isolamento social, sérios acidentes no trânsito e desenvolvimento de outras psicopatologias (Tannock, 1998).

O diagnóstico do TDAH é fundamentalmente clínico e baseia-se em critérios operacionais claros e bem definidos, provenientes de sistemas classificatórios como o DSM-IV ou a CID-10 (Organização Mundial de Saúde, 1993).

O DSM-IV classifica os sintomas do TDAH em dois grupos: desatenção e hiperatividade-impulsividade (Tabela 1). De acordo com esses critérios, são necessários para caracterizar o TDAH seis ou mais sintomas em pelo menos um dos grupos, no mínimo por seis meses com caracterização de prejuízo em função destes sintomas em mais de um ambiente (por exemplo: casa e escola) e início do prejuízo antes dos sete anos de idade. Com base nesses sintomas, o DSM-IV subdivide o TDAH em três tipos clínicos: 1) TDAH predominantemente desatento, no qual o paciente deve apresentar seis ou mais sintomas do primeiro grupo; 2) TDAH predominantemente hiperativo, no qual o paciente deve apresentar seis ou mais sintomas do segundo grupo; 3) TDAH combinado, no qual o paciente deve apresentar seis ou mais sintomas em cada um dos dois grupos.

A prevalência de cada subtipo é bem variada em amostras clínicas, no qual o subtipo combinado é o mais comum, possuindo uma estimativa entre 50% a 75% dos casos, seguido pelo subtipo desatento estimado entre 20% a 30% dos casos e por último o subtipo hiperativo, representando menos de 15% dos casos (Morgan e cols., 1996; Faraone e cols., 1998). No entanto, observa-se uma inversão de prevalência entre o subtipo combinado e o subtipo desatento em amostras da comunidade, no qual o subtipo desatento é mais freqüente (Wolraich e cols., 1996; Gaub e cols., 1997). O subtipo hiperativo é o de menor prevalência nos dois tipos de amostra, existindo um consenso para este dado. Crianças com o subtipo desatento parecem apresentar mais dificuldades na escola e na realização dos temas, mas poucos problemas com a família e com os colegas. Entretanto, crianças com o subtipo hiperativo, sendo mais agressivas e impulsivas, parecem ir, relativamente, bem na escola e na realização dos temas, mas possuem dificuldades de relacionamento tanto com a família quanto com os colegas,

apresentando um alto grau de impopularidade e de rejeição (Rohde e Halpern, 2004; Spencer e cols., 2007).

A proporção entre meninos e meninas afetados com o transtorno varia de aproximadamente 2:1 em estudos populacionais até 9:1 em estudos clínicos, contudo há uma concordância nesses estudos que existe uma maior prevalência de meninos afetados (Rohde e Halpern, 2004). Entretanto, alguns autores sugerem que a prevalência do TDAH é semelhante entre os sexos (Breen e Altepeter, 1990; Rohde e cols., 1999b). Essa contrariedade provavelmente ocorre pelo sub-diagnóstico das meninas, pois estas têm poucos sintomas de agressividade e impulsividade, baixas taxas de transtorno de conduta (TC) e transtorno opositor desafiante (TOD) e alto nível de co-morbidade com transtorno de humor e ansiedade. Desse modo, a idade diagnóstica tende a ser mais avançada em relação aos meninos (Cantwell, 1996; Biederman e cols., 1999).

A prevalência dos subtipos também difere entre gêneros. Meninas com TDAH são mais freqüentemente do subtipo desatento. A probabilidade é de aproximadamente duas vezes de serem diagnosticadas com esse subtipo em comparação aos meninos. Assim como possuem menos sintomas de hiperatividade em comparação aos meninos (Biederman e cols., 2002; Spencer e cols., 2007).

Com relação ao TDAH na vida adulta, sabe-se que os sintomas persistem em cerca de 60% dos indivíduos (Wender e cols., 2001; Comings e cols., 2005). Em adultos, diferentemente do TDAH em crianças e adolescentes, a razão entre homens e mulheres é próxima de 1:1 (Murphy e Barkley, 1996, Grevet e cols., 2006). Estudos demonstraram que sintomas de hiperatividade e impulsividade tendem a diminuir mais precocemente, enquanto os sintomas de desatenção, desorganização e distração são mais duradouros (Swanson e cols., 1998a). Por isso, adultos com TDAH apresentam, mais freqüentemente, acentuada desatenção, distração, dificuldade de organização e pobre eficiência, levando ao insucesso acadêmico e profissional (Spencer e cols., 2007).

A caracterização dos adultos brasileiros com TDAH parece não diferir daquela descrita em outros ambientes e culturas (Grevet e cols., 2006).

Um aspecto muito comum nas doenças psiquiátricas é a co-ocorrência com outras doenças. No TDAH, entre 50% a 80% dos casos apresentam alguma co-morbidade, sendo mais freqüentes os transtornos disruptivos do comportamento (TC e TOD), os transtornos de ansiedade, os transtornos de aprendizagem, os transtornos de humor bipolar (THB) e a depressão (Biederman, 1998). Além desses, outros estudos demonstram que adolescentes e adultos com TDAH possuem uma alta prevalência de

transtornos de abuso ou dependência de drogas (Figura 1). Adolescentes diagnosticados com TDAH experimentam drogas mais precocemente, usam-nas em maior quantidade e tornam-se mais dependentes em comparação aos que não possuem o transtorno. Esse quadro estaria relacionado a uma tendência de automedicação por parte dos adolescentes, na busca por alívio dos sintomas característicos do TDAH (Teixeira, 2006). Estudos sugerem que os adolescentes envolvem-se primeiramente com cigarro, seguido por álcool e então se envolvem com drogas (Wilens e cols., 1998, Spencer e cols., 2007).



**Tabela 1:** Critérios diagnósticos do TDAH segundo o DSM-IV

---

Grupo 1

Desatenção:

- a) freqüentemente deixa de prestar atenção a detalhes ou comete erros por descuidos em atividades escolares, de trabalho ou outras;
- b) com freqüência tem dificuldades para manter a atenção em tarefas ou atividades lúdicas;
- c) com freqüência parece não escutar quando lhe dirige a palavra;
- d) com freqüência não segue as instruções e não termina seus deveres escolares, tarefas domésticas ou deveres profissionais (não devido a comportamento de oposição ou incapacidade de compreender instruções);
- e) com freqüência tem dificuldade para organizar tarefas e atividades;
- f) com freqüência evita, antipatiza ou reluta em envolver-se em tarefas que exijam esforço mental constante (como tarefas escolares ou deveres de casa);
- g) com freqüência perde coisas necessárias para tarefas ou atividades (por exemplo, brinquedos, tarefas escolares, lápis, livros, ou outros materiais);
- h) é facilmente distraído por estímulos alheios às tarefas;
- i) com freqüência apresenta esquecimento em atividades diárias;

Grupo 2

Hiperatividade:

- a) freqüentemente agita as mãos ou os pés ou se remexe na cadeira;
- b) freqüentemente abandona a sua cadeira em sala de aula ou outras situações nas quais se espera que permaneça sentado;
- c) freqüentemente corre ou escala em demasia, em situações nas quais isso é inapropriado (em adolescentes e adultos, pode estar limitado a sensações subjetivas de inquietação);
- d) com freqüência tem dificuldade para brincar ou se envolver silenciosamente em atividades de lazer;
- e) esta freqüentemente “a mil” ou muitas vezes age como se estivesse “a todo vapor”;
- f) freqüentemente fala em demasia;

Impulsividade:

- g) freqüentemente dá respostas precipitadas antes de as perguntas terem sido completadas;
  - h) com freqüência tem dificuldade para aguardar sua vez;
  - i) freqüentemente interrompe ou se mete em assuntos de outro (por exemplo, intrmete-se em conversas ou brincadeiras).
-

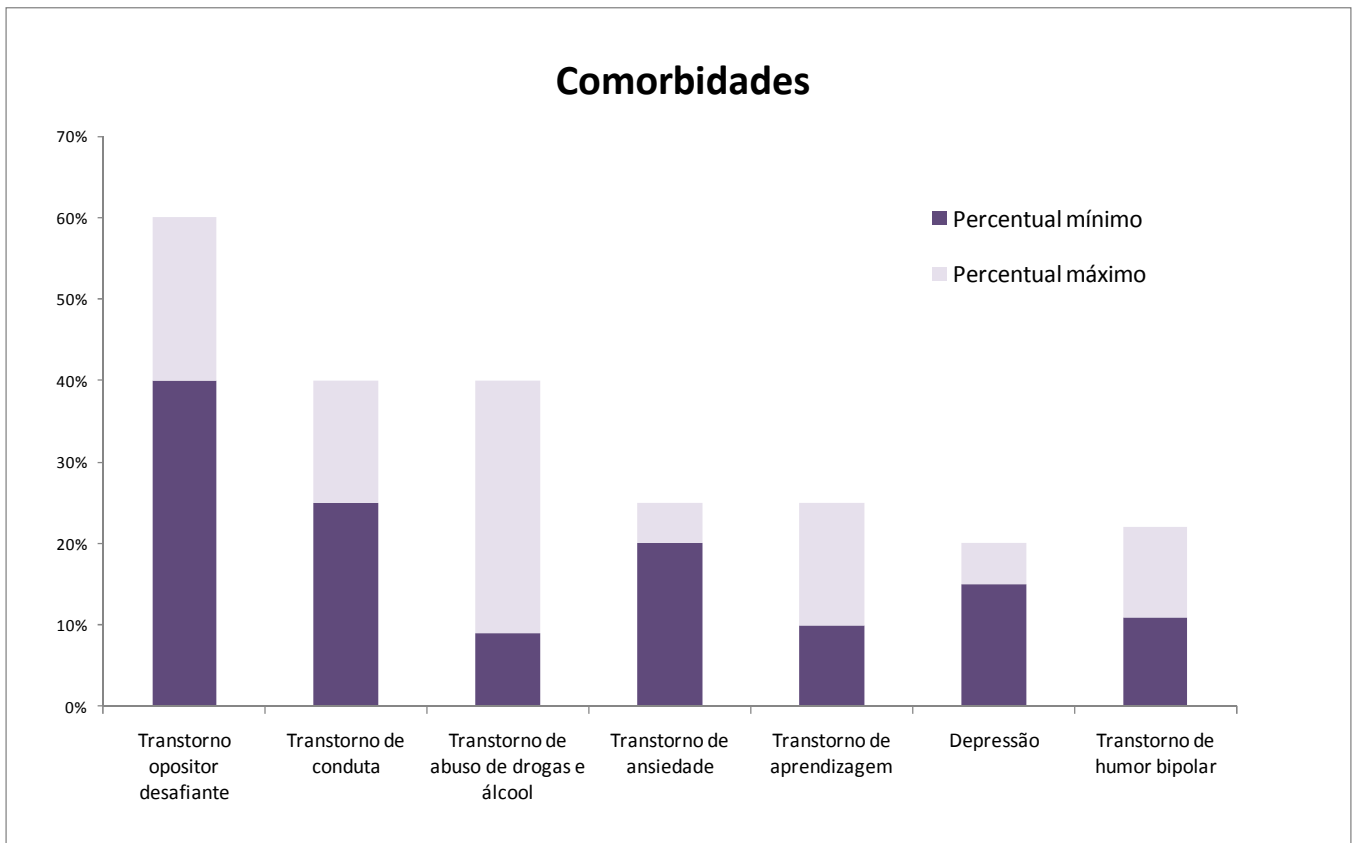


Figura 1: Percentual dos transtornos que co-ocorrem com o TDAH. Adaptado de Biederman et al. (1991).

### **1.3. Tratamento**

No tratamento do TDAH há dois tipos principais de intervenções: psicossociais e farmacológicas.

#### **1.3.1. Intervenções psicossociais**

As intervenções psicossociais englobam um conjunto de procedimentos, envolvendo tanto a família quanto a escola.

Um aspecto muito importante nesse tipo de intervenção é educar a família da criança ou adolescente sobre o transtorno, através de informações claras e precisas dadas pelo psiquiatra. Muitas vezes, pode ser necessário um programa de treinamento para os pais, no âmbito de conhecer melhor seus filhos e aprender a lidar com os sintomas dos mesmos (Rohde e Benczik, 1999).

Ainda dentro das intervenções psicossociais, as escolares estão, recentemente, sendo muito estudadas e analisadas em pacientes com esse transtorno. Assim como com as famílias, os professores necessitariam também de um programa de treinamento.

#### **1.3.2. Intervenções farmacológicas**

As intervenções farmacológicas são utilizadas e estudadas há mais tempo em relação às intervenções psicossociais, existindo, neste sentido, uma extensa literatura avaliando a eficácia desse tipo de intervenção. No entanto, Brasil (2000) ressalva a importância de um processo diagnóstico detalhado e coerente para indicação de psicofármacos. Isso para não haver uma banalização do uso de medicações como uma solução imediata do problema. Brasil (2000) ainda comenta que é necessário discernir o que os pais apresentam sobre os sintomas das crianças, na consulta com o psiquiatra, e o que realmente ocorre com elas.

O uso de psicofármacos é indicado como de grande importância para a redução dos sintomas do TDAH e uma acentuada melhora do mesmo. As medicações de primeira escolha para o tratamento, apontada pela literatura, são os estimulantes (Greenhill e cols., 1999). Esses medicamentos possuem duas formulações: o metilfenidato (MFD) e as anfetaminas. No entanto, a indicação de psicofármacos para o TDAH vai depender das co-morbidades presentes. Muitas vezes, é indicado o uso combinado de medicações, dependendo da co-morbidade presente no paciente (Spencer

e cols., 1996). O MFD é o fármaco mais estudado e, conseqüentemente, o mais utilizado no tratamento de crianças com TDAH. No Brasil, é o único estimulante encontrado no mercado (Rohde e cols., 2000).

Spencer e cols. (1996) estimaram, em um estudo com 5.768 pacientes com TDAH, que a eficiência dos estimulantes é de 70% de resposta favorável, considerando uma diminuição de pelo menos 50% dos sintomas básicos do TDAH nos pacientes. Há efeitos adversos com o uso de estimulantes, no qual os mais freqüentes são perda de apetite, insônia, irritabilidade, cefaléia e sintomas gastrointestinais (Spencer e cols., 1996).

Entretanto, quando não há resposta favorável aos estimulantes, estes são substituídos pelos antidepressivos tricíclicos (ADT). A indicação dos ADT no tratamento também depende da presença de co-morbidade com transtornos de tique ou enurese (Spencer e cols., 1996).

A atomoxetina é um fármaco não-estimulante, representando outra alternativa quando as crianças não respondem ou não toleram os estimulantes. Esta medicação foi aprovada para uso com crianças e tem demonstrado eficácia na melhora dos sintomas do TDAH, embora a resposta seja geralmente menor do que com os estimulantes (Michelson e cols., 2002). Entretanto, também ocorrem efeitos adversos com o uso desta medicação, no qual são incluídos: dores estomacais, diminuição de apetite, sonolência, taquicardia e mudanças de humor (Cormier, 2008).

Muitos autores sugerem o uso de tratamentos mistos, envolvendo intervenções psicossociais, psicoterápicas e psicofarmacológicas. Portanto, aconselham que o uso da medicação não deva ser o tratamento da criança, mas sim fazer parte deste tratamento, de um plano mais amplo, em que outros tipos de intervenções também sejam incluídas (Spencer e cols., 1996; Wolraich, 2006).

#### **1.4. Etiologia**

Apesar de uma extensiva literatura as causas do TDAH, estas ainda não são conhecidas por completo. Contudo, influências de fatores ambientais e de fatores genéticos na etiologia do TDAH são amplamente aceitas (Tannock, 1998).

#### **1.4.1. Fatores ambientais**

Fatores psicossociais que atuam no funcionamento adaptativo e na saúde emocional da criança, tais como desentendimentos familiares e presença de transtornos mentais nos pais parecem ter um papel importante no surgimento e na manutenção da doença. Algumas adversidades sociais como discórdia marital severa, classe social baixa, família muito numerosa, criminalidade dos pais e colocação em lar adotivo, já foram associadas com o TDAH (Biederman e cols., 1995). Complicações na gestação e no parto, assim como o uso de álcool e nicotina pela mãe (Mick e cols., 2002a,b) também parecem agir como fatores de risco para o desenvolvimento do transtorno. Outros fatores que afetam processos específicos implicados no transtorno, como por exemplo, danos cerebrais perinatais no lobo frontal, podem relacionar-se indiretamente com a doença, já que atingem processos de atenção, motivação e planejamento (Levy e cols., 1998).

#### **1.4.2. Fatores Genéticos**

Investigações clássicas de genética epidemiológica, utilizando estudos com famílias, com crianças adotivas ou com gêmeos estabeleceram que o TDAH possui uma contribuição genética significativa (Faraone e Biederman, 1998; Tannock, 1998).

Estudos com famílias mostraram que este transtorno apresenta uma forte recorrência familiar. O risco para esta doença é de 2 a 8 vezes maior nos pais de crianças afetadas do que na população em geral (Faraone e Biederman, 1998, Epstein e cols., 2000). Além disso, irmãos de pacientes com TDAH apresentam uma prevalência maior da doença do que meio-irmãos (Thapar e cols., 1999). A premissa básica do método de agregação familiar é que se existe um componente genético em uma dada doença, esta deve ser mais prevalente entre pais biológicos de probandos comparados com pais de controles. Assim, numerosos estudos em famílias documentaram a alta prevalência de psicopatologias, particularmente TDAH, em parentes e pais de crianças com TDAH (Tannock, 1998).

As evidências mais fortes da herdabilidade do TDAH são fornecidas pelos estudos com adotados, uma vez que conseguem distinguir melhor os efeitos genéticos dos ambientais. Pesquisas com adotados mostraram que a prevalência da doença entre pais biológicos é cerca de 3 vezes maior do que entre pais adotivos das crianças com TDAH (Thapar e cols., 1999; Sprich e cols., 2000). Essa maior prevalência de TDAH entre os

pais biológicos em relação aos pais adotivos dos probandos confirma a existência de importantes fatores genéticos contribuindo para a etiologia do transtorno.

Faraone e cols. (2005), revisando 20 estudos com gêmeos, estimaram uma herdabilidade média de 76% e sugeriram que o TDAH é o distúrbio psiquiátrico com o maior componente hereditário.

A contribuição genética do TDAH é substancial, e assim como na maioria dos transtornos psiquiátricos, sabe-se atualmente que esse componente genético é determinado por vários genes de pequeno efeito, que interagem entre si e com o ambiente (Thapar e cols., 1999; Faraone e cols., 2005). Assim, é possível que diferentes genes estejam envolvidos em casos diversos da doença, e que o efeito de cada um deles mude de acordo com o contexto genético em que eles atuam (State e cols., 2000).

A definição de tipos de TDAH pelo DSM-IV, assim como as diferentes formas de tratamento, a persistência do TDAH e as várias doenças que podem coexistir com este transtorno mostram que, pelo menos ao nível fenotípico, o TDAH é uma patologia bastante heterogênea (Smalley e cols., 2000). Considerando que o TDAH apresenta casos muito diversos, ou seja, uma significativa heterogeneidade clínica, é bem provável que isso se reflita numa heterogeneidade etiológica.

Isso significa que fatores genéticos e ambientais diferentes devem atuar na manifestação das características que compõem os vários quadros clínicos do TDAH. Embora uma alta herdabilidade tenha sido descrita em muitos estudos, essas estimativas foram obtidas considerando o TDAH como uma categoria diagnóstica única. É possível que esta definição não represente um fenótipo válido geneticamente, e que existam aspectos ou subtipos etiológicos mais ou menos herdáveis dentro do TDAH (Thapar e cols., 1999; Todd, 2000a).

O fenômeno da interação gene/ambiente é, completamente, aceito e reconhecido como importante fator para o desenvolvimento das doenças complexas (Thapar e cols., 2005).

Dessa forma, o surgimento e a evolução do TDAH em um indivíduo parecem depender de quais genes de suscetibilidade estão agindo e de quanto cada um deles contribui para a doença, ou seja, qual o tamanho do efeito de cada um, e da interação desses genes entre si e com o ambiente (Smalley, 1997; Nigg e Goldsmith, 1998; Thapar e cols., 1999).

Duas principais estratégias podem ser utilizadas na busca de genes de suscetibilidade do TDAH: os estudos de ligação e os estudos de associação.

Os estudos de ligação por varredura do genoma (*genome-wide scan*) são os menos utilizados no TDAH. O objetivo dessa metodologia é tentar identificar um grande número de locos ou genes possivelmente envolvidos na manifestação de uma determinada doença (Ohashi e Tokunaga, 2001). Esta análise examina muitos marcadores de DNA através do genoma para determinar alguma região cromossômica que seja herdada mais freqüentemente do que a esperada entre membros de famílias com TDAH (Mick e Faraone, 2008).

A primeira varredura genômica para o TDAH foi realizada por Fisher e cols. (2002). O estudo foi executado com 126 pares de irmãos afetados, mostrando alguma evidência de ligação em 5p12, 10q26, 12q23 e 16p13. Smalley e cols. (2002) investigaram 203 famílias e encontraram uma forte evidência de ligação com a região 16p13, implicada previamente com autismo. Ogdie e cols. (2003) realizaram um estudo de ligação, aumentando a amostra original de Fisher e cols. (2002) para 270 pares de irmãos afetados. Com essa nova amostra identificaram 5 regiões com evidência de ligação: 5p13, 6q14, 11q25, 17p11 e 20q13. Em outro estudo realizado com 164 pares de irmãos afetados, Bakker e cols. (2003) identificaram ligação a uma região também implicada com autismo, 15q15, e a outras duas regiões, 7p13 e 9q33. O quinto trabalho foi realizado em uma comunidade geneticamente isolada na Colômbia, na qual foram observadas as 6 regiões que se mostraram significativamente ligadas ao TDAH: 4q13.2, 5q33, 8q11.23, 11q22 e 17p11 (Arcos-Burgos e cols., 2004). Em um estudo realizado na Alemanha com 155 pares de irmãos afetados foram identificadas evidências de ligação em 5p, 6q, 7p, 9q, 11q, 12q e 17p. Esse estudo mostrou a maior significância para a região 5p, que também foi encontrada em outros dois estudos (Heberbrand e cols., 2006).

Como se pode observar, os resultados dos estudos de ligação com o TDAH são ainda inconsistentes, nas quais poucas regiões significativamente ligadas são replicadas nas diferentes investigações. Essas inconsistências podem ser explicadas pelos baixos limites de detecção (*LOD score*) encontrados para algumas regiões ligadas, além de demonstrar que genes de efeito moderadamente grande para o TDAH são improváveis. Genes de pequeno efeito são mais difíceis de serem detectados neste tipo de análise e essa observação aponta para os estudos de associação que seriam mais indicados para se encontrar genes de suscetibilidade para o TDAH (Mick e Faraone, 2008).

No estudo de associação as freqüências dos diferentes alelos de um determinado gene são comparadas entre casos (portadores da característica a ser investigada) e

controles (sem a característica em questão). Nesse tipo de estudo três abordagens podem ser aplicadas. A comparação com controles triados e pareados com a amostra de casos, controles obtidos da população em geral e o método baseado em famílias, no qual o controle ao caso é feito pelos alelos não transmitidos dos pais para a prole afetada.

## **1.5. Neurobiologia**

A neurobiologia do TDAH ainda não é completamente entendida, embora existam algumas hipóteses muito coerentes e aceitas a respeito desse assunto.

Os dados sobre a neurobiologia e o entendimento sobre a patofisiologia do TDAH são obtidos de estudos neuropsicológicos, de neuroimagem e de neurotransmissores (Faraone e Biederman, 1998).

O córtex pré-frontal (CPF) controla comportamento e atenção, onde funções executivas são observadas nesta região do cérebro. As funções executivas incluem: memória de trabalho, organização, antecipação, planejamento, controle inibitório, flexibilidade, auto-regulação e controle da conduta (Arnsten, 2006). Lesões no CPF produzem sintomas como: negligência, distração, impulsividade, pobre concentração e organização. Pacientes com lesões no CPF apresentam uma facilidade de distração e não conseguem manter a atenção, principalmente, por longos períodos (Anderson et al., 1999; Arnsten e Li, 2005). Além disso, estudos demonstraram que lesões no CPF também causam hiperatividade locomotora em macacos (Gross, 1963). Todos estes sintomas de pacientes com lesões no córtex pré-frontal assemelham-se com sintomas do TDAH.

Muitos trabalhos demonstram que há uma disfunção no CPF em pacientes com TDAH, no qual se observa uma função mais fraca nesta região (Arnsten et al., 1996; Aron and Poldrack, 2005). Estudos neuropsicológicos mostram que pacientes com TDAH possuem prejuízos muito semelhantes aos pacientes com lesões pré-frontais (Arnsten, 2006). Essas investigações mostraram que crianças com TDAH possuem uma performance prejudicada em funções cognitivas e executivas, como a atenção, percepção, planejamento e organização, além de falhas na inibição comportamental, processos como visto anteriormente, claramente relacionados ao CPF (Swanson e cols., 1998b; Tannock, 1998).

O envolvimento do CPF na patofisiologia do TDAH também foi sugerido pelos estudos de neuroimagem (Tannock, 1998). De acordo com esses estudos, o CPF



apresenta um tamanho reduzido, particularmente no hemisfério direito do cérebro, em pacientes com TDAH. Estudos de neuroimagem funcional mostraram também evidências de um ineficiente ou reduzido fluxo de sangue ou metabolismo no CPF de pacientes com TDAH, no qual esses déficits correspondem a uma pobre função cognitiva do CPF (Bush e cols., 2005).

Outras regiões cerebrais também são implicadas na neurobiologia do TDAH. Estruturas sub-corticais como o caudado, o putâmen e o globo pálido (gânglios da base) também são encontradas com volumes diminuídos em pacientes com TDAH (Faraone e Bierderman, 1998). Essas áreas são parte do circuito subordinado ao controle motor, funções executivas e comportamento inibitório e possuem uma ligação neuronal com o CPF (Spencer e cols., 2007). A partir dos achados destes estudos de neuroimagens se postula que o TDAH seja uma síndrome fronto/sub-cortical, na qual este circuito estaria envolvido na patofisiologia (Faraone e Bierderman, 1998).

Volume reduzido do cerebelo, mais especificamente na região do vermis, também foi relatado em pacientes com TDAH, como predisposto no controle motor e nos processos cognitivos e afetivos. Conexões entre cerebelo e CPF foram demonstradas, relacionando também um circuito cerebelar/pré-frontal na patofisiologia do TDAH (Seidman e cols., 2005).

Por último, estudos de neuroimagens demonstraram um volume reduzido na área total do cérebro, afetando todos os quatro lobos cerebrais (frontal, parietal, temporal e occipital). Estes estudos compararam crianças com TDAH e controles sem TDAH, no qual se observou uma redução do tamanho cerebral entre 3,2% a 4% nas crianças com o transtorno (Castellanos e cols., 2002; Durston e cols., 2004).

A variação nas manifestações clínicas do TDAH certamente reflete uma grande complexidade dos processos biológicos implicados na origem dos sintomas, e pode-se supor que alterações em diferentes sistemas de neurotransmissores devam estar envolvidas.

O circuito fronto/sub-cortical, que controla atenção e comportamento motor, visto que são regiões implicadas na patofisiologia do TDAH, são ricas em catecolaminas (Faraone e Bierderman, 1998; Swanson e cols., 1998b). Funções do CPF e áreas sub-corticais são extensamente influenciadas por níveis de catecolaminas, sobretudo dopamina (DA) e noradrenalina (NE) mostradas por modelos animais (Arnsten e Li, 2005). Devido a isso, desde 1970, a hipótese bioquímica para explicar o TDAH é baseada nas catecolaminas.

Originalmente, enfatizou-se apenas a importância de mecanismos dopaminérgicos no CPF, mas atualmente se sabe que outros mecanismos além dos dopaminérgicos são críticos na modulação de funções do CPF (Arnsten e Li, 2005; Arnsten, 2006).

Evidências farmacológicas e de estudos com animais favoreceram inicialmente a teoria dopaminérgica do TDAH, onde um déficit de dopamina nas regiões corticais e do estriado seria responsável pela manifestação dos sintomas deste transtorno (Levy, 1991).

No entanto, também se observou que algumas regiões encefálicas primariamente moduladas por redes noradrenérgicas, como o *locus coeruleus* e a região parietal superior direita, parecem estar envolvidas em processos de atenção seletiva (Arnsten e cols., 1996; Pliszka e cols., 1996).

Há 50 anos o TDAH vem sendo tratado com estimulantes como MFD e anfetaminas. A eficácia clínica dos estimulantes, usados no tratamento do TDAH, depende de alterações em funções dopaminérgicas e noradrenérgicas (Seeman e Madras, 1998). Ação do MFD é bem evidenciada em estudos pré-clínicos, no qual se observou bloqueio dos transportadores de DA e NE e aumento da disponibilidade de DA e NE na fenda sináptica (Swanson e cols., 1998a e Swanson e cols., 1998b).

O sistema serotoninérgico também vem sendo alvo de investigações no TDAH. Embora a serotonina (5-HT) tenha sido bem menos estudada na neurobiologia do TDAH em comparação a DA e a NE, sua função na patofisiologia da doença tornou-se de interesse para muitas pesquisas nessa área.

O sistema serotoninérgico exerce um papel importante na etiologia de transtornos comportamentais caracterizados por déficits de inibição tais como abuso de álcool e nicotina, TC, agressividade, impulsividade e hiperatividade (Halperin et al., 1997; Lucki, 1998; Quist e Kennedy, 2001; Ferrari e cols., 2005; Cervantes e Delville, 2007). Como esses comportamentos são característicos do TDAH, evidencia-se o possível envolvimento desse neurotransmissor na etiologia desse transtorno.

Um estudo com ratos nocaute para o gene do transportador de dopamina mostrou que a intensa hiperatividade motora apresentada por estes animais pôde ser revertida tanto com a administração de metilfenidato como de agentes serotoninérgicos (Gainetdinov e cols., 1999). Esses achados sugerem que, em humanos, o metilfenidato pode ter outros sítios de ação além do transportador de dopamina no controle dos sintomas do TDAH, e que a hiperatividade seja mediada pela serotonina, pelo menos em algumas formas da doença.

Outros estudos mostraram ainda que existe uma interação considerável entre os sistemas dopaminérgico e serotoninérgico (Quist e Kennedy, 2001). Alterações nestas interações poderiam ser importantes na manifestação de alguns sintomas da doença. Essa possível regulação da 5-HT sobre a DA é mediada por diferentes subtipos de receptores serotoninérgicos. O bloqueio ou a estimulação de muitos subtipos de receptores 5-HT modulam o sistema DA (Quist e Kennedy, 2001; Alex e Phek, 2007).

Disfunções nos sistemas destes neurotransmissores são importantes na etiologia da doença e, provavelmente, os genes envolvidos nesses sistemas sejam bons candidatos para explicar a patofisiologia do transtorno (Faraone e Biederman, 1998).

## **1.6. Estudos Moleculares**

Evidências farmacológicas, bioquímicas e de estudos neurobiológicos indicam o envolvimento dos sistemas dopaminérgico, noradrenérgico e serotoninérgico na patofisiologia dessa doença. A partir disso o principal alvo das pesquisas à procura de genes candidatos são os que codificam componentes desses sistemas (Pliszka e cols., 1996; Castellanos, 1997; Quist e Kennedy, 2001).

### **1.6.1. Sistema Dopaminérgico**

Os genes do sistema dopaminérgico vêm sendo o foco principal destes estudos. O gene *DAT1* foi o candidato inicial para as investigações, visto que a proteína transportadora é inibida diretamente pelos estimulantes usados no tratamento do TDAH. Assim como ratos nocautes para o gene *DAT1* mostraram comportamento hiperativo e déficit inibitório (Giros e cols., 1996). O gene que codifica a proteína, denominado *DAT1* ou *SLC6A3*, foi mapeado na região 5p15.3 (Giros e cols., 1992) e consiste de 15 éxons intercalados por 14 íntrons totalizando uma extensão de mais de 60 Kb. O polimorfismo mais investigado é um VNTR (polimorfismo de número variável de repetições) no éxon 15 na região 3' não traduzida do gene (3'VNTR). Dez alelos diferentes já foram identificados correspondendo a presença de 3 a 13 cópias da unidade de repetição de 40 pb. O alelo de 10 cópias é o mais prevalente em todo mundo (10R) (Kang e cols., 1999). Embora esta variante tenha sido a mais estudada, ainda não é claro se ela possui uma relevância funcional ou estrutural na proteína. O primeiro relato de associação do gene *DAT1* com a doença foi feito por Cook e cols. (1995). Esses autores investigaram o polimorfismo 3'VNTR, encontrando associação com o alelo de 10

repetições (10R). Após esse trabalho pioneiro vários estudos replicaram esses resultados (revisão em Faraone e Kam, 2006; Mick e Faraone, 2008). No entanto muitos outros estudos, incluindo os do nosso grupo não observaram associação entre esse marcador e o TDAH (revisão em Faraone e Kam, 2007; Mick e Faraone, 2008; Genro e cols., 2008). Várias meta-análises foram realizadas com esse polimorfismo, com resultados igualmente divergentes. Maher e cols. (2002) encontram apenas uma tendência para associação. Evidências positivas de associação com o alelo de 10R foram observadas por Faraone e col. (2005) e Yang e cols. (2007), porém os efeitos foram muito pequenos. Evidências negativas de associação foram mostradas nas meta-análises realizadas por Purper-Ouakil e cols. (2005) e por Li e cols. (2006).

O receptor *DRD4* é também muito investigado no TDAH. O gene do receptor *DRD4* localiza-se na região 11p.15.5 (Gelernter e cols., 1992), sendo composto de 4 éxons (Van Tol e cols., 1991). O grande interesse por este gene surgiu a partir da observação de sua associação com a dimensão de personalidade “busca de novidades”, provavelmente relacionada ao TDAH. O principal polimorfismo investigado no gene *DRD4* é um VNTR de 48pb localizado no exon 3, no qual nove alelos já foram descritos. LaHoste e cols. (1996) foram os primeiros a detectar associação desse gene com o TDAH. Estes autores verificaram associação com o alelo de 7 repetições (7R). O alelo de 7R, o mesmo relacionado com a dimensão “busca de novidades”, foi sugerido como alelo de risco em vários estudos. Embora muitas investigações tenham replicado essa associação com o gene *DRD4*, os resultados são bastante controversos. Roman e cols (2001) observaram uma interação entre os genes *DRD4* e *DAT1* sobre escores de hiperatividade/impulsividade. No entanto, as meta-análises realizadas com esse gene apontam para uma mesma direção, no qual todas evidenciam resultados positivos para o alelo de 7R (Faraone e cols., 2001; Maher e cols., 2002; Faraone e cols., 2005; Li e cols., 2006).

### **1.6.2. Sistema Noradrenérgico**

Embora com menor intensidade que o sistema dopaminérgico, o sistema noradrenérgico também é foco de investigações no TDAH.

Os estudos concentraram-se principalmente no gene que codifica a enzima dopamina-beta-hidrolase (*DBH*). O gene *DBH* foi clonado e mapeado na região cromossômica 9q34, contendo 12 éxons (Craig e cols., 1988). *DBH* é a principal enzima

responsável em converter dopamina em noradrenalina. O principal polimorfismo investigado é um sítio de restrição TaqI localizado no intron 5 do gene. O trabalho de Daly e cols. (1999) foi o primeiro na literatura em que esse polimorfismo foi analisado em uma amostra de pacientes com TDAH. Esses autores verificaram associação com o alelo A2 (presença do sítio), tanto na amostra total como em subgrupos de pacientes definidos pelo diagnóstico do tipo combinado de TDAH e pela presença de história familiar do transtorno. Roman e cols. (2002a) replicaram os resultados de Daly e cols. (1999) em relação à associação com o TDAH, no entanto ao contrário desse último trabalho, no estudo de Roman e cols. (2002a) a associação foi mais forte nos pacientes sem história familiar positiva. Contudo, como observado nos outros genes os resultados dos estudos feitos posteriormente não são conclusivos. Em uma meta análise (Faraone e cols., 2005), uma associação do alelo A2 do polimorfismo Taq1 no intron 5 e o TDAH foi observada. Para essa análise foram incluídos 3 estudos de associação baseados em família obtendo-se uma OR de 1,33.

### **1.6.3. Sistema Serotoninérgico**

O maior alvo dos estudos de associação desse sistema com o TDAH é o transportador de serotonina. O gene que codifica essa proteína transportadora localiza-se na região cromossômica 17q11.2 e consiste de 14 éxons, totalizando 31Kb (Lesh e cols., 1994).

O polimorfismo de inserção/deleção de 44pb localizado na região promotora do gene (5-HTTLPR) é o foco principal dos estudos desse gene (Heils e cols., 1996; Lesh e cols., 1996). Esse polimorfismo possui duas formas alélicas, no qual a variante longa esta associada com o aumento da transcrição do gene (Lesh e cols., 1996).

Seeger e cols. (2001) ao analisar uma amostra de crianças com TDAH evidenciaram maior frequência do genótipo L/L do 5-HTLPR em comparação aos controles. Após este primeiro estudo com o gene *5-HTT* muitas análises tentaram replicar esse achado. Os resultados positivos obtidos com esse polimorfismo apontam uma direção de associação com o alelo longo (Manor e cols., 2001; Zoroglu e cols., 2002; Kopeèkova e cols., 2008). No entanto, muitos trabalhos não evidenciam associação, incluindo o do nosso grupo (Xu e cols., 2005; Heiser e cols., 2007; Guimarães e cols., 2007). Faraone e cols. (2005) realizaram uma meta-análise com os oito genes mais estudados no TDAH, incluindo o gene *5-HTT*. O polimorfismo

analisado nessa meta-análise foi o 5-HTTLPR e foi evidenciada uma OR significativa de 1,31 para o alelo longo.

Há sete tipos principais de receptores serotoninérgicos e aproximadamente 14 subtipos. No TDAH os subtipos mais investigados foram o *HTR1B* e *HTR2A*.

Estudos de neuro-imagem e estudos farmacológicos evidenciam que o receptor 5-HT<sub>2A</sub> estimula liberação de DA, principalmente no CPF e estriado, onde existe uma maior densidade desse receptor (Alex e Pehek, 2008). O gene do receptor humano *HTR2A* foi localizado na região cromossômica 13q14-q21, possuindo três éxons e dois introns, totalizando 63Kb. O gene *HTR2A* codifica uma proteína envolvida na transdução de sinal mediada via hidrólise fosfoinositol e mobilização intracelular de cálcio (Hsieh e cols., 1990). Um polimorfismo descrito no gene do receptor 5-HT<sub>2A</sub> é a troca de aminoácido histidina (His) por uma tirosina (Tyr) na posição 452 (rs6314). Algumas evidências comprovam que essa mutação altera a função do receptor 5-HT<sub>2A</sub>, já que a substituição pelo aminoácido tirosina resulta em menores amplitudes de mobilização de cálcio, e que há também menor tempo de resposta, sugerindo possível desestabilização do receptor associado com a forma tirosina (Ozaki e cols; 1997; Hazelwood e Sanders-Bush, 2004).

Um segundo polimorfismo descrito no gene *HTR2A* é o A1438G localizado na região promotora do gene (rs6311). Um aumento da expressão do gene foi relacionado com o alelo A1438 desse polimorfismo (Parsons e cols., 2004).

Quist e cols. (2000) analisaram o SNP His452Tyr e evidenciaram transmissão preferencial do alelo Tyr nas crianças afetadas com TDAH. Contrariamente, Hawi e cols. (2002) evidenciaram transmissão preferencial do alelo His452 para os probandos com TDAH. Guimarães e cols. (2007) investigaram os polimorfismo His452Tyr e A1438G. Nesse trabalho foi evidenciada a transmissão preferencial do alelo His do polimorfismo His452Tyr, mas somente quando a amostra foi estratificada por gênero.

Outros estudos com esses SNPs e o TDAH não evidenciaram nenhuma associação (Bobb e cols., 2005; Zoroglu e cols., 2003; Li e cols., 2006; Heiser e cols., 2007).

O gene *HTR1B* tornou-se alvo de uma atenção especial, pois ratos nocautes para esse gene mostraram vários comportamentos como maior consumo de cocaína e álcool, agressividade e impulsividade motora (Saudou e cols., 1994; Brunner e Hen, 1997; Brunner e cols., 1999). O gene *HTR1B* humano localiza-se no cromossomo 6q14.3-q16.3 e possui um éxon (Jin e cols., 1992).

Muitos polimorfismos foram descritos para o gene *HTR1B* (Sanders e cols., 2001). O polimorfismo mais estudado em muitos comportamentos e transtornos psiquiátricos, incluindo o TDAH é uma troca G>C na posição 861 (rs6296) (Lappalainen e cols., 1995). Essa troca não altera a seqüência da proteína, assim provavelmente não seja diretamente uma variante funcional. No entanto, Huang e cols. (1999) observaram uma modesta evidência de redução da densidade do receptor 5-HT<sub>1B</sub> no CPF em tecido “post mortem” com o alelo C.

A primeira investigação do gene *HTR1B* com o TDAH foi realizada por Hawi e cols. (2002). Esses autores genotiparam o polimorfismo G861C e observaram transmissão preferencial do alelo G. Quist e cols. (2003) não evidenciaram associação com o mesmo SNP na amostra de crianças com TDAH. No entanto, ao analisarem transmissão preferencial de origem paterna versus origem materna, observaram transmissão preferencial paterna do alelo 861G para os filhos afetados.

Na meta-análise realizada por Faraone e cols. (2005), o SNP G861C apresentou um resultado significativo para o alelo G861 (OR= 1,44).

Li e cols. (2005) investigaram os SNPs G861C e -161A>T e observaram uma tendência de transmissão preferencial tanto do alelo G861 na análise individual quanto do haplótipo 861G/-161A na análise haplotípica, mas somente na amostra do subtipo desatento. Assim como observaram uma tendência de menor transmissão do haplótipo 861C/-161A nessa mesma amostra.

Smoller e cols. (2006) analisaram seis SNPs que estão no mesmo bloco haplotípico, incluindo os SNPs G861C, -161A>T e -261T>G em crianças afetadas com TDAH. Primeiramente, analisaram o SNP G861C individualmente e observaram transmissão preferencial do alelo G, mas essa associação foi observada somente no subtipo de desatenção. Na análise haplotípica evidenciaram transmissão preferencial do haplótipo 1180G/861G/371T/129C/-161A/-261T em crianças com TDAH, novamente somente na amostra do subtipo de desatentos.

Dois estudos posteriores a esses foram realizados com o gene *HTR1B* e o TDAH, sem evidências de associação. No primeiro Ickowicz e cols. (2007), analisaram seis polimorfismos, incluindo o G861 enquanto, Heiser e cols. (2007) investigaram apenas o SNP G861C no gene *HTR1B*.

A monoamino oxidase A (MAOA) é uma enzima mitocondrial envolvida na degradação dos neurotransmissores serotonina, dopamina e noradrenalina, o que sugere, portanto, um papel importante na manutenção da homeostase desses neurotransmissores

(Chen, 2004). Estudos moleculares sugerem que o gene (localizado em Xp11.23) possui um papel importante em características relacionadas à impulsividade, agressividade e comportamentos aditivos. Uma mutação identificada no éxon 8 do gene *MAOA*, em homens de uma família alemã, causa completa deficiência da enzima, levando a um fenótipo que inclui comportamentos de agressividade/impulsividade (Brunner e cols., 1993). Além disso, camundongos transgênicos que possuem o gene *MAOA* deletado apresentam níveis elevados de serotonina no cérebro e um fenótipo que inclui comportamentos agressivos (Cases e cols., 1995). O gene possui vários polimorfismos, incluindo um VNTR de 30pb localizado na região promotora (*MAOA-uVNTR* – *MAOA* upstream VNTR) (Sabol e cols., 1998). Cinco alelos já foram identificados nesse polimorfismo, contendo 2, 3, 3.5, 4 ou 5 repetições, sendo os alelos de 3 e 4 repetições os mais comuns em diferentes populações (Sabol e cols., 1998; Jacob e cols., 2005). Estudos que investigaram a atividade funcional desse polimorfismo mostraram que o mesmo afeta a atividade transcricional do gene (Sabol e cols., 1998; Deckert, 1999, Denney, 1999). Três trabalhos independentes demonstraram que os alelos de 3.5 e 4 repetições transcrevem mais eficientemente do que o alelo de 3 repetições. Com relação ao alelo de 5 repetições não há consenso. O alelo de 2 repetições não foi incluído nos estudos funcionais por ser raro.

Um conjunto de publicações com grande repercussão na literatura, iniciada por Caspi e cols. (2002), sugere uma interação entre esse uVNTR e fatores ambientais. Observou-se que em pessoas portadoras do alelo de 3 repetições o risco de comportamentos anti-sociais na fase adulta é maior naqueles que tiveram experiências de maus-tratos na infância em relação aos que não tiveram.

Com relação ao TDAH, o primeiro trabalho investigando o polimorfismo *MAOA-uVNTR* foi realizado por Manor e cols. (2002). O estudo sugeriu o envolvimento do alelo de 4 repetições (alta atividade enzimática) no TDAH. Lawson e cols. (2003) investigaram o uVNTR no TDAH. A associação encontrada envolveu o alelo de 3 repetições (baixa atividade enzimática) e um sub-grupo de crianças com TDAH e TC. Domschke e cols. (2005) e Xu e cols. (2007) investigaram dois polimorfismos no gene *MAOA*, o uVNTR e o G941T, em uma amostra de pacientes com TDAH. Nos dois estudos não se observou associação positiva ao analisar o uVNTR individualmente, contudo na análise haplotípica evidenciaram a transmissão preferencial do haplótipo contendo o alelo de 3 repetições do uVNTR e o alelo G941.



Por último, Lung e cols. (2006) examinaram o uVNTR em uma amostra de pacientes com TDAH, porém não observaram associação positiva.

Triptofano hidroxilase é a enzima responsável pela síntese de 5-HT. Duas isoformas da enzima são encontradas em ratos e humanos, a TPH1 e TPH2. A isoforma TPH2 é expressa exclusivamente no cérebro (Walther e cols., 2003). O gene humano *TPH2* é localizado na região cromossômica 12q15, possuindo 11 éxons, totalizando 93.5Kb. Poucos estudos foram realizados com o gene *TPH2* e o TDAH. Sheehan e cols. (2005) analisaram o polimorfismo T16073G (rs1843809) localizado no intron 5 no TDAH e observaram associação com o alelo T em uma amostra de 179 famílias. O consórcio Internacional IMAGE (International Multicenter ADHD Genetics) analisou 1038 polimorfismos em 51 genes e observaram associação com 16 genes, incluindo o gene *TPH2* (Brookes e cols., 2006). Esse grupo também observou associação com o polimorfismo T16073G, mas a evidência encontrada foi com o alelo oposto G. Em outro estudo com o mesmo SNP, Sheehan e cols. (2007) não evidenciaram associação em uma amostra de 63 crianças com TDAH.

## **1.7. Estudos farmacogenéticos**

Farmacogenética é o estudo da variabilidade genética na resposta às medicações ou a reações adversas (Weinshieboum, 2003). O campo da farmacogenética foi delimitado por Motulsky em 1957 e descrito como farmacogenética por Vogel em 1959. A monografia de Kalow de 1962 (Kalow, 2007) estabeleceu definitivamente a farmacogenética como disciplina.

Os estudos farmacogenéticos no TDAH analisam os mesmo genes investigados nos estudos de associação e pelas mesmas razões.

O primeiro estudo farmacogenético no TDAH foi realizado com o polimorfismo 3'VNTR do gene *DAT1* por Winsberg e Comings (1999). Esses autores encontraram uma associação significativa para homozigose do alelo de 10R e menor resposta ao MFD em uma amostra de 30 crianças. Esse resultado foi replicado por três trabalhos posteriores (Roman e cols., 2002b; Cheon e cols., 2005; Purper-Ouakil e cols., 2008). Kirley e cols. (2003) também evidenciaram associação significativa com o alelo de 10R, observando uma melhora da resposta ao MFD nos portadores desse alelo. Em outros dois estudos os autores observaram associação com pior resposta ao MFD e homozigose do alelo de 9R (Stein e cols., 2005; Joobar e cols., 2007). Finalmente, outros seis

estudos não encontraram efeito algum de resposta com o gene *DAT1* (Zeni e cols., 2007; Revisão em Stein e McGough, 2008).

Todos os estudos de farmacogenética realizados com o gene *DRD4* e o TDAH analisaram o VNTR de 48pb localizado no éxon 3 do gene. Hamarman e cols. (2004) evidenciaram que crianças portadoras do alelo de 7R do VNTR requerem doses mais altas de MFD para melhora dos sintomas. Cheon e cols. (2007) observaram associação entre a homozigose do alelo de 4R e melhor resposta ao MFD em crianças. Todos os outros estudos com o gene *DRD4* não evidenciaram efeito em relação à resposta do MFD (Revisão em Stein e McGough, 2008).

A primeira investigação que incluiu genes do sistema serotoninérgico foi realizada por nosso grupo (Zeni e cols., 2007). Nesse trabalho nenhuma associação significativa foi observada com os genes *HTR1B*, *HTR2A* e *5HTT* e resposta ao MFD.

Em relação ao sistema noradrenérgico, Polanczyk e cols. (2007b) estudaram o SNP -1291C>G localizado na região promotora do gene *ADRA2A*. Os autores documentaram o efeito da presença do alelo G com a melhora de sintomas de desatenção em crianças e adolescentes com TDAH. da Silva e cols. (2008) replicaram esse resultado em uma amostra do tipo exclusivamente desatento da mesma população.

---

## **Capítulo 2**

### **JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS**

---

O TDAH é uma doença muito comum em crianças e adolescentes, com grandes prejuízos na vida escolar e pessoal, assim como a persistência do transtorno no adulto pode causar graves impactos em suas vidas. Esses prejuízos causados tanto para as crianças e adolescentes quanto para os adultos com TDAH exercem um grande impacto na nossa sociedade, com conseqüente custo financeiro. Devido a isso é de grande importância o estudo dessa patologia.

Tendo em vista o forte componente genético do TDAH, é de suma importância buscar identificar os genes de suscetibilidade para esse transtorno. A neurobiologia da doença ainda não é completamente entendida, mas muitas evidências apontam para disfunções nos sistemas dopaminérgicos, noradrenérgicos e serotoninérgicos. Devido a isso parece muito promissor o estudo de variantes nos genes envolvidos nesses sistemas. O estudo de genes do sistema serotoninérgico, em especial, pode ser de grande contribuição, uma vez que este sistema possui relação com o sistema dopaminérgico, o qual é altamente relacionado ao TDAH. Além disso, muitas investigações evidenciam que alterações da serotonina possam causar problemas comportamentais em humanos. Como esses genes são menos estudados no TDAH em comparação aos sistemas dopaminérgicos e noradrenérgicos, percebe-se que há uma necessidade de mais investigações relacionadas aos polimorfismos de genes serotoninérgicos.

Além disso, como o TDAH é um transtorno extremamente complexo e heterogêneo, possivelmente vários genes de diferentes sistemas que interagem entre si atuam diferencialmente na formação dos tipos clínicos. Assim estudos dos genes desses sistemas em amostras mais específicas são sugeridos por muitos autores para diminuir a heterogeneidade do transtorno. O refinamento por subtipos poderia facilitar a identificação dos genes de suscetibilidade para essa doença.

São objetivos específicos desta tese:

- 1- Investigar a possível associação de polimorfismos no gene *HTR1B* na amostra de crianças afetadas com TDAH.
- 2- Determinar se existem associações mais específicas quando os pacientes são separados em subgrupos exclusivamente do subtipo desatento. Com isso verificar se os polimorfismos mais estudados dos genes do sistema dopaminérgico, noradrenérgico e serotoninérgico estão associados exclusivamente ao subtipo desatento.

3- Analisar se existe uma possível associação entre o polimorfismo uVNTR do gene *MAOA* e uma melhora clínica observada nos sintomas de oposição em crianças com TDAH tratadas com metilfenidato.

---

### **Capítulo 3**

Further Evidence for the Association between Attention  
Deficit/Hyperactivity Disorder and the Serotonin Receptor 1B Gene  
manuscrito em preparação (American Journal of Medical Genetics-Part B)

---

**FURTHER EVIDENCE FOR THE ASSOCIATION BETWEEN ATTENTION  
DEFICIT/HYPERACTIVITY DISORDER AND THE SEROTONIN RECEPTOR 1B GENE**

Ana P. Guimarães<sup>1</sup>, Marcelo Schmitz<sup>2</sup>, Guilherme V. Polanczyk<sup>3</sup>, Cristian Zeni<sup>2</sup>, Julia Genro<sup>1</sup>, Tatiana Roman<sup>1</sup>, Luis A. Rohde<sup>2</sup>, and Mara H. Hutz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Genética, <sup>2</sup>Departamento de Psiquiatria, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; <sup>3</sup>Social, Genetic, and Developmental Psychiatry Centre, Institute of Psychiatry, King's College London, London, UK.

**Running title:** HRT1B gene and ADHD

**Correspondence to:**

Prof. Mara H. Hutz

Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UFRGS. Caixa Postal 15053, 91501-970- Porto Alegre, RS, Brazil.

Phone: 55-51-3308-6720

FAX: 55-51-3308-7311

E-mail: mara.hutz@ufrgs.br

## ABSTRACT

Several evidences suggested that the serotonin 5-HT1B receptor gene may be involved in the susceptibility to attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD). Prior studies reported excess transmissions of the *HTR1B* gene 861G allele to affected ADHD children and of a haplotype block containing this variant and two functional promoter SNPs to probands with ADHD inattentive subtype. However some investigations did not replicate these findings. Therefore we tested for biased transmissions of haplotypes derived from the 861G >C, -161A>T and -261T>G SNPs from parents to ADHD children in 343 families. We also sought to replicate the reported association between *HTR1B* and ADHD-Inattentive subtype. Using a transmission disequilibrium test we found evidence for an excess transmission of haplotype -261G/-161T/861G ( $p=0.014$ ) to affected children in the total sample. When the analysis was repeated with 143 families with ADHD-Inattentive subtype no significant associations were observed. Our results provide additional evidence that *HTR1B* gene may be an important risk factor for the development of ADHD but this effect seems not to be attributable to inattentive cases.

**Keywords:** ADHD; association study, serotonin, ADHD subtypes, *HTR1B* gene



Attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) is a common childhood developmental behavioral disorder that has a prevalence of about 5% [Polanczyk et al., 2007]. The behavioral symptoms of ADHD load onto two separate dimensions, one reflecting inattentiveness and the other reflecting a combination of hyperactivity and impulsivity. These dimensions may be expressed to different extents among children with ADHD, as is reflected in the current DSM-IV designations of primarily inattentive, primarily hyperactive/impulsive and combined subtypes of the disorder. Converging evidence from family, twin, and adoption studies suggests a significant genetic contribution to ADHD, with an estimated average heritability of 76% [Faraone et al., 2005]. Despite the strong heritability, no major gene effects have been discovered; rather it is likely that several genetic variants, each with small effects, together influence the risk of developing ADHD. Both categorical diagnosis and dimensional ratings of ADHD symptoms have been used in molecular genetic studies designed to identify the genes that confer risk to the disorder. The candidate genes associated with the catecholamine neurotransmitter systems have been mentioned in a large body of ADHD genetics literature and, although the dopaminergic genes have so far been the most extensively studied genes associated with the disease, noradrenergic and serotonergic systems have also been the focus of investigation in recent studies [Mick and Faraone, 2008].

The dopaminergic hypothesis [Swanson et al., 2007] is a leading theory on the pathophysiology of ADHD, but one limitation of this theory is that it overlooks the interaction between the dopamine (DA) and serotonin (5-HT) neurotransmitter systems. A large body of experimental evidences suggested that 5-HT can modulate the activity of DA in human brain and alteration in 5-HT transmission can modify DA-mediated behaviors, such as hyperactivity and aggression [Halperin et al., 1997; Lucki et al.,

1998]. The exact nature of this regulatory influence appears to be complex, with animal models suggesting that serotonergic neurons have an inhibitory influence on dopamine cell bodies in midbrain regions, and both excitatory and inhibitory influence on dopamine projections in the striatum, nucleus accumbens and the prefrontal cortex [Quist et al., 2001]. Evidence for an association between serotonin (5-HT) and ADHD comes from a report by Gainetdinov et al. [1999] showing that methylphenidate decreases hyperlocomotion in DAT1-knockout mice by increasing 5-HT neurotransmission. Administration of fluoxetine (a selective serotonin re-uptake inhibitor) was found to reduce the hyperactivity produced by knocking out the dopamine transporter gene (DAT-KO) in mice and had no effect on wild type animals. Furthermore, when DAT-KO mice were treated with 5-HT or with the dietary 5-HT precursor (L-tryptophan), hyperactivity was significantly reduced. These findings demonstrate the importance of 5-HT in relation to the hyperactivity observed in DAT-KO mice [Gainetdinov et al., 1999; Quist et al., 2001]. Additionally, low platelet and whole blood 5-HT levels have been reported in ADHD probands [Spivak et al., 1999]. Investigations with knocked out mice that lack the 5-HT<sub>1B</sub> receptor have demonstrated hyperactivity, intense exploratory activity, aggressive behavior and increased vulnerability to cocaine self-administration [Brunner et al., 1999; Zhuang et al., 1999]. Another study has also shown in experiments that the absence of 5-HT<sub>1B</sub> receptors in mice is associated with important changes in physiology as well as in behavior [Bouwunecht et al., 2001]. Based on these reports, the 5-HT<sub>1B</sub> receptor became an interesting focus for ADHD genetic studies.

The intronless human *HTR1B* gene, which is located at 6q14.3-q16.3 encodes a 390 – amino-acid polypeptide [Jin et al., 1992]. The most investigated polymorphism in ADHD samples is 861G >C, a silent substitution (rs6296) [Lappalainen et al., 1995].

Several independent studies found preferential transmission of the “G” allele at this single nucleotide polymorphism (SNP) in ADHD families [Hawi et al., 2002; Quist et al., 2003]. In Han Chinese, Li et al. [2005], besides 861G >C polymorphism screened a promoter polymorphism -161A>T (rs130058) and reported a tendency toward over-transmission of an 861G/-161A haplotype or under-transmission of an 861C/-161A haplotype to children with ADHD-Inattentive type (ADHD-I). A pooled analysis for the 861G >C SNP reported by Faraone et al. [2005] indicated a small but significant effect for this polymorphism (OR of 1.44; 95% CI 1.14-1.83) on ADHD risk. Smoller et al. [2006] identified an association between ADHD-I and a HTR1B 6-SNP haplotype, including the 861G >C variant and two promoter SNPs with functional effects on *HTR1B* expression (-161A>T and -261T>G). Ickowicz et al. [2007] did not support an association between the *HTR1B* gene and ADHD as a qualitative diagnosis, or as inattentive and hyperactive-impulsive quantitative traits by either TDT single marker or haplotype analysis based on 861G >C and other five additional SNPs, but they did not include in their study the two promoter SNPs investigated by Smoller et al (2006). The 861G >C was also not associated with ADHD in a sample of 102 German families with 229 affected children .nor in a Spanish sample of 188 adults and 263 children ADHD subjects in a case control study [Heiser et al., 2007; Ribasés et al., 2007]. The analysis of combined-type ADHD in the IMAGE project did not identify association with any of the tag SNPs selected for this gene [Brookes et al., 2006].

Based on these conflicting results, the aim of this study was to investigate *HTR1B* gene polymorphisms to determine if there was evidence for biased transmission of haplotypes derived from the 861G >C, -161A>T and -261T>G from parents to 343 families with ADHD children. We also sought to replicate the findings from Li et al. [2005] and

Smoller et al. [2006] that the association between *HTR1B* is preferentially with ADHD-I.

A total of 343 families with an ADHD child were included in the study. The largest sample was composed of 243 children with ADHD clinical diagnosis recruited at the Child and Adolescent Psychiatric Division of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). An ADHD consensus diagnosis based on DSM-IV criteria was achieved as described in detail previously [Roman et al., 2001]. These patients were predominantly males (82.6%), from European descent (92.1%), and their mean age was 10.3 years. Most of them presented the combined type (65.6%), and oppositional defiant disorder was the most common comorbid condition. The remaining 100 families were of children with ADHD inattentive type. This group was ascertained from 12 public schools. Inclusion and diagnostic criteria for this sample have been fully described elsewhere [Schmitz et al., 2006]. The project was approved by the Ethical committee of HCPA and the coordinating committee of the Graduate Program in Genetics and Molecular Biology from the Federal University of Rio Grande do Sul. Parents provided verbal assent to participate.

DNA was extracted from whole blood by a salting out procedure [Lahiri and Nurnberger, 1991]. The three polymorphisms 861G >C, -161A>T and -261T>G were genotyped by PCR using primers and methods described elsewhere [Nöthen et al., 1994; Lappalainen et al., 1995; Sun et al., 2002]. Pairwise linkage disequilibrium (LD) was estimated using the Multiple Locus Haplotype software (mlocusSNP) (Long, 1999). The haplotype family-based association analyses were performed using the statistical program TRANSMIT [Clayton, 1999].

All SNPs investigated were in pairwise significant LD (861G >C -161A>T:  $D' = 0.934$ ;  $P = 0.0001$ ; 861G >C -261T>G:  $D' = 0.954$ ;  $P = 0.0001$ ; -161A>T --261T>G:  $D' =$

0.940 and  $P = 0.0001$ ). As shown in Table I haplotype analyses of the 316 informative ADHD families detected an over-transmission of -261G/-161T/861G haplotype ( $p=0.014$ ) and under-transmission of -261G/-161T/861C haplotype ( $p=0.0009$ ). However when the same analyses were carried out only with 143 families with ADHD-I subtype no preferential transmission of alleles from parents to probands was observed (Table I).

Our findings indicate an association between ADHD and *HTR1B* gene. These results concur with the significant evidence of association with ADHD on the basis of the pooled OR reported by Faraone et al. [2005] for the 861G >C SNP, but in contrast to reports by Li et al. [2006] and Smoller et al. [2006], no evidences for preferential transmissions were found for ADHD-I youths.

Our results show that the over-transmitted and the under-transmitted haplotypes (-261G/-161T/861G and -261G/-161T/861C respectively) differ only at the 861 site. When only the common SNPs between this study and those investigated by Smoller et al. [2006] were compared it can be observed that in their study the over-transmitted haplotype differed from the two observed here at -161 and -261 sites (-261T/-161A/861G). Duan et al. [2003a], based on reporter gene assays, described that the two functional promoter SNPs -261T>G and -161A>T exhibit opposing effect on gene expression, their functional effect on transcription is null when allele -261G and allele -161T are in the same haplotype as observed here whereas the combination reported by Smoller et al. [2006] (-261T/-161A) is associated with lower *HTR1B* expression.

The most consistent associations reported in ADHD studies is with the 861G >C SNP, although it is a synonymous SNP, Huang et al. [1999] reported an association between the 861G allele and high  $B_{\max}$  values for *HTR1B* binding in prefrontal cortex. These results suggest that it is possible that the minor allele 861C is associated with fewer 5-

HT1B receptors. Although it is always claimed that synonymous SNPs are non-functional, a different gene expression pattern might occur by the following reasons: (1) transfer RNA (tRNA) concentrations may be variable for different codons; (2) synonymous changes can modify the predicted messenger RNA (mRNA) folding and lead to changes in mRNA stability and translation as has been suggested for the dopamine receptor D2 gene [Duan et al., 2003b]. Therefore considering all the data available about *HTR1B* association with ADHD is plausible to hypothesize that the 861G >C might be the risk polymorphism or it is a marker for a yet unidentified functional SNP at this gene.

Low central serotonergic function has been implicated in the mediation of negative emotions, impulsive aggressive behaviors, and increased use of alcohol and nicotine [Williams et al., 2003]. Knockout mice have also shown that *HTR1B* effects are associated mainly with hyperactivity and aggressive behaviors [Bouwknicht et al., 2001]. Therefore our observation of an association with all ADHD families which included the combined and hyperactive/impulsive subtypes is closer to what were expected based on animal models than an association specific to the inattentive subtype. Our results should be interpreted in the context of several limitations. Considering the whole sample it is of moderate size, but our inattentive subtype sample is larger than that investigated by Smoller et al. [2006] in which an association was found for this subtype. Moreover it is important to highlight that only subjects with at most three symptoms of hyperactivity were included in the inattentive subtype sample, so we have avoided subthreshold ADHD-combined cases instead of real inattentive cases. We have only performed two analyses with the TRANSMIT program to avoid multiple testing but we cannot exclude that our positive association with haplotype 261G/-161T/861G is a false positive. Besides the 861G >C SNP we concentrated our study in two putative

functional SNPs (-161A>T and -261T>G) but we cannot exclude a role for 129C>T (rs6298) and A1180A>G (rs6297) SNPs that presented allele differences in the over-transmitted and under-transmitted haplotypes described by Smoller et al. [2006]. However Ickowicz et al. [2007] included these last two polymorphisms together with the 861G >C in their investigation and were not able to disclose an association with ADHD in general or with the inattentive subtype.

In conclusion, this study found a new evidence of the influence of the 861G >C polymorphism on ADHD risk but no specific association was observed with the inattentive subtype alone. Therefore the present results add to the evidences that suggest a role for *HTR1B* gene in ADHD genetic susceptibility in Brazilian children.

### **Acknowledgments**

The authors thank the financial support provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil), Institutos do Milênio (CNPq), PRONEX, and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul.

Conflict of interest: Dr L.A. Rohde was on the speakers' bureau and/or acted as consultant for Eli-Lilly, Janssen-Cilag, and Novartis in the last three years. Currently, his only industry related activity is taking part of the advisory board/speakers bureau for Eli Lilly & Company. The ADHD Outpatient Program receives unrestricted educational and research support from the following pharmaceutical companies: Bristol-Myers Squibb, Eli-Lilly, Janssen-Cilag, and Novartis. Guilherme Polanczyk is on the speakers' bureau of Novartis. Cristian Zeni: The ADHD and Juvenile Bipolar Disorder Outpatient Programs receive research support from the following pharmaceutical companies: Abbott Laboratories, Bristol-Myers Squibb, Eli-Lilly, Janssen-Cilag, and Novartis

## References

- Bouwknicht JA, Hijzen TH, van der Gugten J, Maes RA, Hen R, Olivier B. 2001. Absence of 5-HT(1B) receptors is associated with impaired impulse control in male 5-HT(1B) knockout mice. *Biol Psychiatry* 49: 557-568.
- Brookes K, Xu X, Chen W, Zhou K, Neale B, Lowe N, et al. 2006. The analysis of 51 genes in DSM-IV combined type attention deficit hyperactivity disorder: association signals in DRD4, DAT1 and 16 other genes. *Molecular Psychiatry* 11: 934–953.
- Brunner D, Buhot MC, Hen R, Hofer M. 1999. Anxiety, motor activation and maternal–infant interactions in 5HT1B knockout mice. *Behav Neurosci* 113: 587–601.
- Clayton D. 1999. A generalization of the transmission/disequilibrium test for uncertain haplotype transmission. *Am J Hum Genet* 65: 1170-1177.
- Duan J, Sanders AR, Molen JE, Martinolich L, Mowry BJ, Levinson DF, et al. 2003a. Polymorphisms in the 5'-untranslated region of the human serotonin receptor 1B (HTR1B) gene affect gene expression. *Mol Psychiatry* 8: 901–910.
- Duan J, Wainwright MS, Comeron JM, Saitou N, Sanders AR, Gelernter J et al. 2003b. Synonymous mutations in the human dopamine receptor D2 (DRD2) affect mRNA stability and synthesis of the receptor. *Hum Mol Genet* 12: 205-216.



- Faraone SV, Perlis RH, Doyle AE, Smoller JW, Goralnick JJ, Holmgren MA, Sklar P. 2005. Molecular Genetics of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Biol Psychiatry* 57:1313–1323.
- Gainetdinov RR, Wetsel WC, Jones SR, Levin ED, Jaber M, Caron MG. 1999. Role of serotonin in the paradoxical calming effect of psychostimulants on hyperactivity. *Science* 283: 397-401.
- Halperin JM, Newcorn JH, Schwartz ST, Sharma V, Siever LJ, Koda VH. 1997. Age related changes in the association between serotonin function and aggression in boys with ADHD. *Biol Psychiatry* 41: 682-689.
- Hawi Z, Dring M, Kirley A, Foley D, Kent L, Craddock N, et al. 2002. Serotonergic system and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): a potential susceptibility locus at the 5-HT1B receptor gene in 273 nuclear families from a multi-centre sample. *Mol Psychiatry* 7: 718-725.
- Heiser P, Dempfle A, Friedel S, Konrad K, Hinney A, Kiefl H, Walitza S, Bettecken T, Saar K, Linder M, Warnke A, Herpertz-Dahlmann B, Schäfer H, Remschmidt H, Hebebrand J. 2007. Family-based association study of serotonergic candidate genes and attention-deficit/hyperactivity disorder in a German sample. *J Neural Transm* 114: 513–521.

- Huang YY, Grailhe R, Arango V, Hen R, Mann JJ. 1999. Relationship of psychopathology to the human serotonin1B genotype and receptor binding kinetics in postmortem brain tissue. *Neuropsychopharmacology* 21: 238–246.
- Ickowicz A, Feng Y, Wigg K, Quist J, Pathare T, Roberts W, Malone M, Schachar R, Tannock R, Kennedy JL, Barr1 CL. 2007. The Serotonin Receptor HTR1B: Gene Polymorphisms in Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *Am J of Med Genet Part B* 144B:121–125.
- Jin, H., Oksenberg, D., Ashkenazi, A., Peroutka, S. J., Duncan, A. M., Rozmahel, R., Yang, Y. *et al.* 1992. Characterization of the human 5-hydroxytryptamine1B receptor. *J. Biol. Chem* **267**: 5735–5738.
- Lahiri DK and Nurnberger JI. 1991. Rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Research* 19: 5444.
- Lappalainen J, Dean M, Charbonneau L, Virkkunen M, Linnoila M, Goldman D. 1995. 5-HT1D beta autoreceptor gene on chromosome 6 and direct analysis for sequence variants. *Am. J. Med. Genet* 60: 157–161.
- Li J, Yufeng Wang, Zhou Rulun, Zhang H, Li Y, Wang B, Khan S, Faraone S. 2005. Serotonin 5-HT1B receptor gene and attention deficit hyperactivity disorder in chinese Han subjects. *Am J of Med Genet Part B* 132B: 59-63.

- Lucki I. 1998. The spectrum of behaviors influenced by serotonin. *Biol Psychiatry* 44: 151-162.
- Mick, E, Faraone, SV. 2008. Genetics of attention deficit hyperactivity disorder. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am* 17: 261-284.
- Nöthen MM, Erdmann J, Shimron-Abarbanell D, and Propping, P. 1994. Identification of genetic variation in the human serotonin 1D beta receptor gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205: 1194–1200.
- Polanczyk G, Silva de Lima M, Horta BL, Biederman J, Rohde LA. 2007. The Worldwide Prevalence of ADHD: A Systematic Review and Metaregression Analysis. *Am J Psychiatry* 164: 942–948.
- Quist JF e Kennedy JL (2001) Genetics of childhood disorders: XXIII. ADHD, Part 7: The serotonin system. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 40:253-256.
- Quist JF, Barr CL, Schachar R, Roberts W, Malone M, Tannock R, Basile VS, Beitchman J e Kennedy JL. 2003. The serotonin 5-HT1B receptor gene and attention deficit hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry* 8: 98-102.
- Ribasés M, Ramos-Quiroga JA, Hervás A, Bosch R, Bielsa A, Gastaminza X, Artigas J, Rodríguez-Ben S, Estivill X, Casas M, Cormand B, Bayés M. 2007. Exploration of 19 serotonergic candidate genes in adults and children with attention-

deficit/hyperactivity disorder identifies association for 5HT2A, DDC and MAOB. *Mol Psychiatry*. [Epub ahead of print].

Roman T, Schmitz M, Polanczyk G, Eizirik M, Rohde LA, Hutz MH. 2001. Attention-deficit hyperactivity disorder: a study of association with both the dopamine transporter gene and the dopamine D4 receptor gene. *Am J Med Genet* 105: 471-8.

Schmitz M, Denardin D, Laufer Silva T, Pianca T, Hutz MH, Faraone S, Rohde LA. 2006. Smoking during pregnancy and attention-deficit/hyperactivity disorder, predominantly inattentive type: a case-control study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 45:1338-45.

Smoller JW, Biederman J, Arbeitman L, Doyle AE, Fagerness J, Perlis RH, Sklar P, Faraone SV. 2006. Association between the 5HT1B receptor gene (HTR1B) and the inattentive subtype of ADHD. *Biol Psychiatry* 59: 460–467.

Spivak B, Vered Y, Yoran-Hegesh R, Averbuch E, Mester R, Graf E, Weizman A. 1999. Circulatory levels of catecholamines, serotonin and lipids in attention deficit hyperactivity disorder. *Acta Psychiatr Scand* 99: 300-304.

Sun HF, Chang YT, Fann CS, Chang CJ, Chen YH, Hsu YP et al. 2002. Association study of novel human serotonin 5-HT(1B) polymorphisms with alcohol dependence in Taiwanese Han. *Biol Psychiatry* 51: 896–901.

Swanson JM, Kinsbourne M, Nigg J, Lanphear B, Stefanatos GA, Volkow N et al.

2007. Etiologic subtypes of attention-deficit/hyperactivity disorder: brain imaging, molecular genetic and environmental factors and the dopamine hypothesis. *Neuropsychol Rev* 17: 39-59.

Williams RB, Marchuk DA, Gadde KM, Barefoot JC, Grichnik K, Helms MJ et al.

2003. Serotonin – Related gene polymorphisms and Central Nervous System Serotonin Function. *Neuropsychopharmacology* 28: 533-541.

Zhuang X, Gross C, Santarelli L, Compan V, Trillat AC, Hen R. 1999. Altered

emotional states in knockout mice lacking 5-HT1A or 5-HT1B receptors. *Neuropsychopharmacology* 21: 52– 60.

Table I. Haplotype Analysis of *HTR1B* polymorphisms with ADHD and ADHD-Inattentive type samples

Polymorphisms			Total <sup>N</sup>		Inattentive <sup>N</sup>	
rs11568817	rs130058	rs6296	Haplotype freq	P-value *	Haplotype freq	P-value *
T	A	C	0.235	0.542	0.225	0.449
T	A	G	0.253	0.336	0.249	0.423
T	T	C	0.006	0.581	0.011	0.832
T	T	G	0.014	0.644	0.015	0.883
G	A	C	0.009	0.436	0.003	0.753
G	A	G	0.173	0.702	0.168	0.945
G	T	C	0.003	0.0009	0.001	0.267
G	T	G	0.304	0.014	0.324	0.882
Global				0.250	0.942	

N, number of total sample families=316 and number of inattentive sample families=143

---

## **Capítulo 4**

Association study of six genes with attention deficit/hyperactivity  
disorder-predominantly inattentive type

Manuscrito a ser submetido no periódico Genes, Brain and Behavior

---

**ASSOCIATION STUDY OF SIX GENES WITH ATTENTION  
DEFICIT/HYPERACTIVITY DISORDER-PREDOMINANTLY INATTENTIVE TYPE**

A.P. Guimarães<sup>1</sup>, M. Schmitz<sup>2</sup>, T. Roman<sup>1</sup>, L.A. Rohde<sup>2</sup> and M.H. Hutz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Genética, <sup>2</sup>Departamento de Psiquiatria, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Correspondence and reprint requests to:

Prof. Mara H. Hutz  
Departamento de Genética  
Instituto de Biociências, UFRGS  
Caixa Postal 15053  
91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil  
Phone: 55 51 3308-6720  
Fax: 55 51 3343-5850  
E-mail: [mara.hutz@ufrgs.br](mailto:mara.hutz@ufrgs.br)

**Running Title:** ADHD-Inattentive type genetics

**Key Words:** ADHD subtypes, candidate genes, ADHD refined phenotypes, inattentive symptoms, association study

Date of submission:

Number of words: Abstract: 223; Introduction: 485; Discussion: 1504



## ABSTRACT

Attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD) is a common, complex and highly heritable disorder, characterized by inattentive, impulsive and hyperactive behavior. Due to the dimensional nature of the disease, it is likely that genes that contribute to the risk for ADHD do so by conferring risk for specific diagnostic subtypes or symptom dimensions, therefore the aim of this study was to investigate six genes from the dopaminergic (*DRD4* and *DAT1*), noradrenergic (*DBH*) and serotonergic (*HTR2A*, *SLC6A4* and *TPH2*) systems, that were reported to be associated with ADHD with conflicting results, in a sample of children and adolescents with ADHD-Inattentive type to assess if the lack of replication across the available studies completed so far could be reduced by the examination of refined phenotypes such as ADHD subtypes. Seven polymorphisms were genotyped by PCR-based methods in a sample of 128 probands with ADHD inattentive subtype (ADHD-I) and 100 controls. No significant association was observed between *SLC6A4*, *HTR2A*, *TPH-2*, *DRD4*, *DAT1* and *DBH* gene polymorphisms and ADHD-I in case-control association analyses. Moreover, family-based association analyses showed no evidence for biased transmission of any of the polymorphisms investigated in this sample. These negative results found in the present study together with data already reported suggest that some symptom-specific genes might be identified, but probably the DSM-IV categorical subtypes are not the most appropriate phenotype to find these genes.

## INTRODUCTION

Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) is among the most common childhood and adolescent psychiatric disorders, affecting about 5% of children worldwide (Polanczyk *et al.*, 2007). Although its etiology remains unclear, there is strong evidence supporting the role of genes in the disorder, its heritability has been estimated in 76% (Faraone *et al.*, 2005).

ADHD is characterized by developmentally inappropriate and impairing levels of inattention, hyperactivity, and impulsivity. As currently recognized by the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, fourth edition (DSM-IV), the behavioral symptoms of ADHD load onto two separate dimensions, one reflecting inattentiveness and the other reflecting a combination of hyperactivity and impulsivity. These dimensions may be expressed to different extents among children with ADHD, as is reflected in the current DSM-IV designations of primarily inattentive, primarily hyperactive/impulsive, and combined subtypes of the disorder but whether these are genetically distinct is unclear. A major step in elucidating the genetic elements contributing to a disorder is determining what aspects of the disorder are heritable. Despite the almost universal reliance of current candidate gene and genetic linkage studies of ADHD on DSM-IV nosology, very little evidence has been presented regarding the relative heritabilities or familial specificities of DSM-IV ADHD subtypes. Faraone *et al.* (2000) found no evidence of familial distinction between subtypes, a finding different from that suggested from a twin study (Sherman *et al.*, 2007) in which 50% to 70% of the underlying genetic influences were estimated to be unique for hyperactive-impulsive and inattentive symptoms, whereas in Faraone *et al.* (2000) family series there was virtually complete genetic overlap for these two dimensions despite significant variability in symptoms, particularly hyperactive-impulsive

symptoms. These authors concluded that DSM-IV subtypes do not affect the familial transmission of ADHD. Instead, it could be attributed to nonfamilial causes. In contrast, however some studies showed that the DSM-IV subtypes are familial and independently inheritable (Todd *et al.*, 2001a; Rasmussen *et al.*, 2004). Overall the evidence that DSM-IV subtypes are genetically distinct, or that they access substantially different sets of risk or modifier genes, is challenging. Thus examining clinical subtypes separately; to refine the phenotype definition and to provide more homogenous subtypes that could better index the genetic liability may help to find ADHD genes.

The focus for genetic studies has been the dopaminergic, noradrenergic and serotonergic systems, in which the pharmacological, biochemical and neurobiological-study evidences have indicated the involvement of these systems in the pathophysiology of ADHD. Therefore genes coding for receptors or other proteins related to these pathways were selected for ADHD genetic studies (for a revision see Mick and Faraone, 2008). However the lack of replication across the available studies completed so far suggests that the examination of refined phenotypes such as ADHD subtypes that may reduce heterogeneity is needed. In an attempt to further refine ADHD molecular studies we extended the search for the most studied candidate genes to a Brazilian sample of ADHD primarily inattentive subtype (ADHD-I).

## **SUBJECTS AND METHODS**

A total of 128 families including offspring with ADHD-I were recruited from two ongoing studies. The largest sample consisted of 100 children recruited from 12 public schools. The characteristics and diagnostic criteria for this community sample were fully described by Schmitz *et al.* (2006). For these 100 cases selected in schools, 100 matched controls (same gender and age), who had at most three inattentive symptoms

and three hyperactivity and impulsivity symptoms in the SNAP-IV scale completed by the teacher was included in the study. The second group of 28 children and their parents was ascertained among those referred to the ADHD outpatient clinic from the Child and Adolescent Psychiatric Division of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Confirmed ADHD-I cases presenting, or not, comorbidity with other disorders were included in the study, but to ensure that we would be dealing with a relatively pure ADHD–inattentive type, we only included cases fulfilling *DSM-IV* criteria for ADHD–inattentive type, but that presented at most three symptoms of hyperactivity and impulsivity

The Ethics committee of HCPA and the Coordinating Committee of the Graduate Program in Genetics and Molecular Biology of the Federal University of Rio Grande do Sul approved the study protocol. Parents provided written informed consent and probands provided verbal assent to participate.

### **Genotyping**

DNA was extracted from whole blood by a salting out procedure (Lahiri and Nurnberger, 1991). The polymorphisms investigated were the 44bp insertion/deletion polymorphism (HTTLPR) at the *SLC6A4* promoter, G1438A (rs6311) and His452Tyr (rs6314) at *HTR2A*, the 48bp variable number of tandem repeat (VNTR) sequence at *DRD4* third exon, the 40bp VNTR at DAT1 3'-untranslated region and the *TaqI* restriction site polymorphism at *DBH* (rs2519152) and T16073G (rs1843809) at *TPH-2*. These polymorphisms were amplified using the polymerase chain reaction (PCR) conditions as previously described Guimarães *et al.* (2007) and Roman *et al.* (2001), (2002), respectively. The *TPH-2* SNP was genotyped using the TaqMan SNP

Genotyping Assay by demand (Real Time PCR, Applied Biosystems) according to the manufacturer's recommended protocol.

### **Statistical Analyses**

Allele frequencies were estimated by gene counting. The agreement of genotype frequencies to Hardy-Weinberg expectations was tested using the goodness of fit chi-square test. The family-based association analyses for all markers were performed using the TRANSMIT program (Clayton, 1999). For these analyses heterozygous parent/proband pairs with the same genotype were excluded since the transmission status of parental alleles could not be determined (Curtis and Sham, 1995).

In the case-control association approach, we used conditional logistic regression analysis (Hosmer and Lemeshow, 2000) to compare demographic variables (age; ethnicity; IQ - intelligence quotient and gender) and clinical variables (CD, conduct disorder; ODD, oppositional defiant disorder; GAD, generalized anxiety disorder; SAD, separation anxiety disorder; Major Depression; dysthymia; simple phobia and social phobia), and the genotype frequencies between probands and controls. All variables showing some level of association ( $P < 0.20$ ) with both dependent and independent variables were considered potential confounders. The analyses were conducted using SPSS version 12.0 software (SPSS Inc, Chicago, III). A significance level of 5% was set in all analyses (except for potential confounders, as indicated above). Tests were 2-tailed. The Sample Size Logistic statistical program (Demidenko, 2007) was used to calculate statistical power.

## RESULTS

Allele frequencies of cases and controls for all polymorphisms investigated are shown in Table 1. Genotype frequencies did not show any significant deviation from those expected according to Hardy-Weinberg equilibrium. No significant overtransmission of risk alleles for all polymorphisms investigated was seen in the family-based association analyses (Table 2).

At the case-control association approach, the potential confounders varied for each polymorphism. In the conditional logistic regression analysis adjusted for potential confounders, no association was observed as shown in Table 3.

## DISCUSSION

Based on previous molecular genetic studies of ADHD, we tested 7 polymorphisms from 6 candidate genes in a sample of 128 probands with ADHD inattentive subtype and 100 controls. No significant association was observed between *SLC6A4*, *HTR2A*, *THP-2*, *DRD4*, *DAT1* and *DBH* gene polymorphisms and ADHD-I in case-control association analyses. Moreover, TDT analysis using the TRANSMIT program showed no evidence for biased transmission of any of the polymorphisms investigated in this sample.

Bobb *et al.* (2005), in a review on molecular genetic studies, observed that 46% of 26 studies using family-based and case-control approaches on the same population found divergent results. They suggested that both methods should be used to prevent the possibility of type II error. Furthermore, Pfeiffer and Gail (2003) found equivalent statistical power for both designs, therefore we used both methods.

It has been suggested that it is highly unlikely that genes confer risk for the overall spectrum of ADHD (Waldman and Gizer, 2006; Thapar *et al.*, 2006). It is much more

likely that whatever genes contribute to risk for ADHD, they do so by conferring risk for specific diagnostic subtypes or symptom dimensions. Most studies that investigated refined phenotypes used symptoms as quantitative phenotypes or categorically defined subtypes based on DSM-IV criteria. Although there is some support in the literature for a specific genetic contribution to ADHD subtypes, at the molecular level few specific candidate genes were reported to be associated with specific subtypes of ADHD. On the basis of genetic evidence to date, it is interesting to speculate that dopamine pathways are generally involved in attentional ability. Genetic analyses in relation to continuous symptom measures or ADHD subtypes have suggested that some ADHD associated genes may be more strongly associated with inattention than with hyperactivity/impulsivity.

Several studies have reported positive and negative findings between *DRD4* and inattention. The most studied polymorphism, the exon 3 VNTR was more strongly associated with inattention symptoms (Rowe *et al.*, 1998, 2001). McCracken *et al.* (2000) reported an association of the DSM-IV primarily inattentive type of ADHD with the presence of a 120 bp duplication 5' of the gene coding region. Recently Lasky-Su *et al.* (2008) reported that SNPs in the promoter region of *DRD4* were associated with phenotypes generated from ADHD symptoms. The strong correlation of the inattentive symptoms with these quantitative phenotypes and the subsequent FBAT-PC analyses suggested this region as primarily associated with inattentive symptoms. In contrast to these studies Todd *et al.* (2001b, 2005) failed to demonstrate any significant association of the 120 bp duplication and of the exon 3 VNTR with ADHD subtypes derived from latent class analyses. In accordance with these last results, in the present study we did not find an association between Brazilian youths categorically defined as ADHD-I and the *DRD4* exon 3 VNTR.

Waldman *et al.* (1998) found that *DAT1* was associated and linked only with the combined subtype of ADHD, but not with the Inattentive subtype. Also, no significant associations were found for *DAT1* polymorphisms using DSM-IV ADHD subtypes or latent class analysis by Todd *et al.* (2005). Our analyses presented here showed that the *DAT1* VNTR is not associated with ADHD-I. Taken together these data suggest that probably the *DAT* VNTR 10-repeat allele is more strongly related to hyperactive-impulsive than inattentive symptoms of the disorder.

Other dopaminergic genes investigated with attentional refined phenotypes were *DRD5* and *DRD1*. A common 148-bp allele of a microsatellite marker located 18.5 kb from the D5 dopamine receptor gene (*DRD5*) has been associated with the inattentive and combined subtypes, but not the hyperactive-impulsive subtype (Lowe *et al.*, 2004). Luca *et al.* (2007) found an association with symptoms of inattention, and suggested that the *DRD1* gene is a genetic factor that contributes uniquely to symptoms of inattention in families selected either for ADHD or for reading difficulties.

Although dopaminergic genes are yet the most studied in ADHD (Mick and Faraone, 2008), genes related to the noradrenergic system also have been the focus of investigation (Bobb *et al.*, 2005; Roman *et al.*, 2002, 2006). Pharmacological, biochemical and neuropsychological findings have suggested that noradrenergic imbalance are likely important in ADHD (Biederman and Spencer, 1999). Animal-based studies and clinical investigations suggested that noradrenergic projections to the prefrontal cortex improve cortical functions related to ADHD, such as working memory, basically through postsynaptic alpha 2 receptors (Biederman and Spencer, 1999; Arnsten and Li, 2005). Among several noradrenergic genes, those encoding adrenergic receptors and Dopamine- $\beta$ -hydroxylase (D $\beta$ H) the enzyme that catalyzes the conversion of dopamine (DA) into norepinephrine (NE). Considering the strong



evidence for the involvement of the adrenergic system in attentional mechanisms, the adrenergic system genes are prime candidates for ADHD-I. Schmitz *et al.* (2006) reported an *ADRA2A* polymorphism associated with ADHD-Inattentive type, replicating previous findings that have suggested the importance of this gene for the dimension of inattention (Roman *et al.*, 2003, 2006). Although Faraone *et al.* (2005) suggested after a meta-analysis of family-based studies a significant association between ADHD and the *DBH* Taq1 polymorphism (OR:1.33; 95% CI 1.11-1.59), specific investigations with refined phenotypes or symptom scores have not been performed yet, therefore this study was the first attempt to disclose an association between *DBH* and ADHD-I, but we did not detect a specific influence of this gene on this subtype.

Serotonin 5-hydroxytryptamine (5-HT) is a neurotransmitter involved in a variety of functions such as attention, sleep, memory and learning, locomotion, control of appetite, anxiety and drug abuse (Lucki, 1998). These findings were consistent with preclinical and clinical evidence that serotonergic inputs may moderate dopamine's effects on attention and hyperactivity/impulsivity. The review by Mick and Faraone (2008) also found modest evidence for ADHD to be associated with four serotonergic genes: the serotonin 1B receptor (*HTR1B*), serotonin 2A receptor (*HTR2A*), the serotonin transporter (*SLC6A4*), and tryptophan hydroxylase (*TPH*) the rate-limiting enzyme in the biosynthesis of serotonin from tryptophan. Smoller *et al.* (2006) identified association between DSM-IV primarily inattentive type of ADHD and a *HTR1B* 6-SNP haplotype, including the 861G>C polymorphism and two promoter SNPs with functional effects on *HTR1B* expression. We investigated three of these genes (*HTR2A*, *SLC6A4* and *TPH*) but no association with ADHD-I was observed, since no previous studies were performed between these genes and refined phenotypes, these observations require replication.

Other gene polymorphisms were also associated with attentional phenotypes. Using dimensional analyses, Lasky-Su *et al.* (2007) found multiple significant Brain-derived neurotrophic factor (*BDNF*) SNP-by-socio-economic status interactions using inattentive symptom count. Todd *et al.* (2003) reported a relationship between a variant within the nicotinic acetylcholine receptor alpha 4 subunit gene (*CHRNA4*), and severe inattention problems defined by a latent class analysis, but this finding has not been replicated in a sample DSM-IV categorically defined as ADHD-I or with symptom count (Lee *et al.*, 2008).

The overall negative results presented in this study should be viewed in the context of some limitations. Our sample is of moderate size, especially for transmission/disequilibrium-based methods. Despite of sample size, our investigation has up of 80% statistical power to detect a previously reported positive result (Schmitz *et al.*, 2006), therefore we do not think that the negative associations reported herein are type II errors. As far as we are aware, this study included the largest sample of clinically assessed subjects with specific ADHD-I and this is the major strength of this investigation. Furthermore as it was discussed in our previous study (Schmitz *et al.*, 2006) it is important to highlight that the diagnoses in our study were obtained through an extensive clinic evaluation that was performed by a child and adolescent psychiatrist instead of being derived from scores of self-reported scales of symptoms, which is a limitation in some studies. Also, only subjects with at most three symptoms of hyperactivity were included, so the sample includes subjects with relatively pure ADHD–inattentive subtype.

The evidence that DSM-IV subtypes are genetically distinct, or that they access substantially different sets of risk or modifier genes, is far from compelling. Thus, there is little support for selecting specific ADHD subtypes in molecular genetic studies or

examining clinical subtypes separately at present to refine the phenotype definition (Thapar *et al.*, 2006). McLoughlin *et al.* (2007) reported that individual differences in hyperactive–impulsive and inattentive behaviors are both highly heritable and have a large genetic overlap. Using a large sample of twins they estimated the genetic correlation, as 0.57 for girls and 0.62 for boys, which predicts that more than half of the genes found to be associated with hyperactive impulsive behaviors will also be associated with inattentive behaviors. The genetic correlations are, however, less than 1.0, which indicates that, despite the substantial genetic overlap between hyperactive–impulsive and inattentive behaviors, there is some genetic independence. These findings suggest that many genes associated with the hyperactivity–impulsivity dimension will also be associated with the inattentive dimension but there is significant genetic heterogeneity as well. The negative results found in the present study together with those available in the literature suggest that some symptom-specific genes might be identified, but probably the DSM-IV categorical subtypes are not the most appropriate phenotype to find these genes.

### **Acknowledgments**

The authors thank the financial support provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil), Programa de Apoio de Núcleos de Excelência (PRONEX, Brazil), Institutos do Milênio (CNPq, Brazil), and Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

## REFERENCES

- American Psychiatric Association (1994) Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 4th edition. American Psychiatric Press, Washington DC.
- Arnsten A.F., Li B.M. (2005) Neurobiology of executive functions: catecholamine influences on prefrontal cortical functions. *Biol Psychiatry* **57**, 1377-84.
- Biederman J., Spencer T. (1999) Attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) as a noradrenergic disorder. *Biol Psychiatry* **9**, 1234-42.
- Bobb A.J., Addington A.M., Sidransky E., Gornick M.C., Lerch J.P., Greenstein D.K. *et al.* (2005) Support for association between ADHD and two candidate genes: NET1 and DRD1. *Am.J.Med.Genet.B Neuropsychiatr.Genet* **134**, 67-72.
- Clayton D. (1999) A generalization of the transmission/disequilibrium test for uncertain haplotype transmission. *Am J Hum Genet* **65**, 1170-1177.
- Curtis D., Sham P.C. (1995) A note on the application of the transmission disequilibrium test when a parent is missing. *Am J Hum Genet* **56**, 811-812.
- Demidenko E. (2007) Sample size determination for logistic regression revisited. *Stat Med.* **26**, 3385-3397.
- Faraone S.V., Biederman J., Friedman D. (2000) Validity of DSM-IV subtypes of attention-deficit/hyperactivity disorder: a family study perspective. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* **39**, 300-307.
- Faraone S.V., Perlis R.H., Doyle A.E., Smoller J.W., Goralnick J.J., Holmgren M.A., Sklar P. (2005) Molecular genetics of attention deficit hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* **57**, 1313–1323.
- Guimarães A.P., Zeni C., Polanczyk G.V., Genro J.P., Roman T., Rohde L.A., Hutz M.H. (2007) Serotonin genes and attention deficit/hyperactivity disorder in a Brazilian sample: preferential transmission of the HTR2A 452His allele to affected boys. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **144**, 69–73.

- Hosmer D., Lemeshow S. (2000) Applied Logistic Regression. Hoboken, NJ: Wiley-Interscience.
- Lahiri D.K. and Nurnberger J.I. (1991) Rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Research* **19**, 5444.
- Lasky-Su J., Faraone S.V., Lange C., Tsuang M.T., Doyle A.E., Smoller J.W., Laird N.M., Biederman J.A. (2007) Study of how socioeconomic status moderates the relationship between SNPs encompassing BDNF and ADHD symptom counts in ADHD families. *Behav Genet* **37**, 487-97.
- Lasky-Su J., Lange C., Biederman J., Tsuang M., Doyle A.E., Smoller J.W., Laird N., Faraone S. (2008) Family-based association analysis of a statistically derived quantitative traits for ADHD reveal an association in DRD4 with inattentive symptoms in ADHD individuals. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **147B**, 100-6.
- Lee J., Laurin N., Crosbie J., Ickowicz A., Pathare T., Malone M., Kennedy J.L., Tannock R., Schachar R., Barr C.L. (2008) Association study of the nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 4$  subunit gene, CHRNA4, in attention-deficit hyperactivity disorder. *Genes, Brain and Behavior* **7**, 53–60.
- Lowe N., Kirley A., Hawi Z., Sham P., Wickham H., Kratochvil C.J., Smith S.D., Lee S.Y., Levy F., Kent L., Middle F., Rohde L.A., Roman T., Tahir A., Yazgan Y., Asherson P., Mill J., Thapar A., Payton A., Todd R.D., Stephens T., Ebbstein R.P., Manor I., Barr C.L., Wigg K.G., Sinke R.J., Buitelaar J.K., Smalley S.L., Nelson S.F., Biederman J., Faraone S.V., Gill M. (2004) Joint Analysis of the DRD5 Marker Concludes Association with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder Confined to the Predominantly Inattentive and Combined Subtypes. *Am. J. Hum. Genet* **74**, 348–356.
- Luca P., Laurin N., Misener V.L., Wigg K.G., Anderson B., Cate-Carter T., Tannock R., Humphries T., Lovett M.W., Barr C.L. (2005) Association of the dopamine receptor D1 gene, DRD1, with inattention symptoms in families selected for reading problems. *Mol Psychiatry* **12**, 776-85.

- Lucki I. (1998) The spectrum of behaviors influenced by serotonin. *Biol Psychiatry* **44**, 151-162.
- McCracken J.T., Smalley S.L., McGough J.J., Crawford L., Del'Homme M., Cantor R.M., Liu A., Nelson S.F. (2000) Evidence for linkage of a tandem duplication polymorphism upstream of the dopamine D4 receptor gene (DRD4) with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Mol Psychiatry* **5**, 531-536.
- McLoughlin G., Ronald A., Kuntsi J., Asherson P., Plomin R. (2007) Genetic Support for the Dual Nature of Attention Deficit Hyperactivity Disorder: Substantial Genetic Overlap Between the Inattentive and Hyperactive-impulsive Components. *J Abnorm Child Psychol* **35**, 999-1008.
- Mick E., Faraone S.V. (2008) Genetics of attention deficit hyperactivity disorder. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am* **17**, 261-284.
- Pfeiffer R.M., Gail M.H. (2003) Sample size calculations for population- and family-based case-control association studies on marker genotypes. *Genet Epidemiol* **25**, 136-148.
- Polanczyk G., Silva de Lima M., Horta B.L., Biederman J., Rohde L.A. (2007) The Worldwide Prevalence of ADHD: A Systematic Review and Metaregression Analysis. *Am J Psychiatry* **164**, 942-948.
- Rasmussen E.R., Neuman R.J., Heath A.C., Levy F., Hay D.A., Todd R.D. (2004) Familial clustering of latent class and DSM-IV defined attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) subtypes. *J Child Psychol Psychiatry* **45**, 589-598.
- Roman T., Polanczyk G.V., Zeni C., Genro J.P., Rohde L.A., Hutz M.H. (2006) Further evidence of the involvement of alpha-2A-adrenergic receptor gene (ADRA2A) in inattentive dimensional scores of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry* **11**, 8-10.
- Roman T., Schmitz M., Polanczyk G., Eizirik M., Rohde L.A., Hutz M.H. (2001) Attention-deficit hyperactivity disorder: a study of association with both the

- dopamine transporter gene and the dopamine D4 receptor gene. *Am J Med Genet* **105**, 471-8.
- Roman T., Schmitz M., Polanczyk G.V., Eizirik M., Rohde L.A., Hutz M.H. (2002) Further evidence for the association between attention-deficit/hyperactivity disorder and the dopamine-beta-hydroxylase gene. *Am J Med Genet* **114**, 154-8.
- Roman T., Schmitz M., Polanczyk G.V., Eizirik M., Rohde L.A., Hutz M.H. (2003) Is the alpha-2A adrenergic receptor gene (ADRA2A) associated with attention-deficit/hyperactivity disorder? *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **120B**, 116-20.
- Rowe D.C., Stever C., Chase D., Sherman S., Abramowitz A., Waldman I.D. (2001) Two dopamine genes related to reports of childhood retrospective inattention and conduct disorder symptoms. *Molecular Psychiatry* **6**, 429–433.
- Rowe D.C., Stever C., Giedinghagen L.N., Gard J.M., Cleveland H.H., Terris S.T., Mohr J.H., Sherman S., Abramowitz A., Waldman I.D. (1998) Dopamine DRD4 receptor polymorphism and attention deficit hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry* **3**, 419-426.
- Schmitz M., Denardin D., Laufer Silva T., Pianca T., Hutz M.H., Faraone S., Rohde L.A. (2006) Smoking during pregnancy and attention-deficit/hyperactivity disorder, predominantly inattentive type: a case-control study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* **45**, 1338-1345.
- Smoller J.W., Biederman J., Arbeitman L., Doyle A.E., Fagerness J., Perlis R.H., Sklar P., Faraone S.V. (2006) Association between the 5HT1B receptor gene (HTR1B) and the inattentive subtype of ADHD. *Biol Psychiatry* **59**, 460–467.
- Thapar A., Langley K., O'Donovan M., Owen M. (2006) Refining the attention deficit hyperactivity disorder phenotype for molecular genetic studies. *Mol Psychiatry* **11**, 714–720.
- Todd R.D., Huang H., Smalley S.L., Nelson S.F., Willcutt E.G., Pennington B.F., Smith S.D., Faraone S.V., Neuman R.J. (2005) Collaborative analysis of DRD4 and

DAT genotypes in population-defined ADHD subtypes. *J Child Psychol Psychiatry* **46**, 1067-1073.

Todd R.D., Lobos E.A., Sun L-W., Neuman R.J. (2003) Mutational analysis of the nicotinic acetylcholine receptor alpha 4 subunit gene in attention deficit/hyperactivity disorder: evidence for association of an intronic polymorphism with attention problems. *Mol Psychiatry* **8**, 103–108.

Todd R.D., Neuman R.J., Lobos E.A., Jong Y.J., Reich W., Heath A.C. (2001b) Lack of association of dopamine D4 receptor gene polymorphisms with ADHD subtypes in a population sample of twins. *Am J Med Genet* **105**, 432-438.

Todd R.D., Rasmussen E.R., Neuman R.J., Reich W., Hudziak J.J., Bucholz K.K., Madden P.A.F., Heath A. (2001a) Familiality and Heritability of Subtypes of Attention Deficit Hyperactivity Disorder in a Population Sample of Adolescent Female Twins. *Am J Psychiatry* **158**, 1891–1898.

Waldman I.D., Gizer I.R. (2006) The genetics of attention deficit hyperactivity disorder. *Clin Psychol Rev* **26**, 396-432.

Waldman I.D., Rowe D.C., Abramowitz A., Kozel S.T., Mohr J.H., Sherman S.L., Cleveland H.H., Sanders M.L., Gard J.M., Stever C. (1998) Association and linkage of the dopamine transport gene (DAT1) and attention deficit hyperactivity disorder in children: heterogeneity owing to diagnostic subtype and severity. *Am J Hum Genet* **63**, 1767-1776.



Table 1: Frequencies of the markers analyzed in sample ADHD-I

Polymorphisms	Alleles	Allele Frequencies <sup>a</sup>	
		Cases	Controls
<i>SLC6A4</i>			
HTTLPR	Long	0.51	0.54
<i>HTR2A</i>			
G1438A	G	0.58	0.60
His452Tyr	His	0.90	0.93
<i>TPH-2</i>			
T16073G	T	0.83	0.82
<i>DRD4</i>			
VNTR	4 repeat	0.63	0.65
<i>DAT1</i>			
3'-VNTR	10 repeat	0.70	0.68
<i>DBH</i>			
<i>TaqI</i>	A2	0.60	0.63

<sup>a</sup>Refers to the more frequent allele.

Table 2: Family study of the *SLC6A4*, *HTR2A*, *TPH-2*, *DRD4*, *DAT1* and *DBH* genes

Polymorphisms	Allele	Observed	Expected	$\chi^2$	P-value*
<i>SLC6A4</i>					
HTTLPR	L	127	129	0.13	0.72
(n=121)	S	115	113		
<i>HTR2A</i>					
G1438A	G	138	142.16	0.60	0.49
(n=119)	A	100	95.84		
His452Tyr	His	225	220.44	2.01	0.19
(n=123)	Tyr	21	25.56		
<i>TPH-2</i>					
T16073G	T	203	195.83	3.18	0.06
(n=120)	G	37	44.17		
<i>DRD4</i>					
VNTR	<sup>a</sup> Others	187	185.31	0.14	0.74
(n=120)	7R	53	54.69		
<i>DAT1</i>					
3'- VNTR	10R	164	161.05	0.36	0.57
(n=115)	<sup>b</sup> Others	66	68.94		
<i>DBH</i>					
<i>TaqI</i>	A2	138	134.70	0.37	0.57
(n=114)	A1	90	93.30		

n, number of families.

<sup>a</sup> Group the alleles of the 2, 3, 4, 5, 6 e 8 repeat (R).

<sup>b</sup> Group the alleles of the 3, 6, 7, 8, 9 e 11 repeat (R).

\* p-values bases on 10.000 bootstrap samples.

Table 3: Conditional logistic regression analyses adjusted for potential confounders

Polymorphisms	OR	CI 95%	P-value
<i>SLC6A4</i>			
HTTLPR			
Presence Long allele	0.68	0.35-1.31	0.25
Dysthymia	4.64	0.53-40.53	0.16
IQ	0.96	0.94-0.98	0.01
<i>HTR2A</i>			
G1438A			
Presence G allele	0.92	0.47-1.81	0.81
ODD	3.43	1.75-6.74	0.01
His452Tyr			
Homozygosis His allele	0.88	0.44-1.77	0.72
<i>TPH-2</i>			
T16073G			
Presence T allele	1.11	0.62-2.00	0.71
Depression	5.17	0.61-43.55	0.13
GAD	3.40	1.22-9.47	0.02
<i>DRD4</i>			
VNTR			
Presence 7R allele	0.95	0.55-1.64	0.86
GAD	3.55	1.28-9.88	0.02
<i>DAT1</i>			
3'-VNTR			
Homozygosis 10R allele	1.15	0.68-1.94	0.61
<i>DBH</i>			
<i>TaqI</i>			
Presence A2 allele	0.76	0.36-1.61	0.47

---

## **Capítulo 5**

MAOA Is Associated with Methylphenidate Improvement of Oppositional  
Symptoms in boys with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder

(artigo submetido para revista The International Journal of Neuropsychopharmacology)

---

**MAOA IS ASSOCIATED WITH METHYLPHENIDATE IMPROVEMENT OF  
OPPOSITIONAL SYMPTOMS IN BOYS WITH ATTENTION-  
DEFICIT/HYPERACTIVITY DISORDER**

Ana P. Guimarães<sup>1</sup>, Cristian Zeni<sup>2</sup>, Guilherme Polanczyk<sup>3</sup>, Julia P. Genro<sup>1</sup>, Tatiana Roman<sup>1</sup>, Luis A. Rohde<sup>2</sup>, and Mara H. Hutz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Genética, <sup>2</sup>Departamento de Psiquiatria, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; <sup>3</sup>Social, Genetic, and Developmental Psychiatry Centre, Institute of Psychiatry, King's College London, London, UK.

Correspondence and reprint requests to:

Prof. Mara H. Hutz  
Departamento de Genética  
Instituto de Biociências, UFRGS  
Caixa Postal 15053  
91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil  
Phone: 55 51 3308-6720  
Fax: 55 51 3343-5850  
E-mail: [mara.hutz@ufrgs.br](mailto:mara.hutz@ufrgs.br)

Short title: MPH pharmacogenetics and ADHD oppositional symptoms.

**Statistical summary:**

Abstract: 144 words

Manuscript body: 1864 words

References: 22

Table: 1

Figure: 1

## **ABSTRACT**

The *MAOA* gene has been extensively related to aggressive, impulsive and violent behaviors. Previous studies documented the improvement of oppositional symptoms in ADHD patients with methylphenidate (MPH). However, the effect of the *MAOA* gene in response to MPH has not been investigated. A sample of eighty-five boys from an ADHD outpatient service was genotyped for the *MAOA*-uVNTR polymorphism. The outcome measure was the parent-rated oppositional subscale of the Swanson, Nolan, and Pelham Scale- version IV. The scale was applied by child psychiatrists blinded to genotype at baseline and in the first and third months of treatment. A significant interaction between the presence of MAOA high activity genotype and treatment with methylphenidate over time on oppositional scores was detected during the 3-months treatment ( $n=85$ ;  $F_{2,136}=4.83$ ;  $P=0.009$ ). These results suggest an effect of the *MAOA*-uVNTR high activity genotype on the improvement of oppositional symptoms with MPH treatment.

**Key words:** ADHD; pharmacogenetic; MAOA; oppositional symptoms; methylphenidate.

## INTRODUCTION

Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD) is a common psychiatric disorder in childhood and adolescence, affecting around 5% of school-age children worldwide (Polanczyk et al., 2007). The syndrome is characterized by severe inattention, hyperactivity, and impulsiveness. Antisocial, impulsive and aggressive behaviors are common symptoms of conduct disorder (CD) and Oppositional Defiant Disorder (ODD) that are highly comorbid and related to ADHD (Biederman et al., 1991).

With ADHD being a disorder highly responsive to medication, methylphenidate (MPH) is the most widely used drug to treat this condition (Solanto, 1998; Santosh and Taylor, 2000). MPH improves not only the cardinal symptoms of ADHD, but also halo symptoms such as aggressiveness found in ODD and CD (Goldman et al., 1998; Sinzig et al., 2007). The main and most important action of MPH in neurotransmission systems is the blockage of transporters, especially the dopamine transporter (DAT1). As a result, extracellular concentrations of dopamine (DA), noradrenaline (NE) and serotonin (5-HT) can be elevated (Solanto, 1998; Kuczenski and Segal, 1997; Arnsten and Li, 2005).

Monoamine oxidase A (*MAOA*) is one of the main metabolic enzymes for the degradation of catecholamines. Existing evidences suggest that methylphenidate also inhibits *MAOA* (Solanto, 1998). As regards the *MAOA* a variable number tandem repeat (uVNTR) functional polymorphism is present at the promoter region with two common alleles (4-repeat and 3-repeat) (Sabol et al., 1998). These are referred as high and low *MAOA* genotypes, defined by their significantly different transcriptional activities in human cell lines (Sabol et al., 1998).

The prevalence of the high and low *MAOA* genotypes in populations has stimulated many studies on the association of *MAOA* with impulsivity, inhibitory

control, and aggression (Huang et al., 2004; Manuck et al., 2000; Passamonti et al., 2006). There are a number of studies showing that *MAOA* genotype influences vulnerability to environmental stress both in humans (Caspi et al., 2002) and animals (Newman et al., 2005), and that this biological process can be initiated early in life (Kim-Cohen et al., 2006). Overall, these investigations above suggest a link between low *MAOA* genotype and both impulsive and aggressive behaviors.

There are eight studies reporting on the association between *MAOA*-uVNTR polymorphism and ADHD. Seven of these studies found an association with ADHD (Mick and Faraone, 2008). Although theoretically the genetic variants involved in susceptibility to ADHD may also be involved in treatment response, to the best of our knowledge no pharmacogenetic study assessed the role of *MAOA* in the response to MPH treatment.

Considering the effect of the uVNTR polymorphism in the *MAOA* gene on impulsive/aggressive behaviors, the aim of this investigation was to evaluate the association between *MAOA* gene and clinical improvement of oppositional symptoms with methylphenidate treatment in children and adolescents with ADHD.

## **METHODS**

The sample for this investigation included children and adolescents who were consecutively evaluated for 2 years in the ADHD Outpatient Clinic at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. This sample has been fully described by Polanczyk et al. (2007).

Briefly, the inclusion criteria were: ADHD diagnosis according to DSM-IV criteria, age between 4 and 17 years, European-Brazilian ethnicity, subjects who were drug naïve for methylphenidate, and prescribed MPH doses of at least 0.3 mg/kg/day.



The diagnostic process relied on the application of semi-structured interviews (KSADS-E) by fully trained research assistants. All diagnoses generated were confirmed by experienced child psychiatrists (see Polanczyk et al., 2007).

The oppositional subscale of the Swanson, Nolan, and Pelham scale-version IV (SNAP-IV) was selected as the primary outcome measure (Swanson et al., 2001). This measure has been frequently used in ADHD investigations (Polanczyk et al., 2007; Zeni et al., 2007).

Clinical assessments were performed by children psychiatrists at the baseline and at 1 and 3 months of treatment with MPH. Psychiatrists were blinded to patients' genotypes. Dosages of short-acting methylphenidate were augmented until no further clinical improvement was detected or until there were limited adverse effects. The mean daily dosages of MPH were 0.5 and 0.65 mg/kg/day at the first and third months.

The Ethics Committee of the University Hospital approved this study. Written informed consent was obtained from parents, and children and adolescents gave their verbal assent to participate.

DNA was extracted from the whole blood lymphocytes by standard procedures. The *MAOA-uVNTR* was amplified by PCR using primers and methods previously described by Sabol et al. (1998).

Comparison among categorical variables was performed using  $\chi^2$  or Fisher's exact test. All continuous variables showing a normal distribution were compared between groups by Student t test; for those variables that did not show a normal distribution, the Mann-Whitney U test was used. Potential confounders evaluated were age, sex, ADHD subtype, IQ, MPH dose at baseline (mg/Kg/day) and comorbidity (mood, anxiety, and disruptive behavior disorders). Potential confounders to be entered in models were defined based on conceptual analyses of the literature, and by means of

a statistical definition (association with the study factor and with the outcome at  $P \leq 0.10$ ).

Analyses of the SNAP-IV oppositional scores were performed using a mixed-effects model (MEM), as described by Polanczyk et al. (2007) which provides a flexible framework for the analysis of repeated measures while accounting for missing data (eg, loss to follow-up). For each analysis, the best covariance structure fitting the data was selected based on the one with the lowest Akaike information criterion (AIC) value. Independent factors included in all models were treatment over time, group assignment (defined as the presence of the high activity allele), and the interaction between these factors. An unbiased estimate of the effect size (ES) was computed for the SNAP oppositional score, according to the method suggested by Cohen (Cohen, 1998).

All analyses were conducted using SPSS version 12.0 software (SPSS Inc, Chicago, III). A significance level of 5% was set in all analyses (except for potential confounders, as indicated above). Tests were 2-tailed.

## **RESULTS**

A sample of one hundred and thirteen children fulfilled inclusion criteria to participate of the study. Twenty-eight subjects were excluded from the sample. Because the MAOA gene is X-linked, twenty-six girls were excluded. Two boys were also excluded due to problems in genotyping. Hence, analyses were performed with eighty-five affected boys. The affected girls were not analyzed separately because of the small sample size.

The estimated allele frequencies were 0.38 for the 3-repeat (low activity), 0.59 for the 4-repeat allele, and 0.02 for the 5-repeat allele. The rare 2-and-3.5-repeat alleles

were not observed in this sample. The 4-and-5-repeat alleles were joined because both have high transcriptional activity. Their pooled frequency was 0.62.

Demographic and clinical characteristics of patients are reported in the Table 1. No significant between-group differences on potential confounders were found. Also, no potential confounder was associated with both the presence of high activity alleles and oppositional scores in the SNAP-IV.

Figure 1 shows the model including treatment over time, the presence of high activity genotype, and their interaction. As expected, an effect of treatment over time for the SNAP-IV oppositional scores during the 3 months of treatment was detected with last-observation carried forward strategy (LOCF) (n=85; effect size 0.30;  $F_{2,136}=22.94$ ;  $P<0001$ ). Although no effect by the presence of high activity genotype was detected (n=85;  $F_{1,83}=0.33$ ;  $P=0.57$ ), there was a significant interaction effect between the presence of high activity genotype and treatment over time for the SNAP-IV oppositional scores during 3 months of treatment (n=85;  $F_{2,136}=4.83$ ;  $P=0.009$ ) (Figure 1). We also performed the same analyses only with completers and the results followed the same direction ( $p = 0.002$  for the interaction; data available upon request). The covariance structures with the lowest AIC value for these analyses were the Toeplitz and Compound symmetry respectively.

Figure 1 also shows that the greatest effect of treatment occurred from baseline to the first month, but no effect occurred from the first to the third month. Thus, we also assessed the effects of treatment over time, the presence high activity genotype, and the interaction between these factors during the first month of treatment. As a result, we detected significant effects of treatment over time with MPH (n=85;  $F_{1,136} =35.25$ ;  $P<0.001$ ) and a significant interaction effect between the presence of high activity genotype and treatment over time on the SNAP-IV oppositional scores (n=85;  $F_{1,136}$

=6.75; P=0.01). No main effect of the genotype was found (n=85;  $F_{1,83} = 0.01$ ; P=0.91). The covariance structure with the lowest AIC value for these analyses was the Toeplitz.

## DISCUSSION

In this investigation, we documented for the first time that a higher improvement on oppositional symptoms with methylphenidate treatment was associated with *MAOA-uVNTR* high activity genotypes.

The biological mechanisms to explain our results is yet to be determined, since there is no previous pharmacogenetic study assessing the role of any gene in MPH effects on oppositional symptoms in patients with ADHD. Moreover, even considering the emergent literature documenting the association between the uVNTR at MAOA genotype and impulsivity and aggression (Huang et al., 2004; Manuck et al., 2000; Passamonti et al., 2006), the role of this polymorphism in ADHD is controversial, since findings have suggested an association between ADHD and either the low and high transcriptional alleles (Mick and Faraone, 2008). However, it is very important to note the complex interaction among the monoamine systems of neurotransmitters. For instance, in MAOA/5HTT double knocked out mice, an elevated accumulation of 5HT has been observed. However, this abnormal accumulation of 5HT seems to not occur in MAOA/5HTT/DAT triple knocked out mice (Mössner et al., 2006). MPH seems to have a similar triple blockage effect.

Our study should be understood in the context of some limitations. This was a naturalistic study. This design might be valuable to better appreciate the role of genetic factors in routine clinical practice beyond the realm of controlled clinical trials. However, the naturalistic design is subject of some flaws since the placebo effect cannot be ruled out and it is difficult to control for confounders. However, we performed an

extensive assessment of effects of potential confounders between groups. MPH was administered with no control of adherence by investigators. Although it is not possible to exclude that the effects we observed were due to lack of adherence, there is no reason to expect a preferential compliance to MPH according to the presence of high activity genotypes at *MAOA*. We could not adjust our findings for between-group differences in baseline SNAP-IV oppositional scores due to the limited follow-up assessment points (two) and the fact that the main effect of treatment over time occurred in the first month. However, no significant between-group difference was found in baseline SNAP-IV oppositional scores ( $p = 0.18$ ; effect size=0.29).

Although it is important to study pharmacogenetic effects of reasonable candidate genes in ADHD, their putative effects are small. Thus, candidate gene studies should implement strategies that will provide enough statistical power to detect such small effects. One potential strategy is the examination of specific dimensions of medication response as presented here, since it may reduce heterogeneity. The present investigation is only preliminary and further pharmacogenetic studies should be conducted to replicate our results.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors thank financial support provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil), Institutos do Milênio (CNPq), PRONEX, Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

## REFERENCES

**Arnsten, AF, Li, BM. (2005)** Neurobiology of executive functions: catecholamine influences on prefrontal cortical functions. *Biological Psychiatry* 57, 1377-1384.

**Biederman, J, Newcorn, J, Sprich, S. (1991)** Comorbidity of attention deficit hyperactivity disorder with conduct, depressive, anxiety, and other disorders. *The American Journal of Psychiatry* 148, 564-577.

**Caspi, A, McClay, J, Moffitt, TE, Mill, J, Martin, J, Craig, IW et al. (2002)** Role of Genotype in the Cycle of Violence in Maltreated Children. *Science* 297, 851-854.

**Cohen J (1998).** *Statistical power analysis for the behavioral sciences.* (2nd edition). Hillsdale, New Jersey: Lawrence Erlbaum Associates.

**Goldman, LS, Genel, M, Bezman, RJ, Slanetz, PJ. (1998)** Diagnosis and treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder in children and adolescents. Council on Scientific Affairs, American Medical Association. *The Journal of the American Medical Association* 279, 1100-1107.

**Huang, YY, Cate, SP, Battistuzzi, C, Oquendo, MA, Brent, D, Mann, JJ. (2004)** An association between a functional polymorphism in the monoamine oxidase a gene promoter, impulsive traits and early abuse experiences. *Neuropsychopharmacology* 29, 1498-1505.

**Kim-Cohen, J, Caspi, A, Taylor, A, Williams, B, Newcombe, R, Craig, IW et al. (2006)** MAOA, maltreatment, and gene-environment interaction predicting children's mental health: new evidence and a meta-analysis. *Molecular Psychiatry* 11, 903-913.

**Kuczenski, R, Segal, DS. (1997)** Effects of methylphenidate on extracellular dopamine, serotonin, and norepinephrine: comparison with amphetamine. *Journal of Neurochemistry* 68, 2032-2037.

**Manuck, SB, Flory, JD, Ferrell, RE, Mann, JJ, Muldoon, MF. (2000)** A regulatory polymorphism of the monoamine oxidase-A gene may be associated with variability in aggression, impulsivity, and central nervous system serotonergic responsivity. *Psychiatry Research* 95, 9-23.

**Mick, E, Faraone, SV. (2008)** Genetics of attention deficit hyperactivity disorder. *Child and Adolescent Psychiatric Clinics North American* 17, 261-284.

**Mössner, R, Simantov, R, Marx, A, Lesch, KP, Seif, I. (2006)** Aberrant accumulation of serotonin in dopaminergic neurons. *Neuroscience Letters* 401, 49-54.

**Newman, TK, Sygailo, YV, Barr, CS, Wendland, JR, Champoux, M, Graessle, M et al.** (2005) Monoamine oxidase A gene promoter variation and rearing experience influences aggressive behavior in rhesus monkeys. *Biological Psychiatry* 57, 167-172.

**Passamonti, L, Fera, F, Magariello, A, Cerasa, A, Gioia, MC, Muglia, M et al.** (2006) Monoamine oxidase-a genetic variations influence brain activity associated with inhibitory control: new insight into the neural correlates of impulsivity. *Biological Psychiatry* 59, 334-340.

**Polanczyk, G, Zeni, C, Genro, JP, Guimarães, AP, Roman, T, Hutz, MH, Rohde, LS.** (2007) Association of the Adrenergic  $\alpha$ 2A Receptor Gene With Methylphenidate Improvement of Inattentive Symptoms in Children and Adolescents With Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Archives of General Psychiatry* 64, 218-224.

**Polanczyk, P, Silva de Lima, M, Horta, BL, Biederman, J, Rohde, LA.** (2007) The Worldwide Prevalence of ADHD: A Systematic Review and Meta-regression Analysis. *The American Journal of Psychiatry* 164, 942-948.

**Sabol, SZ, Hu, S, Hamer, D.** (1998) A functional polymorphism in the monoamine oxidase A gene promoter. *Human Genetics* 103, 273-279.

**Santosh, PJ, Taylor.** (2000) Stimulant Drugs. *European Child & Adolescent Psychiatry* 9, 27-43.

**Sinzig, J, Döpfner, M, Lehmkuhl, G.** (2007) Long-Acting Methylphenidate Has an Effect on Aggressive Behavior in Children with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology* 17, 421-432.

**Solanto, MV.** (1998) Neuropsychopharmacological mechanisms of stimulant drug action in attention-deficit hyperactivity disorder: a review and integration. *Behavioural Brain Research* 94, 127-152.

**Swanson, JM, Kraemer, HC, Hinshaw, SP, Arnold, LE, Conners, CK, Abikoff, HB et al.** (2001) Clinical relevance of the primary findings of the MTA: success rates based on severity of ADHD and ODD symptoms at the end of treatment. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry* 40, 168-177.

**Zeni, CP, Guimarães, AP, Polanczyk, GV, Genro, JP, Roman, T, Hutz, MH, Rohde, LA.** (2007) No significant association between response to methylphenidate and genes of the dopaminergic and serotonergic systems in a sample of Brazilian children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *American Journal of Medical Genetics Part B (Neuropsychiatric Genetics)* 144, 391-394.

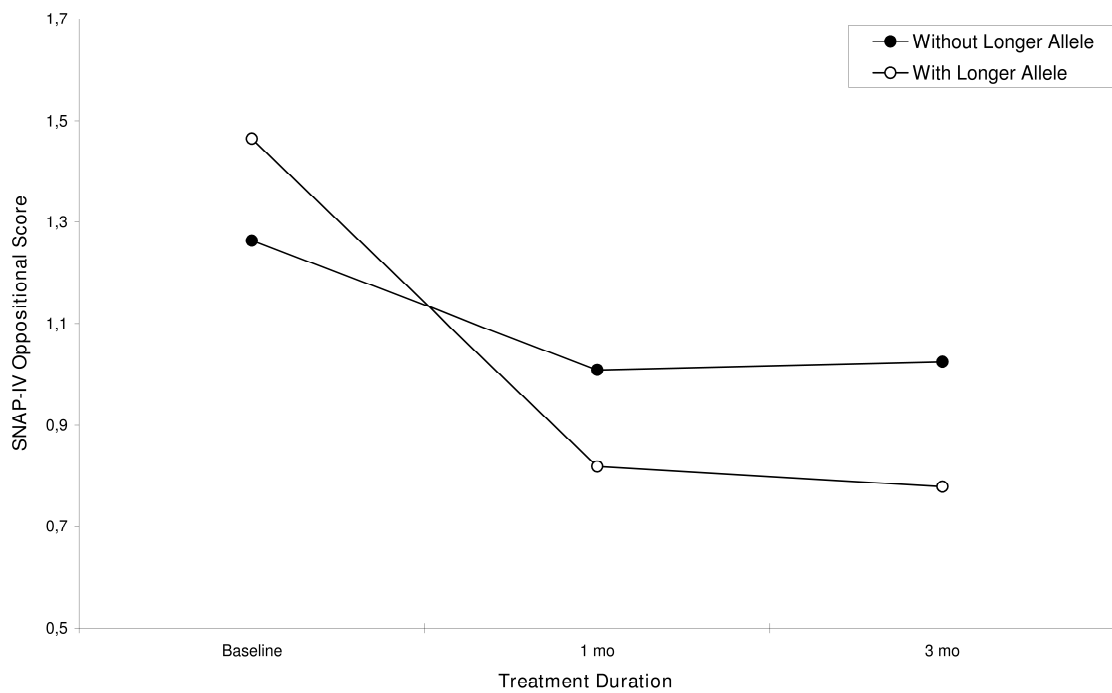
**Table 1:** Demographic and Clinical Characteristics of the Sample According to the Presence of MAOA alleles<sup>a</sup>

Characteristics	High activity alleles (n=52)	Low activity allele (n=33)	P-value <sup>b</sup>
Age	10.1(3.2)	9.4(2.8)	0.33
IQ	92.7(13.6)	98.4(16.8)	0.10
ADHD subtype - combined	30(57.7)	23(69.7)	0.26
Comorbid conditions			
CD	10(19.2)	6(18.2)	>.99
ODD	27(51.9)	20(60.6)	0.50
Anxiety disorder	13(25.0)	10(30.3)	0.62
Mood disorder	3(5.8)	4(12.1)	0.42
SNAP-IV Oppositional baseline scores	1.48(0.69)	1.26(0.71)	0.18
Methylphenidate dose prescribed at baseline, mg/Kg/day	0.52(0.18)	0.49(0.15)	0.42
Concomitant prescription of another medication	5(9.6)	3(9.0)	>.99
Previous use of medication	4(7.7)	1(3.0)	0.64

ADHD, attention-deficit/hyperactivity disorder; CD, Conduct disorder; ODD, oppositional defiant disorder; SNAP-IV, Swanson, Nolan, and Pelham Scale-version IV.

<sup>a</sup> Data are reported as number (percentage) for categorical variables and mean (standard deviations) for continuous variables. <sup>b</sup> Estimated by  $\chi^2$  test or Fisher exact test (categorical variables), by t test (continuous variables with normal distribution) or by Mann-Whitney U test (continuous variables without normal distribution).





**Figure 1:** Mean SNAP-IV oppositional scores during methylphenidate treatment according to the presence of high activity allele (n=85). Treatment over time:  $F_{2,136}=22.94$ ;  $P<0001$ . Presence of high activity allele:  $F_{1,83}=0.33$ ;  $P=0.57$ . Treatment over time X presence of high activity allele:  $F_{2,136}=4.83$ ;  $P=0.009$ .

---

**Capítulo 6**  
DISCUSSÃO

---

Discussões dos aspectos mais específicos desta Tese foram tratados nos capítulos 3 a 5. Neste capítulo final serão abordadas questões mais gerais e será feita uma tentativa de correlacionar e integrar os resultados obtidos nos capítulos anteriores, bem como discutir as perspectivas para a continuidade deste trabalho.

Neste estudo foram enfatizados dois aspectos principais, no qual o primeiro é a utilização de fenótipo refinado para homogeneização da amostra, onde podemos incluir os trabalhos dos capítulos 3 e 4. O segundo aspecto é o estudo farmacogenético que possui como principal objetivo encontrar polimorfismos em genes envolvidos na ação de fármacos, desta forma possibilitando o tratamento dessa doença e aumento da eficácia. Neste aspecto inclui-se o capítulo 5.

Os genes do sistema serotoninérgicos foram um enfoque importante do presente trabalho. Os genes deste sistema são menos explorados nos estudos com o TDAH. No entanto, quando os resultados com esses genes são tomados em conjunto, os estudos de associação evidenciaram mais resultados negativos do que positivos podendo-se inferir que o efeito desses genes seja muito pequeno no transtorno. Outra possibilidade seria a associação destes genes com sintomas e transtornos de externalização, tais como sintomas de impulsividade ou a presença de transtorno de personalidade anti-social, como, por exemplo, os transtornos de conduta ou opositor desafiante, altamente comórbidos com o TDAH. O envolvimento deste sistema com tais fenótipos foi evidenciado por muitos autores (Searce-Levie e cols., 1999; Zhuang e cols., 1999; Bouwknecht e cols., 2001). Traços quantitativos como escores de sintomas já foram sugeridos como uma boa estratégia de análise, visto que um espectro maior de pacientes com uma maior variação de sintomas pode ser investigado (Hudziak e cols., 1997; Todd, 2000b). A partir disso, as análises dimensionais, como por exemplo, de escores de sintomas de hiperatividade e/ou sintomas de oposição poderiam ser interessantes para serem utilizadas com esses genes.

Em relação à homogeneização da amostra, muitos pesquisadores sugerem o uso de fenótipos refinados o que significa buscar amostras mais similares clinicamente, no intuito de diminuir a complexidade da doença nos estudos genéticos (Faraone e cols., 2005; Thapar e cols., 2006; Thapar e cols., 2007; Wallis e cols., 2008). O genótipo refinado deve ser menos complexo geneticamente do que a doença em si, e por este motivo, teoricamente, ele teria mais poder estatístico para detectar um efeito pequeno de um gene individual. Alguns fenótipos refinados sugeridos para o TDAH são os subtipos clínicos da doença, presença de comorbidades e persistência da doença na idade adulta.

No entanto, é importante ressaltar que para considerarmos estas medidas úteis, elas têm que apresentar evidências de herdabilidade.

No estudo com o gene *HTR1B* foram realizadas análises haplotípicas tanto com a amostra total de pacientes com TDAH quanto com a amostra apenas do subtipo desatento. A idéia inicial para esse trabalho foi replicar os estudos de Li e cols. (2005) e Smoller e cols. (2006), onde esses autores evidenciaram associação com o gene *HTR1B* em amostras com o subtipo desatento. No entanto, não foram detectadas associações de variantes desse gene com esse subtipo específico. Esse resultado tomado em conjunto com aqueles descritos no capítulo 3 no qual, outros genes dos sistemas dopaminérgico, serotoninérgico e noradrenérgico foram investigados em pacientes com TDAH do subtipo desatento mostram que os subtipos categóricos definidos pelos critérios do DSM-IV não parecem uma abordagem promissora para identificar genes de suscetibilidade ao TDAH. Contudo, Schmitz e cols. (2006) evidenciaram associação do polimorfismo -1291 C>G do gene *ADRA2A* e o TDAH subtipo desatento. Dentro ainda desse contexto, Polanczyk e cols. (2007b) e da Silva e cols. (2007) também evidenciaram resultados positivos com o mesmo SNP do gene *ADRA2A*, em estudos farmacogenéticos, com escores de sintomas de desatenção. A partir disso, o que podemos inferir é que o gene *ADRA2A* parece ter um papel importante na desatenção.

Muitos estudos investigam a herdabilidade dos subtipos do TDAH separadamente e evidenciam que são formas herdáveis da doença (Sherman e cols., 1997; Stawicki e col., 2006). McLoughlin e cols. (2007) também evidenciaram que o subtipo desatento e o subtipo hiperativo/impulsivo são formas altamente herdáveis da doença, porém esses autores enfatizam que os dois subtipos compartilham os mesmos genes, entretanto como a correlação genética é menor que 1 evidencia a existência de fatores genéticos independentes para o desenvolvimento dessas diferentes dimensões da doença. A partir disso, podemos supor, por exemplo, que diferentes fatores ambientais levariam a um ou outro subtipo do transtorno. Devido a isso, cabe agora salientar a grande importância dos estudos de interação gene-ambiente, ainda pouco explorados nos estudos com TDAH.

Possivelmente outras estratégias para identificar genes de suscetibilidade para o TDAH sejam mais promissoras. As diferenças entre meninos e meninas com TDAH tanto na prevalência dos subtipos como em outras características da doença sugerem que os genes possam se expressar diferencialmente entre os sexos (Wolraich e cols., 1996; Bierdeman e cols., 2002; Spencer e cols., 2007). Em relação a essa abordagem

observamos na mesma amostra investigada no presente trabalho uma associação do gene *HTR2A* com o TDAH apenas em meninos (Guimarães e cols., 2007). Resultados nessa direção foram recentemente descritos por Biederman e cols. (2008). Esses investigadores verificaram que os genes *COMT* e *5HTT* estavam associados à doença apenas em meninos enquanto que a associação dos genes *MAOA* e *SLC6A2* ocorria apenas em meninas.

Outra abordagem que poderia resultar em amostras mais homogêneas seria a investigação de pacientes com TDAH e outra comorbidade associada. Como podemos observar na figura 1 da introdução desta Tese, muitos transtornos co-ocorrem com o TDAH. As comorbidades que são sugeridas, principalmente, como fenótipos refinados são o TC, transtorno de humor bipolar e transtorno de leitura (Faraone e cols., 2005; Thapar e cols., 2006). Muitos autores demonstraram que estas comorbidades juntamente com o TDAH seriam um subtipo distinto herdável da doença (Faraone e cols., 2001; Diler e cols., 2007; Willcutt e cols., 2007; Christiansen e cols., 2008). Esse tipo de refinamento é recomendado por Thapar e col. (2006) e Thapar e cols. (2007).

O trabalho do capítulo 4 foi inédito, sendo o primeiro estudo farmacogenético realizado com o gene *MAOA* e, além disso, também foi o primeiro achado com função de algum gene, interagindo com sintomas de oposição em resposta ao metilfenidato. Como visto no capítulo 1, os estudos farmacogenéticos no TDAH abordam principalmente os genes dopaminérgicos e assim como nos estudos de associação, também possuem resultados inconsistentes. O estudo farmacogenético do gene *MAOA* é muito relevante, pois, além de ser estudado pela primeira vez neste contexto, o metilfenidato bloqueia esse gene, como bloqueia também os transportadores de noradrenalina, serotonina, e mais especificamente dopamina (Solanto, 1998). A partir disso, pode-se inferir que ao bloquear o gene *MAOA* e os três transportadores haverá um aumento extracelular das catecolaminas significativa, visto como sendo de melhora para os sintomas do TDAH. No entanto, os resultados do trabalho do capítulo 4 apontam para melhora dos sintomas de oposição com a diminuição das catecolaminas, inversamente ao principal pressuposto. Seeman e Madras (1998), porém, enfatizam que o desbalanço ou a desregulação das catecolaminas seria mais importante para o desenvolvimento do transtorno.

Outro aspecto relevante é a busca de novos caminhos, talvez, diminuir o enfoque nos genes já extremamente estudados e partir para estudos com genes ainda não explorados nessa doença. Muitos autores sugerem a possibilidade do efeito da

combinação de diferentes genes no desenvolvimento do transtorno. A partir disso, outra possibilidade seria o estudo da interação gene-gene, no qual poderia se estudar a interação de genes já extensamente analisados com genes ainda não explorados.

Os resultados encontrados pelos estudos moleculares no TDAH ainda são muito inconsistentes e sua aplicabilidade ainda parece muito remota. Contudo, é necessário ainda percorrer um longo caminho para o melhor entendimento deste transtorno tão complexo. Esta caminhada, porém deve continuar com muito afinho, pois os resultados a serem alcançados são de extrema importância. Esses resultados podem ser utilizados para o auxílio no diagnóstico, aprimoramento dos fármacos e desenvolvimento de novos fármacos, podendo assim ajudar e auxiliar na melhoria de vida de muitas crianças e adolescentes, além de adultos com a persistência da doença.

---

**Capítulo 7**

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

Alex KD, Pehek EA (2007) Pharmacologic mechanisms of serotonergic regulation of dopamine neurotransmission. *Pharmacol Ther.* 113: 296-320.

American Psychiatric Association (1967) *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 2th Ed. (DSM-II). Washington: American Psychiatric Association.

American Psychiatric Association (1980) *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 3th Ed. (DSM-III). Washington: American Psychiatric Association.

American Psychiatric Association (1987) *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 3th Ed. Rev. (DSM-III). Washington: American Psychiatric Association.

American Psychiatric Association (1994) *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 4th Ed. (DSM-IV). Washington: American Psychiatric Association.

American Psychiatric Association (2000) *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 4th Ed. Rev. (DSM-IV). Washington: American Psychiatric Association.

Anderson SW, Bechara A, Damasio H, Tranel D, Damasio AR (1999): Impairment of social and moral behavior related to early damage in human prefrontal cortex. *Nat Neurosci* 2: 1032-1037.



Arcos-Burgos M, Castellanos FX, Pineda D, Lopera F, Palacio JD, Palacio LG e cols. (2004) Attention-deficit/hyperactivity disorder in a population isolate: linkage to loci at 4q13.2, 5q33.3, 11q22, and 17p11. *Am J Hum Genet* 75: 998-1014.

Arnsten AF, Steere JC e Hunt RD (1996) The contribution of alpha2-noradrenergic mechanisms to prefrontal cortical cognitive function. *Arch General Psychiatr* 53: 448-455.

Arnsten AFT (2006) Stimulants: Therapeutic Actions in ADHD. *Neuropsychopharmacology* 31: 2376-2383.

Arnsten AFT, Li BM (2005) Neurobiology of Executive Functions: Catecholamine influences on prefrontal cortical functions. *Biol Psychiatry*. 57: 1377-1384.

Aron AR, Poldrack RA (2005). The cognitive neuroscience of response inhibition: relevance for genetic research in attention deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiat* 57: 1285-1292.

Bakker SC, van der Meulen EM, Buitelaar JK, Sandkuijl LA, Pauls DL, Monsuur AJ e cols. (2003) A whole-genome scan in 164 Dutch sib pairs with attention-deficit/hyperactivity disorder: suggestive evidence for linkage on chromosomes 7p and 15q. *Am J Hum Genet* 72: 1251-1260.

Biederman J (1998) Attention-deficit/hyperactivity disorder: A life span perspective. *J Clin Psychiatry* 59: 4-16.

Biederman J, Faraone SV, Mick E (1999) Clinical correlates of ADHD in females: findings from a large group of girls ascertained from pediatric and psychiatric referral sources. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 38: 966-967.

Biederman J, Kim JW, Doyle AE, Mick E, Fagerness J, Smoller JW e cols. (2008) Sexually dimorphic effects of four genes (COMT, SLC6A2, MAOA, SLC6A4) in genetic associations of ADHD: A preliminary study. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B: 1511-1518.

Biederman J, Mick E, Faraone SV, Braaten E, Doyle A, Spencer T e cols. (2002) Influence of Gender on Attention Deficit Hyperactivity Disorder in Children Referred to a Psychiatric Clinic. *J Am Psychiatry* 159: 36-42.

Biederman J, Milberger S, Faraone SV, Kiely K, Guite J, Mick E e cols. (1995) Family-environment risk factors for ADHD: a test of Rutter's indicators of adversity. *Arch Gen Psychiatry* 52: 464-470.

Biederman J, Newcorn J, Sprich S (1991) Comorbidity of attention deficit hyperactivity disorder with conduct, depressive, anxiety, and other disorders. *Am J Psychiatry* 148: 564-577.

Bobb AJ, Addington AM, Sidransky E, Gornick MC, Lerch JP, Greenstein DK e cols. (2005) Support for association between ADHD and two candidate genes: NET1 and DRD1. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 134: 67-72.

Bouwknicht JA, Hijzen TH, van der Gugten J, Maes RA, Hen R, Olivier B (2001) Absence of 5-HT(1B) receptors is associated with impaired impulse control in male 5-HT(1B) knockout mice. *Biol Psychiatry* 49: 557-568.

Brasil HHA (2000) Princípios gerais do emprego de Psicofármacos. *Rev Bras Psiquiatr* 22: S140-S141.

Breen MJ, Altepeter TS (1990) Situational variability in boys and girls identified as ADHD. *J Clin Psychol* 4: 486-490.

Brookes K, Xu X, Chen W, Zhou K, Neale B, Lowe N e cols. (2006) The analysis of 51 genes in DSM-IV combined type attention deficit hyperactivity disorder: association signals in DRD4, DAT1 and 16 other genes. *Mol Psychiatry* 11: 934-53.

Brunner D, Buhot MC, Hen R, Hofer M (1999) Anxiety, motor activation, and maternal-infant interactions in 5HT1B knockout mice. *Behav Neurosci* 113:587-601.

Brunner D, Hen R (1997) Insights into the neurobiology of impulsive behavior from serotonin receptor knockout mice. *Ann NY Acad Sci* 836: 81-105.

Brunner HG, Nelen M, Breakefield XO, Ropers HH, van Oost BA (1993) Abnormal behavior associated with a point mutation in the structural gene for monoamine oxidase A. *Science* 262: 578-580.

Bush G, Valera EM, Seidman LJ (2005) Functional neuroimaging of attention-deficit/hyperactivity disorder: a review and suggested future directions. *Biol Psychiatry* 57: 1273-1284.

Cantwell DP (1996) Attention déficit disorder: a review of the past 10 years. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 8: 978-987.

Cases O, Seif I, Grimsby J, Gaspar P, Chen K, Pournin S e cols. (1995) Aggressive behavior and altered amounts of brain serotonin and norepinephrine in mice lacking MAOA. *Science* 268: 1763-1766.

Caspi A, McClay J, Moffitt TE, Mill J, Martin J, Craig IW e cols. (2002) Role of genotype in the cycle of violence in maltreated children. *Science* 297: 851-854.

Castellanos FX (1997) Toward a pathophysiology of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Clin Pediatr* 36: 381-393.

Castellanos FX, Lee PP, Sharp W, et al. (2002) Developmental trajectories of brain volume abnormalities in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder. *JAMA* 288: 1740–8.

Cervantes MC, Delville Y (2007) Individual differences in offensive aggression in golden hamsters: A model of reactive and impulsive aggression? *Neuroscience* 150: 511-521.

Chen K (2004) Organization of MAO A and MAO B promoters and regulation of gene expression. *Neurotoxicology* 25: 31-36.

Cheon K, Kim B, Cho S (2007) Association of 4-repeat allele of the dopamine D4 receptor gene III polymorphism and response to methylphenidate treatment in Korean ADHD children. *Neuropsychopharmacology* 32: 1377-1383.

Cheon KA, Ryu YH, Kim JW, Cho DY (2005) The homozygosity for the 10-repeat allele at dopamine transporter gene and dopamine transporter density in Korean children with attention deficit hyperactivity disorder: relating to treatment response to methylphenidate. *Eur Neuropsychopharmacol* 15: 95–101.

Christiansen H, Chen W, Oades RD, Asherson P, Taylor EA, Lasky-Su J (2008) Co-transmission of conduct problems with attention-deficit/hyperactivity disorder: familial evidence for a distinct disorder. *J Neural Transm* 115: 163-175.

Clements SD (1966) *Minimal brain dysfunction in children: terminology and identification*. Washington, DC: U.S. Department of Health, Education, and Welfare.

Comings DE, Chen TJH, Blum K, Mengucci JF, Blum SH, Meshkin (2005) Neurogenetic interactions and aberrant behavioral comorbidity of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): dispelling myths. *Theor Biol Med Model* 2: 50-65.

Cook EH, Stein MA, Krasowski MD, Cox NJ, Olkon DM, Kieffer JE e cols. (1995) Association of attention deficit disorder and the dopamine transporter gene. *Am J Hum Gen* 56: 993-998.

Cormier E (2008) Attention Deficit/Hyperactivity Disorder: A Review and Update. *J Pediatr Nurs* 23: 345-357.

Craig SP, Buckle VJ, Lamouroux A, Mallet J, Craig IW (1988) Localization of the human dopamine  $\beta$  hydroxylase (DBH) gene to chromosome 9q34. *Cytogenet Cell Genet* 48: 48-50.

da Silva TL, Pianca TG, Roman T, Hutz MH, Faraone SV, Schmitz M, Rohde LA (2008) Adrenergic  $\alpha$ 2A receptor gene and response to methylphenidate in attention-deficit/hyperactivity disorder-predominantly inattentive type. *J Neural Transm* 115: 341-5.

Daly G, Hawi Z, Fitzgerald M, Gill M (1999) Mapping susceptibility loci in attention deficit hyperactivity disorder: preferential transmission of parental alleles at DAT1, DBH and DRD5 to affected children. *Mol Psychiatry* 4: 192-196.

Deckert J, Catalano M, Syagailo YV, Bosi M, Okladnova O, Di Bella D e cols. (1999) Excess of high activity monoamine oxidase A gene promoter alleles in female patients with panic disorder. *Hum Mol Genet* 8: 621-624.

Denney RM, Koch H, Craig IW (1999) Association between monoamine oxidase A activity in human male skin fibroblasts and genotype of the MAOA promoter-associated variable number tandem repeat. *Hum Genet* 105: 542-551.

Diler RS, Uguz S, Seydaoglu G, Erol N, Avci A (2007) Differentiating bipolar disorder in Turkish prepubertal children with attention-deficit hyperactivity disorder. *Bipolar Disord.* 2007 May;9(3):243-51.

Domschke K, Sheehan K, Lowe N, Kirley A, Mullins C, O'sullivan R e cols. (2005) Association analysis of the monoamine oxidase A and B genes with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) in an Irish sample: preferential transmission of the MAO-A 941G allele to affected children. *Am J Med Genet (Neuropsychiatr Genet)* 134B: 110-114.

Duan J, Sanders AR, Molen JE, Martinolich L, Mowry BJ, Levinson DF, e cols. (2003) Polymorphisms in the 5'-untranslated region of the human serotonin receptor 1B (HTR1B) gene affect gene expression. *Mol Psychiatry* 8: 901–910.

Durston S, Hulshoff Pol HE, Schnack HG, et al. (2004) Magnetic resonance imaging of boys with attention-deficit/hyperactivity disorder and their unaffected siblings. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 43: 332–340.

Epstein JN, Conners CK, Erhard TD, Arnold LE, Hechtman L, Hinshaw SP e cols. (2000) Familial aggregation of ADHD characteristics. *J. Abnormal Child Psychol* 28: 585-594.

Faraone SV (2001): Report from the second international meeting of the Attention Deficit Hyperactivity Disorder Molecular Genetics Network. *Am J Med Genet* 105:255–258.

Faraone SV e Biederman J (1998) Neurobiology of Attention-Deficit Hyperactivity Disorder. *Biol Psychiatry* 44: 951-958.

Faraone SV, Biederman J, Weber W, Russel RL (1998) Psychiatric, neuropsychological and psychosocial features of DSM-IV subtypes of attention-deficit/hyperactivity disorder: Results from a clinically referred sample. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 37: 185-193.

Faraone SV, Doyle AE, Mick E, Biederman J (2001) Metaanalysis of the association between the 7-repeat allele of the dopamine D(4) receptor gene and attention deficit hyperactivity disorder. *American Journal of Psychiatry* 158: 1052-1057.

Faraone SV, Khan SA (2006) Candidate Gene Studies of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *J Clin Psychiatry* 8: 13-20.

Faraone SV, Perlis RH, Doyle AE, Smoller JW, Goralnick JJ, Holmgren MA e cols. (2005) Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 57: 1313-1323.

Ferrari PF, Palanza P, Parmigiani S, Almeida RMM, Miczek KA (2005) Serotonin and aggressive behavior in rodents and nonhuman primates: Predispositions and plasticity. *European Journal of Pharmacology* 526: 259-273.

Fisher SE, Francks C, McCracken JT, McGough JJ, Marlow AJ, MacPhie IL e cols. (2002) A Genomewide Scan for Loci Involved in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Am. J. Hum. Genet* 70: 1183-1196.



Gainetdinov RR, Wetsel WC, Jones SR, Levin ED, Jaber M, Caron MG (1999) Role of serotonin in the paradoxical calming effect of psychostimulants on hyperactivity. *Science* 283: 397-401.

Gaub M, Carlson CL (1997) Behavioral characteristics of DSM-IV ADHD subtypes in a school-based population. *J Abnorm Child Psychol* 25: 103-111.

Gelernter J, Kennedy JL, van Tol HH, Civelli O, Kidd KK (1992) The D4 dopamine receptor (DRD4) maps to distal 11p close to HRAS. *Genomics* 13: 208-210.

Genro JP, Polanczyk GV, Zeni C, Oliveira AS, Roman T, Rohde LA e cols. (2008) A common haplotype at the dopamine transporter gene 5' region is associated with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 147B: 1568-1575.

Giros B, el Mestikawy S, Godinot N, Zheng K, Han H, Yang-Feng T e cols. (1992) Clonig, pharmacological characterization, and chromosome assignment of the human dopamine transporter. *Mol Pharmacol* 42: 383-390.

Giros B, Jaber M, Jones S, Wightman R, Caron M (1996) Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature* 379: 606-612.

Greenhill LL, Halperin JM, Abikoff H (1999) Stimulant medications. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 38: 503-512.

Grevet EH, Bau CH, Salgado CA, Ficher A, Kalil K, Victor MM e cols. (2006) Lack of gender effects on subtype outcomes in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder: support for the validity of subtypes. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 256: 311-319.

Gross CG (1963) Locomotor activity following lateral frontal lesions in rhesus. Influences on Prefrontal Cortical Functions. *Biol Psychiatry* 57: 1377-1384.

Guimarães APM, Zeni C, Polanczyk GV, Genro JP, Roman T, Rohde LA e cols. (2007) Serotonin Genes and Attention Deficit/Hyperactivity Disorder in a Brazilian Sample: Preferential Transmission of the HTR2A 452His Allele to Affected Boys. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 144B: 69-73.

Halperin JM, Newcorn JH, Schwartz ST, Sharma V, Siever LJ, Koda VH (1997) Age related changes in the association between serotonin function and aggression in boys with ADHD. *Biol Psychiatry* 41: 682-689.

Hamarman S, Fossella J, Ulger C, Brimacombe M, Dermody J (2004) Dopamine receptor 4 (DRD4) 7-repeat allele predicts methylphenidate dose response in children with attention deficit hyperactivity disorder: a pharmacogenetic study. *J Child Adolesc Psychopharmacol*. 14: 564-574.

Hawi Z, Dring M, Kirley A, Foley D, Kent L, Craddock N, e cols. (2002) Serotonergic system and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): a potential susceptibility locus at the 5-HT1B receptor gene in 273 nuclear families from a multi-centre sample. *Mol Psychiatry* 7: 718-725.

Hazelwood LA, Sanders-Bush E (2004) His452Tyr Polymorphism in the Human 5-HT<sub>2A</sub> Receptor Destabilizes the Signaling Conformation. *Mol Pharmacol* 66: 1293-1300.

Hebebrand J, Dempfle A, Saar K, Thiele H, Herpertz-Dahlmann B, Linder M e cols. (2006) A genome-wide scan for attention-deficit/hyperactivity disorder in 155 german sib-pairs. *Mol Psychiatry* 11: 196-205.

Heils A, Teufel A, Petri S, Stober G, Riederer P, Bengel D e cols. (1996) Allelic variation of human serotonin transporter gene expression. *J Neurochem* 66: 2621-2624.

Heiser P, Dempfle A, Friedel S, Konrad K, Hinney A, Kiefl H e cols. (2007) Family-based association study of serotonergic candidate genes and attention-deficit/hyperactivity disorder in a German sample. *J Neural Transm* 114: 513-521.

Hoffman H (1854) *Der Struwwelpeter*. Berlin: DBGM.

Hsieh CL, Bowcock AM, Farrer LA, Hebert JM, Huang KN, Cavalli-Sforza LL, e cols. (1990) The serotonin receptor subtype 2 locus HTR2 is on human chromosome 13 near genes for esterase D and retinoblastoma-1 and on mouse chromosome 14. *Somat Cell Mol Genet* 16: 567-574.

Huang YY, Grailhe R, Arango V, Hen R, Mann JJ (1999) Relationship of psychopathology to the human serotonin1B genotype and receptor binding kinetics in postmortem brain tissue. *Neuropsychopharmacology* 21: 238-246.

Hudziak JJ, Heath AC, Madden PF, Reich W, Bucholz KK, Slutske W (1997) Latent class and factor analysis of DSM-IV ADHD: A twin study of female adolescents. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 37: 848-857.

Ickowicz A, Feng Y, Wigg K, Quist J, Pathare T, Roberts W e cols, (2007) The Serotonin Receptor HTR1B: Gene Polymorphisms in Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *Am J of Med Genet Part B* 144B: 121-125.

Jacob CP, Muller J, Schmidt M, Hohenberger K, Gutknecht L, Reif A e cols. (2005) Cluster B Personality Disorders are Associated with Allelic Variation of Monoamine Oxidase A Activity. *Neuropsychopharmacology* 4: 1-8.

Jin H, Oksenberg D, Ashkenazi A, Peroutka SJ, Duncan AM, Rozmahel R e cols. (1992) Characterization of the human 5-hydroxytryptamine1B receptor. *J Biol Chem* 267: 5735-5738.

Joobar R, Grizenko N, Sengupta S, Amor LB, Schmitz N, Schwartz G e cols. (2007) Dopamine transporter 3'-UTR VNTR genotype and ADHD: a pharmaco-behavioural genetic study with methylphenidate. *Neuropsychopharmacology* 32: 1370-1376.

Kalow W (2007) Personalized medicine: some thoughts. *Mcgill J Med* 10: 58.

Kang AM, Palmatier MA, Kidd KK (1999) Global variation of 40-bp VNTR in the 3'-untranslated region of the dopamine transporter gene (SLC6A3). *Biol Psychiatry* 46: 151-160.

Kirley A, Lowe N, Hawi Z, Mullins C, Daly G, Waldman I e cols. (2003) Association of the 480 bp DAT1 allele with methylphenidate response in a sample of Irish children with ADHD. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 121B: 50-4.

Kopeèková M, Paclt I, Petrášek J, Pacltová D, Malíková M, Zagatová V (2008) Some ADHD polymorphisms (in genes DAT1, DRD2, DRD3, DBH, 5-HTT) in case-control study of 100 subjects 6–10 age. *Neuro Endocrinol Lett* 29: 246-251.

LaHoste GJ, Swason JM, Wigal SB, Glabe C, Wigal T, King N e cols. (1996) Dopamine D4 receptor gene polymorphism is associated with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry* 1: 121-124.

Lappalainen J, Dean M, Charbonneau L, Virkkunen M, Linnoila M, Goldman D (1995) 5-HT1D beta autoreceptor gene on chromosome 6 and direct analysis for sequence variants. *Am. J. Med. Genet* 60: 157-161.

Lawson DC, Turic D, Langley K, Pay HM, Govan CF, Norton N e cols. (2003) Association analysis of monoamine oxidase A and attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet (Neuropsychiatr Genet)* 116: 84-89.

Lesch KP, Balling U, Gross J, Strauss K, Wolozin BL, Murphy DL (1994) Organization of the human serotonin transporter gene. *J Neural Transm* 95: 157-162.

Lesch KP, Bengel D, Heils A, Sabol SZ, Greenberg BD, Petri S e cols. (1996) Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science* 274: 1527-1531.

Levy F (1991) The dopamine theory of attention-deficit-hyperactivity disorder (ADHD). *Aust N Z J Psychiatry* 25: 277-283.

Levy F, Barr C, Sunohara G (1998) Directions of aetiologic research on attention-deficit/hyperactivity disorder. *Aust N Z J Psychiatry* 32: 97-103.

Li D, Sham PC, Owen MJ, He L (2006) Meta-analysis shows significant association between dopamine system genes and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Hum Mol Genet* 15: 2276-2284.

Li J, Yufeng W, Zhou R, Zhang H, Li Y, Wang B, et al. (2005) Serotonin 5-HT1B receptor gene and attention deficit hyperactivity disorder in Chinese Han subjects. *Am J of Med Genet Part B* 132B: 59-63.

Lucki I (1998) The Spectrum of Behaviors Influenced by Serotonin. *Biol Psychiatry* 44: 151-162.

Lung FW, Yang P, Cheng TS, Kao WT (2006) No allele variation of the MAOA gene promoter in male Chinese subjects with attention deficit hyperactivity disorder. *Neuropsychobiology* 54: 147-51.

Maher BS, Marazita ML, Ferrell RE, Vanyukov MM (2002) Dopamine system genes and attention deficit hyperactivity disorder: a meta-analysis. *Psychiatric Genetics* 12: 207-215.

Manor I, Eisenberg J, Tyano S, Sever Y, Cohen H, Ebstein RP e cols (2001) Family-based association study of serotonin transporter promoter region polymorphism (5-HTTLPR) in attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet (Neuropsychiatr Genet)* 105: 91-95.

Manor I, Tyano S, Mel E, Eisenberg J, Bachner-Melman R, Kotler M, e cols. (2002) Family-based and association studies of monoamine oxidase A and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): preferential transmission of the long promoter-region repeat and its association with impaired performance on a continuous performance test (TOVA). *Mol Psychiatry* 7: 626-632.

McLoughlin G, Ronald A, Kuntsi J, Asherson P, Plomin R (2007) Genetic Support for the Dual Nature of Attention Deficit Hyperactivity Disorder: Substantial Genetic Overlap Between the Inattentive and Hyperactive-impulsive Components. *J Abnorm Child Psychol* 35: 999-1008.

Michelson D, Allen AJ, Busner J, Casat C, Dunn D, Kratochvil C e cols. (2002) Atomoxetine in the treatment of children and adolescents with attention deficit/hyperactivity disorder: A randomized placebo-controlled, dose-response study. *Am J Psychiatry* 159: 1896-1901.

Mick E, Biederman J, Faraone SV, Sayer J, Kleinman SE (2002a) Case-control study of ADHD and maternal smoking, alcohol use, and drug use during the pregnancy. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 41: 378-385.

Mick E, Biederman J, Prince J, Fischer MJ, Faraone SV (2002b) Impact of low birth weight on attention deficit/hyperactivity disorder. *J Dev Behav Pediatr* 23: 16-22.

Mick E, Faraone SV (2008) Genetics of attention deficit hyperactivity disorder. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am* 17: 261-284.

Morgan A, Hynd G, Riccio C, Hall J (1996) Validity of DSM-IV ADHD predominantly inattentive and combined types: relationship to previous DSM diagnoses/subtype differences. *J.Am.Acad.Child Adolesc.Psychiatry* 35: 325-333.

Motulsky A (1957) Drug reactions, enzymes and biochemical genetics. *J Am Medical Association* 165: 835-837.

Murphy K, Barkley RA (1996) Attention deficit hyperactivity disorder adults: comorbidities and adaptive impairments. *Comp Psychiatry* 37: 393-401.

Nigg JT, Goldsmith HH (1998) Developmental psychopathology, personality, and temperament: Reflections on recent behavioral genetics research. *Hum Biol* 70: 387-412.

Nöthen MM, Erdmann J, Shimron-Abarbanell D, and Propping, P (1994) Identification of genetic variation in the human serotonin 1D beta receptor gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205: 1194-1200.

Ogdie MN, Macphie IL, Minassian SL, Yang M, Fisher SE, Francks C e cols. (2003) A genomewide scan for attention-deficit/hyperactivity disorder in an extended sample: suggestive linkage on 17p11. *Am J Hum Genet* 72: 1268-1279.



Ohashi J, Tokunaga K (2001) The power of genome-wide association studies of complex disease genes: statistical limitations of indirect using SNP markers. *J Hum Genet* 46: 478-482.

Organização Mundial de Saúde (1993) *Classificação e Transtornos Mentais e de Comportamento da CID-10: Descrições clínicas e diretrizes diagnósticas*. Porto Alegre: Editora Artes Médicas.

Ozaki N, Manji H, Lubierman V, Lu SJ, Lappalainen J, Rosenthal NE e cols. (1997) A Naturally Occurring Amino Acid Substitution of the Human Serotonin 5-HT<sub>2A</sub> Receptor Influences Amplitude and Timing of Intracellular Calcium Mobilization. *J Neurochemistry* 68: 2186-2193.

Parsons MJ, D'Souza UM, Arranz MJ, Kerwin RW, Makoff AJ (2004) The -1438A/G Polymorphism in the 5-Hydroxytryptamine Type 2A Receptor Gene Affects Promoter Activity. *Biol Psychiatry* 56: 406-410.

Pliszka SR, Mccracken JT, Maas JW (1996) Catecholamines in attention-deficit/hyperactivity disorder: Current perspectives. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 35: 264-272.

Polanczyk G, Silva de Lima M, Horta BL, Biederman J, Rohde LA (2007a) The Worldwide Prevalence of ADHD: A Systematic Review and Metaregression Analysis. *Am J Psychiatry* 164: 942-948.

Polanczyk G, Zeni C, Genro JP, Guimarães AP, Roman T, Hutz MH e cols. (2007b) Association of the adrenergic alpha2A receptor gene with methylphenidate improvement of inattentive symptoms in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Arch Gen Psychiatry* 64: 218-24.

Purper-Ouakil D, Wohl M, Mouren MC, Verpillat P, Ades J, Gorwood P (2005) Meta-analysis of family-based association studies between the dopamine transporter gene and attention deficit hyperactivity disorder. *Psychiatric Genetics* 15: 53-59.

Purper-Ouakil D, Wohl M, Orejarena S, Cortese S, Boni C, Asch M e cols. (2008) Pharmacogenetics of methylphenidate response in attention deficit/hyperactivity disorder: association with the dopamine transporter gene (SLC6A3). *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B: 1425-30.

Quist JF e Kennedy JL (2001) Genetics of childhood disorders: XXIII. ADHD, Part 7: The serotonin system. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 40: 253-256.

Quist JF, Barr CL, Schachar R, Roberts W, Malone M, Tannock R e cols. (2003) The serotonin 5-HT1B receptor gene and attention deficit hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry* 8: 98-102.

Quist JF, Barr CL, Schachar R, Roberts W, Malone M, Tannock R, e cols. (2000) Evidence for the serotonin HTR2A receptor gene as a susceptibility factor in attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Mol Psychiatry* 5: 537-541.

Rhode LA, Biederman J, Busnello A, Zimmermann H, Schmitz M, Martins S e cols. (1999a) ADHD in a School sample of Brazilian adolescents: A study of prevalence, comorbid conditions, and impairments. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 38: 716-722.

Rohde LA (1999b) Exploring different information sources for DSM-IV ADHD diagnoses in Brazilian adolescents. *J Attent Disord* 3: 91-96.

Rohde LA, Barbosa G, Tramontina S, Polanczyk G (2000) Transtorno de déficit de atenção/hiperatividade: atualização diagnóstica e terapêutica. *Rev Bras Psiquiatr* 2: 7-11.

Rohde LA, Halpern R (2004) Transtorno de deficit de atenção/hiperatividade: atualização. *J Pediatr* 80: S61-S70.

Roman T, Schmitz M, Polanczyk G, Eizirik M, Rohde LA, Hutz MH (2001) Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: A Study Of Association with both the dopamine transporter gene and the dopamine D4 receptor gene. *Am J Med Genet* 105: 471-478.

Roman T, Schmitz M, Polanczyk GV, Eizirik M, Rohde LA, Hutz MH (2002a) Further evidence for the association between attention-deficit/hyperactivity disorder and the dopamine-beta-hydroxylase gene. *Am J Med Genet* 114: 154-158.

Roman T, Szobot C, Martins S, Biederman J, Rohde LA, Hutz MH (2002b) Dopamine transporter gene and response to methylphenidate in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Pharmacogenetics* 12: 497-499.

Sabol SZ, Hu S, Hamer D (1998) A functional polymorphism in the monoamine oxidase A gene promoter. *Hum Genet* 103: 273-279.

Sanders AR, Cao Q, Taylor J, Levin TE, Badner JA, Cravchik A e cols. (2001) Genetic Diversity of the Human Serotonin Receptor 1B (HTR1B) Gene. *Genomics* 72: 1-14.

Saudou F, Amara DA, Dierich A, LeMeur M, Ramboz S, Segu L e cols. (1994) Enhanced aggressive behavior in mice lacking 5-HT1B receptor. *Science* 265: 1875-1878.

Scearce-Levie K, Chen JP, Gardner E, Hen R (1999) 5-HT receptor knockout mice: pharmacological tools or models of psychiatric disorders. *Annals of the New York Academy of Sciences* 868: 701-715.

Schmitz M, Denardin D, Laufer Silva T, Pianca T, Hutz MH, Faraone S e cols. (2006) Smoking during pregnancy and attention-deficit/hyperactivity disorder, predominantly inattentive type: a case-control study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 45:1338-45.

Schmitz M., Denardin D., Laufer Silva T., Pianca T., Hutz M.H., Faraone S e cols. (2006) Smoking during pregnancy and attention- deficit/hyperactivity disorder, predominantly inattentive type: a case-control study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 45: 1338-1345.

Seeger G, Schloss P, Schmidt MH (2001) Functional polymorphism within the promoter of the serotonin transporter gene is associated with severe hyperkinetic disorders. *Mol Psychiatry* 6: 235-238.

Seeman P, Madras BK (1998) Anti-Hyperactivity Medication: Methylphenidate and amphetamine. *Mol Psychiatry* 3: 745-753.

Seidman LJ, Valera EM, Makris N (2005). Structural brain imaging of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 57: 1263-1272.

Sheehan K, Hawi Z, Gill M, Kent L (2007) No association between TPH2 gene polymorphisms and ADHD in a UK sample. *Neurosci Lett* 412: 105–107.

Sheehan K, Lowe N, Kirley A, Mullins C, Fitzgerald M, Gill M e cols. (2005) Tryptophan hydroxylase 2 (TPH2) gene variants associated with ADHD. *Mol Psychiatry* 10: 944-949.

Sherman DK, Iacono WG, McGue MK (1997) Attention deficit hyperactivity disorder dimensions: A twin study of inattention and impulsivity–hyperactivity. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 36: 745–753.

Smalley SL (1997) Genetic influences in childhood-onset psychiatric disorders: Autism and attention–deficit/hyperactivity disorder. *Am J Hum Genet* 60: 1267-1282.

Smalley SL, Mccough JJ, Del’ Homme M, Newdeman J, Gordon E, Kim T, e cols. (2000) Familial clustering of symptoms and disruptive behaviors in multiple families with attention- deficit/hyperactivity disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 39: 1135-1143.

Smalley SL, Kustanovich V, Minassian SL, Stone JL, Ogdie MN, McGough JJ e cols. (2002) Genetic linkage of attention-deficit/hyperactivity disorder on chromosome 16p13, in a region implicated in autism. *Am J Hum Genet* 71: 959-963.

Smoller JW, Biederman J, Arbeitman L, Doyle AE, Fagerness J, Perlis RH, e cols. (2006) Association between the 5HT1B receptor gene (HTR1B) and the inattentive subtype of ADHD. *Biol Psychiatry* 59: 460-467.

Solanto MV (1998) Neuropsychopharmacological mechanisms of stimulant drug action in attention-deficit hyperactivity disorder: a review and integration. *Behav Brain Res* 94: 127-152.

Spencer T, Biederman J, Wilens T, Harding M, O'Donnell D, Griffin S (1996) Pharmacotherapy of attention-deficit hyperactivity disorder across the life cycle. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 35: 409-428.

Spencer TJ, Biederman J, Mick E (2007) Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: Diagnosis, Lifespan, Comorbidities, and Neurobiology. *J Pediatr Psychol* 32: 631-642.

Sprich S, Biederman J, Crawford MH, Mundy E, Faraone SV (2000) Adoptive and biological families of children and adolescent with ADHD. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 39: 1432-1437.

State MW, Lombroso PJ, Paul, DL, Leckman JF (2000) The genetics of childhood psychiatric disorders: A decade of progress. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 39: 946-962.

Stawicki JA, Nig JT, von Eye (2006). Family psychiatric history evidence on the nosological relations of DSM-IV ADHD combined and inattentive subtypes: New data and meta-analysis. *Journal of Child Psychology and Psychiatry* 47: 935–945.

Stein MA, McGough JJ (2008) The pharmacogenomic era: promise for personalizing attention deficit hyperactivity disorder therapy. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am* 17: 475-490.

Stein MA, Waldman ID, Sarampote CS, Seymour KE, Robb AS, Conlon C e cols. (2005) Dopamine transporter genotype and methylphenidate dose response in children with ADHD. *Neuropsychopharmacology* 30: 1374-82.

Still GF (1902) Some abnormal psychological conditions in childhood. *Lancet* 1: 1008.

Swanson J, Castellanos FX, Murias M, LaHoste G e Kennedy J (1998b) Cognitive neuroscience of attention deficit hyperactivity disorder and hyperkinetic disorder. *Curr Opin Neurobiology* 8: 263-271.

Swanson JM, Sergeant JA, Taylor E, Sonuga-Barke EJS, Jensen PS e Cantwell DP (1998a) Attention-deficit hyperactivity disorder and hyperkinetic disorder. *Lancet* 351:429-43.

Tannock R (1998) Attention Deficit Hyperactivity Disorder: Advances in Cognitive, Neurobiological, and Genetic Research. *J Child Psychol Psychiatry* 39: 66-99.

Teixeira G (2006) Transtornos Comportamentais na Infância e Adolescência. Rio De Janeiro: Editora Rubio Ltda.

Thapar A, Holmes J, Poulton K e Harrington R (1999) Genetic basis of attention-deficit and hyperactivity. *Br J Psychiatry* 174: 105-111.

Thapar A, Langley K, O'donovan M, Owen M (2006) Refining the attention deficit hyperactivity disorder phenotype for molecular genetic studies. *Mol Psychiatry* 11: 714-720.

Thapar A, Langley K, Owen MJ, O'Donovan MC (2007) Advances in genetic findings on attention deficit hyperactivity disorder. *Psychol Med* 37: 1681-1692.

Thapar A, O'Donovan M, Owen MJ (2005) The genetics of attention deficit hyperactivity disorder. *Hum Mol Genet* 2: R275-R282.

Todd R.D (2000a) Genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder: Are we ready for molecular genetics studies? *Am J Med Genet (Neuropsychiatr Genet)* 96: 241-243.

Todd RD (2000b) Genetics of childhood disorder: XXI. ADHD, part 5: A behavioral genetic perspective. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 39: 1571-1573.

Van Tol HH, Bunzow JR, Guan HC, Sunahara RK, Seeman P, Niznik HB e cols. (1991) Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature* 350: 610-614.



Vogel F (1959) Moderne Problem der Humangenetik. *Ergib Inn Kinderheild* 12: 52-125.

Wallis D, Russell HF, Muenke M (2008) Review: Genetics of attention deficit/hyperactivity disorder. *J Pediatr Psychol* 33:1085-1099.

Walther DJ, Peter JU, Bashammakh S, Hortnagl H, Voits M, Fink H e cols. (2003) Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science* 299: 76.

Weinshilbom R (2003) Inheritance and drug response. *New England Journal of Medicine* 348: 529-537.

Wender PH, Wolf LE, Wassertein J (2001) Adults with ADHD. *Ann N Y Acad Sci* 931: 1-16.

Wilens T, Biederman J, Mick E (1998) Does ADHD Affect the course of substance abuse? Findings from a sample of adults with and without ADHD. *Am J Addict* 7: 156-163.

Willcutt EG, Pennington BF, Olson RK, DeFries JC (2007) Understanding comorbidity: a twin study of reading disability and attention-deficit/hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 144B: 709-714.

Winsberg BG, Comings DE (1999) Association of the dopamine transporter gene (DAT1) with poor methylphenidate response. *J Am Acad Child Adoelsc Psychiatry* 38: 1474-1477.

Wolraich ML (2006) Attention-deficit hyperactivity disorder. *Semin Pediatr Neurol* 13: 279-285.

Wolraich ML, Hannah JN, Pinnock TY, Baumgaertel A, Brown J (1996) Comparison of diagnostic criteria for attention-deficit hyperactivity disorder in a county-wide sample. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 35: 319-324.

Xu X, Brookes K, Chen CK, Huang YS, Wu YY, Asherson P (2007) Association study between the monoamine oxidase A gene and attention deficit hyperactivity disorder in Taiwanese samples. *Psychiatry* 7: 10-13.

Xu X, Mill J, Chen CK, Brookes K, Taylor E, Asherson P (2005) Family-based association study of serotonin transporter gene polymorphisms in attention deficit hyperactivity disorder. No evidence for association in UK and Taiwanese samples. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 139B: 11-3.

Yang B, Chan RC, Jing J, Li T, Sham P, Chen RY (2007) A meta-analysis of association studies between the 10-repeat allele of a VNTR polymorphism in the 30-UTR of dopamine transporter gene and attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 144B: 541-550.

Zeni CP, Guimarães AP, Polanczyk GV, Genro JP, Roman T, Hutz MH e cols. (2007) No significant association between response to methylphenidate and genes of the dopaminergic and serotonergic systems in a sample of Brazilian children with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 144B: 391-394.

Zhuang X, Gross C, Santarelli L, Compan V, Trillat AC, Hen R (1999) Altered emotional states in knockout mice lacking 5-HT1A or 5-HT1B receptors. *Neuropsychopharmacology* 21: 52-60.

Zoroglu SS, Erdal ME, Alasehirli B, Erdal N, Silvasli E, Tutkun H e cols. (2002) Significance of serotonin transporter gene 5-HTTLPR and variable number of tandem repeat polymorphism in attention deficit hyperactivity disorder. *Neuropsychobiology* 45: 176-181.

Zoroglu SS, Erdal ME, Erdal N, Ozen S, Alasehirli B, Sivasli E (2003) No evidence for an association between the T102C and 1438 G/A polymorphisms of the serotonin 2A receptor gene in attention deficit/hyperactivity disorder in a Turkish population. *Neuropsychobiology* 47: 17-20.

---

## **Capítulo 8**

ANEXOS

---

## RESOLUÇÃO

As Comissões Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela CONEP como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA, reanalisaram o projeto:

**Número:** 98201

**Título:** "ESTUDO DO TRANSTORNO DE DEFICIT DE ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE – SUSCETIBILIDADE GENÉTICA E IDENTIFICAÇÃO DE GENES CANDIDATOS."

**Autores:** Luis Augusto Rohde, Mara Helena Hutz e Tatiana Roman.

- O mesmo foi aprovado, por estar adequado ética e metodologicamente, inclusive quanto ao seu Termo de Consentimento Informado, de acordo com as *Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa envolvendo Seres Humanos* (Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde) e às *Resoluções Normativas do GPPG/HCPA*. Os autores deverão encaminhar relatórios semestrais sobre o andamento do Projeto.

Porto Alegre, 16 de setembro de 1998.

  
Profª Themis Reyerbel da Silveira,  
Coordenadora do GPPG e CEP/HCPA.

**TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO**  
**ESTUDO DO TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO E**  
**HIPERATIVIDADE – SUSCETIBILIDADE GENÉTICA E**  
**IDENTIFICAÇÃO DE GENES CANDIDATOS**

Antes de sua participação neste estudo, é preciso esclarecer alguns detalhes importantes, para que possíveis dúvidas sejam resolvidas. Em caso de qualquer outra dúvida quanto à pesquisa ou sobre os seus direitos, vocês poderão contatar Tatiana Roman, bióloga e Mestre em Genética e Biologia Molecular, responsável pelo estudo, pelo telefone (051)316-6735.

*Qual o objetivo desta pesquisa?*

O objetivo do nosso estudo é conhecer um pouco mais sobre algumas das causas do transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH). Atualmente já se sabe que esta é uma doença bastante complexa, com características que variam de um caso para outro, e causada por diferentes fatores. Estes fatores tanto podem ser ambientais, como genéticos. A participação de genes é um aspecto que começou a ser estudado recentemente, e sobre o qual ainda não existem resultados definitivos. Assim, pretendemos esclarecer um pouco mais a respeito da contribuição genética no TDAH.

Como vamos fazer isso? O nosso propósito é investigar se determinados genes que parecem participar do desenvolvimento do TDAH realmente agem como fatores causais. Devido à grande variação clínica do TDAH, também estudaremos a possibilidade de cada um destes genes atuarem diferentemente em cada caso da doença, ou seja, terem alguma relação específica com um determinado sintoma ou característica.

Para chegar a estes resultados, de acordo com o método escolhido por nós, as crianças e os pais vão ser avaliados, através de uma análise de DNA. Nesta análise observaremos quais os genes, entre todos aqueles investigados, ocorrem em cada indivíduo, e como é a distribuição destes genes em cada família. Observaremos, também, como os genes se distribuem em relação aos sintomas apresentados pelas crianças, bem como com a medicação utilizada, prescrita pelos médicos. Comparando-se e analisando-se os dados de todas as crianças e todas as famílias, poderemos chegar aos objetivos colocados.

*Como é feita esta análise do DNA?*

Será coletada de cada indivíduo uma amostra de 5ml de sangue, através de punção venosa, usando-se agulhas e seringas descartáveis. Esta coleta será feita por um indivíduo treinado. De cada amostra de sangue será extraído o DNA, em laboratório. Com o DNA teremos acesso à informação genética que pode estar relacionada com a doença, conforme explicado no item anterior. As amostras são identificadas por números, diferentes daqueles utilizados pelo Hospital. A quantidade de sangue coletada

será suficiente para se extrair o DNA necessário ao estudo, que será completamente utilizado durante o mesmo. Após a investigação, o DNA não ficará armazenado, sendo desprezadas possíveis sobras deste material.

*Quais os riscos em participar?*

Poderá haver a formação de um hematoma local em função da coleta de sangue. Além deste, não há qualquer outro risco, nem para o paciente, nem para os pais, em participar deste projeto.

*O que a família ganha com este estudo?*

Este estudo poderá trazer vários benefícios, mesmo que a longo prazo. Com a análise do DNA, poderemos saber se diferentes genes atuam como fatores causadores da doença, e se estes genes atuam diferentemente em cada caso, como estamos supondo. Tendo-se observado isto, poderemos determinar com mais precisão que mecanismos biológicos estão envolvidos, e quais os medicamentos mais adequados, o que facilitará a escolha do tratamento, e o tornará mais eficiente. Além disso, havendo determinantes genéticos, estes poderão ser observados precocemente, o que contribuirá para estratégias de prevenção. Por fim, a sua participação ajudará no desenvolvimento de novos conhecimentos, que poderão eventualmente beneficiar vocês e outras pessoas que enfrentam o mesmo problema.

*Quais são os seus direitos?*

Os seus registros médicos serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados deste estudo poderão ser usados para fins científicos, mas vocês não serão identificados por nomes.

Sua participação no estudo é voluntária, de forma que, caso vocês decidam não participar, isto não afetará o tratamento normal a que a criança tem direito.

FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA PACIENTES  
ACORDO EM PARTICIPAR DE UM ESTUDO EM GENÉTICA

Número do Estudo: \_\_\_\_\_ Cód. de Ident. do Indivíduo:  
\_\_\_\_\_

Nome do Indivíduo: \_\_\_\_\_

Data de Nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Nome do Pai: \_\_\_\_\_

Nome do Pai: \_\_\_\_\_

Médico Supervisor: \_\_\_\_\_

Assinatura do paciente:

Assinatura do Pai:

Assinatura da Mãe:

Assinatura do Médico Supervisor:

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_