

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Biociências  
Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

Estudo de associação com genes candidatos do sistema  
serotoninérgico em crianças afetadas com o Transtorno de Déficit  
de Atenção e Hiperatividade (TDAH)

Ana Paula Miranda Guimarães

Dissertação 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 Mestre em Ciências

Orientadora: Dra. Mara Helena Hutz

Porto Alegre 2006

## **Agradecimentos**

À Dra. Mara Helena Hutz pela orientação e pela confiança em primeiro lugar. Além disso, pelo carinho e pela amizade com que me tratou nesses anos de orientação e também por todos ensinamentos que me proporcionou.

Ao Dr. Luis Augusto Rohde por ajudar e por aconselhar em todas etapas desta dissertação, sempre com boa vontade e disposição.

Aos colegas do Programa de Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade, em especial a Júlia Genro pelas longas discussões científicas, pela grande amizade e pela ajuda que me proporcionou nesta dissertação.

Aos colegas do Laboratório de DNA, em especial a Janaína Jaeger pela amizade incondicional, pelas conversas intermináveis tanto sobre trabalho, como também outros assuntos particulares e sempre pela disposição de seu tempo para ajudar nas análises estatísticas e outras questões.

Ao Dr. Claiton H. D. Baú, pelo auxílio em assuntos científicos.

Ao Elmo J. A. Cardoso, pela ajuda e pela paciência em assuntos técnicos e burocráticos.

Às amigas do Departamento Janaína Jaeger, Júlia Genro, Marilu Fiegenbaum, Verônica Zembrzusi, Fabiana Barzotti, Silvana de Almeida, Tatiana Roman e Tatiana Gonzalez pelo apoio e ajuda em diversos assuntos, tanto profissionais quanto pessoais.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

À minha família, em especial a minha irmã por todo amor, carinho e amizade que sempre compartilhamos e ao meu pai por todo incentivo e apoio em todos os momentos da minha vida pessoal e acadêmica.

Por último, mas muito importante, ao Victor por ser a pessoa mais maravilhosa que conheço. Por todo apoio sempre e sem contestação, pelas ajudas computacionais e revisões de todos meus trabalhos científicos. Enfim, pelo amor, pelo carinho e pela amizade que me proporciona.

## Resumo

O transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) afeta aproximadamente de 8% a 12% das crianças em idade escolar, sendo os meninos mais afetados, em comparação às meninas. Os sintomas do TDAH reconhecidos dividem-se em dois grupos: desatenção e hiperatividade/impulsividade. A contribuição de fatores genéticos na etiologia do TDAH é fortemente sugerida pelos estudos genéticos clássicos. Atualmente, muitos genes são considerados como possíveis genes de suscetibilidade para este transtorno, principalmente genes do sistema dopaminérgico que são alvos diretos dos agentes farmacológicos. Porém, evidencia-se a grande importância do estudo de genes do sistema serotoninérgico pela extensa relação que este possui com o sistema dopaminérgico. Além disso, existem também boas razões para relacionar o sistema serotoninérgico com o TDAH, dentre as quais podemos citar a evidência de alterações da serotonina que causam problemas comportamentais em humanos. No presente estudo foram analisados dois genes do sistema serotoninérgico (*SLC6A4* e *HTR2A*). No gene *SLC6A4* o polimorfismo estudado localiza-se no promotor, sendo uma inserção/deleção de 44pb. Já no segundo gene foram analisados dois polimorfismos. Um dos polimorfismos investigados também se localiza na região promotora do gene (-1438A>G). O outro polimorfismo investigado é uma troca de aminoácido His452Tyr localizado na região terminal da proteína receptora. A amostra foi composta por 243 crianças em idade escolar com TDAH e seus pais biológicos. O diagnóstico de TDAH está de acordo com os critérios do DSM-IV e foi inferido através do questionário semi-estruturado (K-SADS-E) bem como de avaliações clínicas com os pacientes e seus pais biológicos. A análise de risco relativo de haplótipos revelou uma ausência de associação entre o polimorfismo do gene *SLC6A4* e o polimorfismo -1438 A>G no gene *HTR2A* (-1438 A>G) e a doença ( $p=0,404$  para *SLC6A4* e;  $p=0,886$  para *HTR2A*; -1438 A>G). Entretanto, foi evidenciada associação com o polimorfismo His452Tyr no gene *HTR2A* e a doença. O alelo 452His foi mais frequentemente associado ao TDAH em meninos ( $p=0,04$ ). Portanto, nossos resultados sugerem uma associação do gene *HTR2A* (His452Tyr) dependente de gênero. Esse resultado salienta a importância do uso de amostras mais homogêneas ou o uso de fenótipos mais refinados para estudos de associação com doenças complexas, especialmente com o TDAH.

## Abstract

Attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) affects approximately 5% of school age children. Boys are more affected than girls. The ADHD symptoms are divided in two groups: inattention and hyperactivity/impulsivity. Genetic factors contribution to the etiology of the ADHD is strongly supported by classic genetics studies. At present, many genes are considered as possible susceptibility genes for this disorder, mainly from the dopaminergic system because they are direct targets for pharmacologic agents. However, the importance of studying the serotonergic genes becomes evident since it has an extensive relation with the dopaminergic system. Moreover, there are also good reasons for relating the serotonergic system with ADHD. We could cite, for example, the evidence of serotonin modifications, which cause behavior disorders in humans. In the present study two genes of the serotonergic system were analyzed (SLC6A4 and HTR2A). The SLC6A4 gene polymorphism studied is located in the promoter region and is defined by an insertion/deletion of 44bp. Two polymorphisms were analyzed in the second gene. One was also mapped in the promoter region, -1438 A>G. The second is a His452Tyr substitution mapped in the terminal region of the protein receptor. The present work investigated a sample of 243 ADHD school age children, as well as their biological parents. The ADHD diagnosis followed the DSM-IV classification, inferred by a semi-structured questionnaire (K-AADS-D) as well as clinical evaluations of the patients and their biological parents. The relative haplotype risk analyses revealed a lack of association between the SLC6A4 gene and the -1438A>G polymorphisms of the HTR2A (-1438 A>G) gene and the disease (p=0.404 for SLC6A4; p=0.886 for HTR2A; -1438 A>G). An association between the His452Tyr polymorphism at the HTR2A gene and ADHD was observed. The *452His* allele was more frequently associated with ADHD in boys (p=0.04). Therefore, our results suggest that an association with HTR2A (His452Tyr) gene depends on gender. This result stresses the importance of homogeneous samples or refined phenotypes use for associations studies in complex diseases, such as ADHD.

## Sumário

<b>Capítulo 1</b>	<b><i>Introdução</i></b> .....	<b>6</b>
1.1.	Caracterização da doença.....	7
1.2.	Neurobiologia do TDAH.....	9
1.3.	Aspectos genéticos do TDAH.....	10
1.4.	Identificação de genes candidatos.....	12
1.5.	Sistema serotoninérgico.....	15
1.6.	Genes <i>HTR2A</i> e <i>SLC6A4</i> .....	16
1.7.	Justificativas.....	20
1.8.	Objetivos.....	21
<b>Capítulo 2</b>	<b><i>Serotonin Genes and Attention Deficit/Hyperactivity Disorder in a Brazilian Sample: Preferential Transmission of the HTR2A 452His Allele to affected boys (Manuscrito submetido – American Journal of Medical Genetics)</i></b> .....	<b>22</b>
3.1.	Heterogeneidade e gênero.....	42
3.2.	Interação gene-ambiente.....	44
3.3.	Conclusões e perspectivas.....	45
<b>Capítulo 4</b>	<b><i>Referências Bibliográficas</i></b> .....	<b>46</b>
<b>Capítulo 5</b>	<b><i>Anexo</i></b> .....	<b>60</b>

# **Capítulo 1**

## **Introdução**

## **1.1. Caracterização da doença**

O transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) é um dos transtornos psiquiátricos mais comuns da infância e adolescência (Smalley, 1997; Biederman, 1998). O TDAH afeta de 8% a 12% de crianças em idade escolar, com mais meninos diagnosticados em comparação às meninas (Faraone e cols., 2003).

Esta doença é caracterizada por acentuada desatenção, hiperatividade e impulsividade, causando significantes problemas sociais, educacionais e psicológicos (Kent e cols., 2002). Além dos sintomas básicos do transtorno, em mais de 50% dos casos ocorre co-morbidade como transtornos do aprendizado, transtornos do humor e de ansiedade, transtornos disruptivos do comportamento e transtornos do abuso de substâncias e de álcool (Souza e Pinheiro, 2003). É importante salientar que a taxa de prevalência pode se mostrar mais ampla na literatura, pois é dependente de vários aspectos. Entre eles, os critérios diagnósticos utilizados, bem como a idade e o sexo da população em estudo.

Os sintomas do TDAH reconhecidos pela quarta edição do Manual de Diagnóstico e Estatística de Transtornos Mentais, DSM-IV (American Psychiatric Association, 1994) dividem-se em dois grupos, desatenção e hiperatividade-impulsividade. 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. Assim, conforme a presença de seis ou mais critérios do primeiro, do segundo ou de ambos os grupos, três tipos de TDAH podem ser reconhecidos, respectivamente: predominantemente desatento, predominantemente hiperativo-impulsivo e combinado. A prevalência de cada tipo na população é bastante variável. Em amostras provenientes de hospitais, o tipo combinado é o mais comum, seguido do desatento e por último o tipo hiperativo-impulsivo (Faraone e cols., 1998).

No tratamento do TDAH há várias intervenções possíveis para um tratamento eficiente, entre elas: as intervenções escolares e as intervenções farmacológicas. Neste aspecto, as intervenções escolares estão, recentemente, sendo muito estudadas e analisadas em pacientes com esse transtorno. Segundo Rief (2001), é necessário modificar vários aspectos no processo de ensino-aprendizagem do aluno com TDAH, como o meio

ambiente, a estrutura da aula, os métodos de ensino, os materiais utilizados, as tarefas solicitadas, as provas/avaliação, o feedback, o reforço, o nível de apoio, o tempo despendido, o tamanho e a quantidade de tarefas. Compreendemos, então, que o aluno com TDAH impulsiona o professor a uma constante reflexão sobre sua atuação pedagógica, obrigando-o a uma flexibilidade constante para adaptar seu ensino ao estilo de aprendizagem do aluno, atendendo, assim, as suas necessidades educacionais individuais (Benzik e Bromberg, 2003). Segundo Goldstein e Goldstein (1990), cerca de 20 a 30% das crianças com TDAH apresentam dificuldades específicas, que interferem na sua capacidade de aprender. A desatenção e a falta de autocontrole, características do TDAH, intensificam-se em situações de grupo, dificultando ainda mais a percepção seletiva dos estímulos relevantes, a estruturação e a execução adequada das tarefas. Estas características colocam a criança em grande risco para as dificuldades escolares em termos de desempenho acadêmico e interações com adultos e outras pessoas (Burcham e cols., 1995). Com isso, a presença de professores compreensivos e que dominem o conhecimento a respeito do transtorno, a disponibilidade de sistemas de apoio e oportunidades para se engajar em atividades que conduzem ao sucesso na sala de aula são imperativas para que um aluno com TDAH possa desenvolver todo o seu potencial (Benzik e Bromberg, 2003).

As intervenções farmacoterápicas já são utilizadas e estudadas há mais tempo em relação às intervenções escolares, existindo, neste sentido, uma extensa literatura avaliando a eficácia de estimulantes. Entre estes, o metilfenidato é o fármaco mais estudado e, conseqüentemente, o mais utilizado no tratamento de crianças com TDAH. Estudos demonstraram que os estimulantes possuem cerca de 70% de resposta favorável nos pacientes (Correia Filho e cols., 2003). Entretanto, quando os estimulantes não apresentam respostas favoráveis, eles são substituídos pelos antidepressivos tricíclicos (TCAs) (Dulcan e cols., 1997). A opção por estes fármacos também depende da ocorrência de comorbidades nos indivíduos com TDAH (Correia e Rohde, 1998). Dentre os TCAs o mais utilizado é a imipramina (Biederman, 1998).

Embora caracterizado por sintomas de desatenção, hiperatividade e impulsividade, a existência de diferentes quadros clínicos, bem como as várias possibilidades de tratamento, indicam que, pelo menos ao nível fenotípico, o TDAH é uma patologia bastante heterogênea. De acordo com esta consideração, casos diversos provavelmente apresentam fenomenologias particulares (heterogeneidade clínica) e, conseqüentemente,



heterogeneidade etiológica. O curso clínico desta patologia é bastante heterogêneo; embora possa ocorrer remissão espontânea com a idade, os sintomas podem persistir na adolescência e inclusive na vida adulta. Estudos demonstraram que sintomas de hiperatividade e impulsividade tendem a diminuir mais precocemente, enquanto os de desatenção, desorganização e distração são mais duradouros (Swanson e cols., 1998b). Os estudos longitudinais de Wender e cols. (2001) estimaram que 60 a 70% das crianças que apresentavam TDAH continuavam com esse diagnóstico na vida adulta. Já foi sugerido que esta heterogeneidade pode obscurecer um achado positivo em estudos sobre a etiologia da doença, e deve ser considerada como um fator de confusão (Alsobrook e Pauls, 1998). Mesmo que as melhores estratégias para refinar os fenótipos do TDAH, evidenciando rotas gene-ambiente e/ou reduzindo a heterogeneidade ainda não estejam bem estabelecidas, o delineamento de sub-amostras e o uso de diferentes abordagens de análise irão provavelmente aumentar a chance de se detectar com sucesso genes de suscetibilidade no TDAH.

## **1.2. Neurobiologia do TDAH**

As causas genéticas e ambientais do TDAH seguramente modificam o desenvolvimento cerebral, levando a um perfil heterogêneo de anormalidades neuropsicológicas, estruturais e funcionais. Embora não exista um único perfil patofisiológico para o TDAH, muitos estudos mostram que disfunções no lobo frontal e áreas subcorticais como, por exemplo, no controle de funções cognitivas e executivas (atenção, percepção, planejamento e organização) estão presentes em crianças com TDAH (Swanson e cols., 1998b; Tannock, 1998). Além disso, o envolvimento de circuitos fronto-subcorticais na patofisiologia do TDAH também foi sugerido pelos estudos de neuroimagem (revisão em Tannock, 1998). De acordo com estas investigações, o lobo frontal (córtex frontal e pré-frontal), e os núcleos da base, especificamente o *striatum* (caudado) e globo pálido, parecem ter volume e atividade diminuídos em pacientes com esta patologia. Estas áreas são ricas em catecolaminas, sobretudo dopamina e noradrenalina. 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. Embora os resultados ainda não sejam definitivos, uma série de estudos de neuroimagem,

neuropsicologia e bioquímica vêm corroborando essa idéia (Faraone e Biederman, 1998). Arnsten e Li (2005) numa revisão recente sobre a neurobiologia do TDAH enfatizam a influência das catecolaminas no córtex pré-frontal (CPF). Além das funções anormais e do tamanho reduzido do CPF em pessoas com TDAH, lesões desta estrutura no hemisfério cerebral direito produzem sintomatologia muito semelhante a do transtorno.

Trabalhos sobre anatomia cerebral associados ao TDAH revelaram anormalidades bioquímicas específicas. Desde 1970 a teoria bioquímica para explicar o TDAH era baseada nas catecolaminas. Recentes refinamentos desta teoria têm enfatizado, principalmente, funções da dopamina e noradrenalina (Swanson e cols., 1998b). Castellanos (1997) estendeu a teoria única da dopamina no TDAH baseado na proposta que diferentes anormalidades possam existir dentro de duas regiões dopaminérgicas: hipofunção na região cortical que resulta em déficit cognitivo, e excesso de dopamina na região subcortical que resulta em Hiperatividade e Impulsividade (excesso motor). Arnsten e cols. (1996) modificaram a teoria noradrenérgica de uma maneira semelhante, baseando-se na proposta que diferentes anormalidades possam existir em duas regiões noradrenérgicas: hipofunção na região cortical (dorsolateral pré-frontal), que resulta em déficit de memória, e excesso de noradrenalina na região subcortical (lócus coeruleus) que resulta em atenção seletiva.

Há 50 anos o TDAH vem sendo tratado com estimulantes como metilfenidato e anfetaminas. Estas drogas liberam e inibem a reabsorção de catecolaminas, principalmente dopamina, no sistema nervoso central (Swanson e cols., 1998a e Swanson e cols., 1998b). Assim, é provável que disfunções nos sistemas destes neurotransmissores sejam importantes na etiologia da doença, e que os genes envolvidos nos sistemas dopaminérgicos e noradrenérgicos sejam bons candidatos (Faraone e Biederman, 1998). Embora os estimulantes apareçam em estudos como medicações de primeira linha no tratamento do TDAH em crianças, o mecanismo de ação central, que promove simultaneamente redução na atividade motora e redução da impulsividade com melhora na manutenção da atenção permanece em grande parte desconhecido (Biederman, 1998).

### **1.3.Aspectos genéticos do TDAH**

Investigações clássicas de genética epidemiológica, utilizando estudos com famílias, com gêmeos ou com crianças adotivas estabeleceram que o TDAH possui uma

contribuição genética significativa (Kent e cols., 2002). 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 das crianças afetadas do que na população em geral (Faraone e cols., 1998). 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). 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).

A herdabilidade do TDAH foi estimada em cerca de 80%, mostrando que os genes possuem uma importante função na etiologia da doença. Por outro lado, o fato da herdabilidade ter sido menor que 100% evidencia que fatores ambientais também estão envolvidos na etiologia da doença (Faraone e cols., 1998). Faraone e cols. (2005), revisando 20 estudos com gêmeos, estimaram uma herdabilidade de 76%, sugerindo que talvez o TDAH seja o distúrbio psiquiátrico com maior componente hereditário.

O envolvimento de fatores ambientais vem sendo foco de alguns estudos para o melhor entendimento do TDAH. Fatores psicossociais (brigas familiares, presença de transtornos mentais nos pais), adversidades sociais (classe social baixa, família muito numerosa, criminalidade dos pais e colocação em lar adotivo), complicações na gravidez, uso abusivo de álcool e nicotina parecem ser fatores muito importantes para o desenvolvimento e manutenção da doença (Faraone e cols., 1998; Mick e cols., 2002).

Embora não existam muitas evidências, o mais aceito atualmente é que a transmissão do TDAH ocorre através de vários genes de pequeno efeito, que interagem entre si e com o ambiente, conferindo suscetibilidade ao transtorno (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).

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).

#### **1.4. Identificação de genes candidatos**

É possível, a princípio, pelo uso de técnicas de genética molecular, descobrir genes que conferem vulnerabilidade para doenças psiquiátricas e até mesmo genes que contribuem para características psicológicas normais. Estudos com polimorfismos de DNA em famílias com doenças psiquiátricas foram inicialmente encarados com uma grande expectativa pelos pesquisadores, dado o sucesso na identificação de marcadores (como na doença Huntington) ou dos próprios genes (como na fibrose cística) para doenças não psiquiátricas (Hyman e Nestler, 1993). Métodos de biologia molecular são necessários para encontrar genes que possam estar envolvidos na causa da doença. Duas abordagens são normalmente usadas para esta tarefa: a identificação de genes candidatos e as varreduras genômicas que consideram todos os possíveis genes responsáveis pela doença (Swanson e cols., 2001).

Gene candidato é definido como sendo um possível responsável envolvido na patofisiologia da doença. Contudo, o achado de um possível gene candidato somente é aceito quando existir uma teoria patofisiológica coerente que explique este gene específico relacionando-o à doença (Hyman e Nestler, 1993).

O principal alvo das pesquisas à procura de genes candidatos são genes que codificam componentes dos sistemas dopaminérgico, noradrenérgico e, mais recentemente, serotoninérgico, uma vez que dados de estudos neurobiológicos sugerem fortemente o envolvimento desses neurotransmissores na patofisiologia desse transtorno (Roman e cols., 2002b).

Na última década, a maioria das pesquisas sobre a neurobiologia do TDAH teve como alvo o sistema dopaminérgico, definindo os seus neurotransmissores como os principais responsáveis no desenvolvimento desta doença, muito comum na infância, sendo o principal foco dos estudos moleculares com o TDAH (Roman e cols., 2002a e Quist e cols., 2003). Desta maneira, genes do sistema dopaminérgico são escolhas óbvias por muitas razões como: a redução efetiva dos sintomas da doença através dos agentes farmacológicos que agem principalmente no sistema noradrenérgico e no sistema dopaminérgico; e recentes resultados de estudos de imagens de TDAH que mostraram a

estrutura cerebral com ricas inervações dopaminérgicas, como o circuito fronto-estriado (Tannock, 1998).

O gene do transportador de dopamina (*DAT1*) foi, dessa forma, o candidato inicial para as investigações, visto que a proteína transportadora é inibida pelos estimulantes usados no tratamento do TDAH. Evidências preliminares de associação entre o alelo (10R) de um VNTR no loco do transportador de dopamina e TDAH foi descrito por Cook e cols. (1995). Esta associação vem sendo replicada por muitos autores; contudo, os resultados são conflitantes. A detecção de associação foi analisada e comprovada pelos estudos de: Gill e cols. (1997), Waldman e cols. (1998), Daly e cols. (1999) e Rowe e cols. (2001) entre outros. Contudo, outras investigações não encontraram essa associação, como as de Swanson e cols. (2000) e Roman e cols. (2001). Com isso, recentemente, uma meta análise foi realizada por Faraone e cols. (2005) que mostrou uma associação do alelo de 10R e o TDAH com um efeito pequeno (OR de 1.13) em 14 estudos.

Outro gene do sistema dopaminérgico intensamente investigado neste transtorno é o gene do receptor D4 de dopamina (*DRD4*). Esse possui um VNTR de 48pb no exon III. 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. Além disto, o produto deste gene concentra-se em áreas do cérebro cujas funções são implicadas em sintomas da doença. LaHoste e cols. (1996) foram os primeiros a detectar associação desse gene com o TDAH. O alelo com sete cópias da unidade de repetição de 48pb (alelo 7R), o mesmo relacionado com a dimensão “busca de novidades”, foi sugerido como alelo de risco em vários estudos. Embora muitas investigações tenham replicado a associação com o gene *DRD4*, os resultados são bastante controversos. Contudo, Faraone e cols. (2005) examinaram o gene *DRD4* em uma meta análise com ambos estudos (caso-controle e estudo de família) e encontraram associação entre o alelo de 7 repetições e TDAH, tanto em estudos caso-controle com OR de 1,45 para 13 estudos, quanto para estudos baseados em família com OR de 1,16 com 17 estudos.

O gene *DRD5*, também vem sendo muito estudado e relacionado com TDAH. O polimorfismo mais estudado do receptor D5 de dopamina é um microsatélite de 148 pb. Alguns estudos realizados com este gene observaram associação com o alelo de 148 repetições e TDAH (Daly e cols., 1999, Tahir e cols., 2000, Comings e cols., 2000). Contudo, um estudo não encontrou associação com este gene e outros dois estudos

encontram associação com o alelo de 146pb (Barr e cols., 2000; Payton e cols., 2001; Kustanovich e cols., 2003). Entretanto, a meta análise mais recente feita com este gene mostrou associação do alelo de 148pb e o TDAH a partir de 14 estudos baseados em família (OR de 1,2) (Faraone e cols., 2005).

Praticamente todos os demais genes conhecidos do sistema dopaminérgico já foram objeto de estudos de associação com esse transtorno, incluindo os genes que codificam os receptores D2 e D3 e os genes de enzimas relacionadas com o metabolismo da dopamina. As investigações com a maioria desses marcadores ainda são bastante reduzidas, impedindo conclusões definitivas (Roman e cols., 2002a).

Em doenças complexas influenciadas por vários genes de pequeno efeito, os estudos de associação, de um modo geral, parecem ter um poder estatístico reduzido para identificar tais genes, e a não replicação de achados positivos parece ser a regra, especialmente quando as amostras não são muito grandes. Todas estas limitações podem ter contribuído significativamente para os resultados inconsistentes obtidos nos estudos com os genes *DAT1* e *DRD4* (Tannock, 1998, Roman e cols., 2001 e Roman e cols., 2002b).

Poucos estudos moleculares foram realizados até o momento com genes do sistema noradrenérgico. Estes estudos concentraram-se principalmente no gene que codifica a enzima dopamina-beta-hidrolase (*DBH*), ou loco *DBH*, sendo objetivo de investigação um sítio de restrição TaqI localizado no intron 5 do gene. O primeiro trabalho em que o polimorfismo foi de fato analisado em uma amostra diagnosticada com este transtorno foi o de Daly e cols. (1999). Estes 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 (Daly e cols., 1999). Roman e cols. (2002a), replicaram estes achados para a amostra total e para o subgrupo de pacientes do tipo combinado. Porém, um efeito significativo do alelo A2 foi verificado também entre os pacientes sem história familiar de TDAH, contrastando com parte dos resultados obtidos anteriormente. Na revisão de Faraone e cols. (2005), também foi realizada uma meta análise com o gene *DBH*, onde se observou uma associação com o alelo Taq1 no intron 5 e o TDAH analisada em 3 estudos baseados em família com OR de 1,33.

Genes de alguns dos receptores adrenérgicos também já foram investigados no TDAH. Associações dos genes que codificam os receptores  $\alpha 2A$  (*ADRA2A*) e  $\alpha 2C$

(*ADRA2C*) com escores elevados de TDAH em pacientes com síndrome de Tourette foram observadas por Comings e cols. (1999). Após este trabalho, foram feitos três novos estudos baseados em família com o gene *ADRA2A* que encontraram associação com o alelo G do polimorfismo -1291C/G (*MspI*) e sintomas de desatenção (Roman e cols., 2003, 2005, Park e cols., 2005).

Vários outros genes de diferentes sistemas biológicos também já foram sugeridos como genes de suscetibilidade ao TDAH. Porém, os resultados são muito contraditórios. Este panorama possivelmente é devido, em grande parte, a uma heterogeneidade genética ímpar, representada pela alta complexidade clínica da doença (Roman e cols., 2002b).

### **1.5.Sistema serotoninérgico**

O sistema serotoninérgico vem sendo alvo de novos modelos genéticos, mostrando que qualquer alteração na quantidade da serotonina (5-HT) causa permanentes mudanças comportamentais em humanos sendo relacionadas com comportamentos impulsivos e agressivos (Seeger e cols., 2001a e Gaspar e cols., 2003). Além disso, a serotonina media uma extensa variedade de funções como: sensorial, motora e cortical (Erdmann e cols., 1996). Assim, o sistema serotoninérgico, na etiologia do TDAH, também está sendo investigado como possível responsável pelo transtorno (Zoroglu e cols., 2003). Embora a serotonina tenha sido bem menos estudada na neurobiologia do TDAH até o momento, esta função na patofisiologia da doença tornou-se de interesse para muitas investigações recentes nesta área.

Consideráveis evidências sugerem a função para este neurotransmissor na etiologia de doenças comportamentais caracterizadas por déficit de inibição que incluem o abuso de álcool, a tendência suicida, o transtorno de conduta e a agressão. Como o TDAH também é uma doença comportamental largamente caracterizada por déficits de inibição e é tão bem conhecida como precursora de muitas doenças relacionadas ao controle de impulsividade de adultos, a função para 5-HT no TDAH possui muitas hipóteses. Realmente, evidências de estudos bioquímicos mostraram que os níveis de 5-HT foram relativamente baixos no TDAH. Somando-se a isto, existem muitas evidências de estudos com animais e humanos (adultos e crianças) em que o neurotransmissor serotoninérgico é necessário para mediar muitos comportamentos presentes no TDAH. Assim, demonstrou-se que a atividade

serotoninérgica central reduzida implica em uma regulação de impulsividade prejudicada, comportamento agressivo e desinibição. (Quist e Kennedy, 2001 e Kent e cols., 2002).

Estudos com animais também indicaram que a dopamina no córtex frontal e 5-HT possuem importante função na modulação da atenção e do controle da resposta. Experimentos com ratos “knockout” sugeriram que o efeito de psicoestimulantes no TDAH é particularmente mediado pelo sistema 5-HT através de receptores alvos precisos de 5-HT ou aumentando a disponibilidade do precursor de 5-HT. Desta forma, o experimento mostrou uma considerável interação entre os sistemas de neurotransmissores serotoninérgico e dopaminérgico (Gainetdinov e cols., 1999).

Uma hipótese para este envolvimento do 5-HT no desenvolvimento do TDAH é o controle regulatório do 5-HT sobre o neurotransmissor dopamina (DA). Problemas no sistema 5-HT resultam em problemas no sistema DA e afetam comportamentos mediados pela DA. Neurônios 5-HT enviam projeções para corpos celulares da DA localizados na região média do cérebro, incluindo a substância negra e área tegmental ventral. O 5-HT inerva corpos e terminações celulares dopaminérgicos permitindo a regulação funcional por 5-HT tanto do disparo neuronal como da liberação de DA. O 5-HT apresenta também influência sobre a liberação de DA em regiões terminais, porém é menos claro já que ambos efeitos excitatórios e inibitórios foram observados. Diferentes subtipos de receptores 5-HT mediam a regulação de 5-HT sobre o neurotransmissor DA e incluem três receptores, o 5-HT<sub>1A</sub>, o 5-HT<sub>1B</sub>, e o 5-HT<sub>2A</sub> (Quist e Kennedy, 2001).

Estudos com o receptor 5-HT<sub>2A</sub> têm evidenciado que este pode ser considerado um heteroreceptor, por exibir regulação sobre a dopamina, além da serotonina. Por esta razão, dentro de relatos de exploração de genes para o TDAH, é razoável focar em candidatos envolvidos na regulação de 5-HT (Zoroglu e cols., 2003).

Além do mais, em recente varredura genômica, foi observado uma grande quantidade de genes serotoninérgicos com *lod scores* maiores que 3. Entre os genes observados estavam: *HTR1A*, *HTR1B*, *HTR1E*, e *SLC6A4* (Fisher e cols., 2002).

## **1.6. Genes *HTR2A* e *SLC6A4***

O receptor 5-HT<sub>2A</sub> foi recentemente relacionado ao TDAH através de estudos de ligação e de associação (Quist e cols., 2000, Levitan e cols., 2002, Hawi e cols., 2002 e Zoroglu e cols., 2003). O gene do receptor humano *HTR2A* foi localizado na região



cromossômica 13q14-q21 e codifica a proteína que é envolvida na transdução de sinal mediada via hidrólise fosfoinositol e mobilização intracelular de cálcio. Três polimorfismos do gene *HTR2A* foram descritos e testados para associação com o TDAH (Quist e cols., 2000, Levitan e cols., 2002, Hawi e cols., 2002 e Zoroglu e cols., 2003).

O polimorfismo mais estudado no gene do receptor 5-HT<sub>2A</sub> no TDAH é a troca de aminoácido His452Tyr. Esta variante causa a substituição de uma histidina por uma tirosina na posição 452 da cauda C terminal da proteína receptora. Algumas evidências comprovam que essa mutação altera a função do receptor 5-HT<sub>2A</sub>, já que a substituição pelo aminoácido Tyr 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 Tyr. Estas evidências foram obtidas a partir de testes bioquímicos que induziram a mobilização de cálcio intracelular comparando os dois tipos de genótipos: His452His e His452Tyr (Ozaki e cols; 1997). Hazelwood e Sanders-Bush (2004) também evidenciaram a funcionalidade do SNP His452Tyr, mostrando que a variante 452Tyr reduziu a habilidade em ativar proteína G, concluindo que na presença desta variante ocorre perda de magnitude após a resposta. Quist e cols. (2000) mostraram associação deste polimorfismo com o TDAH através do teste de desequilíbrio de transmissão (TDT) evidenciando transmissão preferencial do alelo Tyr nas crianças afetadas pelo TDAH em canadenses. Já, Hawi e cols. (2002) em uma amostra composta por pacientes do Reino Unido e da Irlanda não demonstraram associação desse polimorfismo com TDAH. Mas, ao examinarem apenas Irlandeses, através do TDT evidenciaram transmissão preferencial do alelo His para os probandos com TDAH, contrariamente aos resultados obtidos por Quist e cols. (2000). Assim, seria muito importante replicar o estudo deste polimorfismo, já que os resultados atuais são controversos.

O segundo polimorfismo no gene do receptor 5-HT<sub>2A</sub> identificado foi a transição T>C na posição 102. Esta mutação não altera a composição de aminoácidos e conseqüentemente, não altera a proteína receptora. Contudo, há vários estudos de associação que sugerem as evidências de que o genótipo 102T>C em homozigose (C/C) possa estar relacionado mais especificamente com o controle comportamental deficiente, que se inclui no grupo B, eixo II de doenças de personalidade. Doenças do grupo B compartilham a impulsividade como característica comum. Portadores dessas doenças podem apresentar uma disfunção serotoninérgica nas áreas do córtex prefrontal que

controla a regulação da impulsividade. Todas estas características têm grande similaridade com aspectos clínicos e neurobiológicos do TDAH (Zoroglu e cols., 2003). Entretanto, até o momento foram feitos apenas dois estudos de associação deste polimorfismo com TDAH, cujos resultados foram negativos (Quist e cols., 2000 e Zoroglu e cols., 2003).

No entanto, este polimorfismo está em total desequilíbrio de ligação com o SNP – 1438 A>G localizado na região promotora. A análise do desequilíbrio de ligação entre estes dois polimorfismos foi evidenciada em várias populações, como por exemplo, na população japonesa (Tochigi e cols., 2005) e na população europeia (Robertson e cols., 2003; Zoroglu e cols., 2003; Martinez-Barrondo e cols., 2005).

O polimorfismo -1438 A>G na região promotora do gene *HTR2A* foi relacionado com a anorexia nervosa, assim como com o transtorno obsessivo compulsivo e o transtorno afetivo sazonal. O polimorfismo -1438 A>G pode ser um SNP funcional, afetando a atividade da região promotora do gene. Na presença do alelo A é evidenciado um aumento significativo na atividade do promotor, mas somente em linhagens celulares que expressam o gene *HTR2A*, sugerindo a importância dos fatores de transcrição para a possível funcionalidade desta variante (Parsons e cols., 2004).

Contudo, somente um estudo sobre o polimorfismo -1438 A>G no TDAH foi realizado até o momento. O resultado deste trabalho sugere que o polimorfismo -1438 A>G no gene *HTR2A* não está associado ao TDAH e, portanto, não possui uma função principal deste polimorfismo na susceptibilidade desta doença (Zoroglu e cols., 2003).

Muitos estudos vêm focando o transportador de serotonina (*SLC6A4*) como um possível gene candidato para o TDAH. O gene que codifica o transportador de serotonina humano se localiza na região cromossômica 17q11.2, possuindo um polimorfismo que vem sendo relacionado com características de personalidade humana, que é uma inserção/deleção de 44pb localizada na região promotora deste gene. Desse modo, variantes específicas do transportador de serotonina estão sendo associadas com psicopatologias, como TDAH, comportamento impulsivo e compulsivo e depressão (Manor e cols., 2001; Lakatos e cols., 2003).

Este polimorfismo possui duas formas alélicas: uma variante longa com 16 repetições e uma variante curta com 14 repetições. A variante curta é associada com redução da transcrição do gene e subsequente baixa expressão funcional do transportador (*SLC6A4*) e, conseqüentemente um aumento de 5-HT, evidenciando possíveis influências

comportamentais e psicopatológicas relacionadas ao 5-HT (Heils e cols., 1996; Lesch e cols., 1996). Com isso, o polimorfismo da região promotora vem sendo o mais estudado no sistema serotoninérgico investigado no TDAH (Manor e cols., 2001, Seeger e cols., 2001a, Zoroglu e cols., 2002; Kent e cols., 2002; Retz e cols., 2002; Beitchman e cols., 2003; Cadoret e cols., 2003; Langley e cols., 2003; Xu e cols., 2005, Kim e cols., 2005).

Seeger e cols. (2001a) mostraram, em suas análises, associação do polimorfismo do promotor do gene do transportador de serotonina com o TDAH. Este resultado foi produzido através da análise caso-controle mostrando associação do alelo longo em crianças afetadas com TDAH. Em outro estudo, Manor e cols. (2001) verificaram uma significativa diminuição do alelo curto em homozigose deste polimorfismo com o TDAH. Entretanto, essa associação foi restrita para a sub-amostra do tipo combinado, através do método estatístico do risco relativo de haplótipo (HRR). Replicando este trabalho, Zoroglu e cols. (2002) observaram uma significativa diminuição do genótipo curto/curto comparando casos com controles.

Kent e cols. (2002) confirmaram transmissão preferencial do alelo longo em crianças afetadas com TDAH, através do teste de desequilíbrio de transmissão (TDT), associando, conseqüentemente, este polimorfismo com TDAH. Retz e cols. (2002) encontraram associação, através de testes não paramétricos, com o alelo longo em pacientes com altos escores da escala *Wender Utah Rating Scale*, a qual foi usada para medir a história de TDAH, e os sintomas característicos da doença nos indivíduos estudados. Beitchman e cols. (2003) demonstraram associação do alelo longo com o TDAH, em um pequeno estudo de crianças agressivas com TDAH. Cadoret e cols. (2003) analisaram por regressão a relação entre o polimorfismo inserção/deleção de 44pb e sub-escalas de agressividade, de transtorno de Conduta e de TDAH. O resultado deste trabalho, no entanto, é controverso aos outros trabalhos, pois encontram associação com o alelo curto e maior probabilidade de desenvolver sintomas de agressividade, de Transtorno de Conduta e de TDAH em uma amostra de 39 meninos.

Langley e cols. (2003), Xu e cols. (2005) e Kim e cols. (2005) também analisaram o polimorfismo da região promotora, contudo não encontraram associação com o TDAH.

Faraone e cols. (2005) realizaram uma meta análise com o *SLC6A4* com 3 estudos caso-controle observando um OR de 1,31.

Em um estudo a parte, Seeger e cols. (2001b) obtiveram um resultado muito interessante. Eles evidenciaram significativa interação do genótipo *DRD4* (alelo7) com o genótipo *SLC6A4* (alelo longo) em crianças afetadas com TDAH. Ressaltando, com isso, a interação do sistema dopaminérgico com o sistema serotoninérgico, assim como a relação do alelo longo do polimorfismo do transportador de serotonina com o TDAH.

Através da análise destes estudos, percebe-se que a investigação do sistema serotoninérgico relacionado ao TDAH é muito promissor.

### **1.7. Justificativas**

Embora muitos estudos já tenham sido realizados com possíveis genes candidatos do sistema dopaminérgico e noradrenérgico, ainda pouco se sabe sobre a etiologia do TDAH. O sistema dopaminérgico é o mais estudado e relacionado com o TDAH por inúmeras razões, sendo a principal a redução efetiva dos sintomas da doença através dos agentes farmacológicos que agem principalmente neste sistema. Evidencia-se, em consequência, a grande importância do estudo de genes do sistema serotoninérgico uma vez que este sistema possui relação com o sistema dopaminérgico. Existem também boas razões para relacionar o sistema serotoninérgico com o TDAH, dentre as quais podemos citar a evidência de alterações da serotonina que causam problemas comportamentais em humanos. Como o estudo destes genes relacionados ao TDAH é muito recente, percebe-se que há uma necessidade de mais estudos relacionados aos polimorfismos de genes serotoninérgicos para a identificação de novos fatores que condicionam o TDAH, possibilitando, assim, possíveis conclusões relacionadas com a etiologia da doença.

O TDAH é uma doença complexa, possuindo diferentes comportamentos como desatenção, hiperatividade e impulsividade, e freqüentemente co-ocorrem com outros problemas comportamentais. Assim, é provável que a causa da heterogeneidade desta doença provenha da relação de diferentes genes de diferentes sistemas de neurotransmissores. Este estudo pode levantar novas hipóteses na pesquisa genética molecular do TDAH, expandindo a atual hipótese das catecolaminas para incluir a hipótese serotoninérgica e desta forma ajudar a elucidar a complexa relação dos sistemas neurotransmissores com a etiologia do TDAH.

A identificação destes fatores é fundamental, uma vez que um maior conhecimento do componente genético permitirá identificar melhores estratégias de prevenção e tratamento bem como novos alvos terapêuticos para o TDAH.

### **1.8.Objetivos**

1. Investigar a associação de dois polimorfismos no gene do receptor de serotonina *HTR2A* e um polimorfismo na região promotora do gene do transportador de serotonina (*SLC6A4*) com o TDAH.

2. Determinar os haplótipos derivados dos dois polimorfismos do receptor 5-HT<sub>2A</sub> e verificar se ocorre transmissão preferencial de algum desses haplótipos para a criança com TDAH

**Capítulo 2**  
**Serotonin Genes and Attention Deficit/Hyperactivity Disorder in a Brazilian Sample: Preferential Transmission of the HTR2A 452His Allele to affected boys (Manuscrito submetido – American Journal of Medical Genetics).**

**Serotonin Genes and Attention Deficit/Hyperactivity Disorder in a  
Brazilian Sample: Preferential Transmission of the HTR2A 452His Allele  
to affected boys.**

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

<sup>1</sup>Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, <sup>2</sup>Departamento de Psiquiatria, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, <sup>3</sup>Fundação Federal Faculdade de Ciências Médicas. Porto Alegre, Brazil

Address to which correspondence should  
be sent:

Prof. Mara H. Hutz  
Departamento de Genética  
Instituto de Biociências, UFRGS  
Caixa Postal 15053  
91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil  
Tel. 55 51 3316-6720  
Fax. 55 51 3343-5850  
E-mail: [mara.hutz@ufrgs.br](mailto:mara.hutz@ufrgs.br)

**Short title:** Serotonin genes and ADHD.

## **Abstract**

Attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD) is one of the most common psychiatric disorders of childhood. The role of genetic factors in its etiology is strongly supported by family, adoption, and twin studies. Low serotonin activity has been associated in both animal and human studies with measures of impulsivity, aggression, and disinhibited behaviors, which make genes from the serotonin system good candidates for ADHD susceptibility. In the present study, we investigated the serotonin transporter (SLC6A4) promoter region polymorphism and two polymorphisms (-1438 A>G and His452Tyr) in the serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor gene using family based association analyses in a sample of 243 Brazilian ADHD children and adolescents and their parents. No linkage disequilibrium between the two HTR2A polymorphisms was detected in this sample (P=0.76). Considering several evidences from animal models for sexual dimorphism in serotonin genes expression, analyses were performed separately for the whole sample and for male probands. No evidences for biased transmissions of both HTR2A -1438 A>G and SLC6A4 polymorphisms to ADHD youths were observed. Preferential transmission of the HTR2A His452 allele was observed only in families with affected boys (P=0.04). Our results suggest that findings from ADHD association studies for serotonin genes might be understood in the context of a gender effect, which may help to explain conflicting results in these association studies. However our first findings should be interpreted cautiously until replicated in independently recruited samples.

**Key Words: ADHD, 5-HTT, 5-HT<sub>2A</sub> Receptor, Gender susceptibility, Sexual dimorphism.**



## **INTRODUCTION**

Attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) is a highly heritable condition and is relatively common in childhood, affecting 8-12% of children worldwide. In clinically referred samples of children, ADHD affects three times more males than females [Rohde et al., 1999; Biederman and Faraone, 2005], while epidemiological studies report a ratio of 2:1 [Arcia and Conners, 1998]. Family, twin and adoption studies strongly support a role for genetic components in the etiology of the disorder [Biederman and Faraone, 2005].

The dopaminergic and the noradrenergic systems have been extensively implicated in the pathophysiology of ADHD [Biederman and Faraone, 2005]. Nevertheless, the serotonergic system has also been recently implicated in the etiology of ADHD. The neurotransmitter serotonin (5-HT) is involved in the regulation of a broad array of psychological, behavioral, and biological functions that when deregulated influence the development and course of an equally broad range of psychiatric and medical disorders. Reduced central serotonergic activity has been implicated, for example, in the mediation of negative emotions, poor impulse regulation, aggressive behavior, increased use of alcohol and nicotine and increased food consumption in animals and humans [Halperin et al., 1997; Lucki et al., 1998]. The serotonergic hypothesis is also supported by a study showing that platelet 5-HT levels were relatively low in a sample of children with severe ADHD [Spivak et al., 1999].

Moreover, animal studies also indicated that frontal cortex dopamine (DA) and 5-HT play an important role in the modulation of attention and response control [Ruotsalainen et al., 1997]. Animal models are beginning to show the importance of obtaining a balance between interlinked systems in neuropsychiatric disorders. One such example is the ADHD dopamine transporter knockout mouse. The calming effects of methylphenidate were still observed when the DAT gene was knocked out suggesting a role of other systems. In this model, hyperactivity was also calmed by fluoxetine, implying that methylphenidate may also exert its effect by increasing serotonin levels [Gainetdinov et al., 1999; Norton and Owen, 2005]. For this reason, the study of the serotonergic system is a very promising one. Thus, the receptors and the serotonin transporter are potential candidate genes for ADHD. The human serotonin transporter is the major regulator of synaptic serotonin concentration and actively transports this neurotransmitter, by a high affinity of Na (+) and Cl (-), into the presynaptic terminal [Lesch et al., 1994]. The gene encoding the human serotonin

transporter (SLC6A4) is located at 17q11.2. One common polymorphism in the promoter region of the serotonin transporter gene has been identified which is defined by a 22bp VNTR with two alleles, termed long (L with 16 repeats) and short (S with 14 repeats) [Lesch et al., 1994; Ogilvie et al., 1996]. There are some studies demonstrating that the long variant is associated with greater transcriptional efficiency than the short variant. Therefore, this polymorphism might influence ADHD symptoms [Heils et al., 1996; Lesch et al., 1996]. The serotonin transporter has been investigated in several studies on ADHD with both positive [Seeger et al., 2001; Manor et al., 2001; Kent et al., 2002; Cadoret et al., 2003] and negative reports [Langley et al., 2003; Xu et al., 2005; Kim et al., 2005].

The human HTR2A gene is located on chromosome 13q 14-q21 [Hsieh et al., 1990]. Receptor autoradiography studies have shown high levels of 5-HT<sub>2A</sub> binding sites in many forebrain regions, particularly in cortical areas [Pazos et al., 1985,1987; López-Giménez et al., 1997]. Evidence from pharmacological studies have suggested that striatal 5-HT<sub>2A</sub> receptors regulate stimulant-induced dopamine release and hyperactivity, providing support for the interaction of serotonergic and dopaminergic systems in mediating hyperactivity behavior [O'Neill et al., 1999].

Two polymorphisms of the HTR2A gene are focused in the present study: The His452Tyr and -1438A>G variants [Ozaki et al., 1996; Erdmann et al., 1996; Spurlock et al., 1998]. The -1438 A>G polymorphism in the HTR2A promoter region might be a functional SNP that affects promoter activity, having functional effects on 5-HT<sub>2A</sub> receptor expression in the brain and might be responsible for associations with many neuropsychiatry phenotypes [Parsons et al., 2004]. Only one association study with this polymorphism and ADHD with negative results has been reported so far [Zoroglu et al., 2003].

The second polymorphism investigated in the 5-HT<sub>2A</sub> receptor gene is a His452Tyr substitution that might alter the 5-HT<sub>2A</sub> function and consequently contribute to the development of psychiatric disorders [Ozaki et al., 1997]. Two association studies between the His452Tyr polymorphism and ADHD have been reported with conflicting results [Quist et al., 2000; Hawi et al., 2002].

Several evidences suggest that gender should be taken into account in research evaluating the effects of serotonin gene polymorphisms on central nervous functions or diseases [Williams et al., 2003]. Sexual dimorphisms in neuroanatomy, and neurochemistry, including higher serotonin concentrations in female rats, have been described [Zhang et al.,

1999]. Sumner and Fink [1998] and Zhang et al. [1999] have shown that these differences are in part due to the presence of sexual dimorphism in 5-HTR2A mRNA levels and receptor density. Additionally, these authors have also demonstrated that the transcriptional regulation of 5-HTR2A receptors in the rat brain is sex-steroid dependent. Recently Robichaud and Debonnel [2005] reported an increase in 5-HT neuronal firing activity induced by testosterone and 17 $\beta$ -estradiol in both male and female rats. In the current study, considering these gender differences in the expression of serotonin genes, we investigated the possible role of the SLC6A4 gene (22bp VNTR) and the HTR2A (His452Tyr and -1438A>G) polymorphisms in a Brazilian sample of families with ADHD probands as well as in those families with affected boys only.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Sample**

Families of children with diagnosed ADHD were recruited from the Child and Adolescent Psychiatric Division of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). A consensus diagnosis of ADHD based on DSM-IV criteria was achieved through a three-stage process, described in detail previously [Roman et al., 2001; Rohde et al., 2002].

The sample included 243 families comprising 186 parent proband trios and 57 parent-child duos. Table I presents demographic and diagnostic characteristics of proband subjects. The Ethical 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 lymphocytes by a salting out procedure as already described [Lahiri and Nurnberger, 1991]. The polymorphism at the SLC6A4 promoter was amplified using the polymerase chain reaction (PCR) adapted from Seeger et al. [2001] and Manor et al. [2001]. The HTR2A -1438 A>G and His452Tyr polymorphisms were carried out using the primers and methods described, respectively by Arranz et al [1998] and Ozaki et al. [1996].

### **Statistical Analyses**

Allele frequencies were estimated by counting. Haplotypes and linkage disequilibrium (D) were estimated using the ARLEQUIN software (version 2.000) [Schneider et al., 2000].  $D_{max}$  (D theoretical maximum) and  $D'$  (the relative magnitude of D as compared to its theoretical maximum), calculated as  $(D/D_{max})$  values were calculated as described by Lewontin [1988]. The haplotype relative risk (HRR) statistics [Terwilliger and Ott, 1992] was used for family-based association analysis. Both trios composed of father, mother, and affected child and parent/proband pairs were included in the HRR 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]. The statistical package Transmit [Clayton, 1999] was used for replication of the results observed in HRR as well as to test for evidence of association with haplotypes at the HTR2A (-1438 A>G and His452Tyr polymorphisms) gene. A significance level of 5% was accepted in these comparisons.

## RESULTS

The ADHD patients were predominantly males (82.6%), of 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 (Table I).

Allele frequencies for all markers did not show any significant deviation from those expected according to Hardy-Weinberg equilibrium. The HRR analyses for SLC6A4 and HTR2A -1438A>G polymorphisms are presented in Table II and in Table III, respectively. No evidences for biased transmission of alleles for both HTR2A -1438A>G and SLC6A4 polymorphisms to the ADHD probands were observed. Preferential transmission of the His452 allele ( $P=0.04$ ) was observed in families with affected boys (Table IV).

In this sample, no linkage disequilibrium between the two HTR2A markers was detected ( $P=0.76$ ), indicating that -1438A>G and His452Tyr loci are essentially independent. Therefore, no specific haplotype was preferentially transmitted to affected children (Table V).

## DISCUSSION

In the present study, we conducted HRR analyses on three markers in two serotonergic genes, which have been previously analyzed, for association with ADHD. A significant

over-transmission of the His452 of HTR2A gene to cases was observed in boys ( $P=0.04$ ). No preferential transmission of the SLC6A4 and HTR2A promoter (-1438A>G) polymorphisms was observed in Brazilian ADHD probands and their families.

Four independent case-control studies reported associations between the serotonin transporter gene polymorphisms and ADHD [Seeger et al., 2001; Manor et al., 2001; Kent et al., 2002; Cadoret et al., 2003]. However, three further studies found no evidence for association [Langley et al., 2003; Xu et al., 2005; Kim et al., 2005]. Our results are in line with those that did not find an association between this gene and ADHD. The first studies to report such association were performed with smaller sample sizes ( $n=80-113$  probands) than those that described negative results ( $n=126-284$  probands). In the present study we investigated 231 youths considering the whole sample or 192 probands if only boys were considered. These results taken together suggest that the first positive associations were probably due to chance due to their case-control design and smaller sample sizes.

The serotonin HTR2A receptor gene has been examined in few studies. Zoroglu et al [2003] found no association between the -1438 A>G polymorphism and ADHD in a case – control study of Turkish children. This absence of association was replicated in the Brazilian youths investigated here with a family-based approach.

A second variant in the HTR2A receptor gene, the coding polymorphism His452Tyr was associated with ADHD in one family based study, being the 452Tyr the risk allele [Quist et al., 2000], whereas in a pooled Irish and United Kingdom multi-center study, negative results for this polymorphism were reported. However, it is important to note that the Irish sample alone showed a significant association with the 452His allele [Hawi et al., 2002]. The present investigation concurs with findings from the Irish sample, when analyses were restricted to boys.

Taken together with previous findings, these data suggest that potential interactions between gender and candidate genes could be important in understanding gender differences in various psychiatric disorders. Preliminary evidences for sexual dimorphism of HTR2A in obsessive-compulsive disorder and anorexia nervosa have also been suggested [Norton and Owen, 2005]. If the sexual dimorphism of HTR2A expression were not been considered, the association between this polymorphism at the receptor and ADHD would not have been disclosed in the present study. Although not statistically significant,

the level of association between the serotonin transporter gene polymorphism and ADHD also presented a substantial increase when only boys were considered (Table II).

Sex differences also extend to cognitive functions such as memory, attention and perception. These differences may also be protective in girls, who have much lower rates than boys of childhood developmental and mental disorders like ADHD [Holden, 2005].

Investigations of sex differences in the neurobiology of ADHD are just beginning. Hermens et al. [2005] investigated sex differences in adolescent ADHD using concurrently recorded electroencephalography (EEG) and electrodermal activity (EDA). These investigators concluded that different psychophysiological processes might underlie ADHD in each sex. The profile of theta enhancement in ADHD males is consistent with a developmental deviation model of ADHD, whereas ADHD in females may be better understood within an arousal model, which emphasizes both central and autonomic functions.

In complex traits like ADHD, where the phenotype is dependent of multiple genes interacting both one to each other and with multiple aspects of the environment over time, it is not surprising that factors like gender are associated with different effects of polymorphisms at serotonin-related genes. The present findings also suggest that samples with different proportions of boys and girls might be one source of conflicting results in ADHD association studies.

In conclusion, our results suggest a possible role for gender in the genetic susceptibility of a candidate gene in ADHD. The results of this study should be interpreted cautiously due to both the significance level found and the absence of adjustment for multiple testing. More studies replicating our findings are clearly needed.

## **Acknowledgments**

The authors thank the financial support provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) to LAR and MHH.

## REFERENCES

- Arcia E, Conners CK. 1998. Gender differences in ADHD? *J Dev Behav Pediatr* 19(2):77-83.
- Arranz MJ, Munro J, Owen MJ, Spurlock G, Sham PC, Zhao J, Kirov G, Collier DA, Kerwin RW. 1998. Evidence for association between polymorphism in the promoter and coding regions of the 5-HT<sub>2A</sub> receptor gene and response to clozapine. *Mol Psychiatry* 3:61-66.
- Biederman J, Faraone SV. 2005. Attention-deficit hyperactivity disorder. *Lancet* 366:237-248.
- Cadoret RJ, Langbehn D, Caspers K, Troughton EP, Yucuis R, Sandhu HK, Philibert R. 2003. Associations of the Serotonin Transporter Promoter Polymorphism With Aggressivity, Attention Deficit, and Conduct Disorder in a Adoptee Population. *Comprehensive Psychiatry* 44:88-101.
- Clayton D. 1999. A generalization of the transmission/disequilibrium test for uncertain haplotype transmission. *Am J Hum Genet* 65:1170-1177.
- Curtis D, Sham PC. 1995. A note on the application of the transmission disequilibrium test when a parent is missing. *Am J Hum Genet* 56:811-812.
- Erdmann J, Shimron-Abarbanell D, Rietschel M, Albus M, Maier W, Korner J et al. 1996. Systematic screening for mutations in the human serotonin-2A (5-HT<sub>2A</sub>) receptor gene: identification of two naturally occurring receptor variants and association analysis in schizophrenia. *Hum Genet* 97:614-619.
- 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. 1999. *Science* 283:397-401.
- Halperin JM, Newcorn JH, Schwartz ST, Sharma V, Siever LJ, Koda VH. Age related changes in the association between serotonin function and aggression in boys with ADHD. 1997. *Biol Psychiatry* 41:682-689.
- Hawi Z, Dring M, et al. 2002. Serotonergic system and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): a potential susceptibility locus at the 5-HT<sub>1B</sub> receptor gene in 273 nuclear families from a multi-centre sample. *Molecular Psychiatry* 7:718-725.
- Heils A, Teufel A, Petri S, Stober G, Riederer P, Bengel D, Lesch KP. 1996. Allelic variation of human serotonin transporter gene expression. *J Neurochem* 66:2621-2624.
- Hermens DF, Kohn MR, Clarke SD, Gordon E, Williams LM. 2005. Sex differences in adolescent ADHD: findings from concurrent EEG and EDA. *Clinical Neurophysiology* 116:1455-1463.
- Holden C. 2005. Sex and the Suffering Brain. *Science* 308:1574-1577
- Hsieh CL, Bowcock AM, Farrer LA, Hebert JM, Huang KN, CavalliSforza LL et al. 1990. The serotonin receptor subtype 2 locus HTR<sub>2</sub> 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.
- Kent L, Doerry U, Hardy E, Parmar R, Gingell K, Hawi Z, Kirley A, Lowe N, Fitzgerald M, Gill M e Craddock N. 2002. Evidence that variation at the serotonin transporter gene influences susceptibility to attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): analysis and pooled analysis. *Molecular Psychiatry* 7:908-912.
- Kim SJ, Badner J, Cheon CA, Kim BN, Yoo HJ, Kim SJ, Cook E J, Leventhal BL,



- Kim SY. 2005. Family-based association study of the serotonin transporter gene polymorphisms in Korean ADHD trios. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* Aug 4; [Epub ahead of print]
- 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.
- Langley K, Payton A, Hamshere ML, Pay HM, Lawson DC, Turic D, Ollier W, Worthington J, Owen MJ, O'Donovan MC, Thapar A. 2003. No evidence of association of two 5HT transporter gene polymorphisms and attention deficit hyperactivity disorder. *Psychiatr Genet* 13(2):107-10.
- 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, Benjamin J, Muller CR, Hamer DH, Murphy DL. 1996. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science* 274:1527-1531.
- Lewontin RC. 1988. On measures of gametic disequilibrium. *Genetics* 120:849-852.
- López-Giménez JF, Mengod G, Palacios JM et al. 1997. Selective visualization of rat brain 5-HT<sub>2A</sub> receptors by autoradiography with [<sup>3</sup>H]MDL 100907. *Naunyn-Schmeideberg's Arch. Pharmacol* 356:446-454.
- Lucki I. 1998. The spectrum of behaviors influenced by serotonin. *Biol Psychiatry* 44:151-162.
- Manor I, Eisenberg J, Tyano S, Sever Y, Cohen H, Ebstein RP, et al. 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.
- Norton N, Owen MJ. 2005. HTR2A: Association and expression studies in neuropsychiatry genetics. *Annals of Medicine* 37:121-129.
- O'Neill MF, Heron-Maxwell CL, Shaw G. 1999. 5-HT<sub>2</sub> receptor antagonism reduces hyperactivity induced by amphetamine, cocaine and Mk-801 but not D1 agonist C-APB. *Pharmacol Biochem Behav* 63:237-243.
- Ogilvie AD, Battersby S, Bubb VJ, Fink G, Harmar AJ, Goodwin GM et al. 1996. Polymorphism in serotonin transporter gene associated with susceptibility to major depression. *Lancet* 347:731-733.
- Ozaki N, Manji H, Lubierman V, Lu SJ, Lappalainen J, Rosenthal NE et al. 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. *Neurochem* 68:2186-2193.
- Ozaki N, Rosenthal NE, Pesonen U, Lappalainen J, Feldman-Naim S, Schawartz PJ et al. 1996. Two naturally occurring amino acid substitutions of the 5-HT<sub>2A</sub> receptor: similar prevalence in patients with seasonal affective disorder and controls. *Biol Psychiatry* 40:1267-1272.
- 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.
- Pazos A, Palacios JM. 1985. Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. II. Serotonin-2 receptors. *Brain Res* 346:231-249.
- Pazos A, Probst A, Palacios JM. 1987. Serotonin receptors in the human brain-IV. Autoradiographic mapping of serotonin-2 receptors. *Neuroscience* 21:123-139.

- Quist JF, Barr CL, Schachar R, Roberts W, Malone M, Tannock R, Basile VS, Beitchman J e Kennedy JL. 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 EA, Zimmerman H, Schmitz M, Martins S, Tramontina S. 1999. 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.
- Robichaud M and Debonnel G. 2005. Oestrogen and Testosterone Modulate the Firing Activity of Dorsal Raphe Nucleus Serotonergic Neurones in Both Male and Female Rats. *J Neuroendoc* 17:179-185
- Rohde LA. 2002. ADHD in a developing country: are DSM-IV criteria suitable for culturally different populations? *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 41:1131-1133.
- 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 (Neuropsychiatr Genet)* 105:471-478.
- Ruotsalainen S, Sirvio J, Jakala P, Puumala T, MacDonald E, Riekkinen P Sr. 1997. Differential effects of three 5-HT receptor antagonists on the performance of rats in attentional and working memory tasks. *Eur Neuropsychopharmacol* 7:99-108.
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L. 2000. Arlequin ver.2.000. A software for population genetics data analysis. University of Geneva.
- 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.
- 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.
- Spurlock G, Heils A, Holmans P, Williams J, D'Souza UM, Cardno A et al. 1998. A family based association study of T102C polymorphism in 5HT2A and schizophrenia plus identification of new polymorphisms in the promoter. *Mol Psychiatry* 3:42-49.
- Sumner BEH and Fink G. 1998. Testosterone as well as estrogen increases serotonin<sub>2A</sub> receptor mRNA and binding site densities in the male rat brain. *Molecular Brain Research* 59:205-214.
- Terwilliger J, Ott J. 1992. A haplotype-based "haplotype relative risk" approach to detecting allelic associations. *Hum Hered* 42:337-346.
- Williams RB, Marchuk DA, Gadde KM, Barefoot JC, Grichnik K, Helms M, Kuhn CM, Lewis JG, et al. 2003. Serotonin-Related Gene Polymorphisms and central nervous system serotonin function. *Neuropsychopharmacology* 28:533-541.
- 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* [Epub ahead of print].
- Zhang L, Ma W, Barker JL, Rubinow DR. 1999. Sex differences in expression of serotonin receptors (subtypes 1A and 2A) in rat brain: a possible role of testosterone. *Neuroscience* 94:251-259.
- Zoroglu SS, Erdal ME, Erdal N, Ozen S, Alasehirli B, Sivasli E. 2003. No evidence for association between the T102C and 1438 G/A polymorphisms of the serotonin receptor

gene in attention deficit/hyperactivity disorder in a Turkish population.  
*Neuropsychobiology* 47:17-20.

TABLE I. Demographic and Diagnostic Characteristics of the Sample\*

Age (years)	10.32 (3.13)
Sex (males)	199 (82.6)
Ethnicity (European-Brazilian)	209 (92.1)
DSM-IV ADHD types	
Predominantly hyperactive	15 (6.2)
Predominantly inattentive	54 (22.4)
Combined	158 (65.6)
Patients with no co morbidity	76 (21.5)
Main comorbid conditions <sup>a</sup>	
Oppositional defiant disorder	113 (47.1)
Conduct disorder	37 (15.4)
Anxiety disorder	51 (21.3)
Mood disorder	33 (13.8)
Other comorbidities	48 (20.1)

\*Mean and standard deviations (in parentheses) are reported for continuous variables and percent (in parentheses) are reported for categorical variables.

<sup>a</sup>Multiple comorbid conditions may be presented.

TABLE II. HRR analyses of the promoter polymorphism of the SLC6A4 gene considering all patients and boys only

	All patients <sup>a</sup>			Boys <sup>b</sup>		
	L	S	Total	L	S	Total
Transmitted	237	177	414	205	140	345
Not transmitted	228	186	414	186	159	345
Total	465	363	828	391	299	690
Allele frequency	0.54	0.45				

<sup>a</sup>All patients  $\chi^2=0.40$ ;  $P=0.53$ , 231 patients from 183 trios and 48 parent/child pairs

<sup>b</sup>Boys only  $\chi^2=2.13$ ;  $P=0.14$ , 192 patients from 153 trios and 39 parent/child pairs.

TABLE III. HRR Analyses of the -1438 A>G polymorphism in the HTR2A gene considering all patients and boys only

	All patients <sup>a</sup>			Boys <sup>b</sup>		
	G	A	Total	G	A	Total
Transmitted	229	172	401	186	140	326
Not transmitted	232	169	401	189	137	326
Total	461	341	802	375	277	652
Allele frequency	0.43	0.57				

<sup>a</sup>All patients  $\chi^2=0.05$ ; P=0.83, 220 patients from 181 trios and 39 parent/child pairs.

<sup>b</sup>Boys only  $\chi^2=0.06$ ; P=0.81, 178 patients from 148 trios and 30 parent/child pairs.

TABLE IV. HRR Analyses of the His452Tyr polymorphism in the HTR2A considering all patients and boys only

	All patients <sup>a</sup>			Boys <sup>b</sup>		
	His	Tyr	Total	His	Tyr	Total
Transmitted	380	32	412	313	26	339
Not transmitted	365	47	412	297	42	339
Total	745	79	824	610	68	678
Allele frequency	0.89	0.11				

<sup>a</sup>All patients  $\chi^2=3.150$ ;  $P=0.07$ , 228 patients from 184 trios and 44 parent/child pairs.

<sup>b</sup>Boys only  $\chi^2=4.18$ ;  $P=0.04$ , 187 patients from 152 trios and 35 parent/child pairs.

TABLE V. HTR2A-1438AG/HTR2A Haplotype Analysis

Haplotype	$\chi^2$	P-Value <sup>a</sup>
G/His	0.09 (df=1)	0.75
A/His	0.47 (df=1)	0.50
G/Tyr	3.25 (df=1)	0.06
A/Tyr	0.40 (df=1)	0.54
	3.56 (df=3)	0.32

<sup>a</sup>Simulated p-values based on 10,000 bootstrap samples



## **Capítulo 3**

### **Discussão**

Os aspectos mais específicos referentes aos resultados obtidos nesta dissertação foram discutidos no artigo científico (capítulo 2). No presente capítulo serão discutidos aspectos mais gerais sobre a heterogeneidade da doença. Além disso, serão também discutidas possíveis perspectivas para continuidade desta linha de pesquisa.

### **3.1.Heterogeneidade e gênero**

O TDAH é uma doença com grande heterogeneidade clínica (Todd, 2000; Swanson e cols., 2001). Desde 1960 existem evidências da influência genética no TDAH (Lopez, 1965). Com isso, muitos genes candidatos foram implicados para uma possível suscetibilidade ao transtorno. Atualmente, existem muitos estudos com genes candidatos associando-os ao TDAH (Faraone, 2000). Contudo, os resultados são inconsistentes, por exemplo, como foi mostrado e exemplificado no artigo científico do capítulo 2 dessa dissertação com os genes *SLC6A4* e *HTR2A*. Assim, as investigações realizadas vêm demonstrando que inconsistências nos resultados podem ocorrer por dois motivos principais: heterogeneidade da doença e baixo poder estatístico para detectar genes de pequeno efeito (Faraone e cols., 1999; Faraone e cols., 2005).

O termo endofenótipo refere-se a um fenótipo mais próximo da etiologia biológica da doença clínica geneticamente menos complexo quando comparado à doença (Gottesman e Gould, 2003; Doyle e cols., 2005a,b). Assim, o uso de endofenótipos nas análises poderia ser muito útil para o entendimento da etiologia de doenças complexas, pois são influenciados por menos fatores genéticos e ambientais comparados à doença como um todo. Endofenótipos podem também ajudar a clarear a base patofisiológica da condição em estudo e para identificação de gene ou genes que possam contribuir para o desenvolvimento da doença ou condição em estudo (Doyle e col., 2005a,b).

Muitos pesquisadores vêm propondo critérios para o uso de endofenótipos nos estudos com esquizofrenia e outras doenças psiquiátricas em geral (Leboyer e cols., 1998; Almasy e Blangero, 2001; Skuse, 2001; Gottesman e Gould, 2003). Critérios para o uso de endofenótipos para o TDAH vêm sendo discutidos, ver por exemplo Faraone (2003). Embora, não existe uma definição universal para endofenótipos, há algumas propostas para defini-los. Doyle e cols. (2005a,b) sugeriram quatro critérios: 1)co-ocorrer com a doença; no entanto devido ao caráter heterogêneo das psicopatologias, não há necessidade dessa característica ser observada em todos os pacientes; 2)ser medida por ferramentas com boas

propriedades psicométricas, incluindo confiabilidade; 3) mostrar evidência de herdabilidade; e 4) mostrar uma coincidência genética familiar com a doença em questão, isso é importante, pois sem tal evidência, poderiam ser encontrados genes para a base biológica do fenótipo, mas estes genes podem não estar relacionados com a doença de interesse.

Outra abordagem para reduzir a heterogeneidade da doença proposta por diversos pesquisadores seria a investigação de fenótipos mais refinados. Curran e cols. (2003) sugerem o uso de subtipos da doença definidos por sintomas. Outros refinamentos tais como por co-morbidades psiquiátricas foram sugeridos. Faraone e cols. (1997b; 2001) e Wozniak e cols. (1995) sugeriram a investigação da co-ocorrência entre o Transtorno Bipolar (TB) e o TDAH. Já Faraone (2001) e Faraone e cols. (1991; 1997a) sugeriram o estudo do fenótipo determinado pelo TDAH e co-morbidade com Transtorno de Conduta (TC). Thapar e cols. (2001) através de estudos com gêmeos demonstram que TDAH+TC possui um alto risco familiar e alta herdabilidade. Confirmando este achado, Doyle e Faraone (2002) sugeriram que TDAH+TC e TDAH+TB seriam subtipos herdáveis do transtorno. O uso de medidas de funções neuropsiquiátricas ou de neuroimagens, também poderiam ser usados como fenótipos refinados (ou endofenótipos) como tem sido aplicado na esquizofrenia (Egan e cols., 2001). Este tipo de endofenótipo foi usado, recentemente por Doyle e cols. (2005a,b), Willcutt e cols. (2005) e Nigg e cols. (2005) no TDAH. Estes trabalhos mostraram que estas medidas possuem correlação com o TDAH e possuem evidências de herdabilidade. Porém, é discutido que essas medidas não são fixas e podem variar à medida do tempo e com o tratamento da doença (Doyle e cols., 2005a,b). Em uma revisão sobre esse tema Doyle e cols. (2005b) concluíram que endofenótipos de medidas neuropsicológicas, neuro-imagens e eletrofisiológicas oferecem potencial para futuras pesquisas moleculares e genéticas no TDAH.

A estratificação da amostra por gênero pode ser interessante para identificar novos genes de suscetibilidade, pois talvez possa explicar ou clarear o entendimento da proporção diferencial de meninos afetados com o transtorno em comparação às meninas afetadas em amostras clínicas como em amostras da população em geral.

Contudo, a estratificação por gênero não é muito comentada ou estudada até o momento nos trabalhos realizados com TDAH. O resultado desta dissertação, que é

apresentado no capítulo 2, constitui-se em um dos primeiros estudos apontando um gene com uma associação em uma amostra exclusiva de meninos com TDAH.

Recentemente Simsek e cols. (2005) relataram uma maior prevalência do alelo 10R do gene DAT em meninos em comparação com as meninas. Esses resultados não foram observados nem na amostra como um todo nem nos controles.

Willcutt e Pennington (2000) estudaram uma amostra de pacientes com o transtorno de leitura (TL) e o TDAH, analisando diferenças dos sintomas descritos pelo DSMIII e DSMIV e diferença de gênero. Os resultados mostraram que o TL e TDAH do subtipo hiperativo/impulsivo foi significativamente associado somente na amostra de meninos. Com isso, eles sugerem que esta diferença possa clarear a discrepância da proporção de meninos afetados em comparação a meninas afetadas com o TDAH.

Assim, como evidenciado em muitos estudos discutidos no capítulo 2, existem diferenças neurobiológicas entre meninos e meninas. Isto pode ser conseqüente à expressão diferencial de genes para o desenvolvimento do TDAH em meninos e meninas. Portanto, a estratificação da amostra por gênero pode demonstrar e apontar estes possíveis genes de suscetibilidade nas análises de associação com este tipo de amostra.

### **3.2. Interação gene-ambiente**

A etiologia do TDAH, como a de todas as doenças complexas, não é completamente explicada pelos genes. Fatores ambientais também contribuem para a determinação fenotípica. Entre as características ambientais investigadas, o fumo “*in útero*” e o baixo peso para a idade gestacional são as mais relatadas na literatura (Bhutta e cols., 2002; Schmitz e cols., 2005).

Assim como nenhum gene é necessário nem suficiente para determinar o TDAH, nem todos os indivíduos expostos aos fatores de risco ambiental irão desenvolver a doença. As interações gene-ambiente estão atualmente sendo reconhecidas como um ponto importante para a não replicação entre estudos comumente encontradas na literatura. A inclusão de co-variáveis ambientais poderia aumentar o poder dos testes de associação para identificação de genes associados ao TDAH. Em um único estudo realizado com essa abordagem, o alelo de 10 repetições do VNTR localizado no gene DAT, estava associado com sintomas de hiperatividade/impulsividade somente nos indivíduos expostos ao tabagismo materno durante a gestação (Khan e cols., 2003).

### **3.3. Conclusões e perspectivas**

Conforme já discutido no presente trabalho, na última década na qual os estudos de genética molecular do TDAH foram realizados, verificou-se um número grande de estudos. Replicações de algumas associações com genes candidatos, também foram realizadas. De uma forma geral, os genes selecionados nesses estudos foram baseados em abordagens funcionais. As escolhas de genes candidatos focaram principalmente genes que codificam proteínas em rotas dopaminérgicas e em menor extensão em rotas serotoninérgicas, como a investigação aqui desenvolvida. A escolha desses candidatos funcionais foi baseada principalmente em modelos animais.

Os estudos de ligação e as varreduras genômicas ainda encontram-se em um estágio inicial e claramente mais estudos com essas abordagens deveriam ser feitos para que possamos identificar novos genes por clonagem posicional.

Frente aos estudos já existentes, será importante que a próxima geração de estudos de associação considere a heterogeneidade fenotípica e, se possível, indicadores neurocognitivos para que se possa elucidar a patogênese dessa doença.

**Capítulo 4**  
**Referências**  
**Bibliográficas**

Almasy L, Blangero J (2001) Endophenotypes as quantitative risk factors for psychiatric disease: Rationale and study design. *Am J Med Genet* 105:42-44.

Alsobrook JP e Pauls DL (1998) Molecular approaches to child psychopathology. *Hum Biol* 70:413-432.

American Psychiatric Association (1994) *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV)*. American Psychiatric Association quarta edição, Washington.

Arnsten AF, Li BM (2005) Neurobiology of executive functions: catecholamine influences on prefrontal cortical functions. *Biol Psychiatry*. 57(11):1377-1384.

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.

Barr CL, Wigg KG, Feng Y, Zai G, Malone M, Roberts W, e cols (2000) Attention-deficit hyperactivity disorder and the gene for the dopamine D5 receptor. *Mol Psychiatry* 5:548-551.

Beitchman JH, Davidge KM, Kennedy JL, Atkinson L, Lee V, Shapiro S, Douglas L (2003) The serotonin transporter gene in aggressive children with and without ADHD and nonaggressive matched controls. *Ann N Y Acad Sci*. 1008:248-51.

Benczik EBP e Bromberg MC *Intervenções na Escola* (2003) Em Rohde LA e Mattos P *Princípios e Práticas em transtorno de déficit de atenção e hiperatividade*. Em: Artmed Editora S.A., Porto Alegre, pp 200-218.

Bhutta AT, Cleves MA, Casey PH, Cradock MM, Anand KJ (2002) Cognitive and behavioral outcomes of school-aged children who were born preterm. Meta-analysis. *JAMA* 288:728-737.

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

Burcham BG e Mers ST (1995) Comprehensive assessment of children and youth with ADHD. *Intervention of children and youth with ADHD* pp 220-221.

Cadoret RJ, Langbehn D, Caspers K, Troughton EP, Yucuis R, Sandhu HK, Philibert R (2003) Associations of the serotonin transporter promoter polymorphism with aggressivity, attention deficit, and conduct disorder in an adoptee population. *Comprehensive Psychiatry* 44:88-101.

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

Comings DE, Gade-Andavolu R, Gonzalez N, Blake H, Wu S e MacMurry JP (1999) Additive effect of three noradrenergic genes (ADRA2A, ADRA2C, DBH) on attention-deficit/hyperactivity disorder and learning disabilities in Tourette syndrome subjects. *Clin Genet* 55:160-172.

Comings DE, Gade-Andavolu R, Gonzalez N, Wu S, Muhleman D, Blake H, e cols (2000). Comparison of the role of dopamine, serotonin, and noradrenaline genes in ADHD, ODD and conduct disorder: Multivariate regression analysis of 20 genes. *Clin Genet* 57:178-196.

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

Correia F e Rohde AL (1998) Árvore da decisão terapêutica do uso de psicofármacos no TDAH e co-morbidades em crianças. *Infanto* 6:83-91.



Correia Filho AG e Pastura G As medicações Estimulantes (2003) Em Rohde LA e Mattos P Princípios e práticas em transtorno de déficit de atenção e hiperatividade. Artmed Editora S.A., Porto Alegre, pp 161-173.

Curran S, Rijdsdijk F, Martin N, Marusic K, Asherson P, Taylor E et al (2003) CHIP: Defining a dimension of the vulnerability to attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) using sibling and individual data of children in a community-based sample. *Am J Med Genet* 119B:86-97.

Daly G, Hawi Z, Fitzgerald M e 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.

Doyle AE, Faraone SV (2002) Familial links between attention deficit hyperactivity disorder, conduct disorder, and bipolar disorder. *Curr Psychiatry Rep.* 4:146-52.

Doyle AE, Willcutt EG, Seidman LJ, Biederman J, Chouinard VA, Silva J, Faraone SV (2005a) Attention-deficit/hyperactivity disorder endophenotypes. *Biol Psychiatry* 57:1324-1335.

Doyle AE, Faraone SV, Seidman LJ, Willcutt EG, Nigg JT, Waldman ID, Pennington BF, Peart J, Biederman J (2005b) Are endophenotypes based on measures of executive functions useful for molecular genetic studies of ADHD? *J Child Psychol Psychiatry* 46:774-803.

Dulcan M, Dunne JE, Ayres W, Arnold V, Benson S, Bernet W, Bukstein O, Kinlan J, Leonard H, Licamele W e McClellan J (1997) Practice parameters for the assessment and treatment of children, adolescents and adults with attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 36:85-121.

Egan MF, Goldberg TE, Gscheidle T, Weirich M, Rawlings R, Hyde TM, Bigelow L, Weinberger DR (2001) Relative risk for cognitive impairments in siblings of patients with schizophrenia. *Biol Psychiatry* 50:98-107.

Erdmann J, Abarbanell DS, Rietschel M, Albus M, Maier W, Körner J, Bondy B, Chen K, Shih JC, Knapp M, Propping P, Nöthen (1996) Systematic screening for mutations in the human serotonin-2A (5-HT<sub>2A</sub>) receptor gene: identification of two naturally occurring receptor variants and association analysis in Schizophrenia. *Hum Genet* 97:614-619.

Faraone SV, Biederman J, Keenan K, Tsuang MT (1991) Separation of DSM-III attention deficit disorder and conduct disorder: Evidence from a family-genetic study of American child psychiatric patients. *Psychol Med* 21:109-121.

Faraone S, Biederman J, Garcia JJ, Tsuang M (1997a) Attention deficit disorder and conduct disorder: Longitudinal evidence for a familial sub-type. *Psychol Med* 27:291-300.

Faraone SV, Biederman J, Mennin D, Wozniak J, Spencer T (1997b) Attention-deficit hyperactivity disorder with bipolar disorder: A familial sub-type? *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 36:1378-1387.

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

Faraone SV, Biederman J, Weber W e 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, Tsuang D, Tsuang MT (1999) Genetics and mental disorders: A guide for students, clinicians, and researchers. New York: Guilford Press.

Faraone SV (2000) Genetics of childhood disorders: XX. ADHD, Part 4: Is ADHD genetically heterogeneous? *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry* 39:1455-1457.

Faraone S, Biederman J, Monuteaux MC (2001) Attention deficit hyperactivity disorder with bipolar disorder in girls: Further evidence for a familial subtype? *J Affect Disord* 64:19-26.

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

Faraone SV (2003) Report from the fourth international meeting of the attention deficit hyperactivity disorder molecular genetics network. *Am J Med Genet (Neuropsychiatr Genet)* 121B:55-59.

Faraone SV, Sergeant J, Gillberg C, Biederman J (2003). The worldwide prevalence of ADHD: is it an American condition? *World Psychiatry* 2:104-113.

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.

Fisher SE, Francks C, McCracken JT, et al (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.

Gaspar P, Cases O e Maroteaux L (2003) The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. *Nature Reviews* 4:1002-1011.

Gill M, Daly G, Heron S, Hawi Z e Fitzgerald M (1997) Confirmation of association between attention-deficit/hyperactivity disorder and a dopamine transporter polymorphism. *Mol Psychiatry* 2:311-313.

Goldstein S e Goldstein M (1990) Hiperatividade: como desenvolver a capacidade de atenção da criança. Editora Papirus, São Paulo, 245 pp.

Gottesman II, Gould TD (2003) The endophenotype concept in psychiatry: Etymology and strategic intentions. *American Journal of Psychiatry* 160:636-645.

Hawi Z, Dring M, Kirley A, Foley D, Kent L, Craddock N, Asherson P, Curran S, Gould A, Richards S, Lawson D, Pay H, Turic D, Langley K, Owen M, O'Donovan M, Thapar A, Fitzgerald M e Gill M (2002) Serotonergic system and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): a potential susceptibility locus at the 5-HT<sub>1B</sub> 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.

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

Hyman SE e Nestler EJ (1993) *The Molecular Foundations of Psychiatry*. American Psychiatric Press, Inc, Washington, 239pp.

Kent L, Doerry U, Hardy E, Parmar R, Gingell K, Hawi Z, Kirley A, Lowe N, Fitzgerald M, Gill M e Craddock N (2002) Evidence that variation at the serotonin transporter gene influences susceptibility to attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): analysis and pooled analysis. *Molecular Psychiatry* 7:908-912.

Khan RS, Khoury J, Nichols WC, Lanphear BP (2003) Role of dopamine transporter genotype and maternal prenatal smoking in childhood hyperactive-impulsive, inattentive and oppositional behaviors. *J. Pediat.* 143:104-110.

Kim SJ, Badner J, Cheon CA, Kim BN, Yoo HJ, Kim SJ, Cook E J, Leventhal BL, Kim SY (2005) Family-based association study of the serotonin transporter gene polymorphisms in Korean ADHD trios. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* Aug 4; [Epub ahead of print]

Kustanovich V, Ishii J, Crawford L, Yang M, McGough JJ, McCracken JT, et al (2003) Transmission disequilibrium testing of dopamine-related candidate gene polymorphisms in ADHD: Confirmation of association of ADHD with DRD4 and DRD5. *Mol Psychiatry* 9:711-717.

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

Lakatos K, Nemoda Z, Birkas E, Ronai Z, Kovacs E, Ney K, Toth I, Sasvari-Szekely M, Gervai J (2003) Association of D4 dopamine receptor gene and serotonin transporter promoter polymorphisms with infants' response to novelty. *Mol Psychiatry* 8:90-97.

Langley K, Payton A, Hamshere ML, Pay HM, Lawson DC, Turic D, Ollier W, Worthington J, Owen MJ, O'Donovan MC, Thapar A (2003) No evidence of association of two 5HT transporter gene polymorphisms and attention deficit hyperactivity disorder. *Psychiatr Genet* 13:107-10.

Leboyer M, Bellivier F, Nosten-Bertrand M, Jouvent R, Pauls D, Mallet J (1998) Psychiatric genetics: Search for phenotypes. *Trends of Neuroscience* 21:102-105.

Lesch KP, Bengel D, Heils A, Sabol SZ, Greenberg BD, Petri S, Benjamin J, Muller CR, Levitan RD, Masellis M, Basile VS, Lam RW, Jain U, Kaplan AS, Kennedy SH, Siegel G, Walker ML, Vaccarino FJ e Kennedy JL (2002) Polymorphism of the serotonin-2A receptor gene (HTR2A) associated with childhood attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) in adult women with seasonal affective disorder. *J Affect Dis* 71:229-233.

Lopez RE (1965) Hyperactivity in twins. *Canadian Psychiatric Association Journal* 10:421-426.

Manor I, Eisenberg J, Tyano S, Sever Y, Cohen H, Ebstein RP, et al (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.

Martinez-Barrondo S, Saiz PA, Morales B, Garcia-Portilla MP, Coto E, Alvarez V, Bobes J (2005) Serotonin gene polymorphisms in patients with panic disorder. *Actas Esp Psiquiatr* 33(4):210-5.

Mick E, Biederman J, Faraone SV, Sayer J, Kleinman SE (2002) 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.

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

Nigg JT, Willcutt EG, Doyle AE, Sonuga-Barke E (2005) Causal heterogeneity in attention-deficit/hyperactivity disorder: Do we need neuropsychological subtypes? *Biol Psychiatry* 57:1224-1230.

Ozaki N, Manji H, Lubierman V, Lu SJ, Lappalainen J, Rosenthal NE, et al Goldman D (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.

Park L, Nigg JT, Waldman ID, Nummy KA, Huang PC, Rappley M, Friderici KH (2005) Association and linkage of alpha-2A adrenergic receptor gene polymorphisms childhood ADHD. *Mol Psychiatry* 10(6):572-80

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.

Payton A, Holmes J, Barrett JH, Hever T, Fitzpatrick H, Trumper AL, e cols (2001) Examining for association between candidate gene polymorphisms in the dopamine pathway and attention-deficit hyperactivity disorder: A family-based study. *Am J Med Genet* 105:464-470.

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 (2000) Evidence for the serotonin HTR2A receptor gene as a susceptibility factor in attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Mol Psychiatry* 5:537-541.

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.

Retz W, Thome J, Blocher D, Baader M, Rosler M (2002) Association of attention deficit hyperactivity disorder-related psychopathology and personality traits with the serotonin transporter promoter region polymorphism. *Neurosci Lett.* 319:133-136.

Rief S (2001) Conferência internacional sobre o transtorno de déficit de atenção/hiperatividade. Estratégias de intervenção na escola, São Paulo.

Robertson E, Jones I, Middle F, Moray J, Craddock N (2003) No association between two polymorphisms at the 5HT2A gene and bipolar affective puerperal psychosis. *Acta Psychiatr Scand* 108:387-391.

Roman T, Schmitz M, Polanczyk G, Eizirik M, Rohde LA e 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 (Neuropsychiatr Genet)* 105:471-478.

Roman T, Schmitz M, Polanczyk GV, Eizirik M, Rohde LA e 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, Rohde LA e Hutz MH (2002b) Genes de suscetibilidade no transtorno de déficit de atenção e hiperatividade. *Rev Bras Psiquiatr* 4:196-201.

Roman T, Schmitz M, Polanczyk GV, Eizirik M, Rohde LA, Hutz MH (2003) Is the alpha-2A adrenergic receptor gene (ADRA2A) associated with attention-deficit/hyperactivity disorder? *Am J Med Genet* 120B:116-120.

Roman T, Polanczyk GV, Zeni C, GenroJP, Rohde LA, Hutz MH (2005) Further evidence of the involvement of alpha-2A-adrenergic receptor gene (ADRA2A) in inattentive dimensional scores of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Molecular Psychiatry* 0:1-2.

Rowe DC, Stever C, Chase D, Sherman S, Abramovitz A e Waldman ID (2001) Two dopamine genes related to reports of childhood retrospective inattention and conduct disorder symptoms. *Mol Psychiatry* 6:429-433.

Schmitz M, Denardin D, Silva TL, Pianca T, Faraone S, Hutz MH, Rohde LA (2005) Smoking during pregnancy and attention-deficit/hyperactivity disorder-predominantly inattentive type. A case-control study. (Manuscrito submetido).

Seeger G, Schloss P e Schmidt MH (2001a) Marker gene polymorphisms in hyperkinetic disorder-predictors of clinical response to treatment with methylphenidate? *Neurosc Letters* 313:45-48.



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

Simsek M, Al-Sharbaty M, Al-Adawi S, Ganguly S, Lawatia K (2005) Association of the risk allele of dopamine transporter gene (DAT\*10) in Omani male children with attention-deficit hyperactivity disorder. *Clinical Biochemistry* 38:739-742.

Skuse DH (2001) Endophenotypes and child psychiatry. *British Journal of Psychiatry* 178:395-396.

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

Souza I, Pinheiro M.A.S. Co-morbidades (2003) Em Rohde LA e Mattos P *Princípios e Práticas em transtorno de déficit de atenção e hiperatividade*. Em: Artmed Editora S.A., Porto Alegre, pp 200-218.

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.

Swanson JM, Sergeant JA, Taylor E, Sonuga-Barke EJS, Jensen PS e Cantwell DP (1998a) Attention-deficit hyperactivity disorder and hyperkinetic disorder. *Lancet* 351:429-433.

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, Flodman P, Kennedy J, Spence MA, Moyzis R, Schuck S e col (2000) Dopamine genes and ADHD. *Neurosci Biobehav* 24:21-25.

Swanson J, Deutsch C, Cantwell D, Posner M, Kennedy JL, Barr CL, Moyzis R, Schuck S, Flodman P, Spence MA, Wasdell (2001) Genes and attention-deficit hyperactivity disorder. *Clinical Neuroscience Research* 1:207-216.

Tahir E, Yazgan Y, Cirakoglu B, Ozbay F, Waldman I, Asherson PJ (2000). Association and linkage of DRD4 and DRD5 with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) in a sample of Turkish children. *Mol Psychiatry* 5:396-404.

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

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, Holmes J, Payton A, Barrett J, Harrington R, McGuffin P, Owen M, Ollier W, Gill M, Kirley A, Hawi Z, Fitzgerald M, Asherson P, Curran S, Mill J, Gould A, Taylor E, Kent L, Craddock N, Worthington J (2001) Evidence of association between DRD4 and ADHD with conduct disturbance. *Behavior Genetics* 31:470-471.

Tochigi M, Umekage T, Kato C, Marui T, Otowa T, Hibino H, Otani T, Kohda K, Kato N, Sasaki T (2005) Serotonin 2A receptor gene polymorphism and personality traits: no evidence for significant association. *Psychiatr Genet* 15(1):67-9.

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

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.C.; Stever, C. (1998) Association and linkage of the dopamine transporter gene (DAT1) and attention-deficit/hyperactivity disorder in children. *Am J Hum Genet* 63: 1767-1776.

Wender, P.H.; Wolf, L.E.; Wassertein, J. (2001) Adults with ADHD. Na overview. *Ann N Y Acad Sci* 931: 1-16.

Willcutt EG, Doyle AE, Nigg JT, Faraone SV, Pennington BF (2005) Validity of the Executive Function Theory of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: A Meta-Analytic Review. *Biol Psychiatry* 57:1336-1346.

Willcutt EG, Pennington BF (2000) Comorbidity of reading disability and attention-deficit/hyperactivity disorder: differences by gender and subtype. *J Learn Disabil* 33:179-9.

Wozniak J, Biederman J, Mundy E, Mennin D, Faraone SV (1995) A pilot family study of childhood-onset mania. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 34:1577-1583.

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* [Epub ahead of print].

Zoroglu SS, Erdal ME, Alasehirli B, Erdal N, Silvasli E, Tutkun H, Savas HA, Herken H (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 1438G/A Polymorphisms of the Serotonin 2A Receptor Gene in Attention Deficit/Hyperactivity Disorder in a Turkish Population. *Biol Psychiatry* 47:17-20.

**Capítulo 5**  
**Anexo**

## ANEXO I

### 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: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_