

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Biociências

ANÁLISE DO GENE *5-HTT* E INVESTIGAÇÃO DA POSSIBILIDADE DE INTERAÇÃO COM O GENE *DRD4* NA ETIOLOGIA DO TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO/HIPERATIVIDADE

Tiago de Bone Koppe

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Tatiana Roman

Porto Alegre, abril de 2012.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética Humana Molecular do Departamento de Genética do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, subvencionado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Este trabalho é inteiramente dedicado à memória dos meus pais, Raimundo da Silva Koppe e Eloisa de Bone Koppe.

“A luta contra o erro tipográfico tem algo de homérico. Durante a revisão os erros se escondem. Fazem-se positivamente invisíveis. Mas, assim que o livro sai, tornam-se visibilíssimos. Verdadeiros sacis a nos botar a língua em todas as páginas. Trata-se de um mistério que a ciência ainda não conseguiu decifrar.”

(Monteiro Lobato)

Agradecimentos

Agradecimentos são devidos a muitos. Difícil de se mencionar em poucas linhas todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para que esse texto tomasse forma e chegasse a cabo. Verdadeiramente, cumprimento e agradeço todo o corpo discente e docente do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular desta Universidade que, por meio de gestos, palavras e atitudes, sempre me influenciaram positivamente. Deixo um grande abraço ao Lucas Azeredo pela cumplicidade de longa data. Da mesma forma, abraço minhas colegas da sala - Gláucia, Gabriela, Angélica, Andressa – e agradeço pela ajuda sempre em boa hora. Agradeço à minha orientadora, Tatiana Roman, pela oportunidade de poder trabalhar com ela e pelo companheirismo sempre pronto. Não podia me esquecer de abraçar o nosso Elmo Cardoso, que, sem dúvida, é uma pessoa ímpar. De maneira singela, deixo todo o meu carinho registrado aqui a todos os meus familiares que vêm junto a mim nesses anos todos me dando suporte e amor: minha tia e madrinha Valkiria Koppe, meu irmão Teodoro Koppe e a minha namorada Taiane Feiten são, indiscutivelmente, parte de mim e a eles devo muito. **Agradeço por Tudo, finalmente, aos meus queridos pais.**

Sumário

Resumo	7
Abstract.....	9
Capítulo I - Introdução	11
1. Caracterização Clínica do TDAH.....	12
2. Caracterização Etiológica do TDAH.....	15
3. Caracterização Neurobiológica do TDAH	18
3.1. Sistema Dopaminérgico.....	21
3.1.1. Gene <i>DRD4</i>	23
3.2. Sistema Serotoninérgico	27
3.2.1. Gene <i>5-HTT</i>	29
3.3. Interação entre Sistemas Dopaminérgico e Serotoninérgico	32
Capítulo II - Justificativa e Objetivos.....	36
Capítulo III - Manuscrito em preparação	39
Capítulo IV - Discussão.....	73
Referências Bibliográficas.....	79

Resumo

O Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade (TDAH), com prevalência estimada em 5,29%, é um dos transtornos psiquiátricos mais comuns da infância e da adolescência e caracteriza-se clinicamente por um quadro persistente de desatenção e/ou hiperatividade/impulsividade mais severo do que o esperado para indivíduos com nível comparável de desenvolvimento. O TDAH é um fenótipo bastante complexo e de herança multifatorial, porém com alta herdabilidade (~76%), fato que impulsiona a busca por genes de susceptibilidade. Estudos de associação, apoiados em hipóteses biológicas *a priori*, vêm focando especialmente em genes do sistema dopaminérgico. Dentre esses, o gene do receptor D4 de dopamina (*DRD4*) é objeto de intensa investigação, sendo sugerido como um *locus* de suscetibilidade ao TDAH. Embora existam resultados conflitantes, o alelo de 7 repetições gerado por um VNTR de 48pb localizado no exon 3 parece ser o principal alelo de risco. Evidências neurobiológicas também sugerem o envolvimento do sistema serotoninérgico. O principal *locus* investigado é o gene do transportador de serotonina (*5-HTT*), através do marcador 5-HTTLPR, um indel de 44pb na região promotora que possui efeito funcional. Tanto resultados positivos quanto negativos já foram verificados em estudos de associação com o TDAH, tendo sido sugerido o alelo longo (L) como de risco. Entretanto, estes estudos não têm explorado um SNP presente na inserção de 44pb (A>G, rs25531), descrito mais recentemente e que influencia fortemente a eficácia transcricional do gene, sendo sugerida a sua inclusão em estudos futuros e para corroborar achados prévios. A natureza complexa do fenótipo TDAH impõe ainda a necessidade do emprego de análises que contemplem modelos etiológicos mais elaborados e adequados para a busca por genes de susceptibilidade, tais como as análises de interação gene-gene. O presente trabalho objetivou, então, testar duas hipóteses: 1) a participação do gene *5-HTT* na etiologia do TDAH, por meio da análise do sistema trialélico (5-HTTLPR/ rs25531) e 2) a possibilidade de interação entre os genes *5-HTT* (5-HTTLPR/ rs25531) e *DRD4* (VNTR de 48pb) na expressão desse fenótipo. A amostra utilizada foi obtida junto ao Programa do Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (ProDAH/HCPA) e em escolas públicas de Porto Alegre, consistindo de 478 crianças e/ou adolescentes com TDAH, diagnosticados de acordo com os critérios do DSM-IV, seus pais biológicos e 100 indivíduos controles. Os polimorfismos do gene *5-HTT* foram genotipados por PCR convencional e detecção em gel, sendo necessária também incubação com a endonuclease *MspI* para a discriminação do rs25531. O polimorfismo do gene *DRD4* foi genotipado em estudos prévios realizados pelo nosso grupo. A hipótese de associação com o *5-HTT* foi testada por um método baseado em famílias (FBAT) e a hipótese de interação entre os *loci* foi testada através de: 1) teste qui-quadrado de Pearson; 2) regressão logística binária e 3) ANOVA de uma via. Para as análises de interação, os pacientes foram agrupados como portadores e não portadores do alelo 7R para o gene *DRD4* e de acordo com a suposta eficácia dos alelos para o *5-HTT* (baixa = SS, SL_G e L_GL_G; média = SL_A e L_AL_G; alta = L_AL_A). O estudo de associação não mostrou nenhum resultado positivo, tanto para a amostra total do ProDAH quanto em subgrupos de pacientes definidos por critérios clínicos ($0,152 \leq P \leq 0,902$). Similarmente, nenhuma das abordagens que testaram interação gene-gene teve resultados com significância estatística ($0,073 \leq P \leq 0,852$). Em relação ao *5-HTT*, ao replicarmos na forma trialélica um resultado prévio obtido em nossa amostra com a forma bialélica, acreditamos que não tenha efeito em nossa população, embora heterogeneidade genética/alélica pode explicar a divergência em comparação à literatura. Uma caracterização “população-específica” do *locus 5-HTT*, aliada a estudos de funcionalidade com diferentes polimorfismos, parece ser fundamental para apontar a real significância do sistema 5-HTTLPR/rs25531 na função deste gene, e, conseqüentemente, no TDAH, nas diferentes amostras estudadas. Em relação às abordagens de interação gene-gene,

os resultados negativos não devem ser encarados como definitivos, uma vez que há ainda muitas limitações e divergências nas metodologias utilizadas atualmente. Diferentes modelos de interação, juntamente com a investigação de *clusters* gênicos, podem ajudar a compreender de forma mais exata a participação de diferentes genes na etiologia do TDAH, incluindo os genes *5-HTT* e *DRD4*. Acreditamos ainda que a natureza pioneira do presente estudo possa estimular investigações futuras sobre os aspectos aqui discutidos.

Palavras-chave: TDAH, *DRD4*, *5-HTT*, rs25531, associação, interação gene-gene.

Abstract

Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD) is one of the most common psychiatric disorders of childhood and adolescence, with an estimated prevalence of 5.29%. It is a complex phenotype and, clinically, is characterized by a persistent pattern of inattention and/or hyperactivity-impulsivity that is more severe than usually expected in individuals at a comparable developmental level. Although of multifactorial inheritance, the high heritability (~76%) of ADHD has been driving the search for susceptibility genes. Association studies, supported by *a priori* biological hypotheses have focused on dopaminergic genes. Among these, the most studied has been the dopamine D4 receptor gene (*DRD4*), suggested as a susceptibility locus in ADHD. Even with conflicting results, the 7 repeat allele created by a 48bp VNTR located at exon 3 seems to be the risk allele. Neurobiological evidences also indicate the involvement of serotonergic system. The serotonin transporter gene (*5-HTT*) has been the most investigated locus, through the 5-HTTLPR polymorphism, a 44bp indel at promoter region that shows functional effects. Both positive and negative results were verified in association studies, being the long (L) allele the putative risk one. However, these studies do not usually explore a SNP located into the 44bp insertion (A>G, rs25531), recently described and which strongly influences the gene's transcriptional efficacy; its inclusion in future studies and for corroborating previous findings has been suggested. The complex nature of ADHD phenotype still requires the use of analyses considering more elaborated causal models, fitted to the search of susceptibility genes; in this regard, gene-gene interaction analyses would be a valid strategy. The aim of this study was therefore to test two hypotheses: 1) the involvement of *5-HTT* gene in ADHD etiology, through the analysis of triallelic system (5-HTTLPR/ rs25531) and 2) the possibility of gene-gene interaction between *5-HTT* and *DRD4* (48bp VNTR) in the manifestation of this phenotype. The sample analyzed was obtained from Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder Outpatient Program hosted in Hospital de Clínicas de Porto Alegre (ProDAH/HCPA) and from public schools from Porto Alegre, consisting of 478 children and/or adolescents with ADHD diagnosed according DSM-IV criteria, their biological parents and 100 control individuals. *5-HTT* polymorphisms were genotyped by conventional PCR and gel electrophoresis, being the incubation with the endonuclease *MspI* needed to discriminate rs25531 alleles. *DRD4* polymorphism has already been genotyped in previous studies from our group. The association hypothesis with *5-HTT* was tested by a family-based method (FBAT), while the interaction hypothesis was tested by: 1) Pearson's chi-square test 2) binary logistic regression and 3) One-Way ANOVA. For this last purpose, patients were grouped according to the presence of 7R allele at *DRD4* (7R-carriers vs. 7R-noncarriers) and according to putative transcriptional efficiency of different alleles at *5-HTT* (low = SS, SL_G e L_GL_G; mid = SL_A and L_AL_G; high = L_AL_A). The association study did not show any positive result, either considering total ProDAH sample or considering subgroups of patients defined by clinical criteria ($0.152 \leq P \leq 0.902$). None of gene-gene interaction tests used was able to detect any result with statistical significance likewise ($0.073 \leq P \leq 0.852$). Regarding *5-HTT* locus, the replication of previous biallelic results in our sample even using the triallelic system indicates that this gene does not influence ADHD in our population, although some genetic/allelic heterogeneity might explain the discordance with the literature. A population-based characterization of *5-HTT* locus, along with functional studies of different polymorphisms seems to be crucial to reveal the real impact of 5-HTTLPR/rs25531 variants on gene's function, and thus on ADHD, in the several investigated samples. Regarding gene-gene interaction tests, the negative results should not be understood as a definitive statement, since there are a lot of limitations and divergences in methods currently used in these analyses. Different interaction models and the analyses of gene clusters may help to elucidate the exact contribution of each gene in ADHD etiology,

including *5-HTT* e *DRD4* locus. We also believe the pioneering nature of this study may work as a stimulus for further investigations on the issues presented herein.

Keywords: ADHD, *DRD4*, *5-HTT*, rs25531, association, gene-gene interaction.

1. Caracterização Clínica do TDAH

O quadro sintomático do Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade (TDAH) tem sido caracterizado como síndrome há mais de um século (Adler *et al.*, 2005). Mesmo sem se denominar explicitamente a doença, muitas referências a pessoas que hoje seriam consideradas portadoras do TDAH podem ser encontradas em textos médicos e literários (Louzã Neto, 2010). O trabalho de George F. Still em 1902, que utilizou os termos “Hiperatividade” e “Desordem Hiperkinética da Infância”, pode ser considerado o primeiro com uma descrição médica detalhada da doença (Louzã Neto, 2010; Still, 1902). Desde essa publicação até os dias de hoje, a caracterização e a nomenclatura têm experimentado modificações. Atualmente, a terminologia utilizada está contida nos textos da Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados com a Saúde - 10ª Revisão, Versão 2007 (CID-10; World Health Organization [WHO], 2007) e do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais - 4ª Edição, Texto Revisado (DSM-IV-TR; American Psychiatric Association [APA], 2002), sendo que aquele adota o termo “Desordem Hiperkinética” e este adota a terminologia “Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade”. Apesar das diferenças na nomenclatura e no modo de se estabelecer o diagnóstico, ambos apresentam uma lista muito similar de sintomas para caracterizar a doença (Polanczyk *et al.*, 2007), sendo os critérios da Organização Mundial da Saúde (WHO) aplicados principalmente na Europa e os da Associação Americana de Psiquiatria (APA) utilizados nos demais continentes (Biederman & Faraone, 2005).

A principal característica do TDAH é a presença de um quadro persistente de falta de concentração, desatenção, agitação motora e impulsividade, mais frequente e severo do que o observado e esperado em indivíduos com nível de desenvolvimento comparável (Wallis *et al.*, 2008), o que acarreta em prejuízos na performance ocupacional e acadêmica dos afetados (Sohn *et al.*, 2010). De acordo com o DSM-IV-TR (APA, 2002), a tríade sintomatológica clássica do TDAH é subdividida nas áreas de desatenção e hiperatividade-impulsividade. Partindo dessa classificação, são reconhecidos três tipos clínicos do transtorno, conforme a presença de um mínimo de seis sintomas em uma ou ambas as áreas: predominantemente desatento, predominantemente hiperativo-impulsivo e combinado. A Tabela 1 descreve os critérios diagnósticos para o TDAH segundo as recomendações da APA. Não existe, atualmente, um teste laboratorial específico para o TDAH tampouco há testes de imagem e neuropsicológicos destinados ao diagnóstico do transtorno; a única maneira de se diagnosticar

o TDAH é apoiar-se nos critérios clínicos, à semelhança do que ocorre com os outros transtornos psiquiátricos (Fernandez-Mayoralas *et al.*, 2010; Kieling & Rohde, 2012).

Tabela 1. Critérios diagnósticos do TDAH segundo o DSM-IV-TR

1. Ou (1) ou (2)

• Seis (ou mais) dos seguintes sintomas de desatenção persistiram pelo menos seis meses, em grau mal-adaptativo e inconsistente com o nível de desenvolvimento:

Desatenção:

- Frequentemente deixa de prestar atenção a detalhes ou comete erros por descuido em atividades escolares, de trabalho ou outras
 - Com frequência tem dificuldades para manter a atenção em tarefas ou atividades lúdicas
 - Com frequência parece não escutar quando lhe dirigem a palavra
 - Com frequência não segue instruções e não termina seus deveres escolares, tarefas domésticas ou deveres profissionais (não devido a comportamento de oposição ou incapacidade de compreender instruções)
 - Com frequência tem dificuldade para organizar tarefas e atividades
 - Com frequência, antipatiza ou reluta envolver-se em tarefas que exijam esforço mental constante (como tarefas escolares ou deveres de casa)
 - Com frequência perde coisas necessárias para tarefas ou atividades (por exemplo, brinquedos, tarefas escolares, lápis, livros ou outros materiais)
 - É facilmente distraído por estímulos alheios às tarefas
 - Com frequência apresenta esquecimento em atividades diárias
- Seis (ou mais) dos seguintes sintomas de hiperatividade persistiram por pelo menos seis meses, em grau mal-adaptativo e inconsistente com o nível de desenvolvimento:

Hiperatividade:

- Frequentemente agita a mãos ou os pés ou se remexe na cadeira
- Frequentemente abandona sua cadeira em sala de aula ou outras situações nas quais se espera que permaneça sentado
- Frequentemente corre ou escala em demasia, em situações nos quais isso é inapropriado (em adolescentes e adultos, pode estar limitado a sensações subjetivas de inquietação)
- Com frequência tem dificuldade para brincar ou se envolver silenciosamente em atividades de lazer
- Está frequentemente "a mil" ou muitas vezes age como se estivesse "a todo vapor"
- Frequentemente fala em demasia

Impulsividade:

- Frequentemente dá respostas precipitadas antes de as perguntas terem sido completadas
- Com frequência tem dificuldade para aguardar sua vez
- Frequentemente interrompe ou se mete em assuntos de outros (por exemplo, intrometem-se em conversas ou brincadeiras)

2. Alguns sintomas de hiperatividade/impulsividade ou desatenção que causaram prejuízo estavam presentes antes dos sete anos de idade.

3. Algum prejuízo causado pelos sintomas está presente em dois ou mais contextos (por exemplo, na escola (ou trabalho) e em casa)

4. Deve haver claras evidências de prejuízo clinicamente significativo no funcionamento social, acadêmico ou ocupacional.

5. Os sintomas não ocorrem exclusivamente durante o curso de um transtorno invasivo do desenvolvimento, esquizofrenia ou outro transtorno psicótico e não são melhores explicados por outro transtorno mental (por exemplo, transtorno de humor, transtorno de ansiedade, transtorno dissociativo ou um transtorno de personalidade).

Uma revisão sistemática da literatura, conduzida por Polanczyk *et al.* em 2007, avaliou 102 estudos epidemiológicos provenientes de todos os continentes sobre prevalência acumulada do TDAH, mostrando uma ocorrência de 5,29% (IC95% = 5,01 – 5,56) em diferentes países. Além disso, o TDAH, em amostras clínicas, mostra-se mais prevalente em

meninos do que em meninas (Kielling & Rohde, 2012). A observação dos casos nos mostra que o curso clínico do TDAH é bastante variável. Por exemplo, os sintomas de hiperatividade e impulsividade tendem a diminuir mais precocemente, enquanto que os de desatenção, desorganização e distração são os mais persistentes (Biederman *et al.*, 2010). Outro ponto refere-se à questão da continuidade dos sintomas ao longo da vida. Até a metade da década de 1970 pensava-se que o TDAH fosse uma doença exclusivamente da infância, porém, a essa época, as formas adultas da doença foram sendo observadas (Adler *et al.*, 2005). De fato, 50-75% dos casos de TDAH prosseguem até a idade adulta (McGough & Barkley, 2004; Biederman, 2007; Lara *et al.*, 2009; Biederman *et al.*, 2010). Geralmente, a persistência dos sintomas está associada a uma série de disfunções significativas na vida do indivíduo, como dificuldades emocionais, de relacionamento e de ajustamento social, falhas acadêmicas e ocupacionais, além de um risco maior para outros problemas de comportamento (Wilens & Dodson, 2004; De Graaf *et al.*, 2008).

Apesar da sintomatologia clássica, o TDAH se caracteriza por ser uma patologia bastante heterogênea clinicamente. Uma proporção significativa de crianças e adolescentes com TDAH apresentam comorbidades psiquiátricas associadas, como transtorno de oposição desafio ou de conduta (em 50% dos casos de TDAH), transtornos de ansiedade (25% dos casos), de humor (15-30% dos casos) e de aprendizado (20-30% dos casos) (Jensen *et al.*, 2001; Acosta *et al.*, 2004). Também é frequente a ocorrência de comportamentos delinquentes em adolescentes com TDAH (Acosta *et al.*, 2004; Cormier, 2008). Entre estes, o tabagismo atinge uma prevalência em torno de 30% em ambos os sexos (Galera *et al.*, 2005; McClernon & Kollins, 2008), estando geralmente associado ao uso de drogas ilícitas (Wilens & Dodson, 2004). Este quadro também é visto nos adultos com TDAH, nos quais, além de problemas por abuso ou dependência de substâncias psicoativas, é comum a personalidade antissocial (Acosta *et al.*, 2004; Newcorn, 2008; Stein, 2008). A presença de comorbidades parece influenciar na continuidade dos sintomas, além de contribuir para o desenvolvimento de psicopatologias graves em idades posteriores, piorando o prognóstico do paciente (Wilens & Dodson, 2004; Newcorn, 2008). Nesse sentido, o TDAH parece servir como uma “condição-ponte” para outros sérios problemas psiquiátricos incluindo transtorno de conduta, depressão, transtornos de personalidade e abuso de substâncias psicoativas (Newcorn, 2008; Stein, 2008).

2. Caracterização Etiológica do TDAH

Não existe certeza quanto às causas precisas do TDAH. Todavia, sabe-se que é um transtorno neurocomportamental heterogêneo com múltiplas etiologias possíveis. Sob essa perspectiva, entende-se o TDAH como uma doença multifatorial causada pela confluência de muitos fatores de risco, tanto genéticos como ambientais, cada um tendo um pequeno efeito em aumentar a vulnerabilidade ao transtorno (Spencer, 2008; Curatolo *et al.*, 2009). Presumivelmente, os sintomas do TDAH são o reflexo provável da interação desses fatores entre si, que gradualmente vão moldando a circuitaria neuronal do controle do comportamento e da cognição (Luman *et al.*, 2010; Sohn *et al.*, 2010).

Quanto aos fatores ambientais, muitos estudos já foram desenvolvidos para que se verificasse a participação de diversos componentes. O tabagismo materno durante a gestação é um dos fatores com maior número de evidências sugerindo associação. No geral, eles sugerem que o consumo de tabaco pela mãe aumentaria em média duas vezes a chance de a criança ter TDAH (Banerjee *et al.*, 2007). Embora a relação exata desse fator com a doença ainda não esteja completamente esclarecida, Thapar *et al.* (2009) sugeriram que a associação é independente de mãe e filho serem geneticamente aparentados, mas aumenta em magnitude quando há parentesco. Além dessa, outras condições pré- e peri-natais também parecem estar envolvidas, como o consumo de álcool materno; o baixo peso ao nascer; as carências alimentares maternas e injúrias pré- e peri-natais diversas, como eclampsia. Outros fatores ambientais provavelmente envolvidos incluem os de ordem psicossocial, como o baixo nível socioeconômico; os desentendimentos familiares; as atitudes parentais hostis e a presença de transtornos mentais na mãe, como a depressão (Banerjee *et al.* 2007; Spencer, 2008; Purper-Ouakil *et al.*, 2010). A participação de agentes químicos presentes no ambiente – tais como Policlorobifenilos (PCBs) e chumbo – também tem sido sugerida como possível causadora de déficit em funções neurocomportamentais envolvidas no TDAH. Entretanto, os resultados são ainda controversos (Eubig *et al.*, 2010).

Apesar das evidências sugeridas por esses estudos, a contribuição ambiental na variância fenotípica provavelmente não excede 40% na maioria dos casos (Waldman & Gizer, 2006; Thapar *et al.*, 2007; Wallis *et al.*, 2008). Por outro lado, a alta recorrência familiar fez do TDAH um alvo atrativo para estudos genéticos (Cardo *et al.*, 2010). Estudos de famílias

mostraram que os parentes de pacientes com esse transtorno têm um risco aumentado de 2-8 vezes para desenvolver o quadro sintomático quando comparados com famílias sem casos de TDAH (Thapar *et al.*, 2007; Mick & Faraone, 2008; Cardo *et al.*, 2010). Estudos de adoção também têm contribuído para o esclarecimento da etiologia do TDAH, reforçando a influência genética. Quatro estudos de adoção sobre a doença são amplamente citados na literatura internacional (i.e. Morrison & Stewart, 1973; Cantwell, 1975; Alberts-Corush *et al.*, 1986; Sprich *et al.*, 2000), os quais, no geral, apontam taxas aproximadamente 3 vezes mais altas de TDAH em pais biológicos do que em pais adotivos de crianças com TDAH. Já os estudos de gêmeos mostram que pares monozigóticos são mais concordantes para o transtorno do que os pares dizigóticos, e indicam uma alta herdabilidade para o TDAH, estimada em 76% (Purper-Ouakil *et al.*, 2010; Faraone & Mick, 2010; Freitag *et al.*, 2010). Embora alguns autores já tenham proposto modelos monogênicos, oligogênicos e com genes de efeito maior (Morrison & Stewart, 1974; Deutsch *et al.*, 1990; Maher *et al.*, 1999; Acosta *et al.*, 2004), o modelo de transmissão poligênico estabeleceu-se como o mais plausível, em que muitos genes de pequeno efeito interagem uns com os outros e com genes modificadores, conferindo susceptibilidade ao transtorno (Franke *et al.*, 2009; Rommelse *et al.*, 2010).

Diferentes genes possivelmente envolvidos na origem do TDAH vêm sendo sugeridos pelos estudos moleculares. Através das varreduras genômicas, ou *genome-wide association studies* (GWAS), vários locos candidatos vêm emergindo, os quais participam de inúmeros processos biológicos não classicamente relacionados aos sintomas do TDAH. Esses processos envolvem especialmente migração, proliferação e maturação neuronal, apoptose de células do tecido nervoso e regulação da formação da barreira hemato-encefálica na angiogênese. Como exemplos de genes implicados nesses processos, pode-se citar os genes que codificam o *brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2* (BAIAP2), o *inhibitor of DNA binding 2* (ID2), o *family with sequence similarity 190 - member A* (FAM190A), o *integrin - alpha 11* (ITGA11) e o *cadherin 13, H-cadherin* (CDH13) (Roman *et al.*, 2009; Poelmans *et al.*, 2011). Com exceção do último, há pouca concordância entre os achados de cada estudo, o que torna os GWAS mais importantes como geradores de hipóteses do que como indicadores de genes de suscetibilidade.

Os estudos de associação, desenhados a partir de hipóteses biológicas e realizados através de diferentes abordagens, são bem mais numerosos na pesquisa com TDAH. Por esses estudos, genes codificadores de componentes dos sistemas dopaminérgico, noradrenérgico e serotoninérgico, entre outros sistemas de neurotransmissão, têm sido extensivamente

estudados. Os principais resultados positivos obtidos, sumarizados em algumas metanálises, sugerem como de suscetibilidade os genes do *synaptosomal-associated protein of 25 KDa* (*SNAP25*), do Receptor D4 de Dopamina (*DRD4*), do Receptor D5 de Dopamina (*DRD5*), do Receptor Adrenérgico α -2A (*ADRA2A*), do Receptor Serotoninérgico 1B (*5HTR1B*), do Transportador de Dopamina (*DAT1*), do Transportador de Serotonina (*5-HTT*), e das enzimas Dopamina β -hidroxilase (*DBH*), Catecol-metil-transferase (*COMT*), Monoamino-oxidase (*MAO*) e Triptofano-hidroxilase (*TPH*) (Gizer *et al.*, 2009; Stergiakouli & Thapar, 2010), todos com efeito bastante pequeno. A escolha desses genes para estudos moleculares no TDAH está baseada em evidências neurobiológicas, discutidas a seguir.

3. Caracterização Neurobiológica do TDAH

A natureza familiar do transtorno, a efetividade do tratamento farmacológico e os dados obtidos em estudos neuropsicológicos, de neuroimagem e com modelos animais confirmam a natureza neurobiológica do TDAH (Tripp & Wickens 2009). Embora ainda se tenha muito a esclarecer sobre essa doença, numerosas evidências indicam que os sintomas e, conseqüentemente, os prejuízos cognitivos e comportamentais sejam devidos a anormalidades estruturais e funcionais de regiões encefálicas específicas (Luman *et al.*, 2010).

Wender, em 1971, foi o primeiro a propor que os sintomas usualmente presentes no TDAH poderiam ser o resultado de anormalidades nos sistemas de neurotransmissão (Wender *et al.*, 1971). Esse pesquisador sugeriu que os sistemas dopaminérgico e noradrenérgico estavam implicados no TDAH e que as drogas comumente utilizadas no tratamento dos sintomas agiam nesses sistemas, compensando o déficit funcional. No mesmo ano, Satterfield & Dawson incluíram evidências neuroanatômicas nesse modelo, sugerindo que os sintomas do TDAH seriam causados por disfunções fronto-límbicas, nas quais um fraco controle inibitório da região frontal cortical sobre as funções límbicas poderia levar aos sintomas de TDAH (Satterfield & Dawson, 1971).

A partir desses estudos, houve grande progresso na compreensão da neurobiologia do transtorno, vinculado ao avanço nas técnicas de investigação em neurociências e nas estratégias de estudo (Waldman & Gizer, 2006). Estudos de neuroimagem, por exemplo, têm sugerido fortemente uma disfunção dos circuitos frontoestriatais, que englobam o córtex pré-frontal e as suas conexões com os núcleos da base (estriado e outros), o tálamo e o cerebelo como base fisiopatológica do TDAH (Makris *et al.*, 2009; Fernandez-Mayoralas *et al.*, 2010). Geralmente, em pacientes com TDAH, essas regiões apresentam alterações estruturais detectáveis, que acarretam em prejuízos funcionais. Entre estas, observa-se que o córtex pré-frontal apresenta perda de substância cinzenta e assimetria entre córtices direito e esquerdo, que os núcleos da base apresentam perda de simetria e volume diminuído e que o cerebelo apresenta redução global de volume (Sonuga-Barke, 2003; Curatolo *et al.*, 2009; Makris *et al.*, 2009). A integração dos achados estruturais com os achados funcionais sugere que a diminuição global da eficiência dessas circuitarias neuronais observada no TDAH possa estar também associada à perda extensiva das conexões neuronais (Konrad & Eickhof, 2010).

Estudos utilizando outras abordagens indicam as mesmas regiões encefálicas. Apoiando-se em achados neuropsicológicos, por exemplo, Barkley em 1997 e Sonuga-Barke em 2005 desenvolveram teorias sobre os defeitos-base no TDAH. O primeiro, por meio de

avaliações neuropsicológicas, sugeriu que uma inibição comportamental prejudicada e um déficit global das funções executivas, com aspectos envolvendo motivação, processamento temporal da informação, organização motora e percepção temporal, estariam no cerne da miríade de apresentações clínicas possíveis do TDAH (Barkley, 1997). Por sua vez, o segundo propõe que os prejuízos observados em crianças com TDAH seriam devidos a falhas nas vias responsáveis pelo que o autor denomina de “vias de sinalização de recompensas tardias” (Sonuga-Barke, 2005). Resultados de estudos posteriores corroboraram ambas as teorias. É importante salientar que todos esses processos são claramente relacionados ao lobo frontal e a outras áreas corticais e subcorticais (Arnsten & Li, 2005; Nigg, 2005; Makris *et al.*, 2009). Outra linha de evidências advém dos estudos com modelos animais, os quais também apontam essas regiões como estruturas-chave na patofisiologia do TDAH: o estudo de Russell (2002), por exemplo, mostrou que ratos espontaneamente hipertensivos, uma linhagem utilizada como modelo animal de TDAH, apresentavam secreção reduzida de dopamina no córtex pré-frontal, quando comparados às linhagens normais.

É bem estabelecido que as regiões indicadas são amplamente inervadas, entre outros, por neurônios catecolaminérgicos e serotoninérgicos, o que sugere que disfunções nesses sistemas estejam envolvidas no aparecimento dos sintomas (Arnsten & Li, 2005; Curatolo *et al.*, 2009). De fato, diversos estudos farmacológicos suportam essa ideia (Van der Kooij & Glennon, 2007). Os psicoestimulantes utilizados exitosamente no tratamento de pacientes com sintomas de TDAH parecem exercer suas ações preferencialmente por meio do bloqueio da recaptação noradrenérgica e dopaminérgica. Mais especificamente, o metilfenidato, que é amplamente utilizado na prática clínica, liga-se com alta afinidade ao transportador de dopamina (Swanson *et al.*, 2007). Diversos fármacos que agem diretamente sobre a neurotransmissão noradrenérgica também vêm se mostrando eficazes no controle dos sintomas do TDAH, tais como a tomoxetina, um inibidor altamente seletivo do transportador pré-sináptico de noradrenalina (Christman *et al.*, 2004), e a clonidina, um agonista dos receptores adrenérgicos do tipo α_2 (Connor *et al.*, 1999). Agentes serotoninérgicos da classe dos Inibidores Seletivos da Recaptação da Serotonina (ISRS), como a fluoxetina, também mostram eficiência na remissão dos sintomas em alguns pacientes com TDAH (Tandon & Pruett, 2008).

Infelizmente, não existem estudos que integrem todos esses achados numa teoria unificada, capaz de explicar de forma mais completa a neurobiologia do TDAH. No entanto, parece razoável supor-se que alterações em apenas um sistema neurotransmissor não sejam

responsáveis por uma síndrome tão heterogênea quanto essa (Oades 2010). Logo, a influência bem demonstrada da transmissão dopaminérgica deve ser encarada no contexto das inúmeras interações que tais neurônios estabelecem com outros sistemas (Di Giovanni, 2010), entre os quais se destacam o noradrenérgico e o serotoninérgico.

3.1. Sistema Dopaminérgico

O sistema dopaminérgico constitui-se de neurônios cujos corpos celulares localizam-se principalmente na *substantia nigra*, na área tegmental ventral (ATV) e no hipotálamo e cujos axônios projetam-se para diversas áreas do encéfalo, incluindo o córtex pré-frontal e o estriado (Björklund & Dunnett, 2007). Para o TDAH, as vias dopaminérgicas mesolímbica, mesocortical e nigroestriatal, parecem ser importantes, uma vez que estão implicadas em comportamentos impulsivos, em atenção seletiva e memória de trabalho e em padrões de hiperatividade, respectivamente (Genro *et al.*, 2010).

A dopamina é produzida a partir da hidroxilação do aminoácido tirosina pela enzima Tirosina Hidroxilase, a qual é amplamente expressa nos neurônios dopaminérgicos (Di Giovanni, 2010). Secretada ativamente para a fenda sináptica, ela promove sua ação ligando-se aos 5 tipos de Receptores Dopaminérgicos conhecidos (D1, D2, D3, D4, D5). Esses receptores, divididos em *D1-like* (D1 e D5) e *D2-like* (D2, D3 e D4), são capazes de promover uma resposta intracelular cujo mecanismo efetor envolve a ligação a proteínas-G pré- e pós-sinápticas (Smith, 2010), que estimulam ou bloqueiam a enzima Adenil-Ciclase, respectivamente, responsável pela conversão de ATP à AMPc (Van Tol *et al.*, 1991). O padrão de expressão desses receptores apresenta bastante variação entre as diferentes regiões encefálicas. Por outro lado, as enzimas associadas a esse sistema encontram-se virtualmente em todos os neurônios dopaminérgicos: a Dopamina β -hidroxilase (DBH) converte a dopamina em noradrenalina; a Monoamino Oxidase A (MAO-A) mantém os níveis das monoaminas (dopamina, noradrenalina e serotonina) numa faixa aceitável de normalidade e a Catecol-O-Metiltransferase (COMT) atua na degradação da dopamina e das outras catecolaminas (Faraone & Mick, 2010). Apesar de as enzimas citadas anteriormente terem um papel importante na regulação dos níveis de dopamina, é a proteína transportadora de dopamina (DAT) a principal responsável pelo *clearance* desse neurotransmissor da fenda sináptica. Recaptando-o ativamente para o neurônio pré-sináptico, ela cumpre o papel de finalização da ação sináptica da dopamina (Genro *et al.*, 2010).

Devido à sua concentração em áreas do encéfalo que possuem funções relacionadas com os sintomas do TDAH, o sistema dopaminérgico tem sido extensivamente estudado em pacientes com esse transtorno (Wallis *et al.*, 2008). A primeira hipótese que tentava atribuir a causa do transtorno a um fator neurobiológico foi justamente a hipótese dopaminérgica, formulada por Levy em 1991. Esta teoria foi construída a partir de estudos farmacológicos em animais, que apontavam uma hipofunção dopaminérgica nas regiões corticais e no estriado

como responsável pela manifestação dos sintomas do transtorno (Levy, 1991; Makris *et al.*, 2009). No entanto, posteriormente verificou-se que a participação desse sistema se daria de forma mais complexa na expressão do fenótipo clínico e, atualmente, acredita-se que diferentes desequilíbrios bioquímicos ocorram nas várias áreas dopaminérgicas, embora ainda não tenham sido creditados sintomas específicos a alterações particulares (Levy & Swanson, 2001; Sagvolden *et al.*, 2005).

Outra linha de evidência que sustenta a hipótese dopaminérgica na etiopatogênia do TDAH advém do largo emprego dos psicoestimulantes no tratamento dos sintomas do transtorno. Como dito na seção anterior, a droga modelo dos psicoestimulantes utilizados no tratamento do TDAH tem sido o metilfenidato. O bloqueio do transportador de dopamina feito por este fármaco culmina com o aumento da disponibilidade de dopamina na fenda sináptica em áreas específicas, como o estriado e córtex pré-frontal (Biederman & Spencer, 1999; Madras *et al.*, 2005). O aumento dos níveis sinápticos desse neurotransmissor reflete uma amplificação da dopamina liberada espontaneamente, o que sugere um provável mecanismo para o efeito terapêutico do metilfenidato (Volkow *et al.*, 2001; Swanson *et al.*, 2007).

Levando em conta essas evidências, é razoável que a maioria dos estudos moleculares sobre o TDAH tenha como foco os genes codificadores de componentes desse sistema de neurotransmissão (Durstun, 2010).

3.1.1. Gene *DRD4*

Em consonância com a hipótese dopaminérgica de Levy (1991), o primeiro gene a ser investigado num estudo de associação com o TDAH foi o gene do transportador de dopamina (*DAT1*) (Cook *et al.*, 1995). O resultado positivo impulsionou o surgimento de novos estudos de associação, tanto com o *DAT1* quanto com outros genes codificadores de componentes do sistema dopaminérgico, especialmente o gene do receptor do tipo 4 de dopamina, o *DRD4*. O receptor D4 é uma proteína transmembrana de sete domínios, encontrada densamente no córtex pré-frontal, amígdala, hipocampo, hipotálamo e mesencéfalo, ou seja, no sistema límbico (Petronis *et al.*, 1993; Van Tol *et al.*, 1991;). Acredita-se que seja através da terceira alça intracelular que ocorra a ativação da resposta celular quando a dopamina se liga ao receptor extracelularmente (Waldman & Gizer, 2006; Li *et al.*, 2006). Esse receptor destaca-se sobre os demais tipos de receptores dopaminérgicos, visto que exibe alta afinidade pela dopamina.

O gene *DRD4* está localizado no cromossomo 11p15.5, possui aproximadamente 4 Kb (Gelernter *et al.*, 1992; Petronis *et al.*, 1993) e é extremamente polimórfico, como pode ser visto na Figura 1.

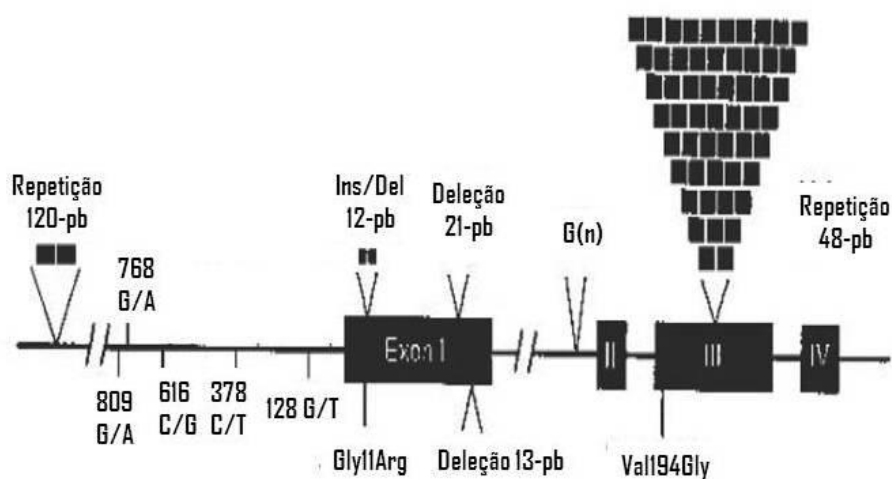


Figura 1. Visão Esquemática da posição dos principais polimorfismos e mutações no gene *DRD4*. Adaptado de Barr, 2001.

Entre os polimorfismos presentes nesse *locus*, o mais estudado é um número variável de repetições em tandem (VNTR) de 48pb, localizado no éxon 3 (Gelernter *et al.*, 1992;

Petronis *et al.*,1993). Diferentes alelos, contendo de 2 a 11 repetições (alelos 2R-11R) têm sido identificados na população mundial. Embora os alelos 4R, 7R e 2R sejam respectivamente as variantes mais comuns na maioria das amostras estudadas, os alelos detectados e suas frequências variam substancialmente entre os grupos étnicos, populações e amostras estudadas (Chang *et al.*, 1996; Hattori *et al.*, 2009; Tovo-Rodrigues *et al.*, 2011). Por exemplo, o alelo 7R é o mais prevalente nas populações nativas da América do Sul e América Central, o segundo mais prevalente, em populações europeias e bem menos frequente em populações asiáticas (Chang *et al.*, 1996; Hutz e cols., 2000).

As variantes alélicas geradas pelo VNTR produzem diferenças estruturais na terceira alça intracelular do receptor D4. Por essa razão, é provável que haja consequências funcionais na resposta do receptor aos ligantes. Estudos realizados *in vitro* com o objetivo de determinar o significado funcional desse polimorfismo vêm apresentando resultados divergentes. Asghari *et al.* (1995) demonstraram que a dopamina, ao se ligar no receptor codificado pelo alelo 7R, apresentava capacidade de inibir a formação de AMPc reduzida à metade, em comparação aos receptores correspondentes aos alelos 2R e 4R. Porém, Jovanovic *et al.* (1999) não observaram diferenças marcantes entre os peptídeos codificados por esses alelos, enquanto Wang *et al.* (2004) sugeriram que ambos receptores produzidos pelos alelos 2R e 7R têm eficiência reduzida em relação ao receptor codificado a partir do alelo 4R. Alelos que expressam proteínas com eficiência reduzida poderiam estar associados a uma hiposensibilidade do receptor D4 pós-sináptico ou a um hipofuncionamento das vias dopaminérgicas mesocorticais e mesolímbicas, refletindo-se em disfunções nas funções relacionadas a essas vias (Smith, 2010).

A elevada densidade do receptor D4 em áreas encefálicas associadas aos sintomas do TDAH (Matsuomoto *et al.*, 1995; Barkley, 1997; Oak *et al.*, 2000), assim como o relato de associação com a dimensão de personalidade “busca de novidades”, supostamente relacionada com o transtorno (Benjamin *et al.*, 1996; Ebstein *et al.*, 1996), fizeram do gene *DRD4* o principal candidato na pesquisa sobre essa doença. Valendo-se de uma abordagem caso-controle, LaHoste *et al.* (1996) foram os primeiros a observar uma associação, indicando o alelo 7R como alelo de risco. Este resultado estava de acordo com a sugestão de hipofuncionamento de ambas as vias dopaminérgicas na presença desse alelo, implicando-o nos sintomas de hiperatividade-impulsividade e desatenção. (Sagvolden *et al.*, 2005; Smith, 2010). Após esse trabalho, inúmeros outros foram publicados, grande parte dos quais ratifica o alelo de 7 repetições como alelo de risco (Gizer *et al.*, 2009; Durston *et al.*, 2009).

Entretanto, há diversas inconsistências entre as investigações: enquanto alguns estudos simplesmente não relataram associação (Frank *et al.*, 2004; Brookes *et al.*, 2005), outros verificaram associações com alelos diferentes, como é o caso de Li *et al.* (2006), que demonstraram associação com o alelo 5R. Já Manor *et al.* (2002) observaram uma não-transmissão preferencial do alelo 7R dos pais para os filhos afetados; ou seja, de acordo com esses dados, esse alelo conferiria proteção ao TDAH. Um efeito similar foi observado por Swanson *et al.* (2000) e Bellgrove *et al.* (2005), em que o alelo 7R foi associado a um melhor desempenho em testes neuropsicológicos. Apesar destes resultados negativos e divergentes, as revisões sistemáticas têm consistentemente apoiado a ideia do envolvimento do gene *DRD4* no TDAH, ainda que com uma contribuição pequena (Gizer *et al.*, 2009; Faraone & Mick, 2010). Na primeira metanálise publicada, Faraone *et al.* (2005) encontraram uma associação estatisticamente significativa do alelo 7R com o TDAH tanto em estudos do tipo caso-controle (OR=1,45; IC95%=1,27–1,65) quanto em estudos com delineamento baseado em famílias (OR=1,16; IC95%=1,03–1,31). Revisões sistemáticas mais recentes da mesma forma sugerem o envolvimento do alelo 7R no TDAH ($1,6 \leq ORs \leq 2,4$), ainda que essa contribuição seja moderada (Gizer *et al.*, 2009; Nikolaidis & Gray, 2010; Smith, 2010).

Em nossa população, esse gene também vem sendo estudado. No primeiro relato, Roman *et al.*, (2001) demonstraram associação do alelo 7R com o TDAH, valendo-se de uma abordagem caso-controle. Entretanto, esse resultado foi questionado devido à origem do grupo controle, obtido a partir da população geral e não triado para doenças psiquiátricas. Nesse mesmo estudo, um efeito de interação entre o gene *DRD4* e o gene *DAT1* foi detectado: pacientes que tinham pelo menos um alelo 7R para o *DRD4* e a homozigose para o alelo de 10 repetições (10R) gerado por um VNTR da região 3' no gene *DAT1* apresentaram um aumento significativo no número de sintomas de hiperatividade/impulsividade em relação aos demais pacientes. Esta interação foi novamente observada numa investigação posterior do mesmo grupo. Neste trabalho, crianças e adolescentes com TDAH que possuíam as condições de risco em ambos os *loci* (presença de alelo 7R + genótipo 10R/10R), quando submetidos a um exame de neuroimagem funcional (Tomografia Computadorizada por Emissão de Fótons Únicos - SPECT), mostraram maior perfusão sanguínea no giro temporal medial direito do que os pacientes com outros genótipos. É importante mencionar que esta é uma área relacionada à memória de trabalho e atenção seletiva, aspectos claramente comprometidos no TDAH (Szobot *et al.*, 2005). Em outro estudo de neuroimagem, também utilizando SPECT e realizado em 2011, Szobot *et al.* verificaram novamente um efeito de interação entre a

presença do alelo 7R e o genótipo 10R/10R, porém em adolescentes com TDAH apresentando a comorbidade dependência de substâncias: em relação aos demais, pacientes com essa combinação genotípica apresentaram menor ligação de metilfenidato ao transportador de dopamina nos núcleos caudado e putâmen, após três semanas de tratamento. Outro efeito interessante do VNTR do gene *DRD4* foi ainda observado por Kieling *et al.* (2006): pacientes com TDAH submetidos a um teste neuropsicológico que avalia flexibilidade cognitiva (Teste de Desempenho Contínuo, CPT) tiveram um melhor desempenho, cometendo menos erros, quando a homozigose para o alelo 4R estava presente, enquanto que a presença de pelo menos um alelo 7R contribuiu para uma frequência maior de erros. Já em 2007, Zeni *et al.* não obtiveram resultados positivos ao tentar associar o VNTR à resposta farmacológica frente ao metilfenidato. Mais recentemente, Akutagava-Martins *et al.*, 2012 também não observaram nenhum efeito do alelo 7R por um método baseado em famílias (FBAT). Entretanto, foi possível detectar um déficit de transmissão de alelos 2R e um excesso de transmissão de alelos 4R dos pais para os pacientes com TDAH do subtipo combinado. Esses achados sugerem a possibilidade de que o VNTR de 48pb do gene *DRD4* tenha alguma influência sobre o TDAH na nossa população, embora de uma maneira complexa e ainda pouco compreendida.

3.2. Sistema Serotoninérgico

Os neurônios dos núcleos da rafe são a principal fonte de serotonina (ou 5-hidroxitriptamina [5-HT]) no encéfalo. Essas células agrupam-se na linha média da formação reticular em cerca de nove pares de núcleos que se distribuem ao longo de toda a extensão do tronco encefálico. Axônios dos neurônios dos núcleos da rafe enviam projeções para quase todas as partes do sistema nervoso central: enquanto os pertencentes aos núcleos inferiores se espalham para o cerebelo e medula espinhal, os localizados em núcleos superiores se distribuem por todo o encéfalo (Owens & Nemeroff, 1994; Frazer & Hensler, 1999).

A serotonina é formada a partir da hidroxilação e da posterior descarboxilação do aminoácido triptofano, sendo a enzima Triptofano Hidroxilase (TH) a mais importante nesse processo (Walther *et al.*, 2003). Embora a enzima Monoamino Oxidase A (MAO-A) participe da degradação da serotonina, contribuindo para manter os níveis adequados desse neurotransmissor, sua remoção da fenda sináptica depende fundamentalmente da recaptação feita pela proteína transportadora de serotonina (5-HTT) (Popova, 2008). Alvo principal da ação das drogas antidepressivas (Lesch *et al.*, 1995), esse transportador está localizado na membrana pré-sináptica e recapta ativamente a serotonina da fenda sináptica (Ramamoorthy *et al.*, 1993). Dessa maneira, ele consegue controlar finamente os níveis sinápticos e finalizar a ação desse neurotransmissor (Lesch, 2001; Lesch *et al.*, 2002). Os efeitos da serotonina são mediados por receptores pré- e pós-sinápticos das famílias 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆ e 5-HT₇ (Andrade *et al.*, 2010). Cada família contempla um ou mais receptores; estes, no geral, promovem suas ações intracelulares por meio de proteínas-G pré- e pós-sinápticas que estimulam ou bloqueiam a enzima Adenil-Ciclase. Os receptores serotoninérgicos apresentam um padrão difuso de expressão, mas com localizações preferenciais, no Sistema Nervoso Central (SNC), concordante com a ampla inervação serotoninérgica (Andrade *et al.*, 2010). Por outro lado, as enzimas de síntese (TH) e degradação (MAO-A), assim como o transportador não exibem preferência regional e apresentam ampla distribuição nos neurônios serotoninérgicos (Brust *et al.*, 2003; Popova, 2008).

Em humanos, primatas e outros animais, estudos clínicos e pré-clínicos vêm acumulando evidências de que a sinalização serotoninérgica é a principal moduladora do comportamento emocional (incluindo medo e ansiedade) e de processos encefálicos complexos, como a cognição, o processamento sensorial e a atividade motora. A diversidade dessas funções se deve ao fato de que a serotonina orquestra a atividade de muitos outros

sistemas de neurotransmissores. Além dos efeitos de sinalização, este neurotransmissor possui um papel importante no desenvolvimento do encéfalo. Aparentemente, a maioria da síntese de serotonina no SNC nos estágios iniciais do desenvolvimento parece estar relacionada ao seu papel como fator de crescimento e regulador do desenvolvimento neuronal (Whitaker-Azmitia, 2001).

Acredita-se que mecanismos serotoninérgicos também contribuam para a patofisiologia do TDAH. A influência da serotonina sobre a inibição comportamental e comportamentos impulsivos é bem estabelecida (Borycz *et al.*, 2008; Zepf *et al.*, 2008). Além disso, axônios serotoninérgicos espraíam-se para regiões encefálicas que desempenham funções relacionadas com os sintomas do TDAH, tais como domínio da cognição e controle motor (Owens & Nemeroff, 1994). Estudos em animais contribuem com algumas evidências. O estudo de Puumala & Sirvio (1998) mostrou que roedores com alta utilização de serotonina no córtex pré-frontal não desempenham adequadamente tarefas que aferem o nível de atenção e impulsividade. Já Quist & Kennedy (2001) observaram que roedores apresentam alta densidade do receptor tipo 1B no estriado e no cerebelo, sugerindo a participação da serotonina nos processos biológicos que acontecem nas mesmas. Evidências farmacológicas também apontam para o envolvimento serotoninérgico, não só devido ao uso de ISRS no tratamento do TDAH, como comentado anteriormente. Tem sido sugerido que a resposta comportamental ao metilfenidato, primariamente atribuída ao bloqueio do transportador de dopamina, também seja mediada por mecanismos serotoninérgicos agindo na modulação das vias dopaminérgicas (Thakur *et al.*, 2010). Nesse passo, a serotonina reveste-se de importância na pesquisa sobre a patofisiologia e etiologia do TDAH.

3.2.1. Gene *5-HTT*

Embora com um número menor de investigações do que o sistema dopaminérgico, genes do sistema serotoninérgico também têm sido objeto de estudos moleculares no TDAH. Um dos primeiros a ser investigado, e também um dos mais promissores, foi o gene do transportador de serotonina (*5-HTT* ou *SLC6A4*) (Manor *et al.*, 2001). Considerando a existência de muitos estudos prévios demonstrando o envolvimento deste gene na etiologia de comportamentos impulsivos (Stein *et al.* 1993) e na modulação da hiperatividade (Gainetdinov *et al.*, 1999), foi teorizado que o mesmo poderia estar implicado no surgimento dos sintomas do TDAH (Quist & Kennedy, 2001).

O *5-HTT* (ou SERT) é uma proteína transmembrana com 12 domínios, que transporta serotonina contra um gradiente de concentração, permutando Na^+/Cl^- para cada molécula de serotonina (Blakely *et al.*, 1994; Ravna & Edvardsen, 2001). Estudos de homologia de sequências posicionam o *5-HTT* como um membro da superfamília de transportadores de neurotransmissores dependentes de NaCl (Dopamina, Noradrenalina, Serotonina etc.) (Masson *et al.*, 1999). Ele é amplamente expresso em todos os neurônios serotoninérgicos, inclusive nos presentes na amígdala, hipocampo, tálamo, putâmen e córtex cingulado anterior, regiões envolvidas com memória, atenção e controle motor (Oquendo *et al.*, 2007).

Blakely *et al.*, (1991), trabalhando com roedores, foram os primeiros a identificar a estrutura do gene *5-HTT*, ao cloná-lo e expressá-lo *in vitro* em células não-neurais. Logo após, Ramamoorthy *et al.* (1993) revelaram a estrutura do gene humano, com cerca de 38 Kb, mapeando-o no cromossomo 17q11.1-q12. Este gene contém diversos polimorfismos conhecidos, principalmente na sua região promotora (Figura 2), fato que chama a atenção para a possível influência na sua eficácia transcricional (Lesch *et al.*, 1995). Collier *et al.* (1996) identificaram um polimorfismo bialélico (*5-HTTLPR*; *serotonin transporter gene-linked polymorphic region*) na região promotora do gene do transportador de serotonina, o qual é atualmente um dos polimorfismos mais conhecidos e estudados em psiquiatria (Antypa & Van der Does, 2010). O *5-HTTLPR* consiste numa inserção/deleção de 44pb que produz um alelo longo (L) e um alelo curto (S), respectivamente. Estudos iniciais sugeriram que o alelo S reduz a eficácia transcricional da região promotora, resultando em expressão gênica e disponibilidade de produto proteico diminuídos. Linfoblastos que expressavam o alelo S mostraram transcrição diminuída de *5-HTT*, recaptação de serotonina diminuída e baixa afinidade por diversos ligantes em comparação com indivíduos homocigotos LL (Scheffel *et al.*, 1992 ; Preuss *et al.*, 2000). O alelo S parece ainda influenciar a resposta encefálica a

estímulos emocionais, estando associado a uma série de condições clínicas, como, por exemplo, transtornos de humor, agressividade, impulsividade e abuso de substâncias (Kosek *et al.*, 2009). Mais recentemente, foi identificada uma mutação de ponto (rs25531) (Hu *et al.*, 2005) posicionada nas proximidades do 5-HTTLPR e caracterizada por uma troca de A por G, também implicada na efetividade transcricional do gene. Ambos os polimorfismos são comumente estudados em conjunto e referidos como um sistema dialélico, diferenciando indivíduos com uma eficácia transcricional alta ($L_A L_A$), intermediária ($L_A L_G$, $S L_A$) ou baixa ($S S$, $S L_G$, $L_G L_G$).

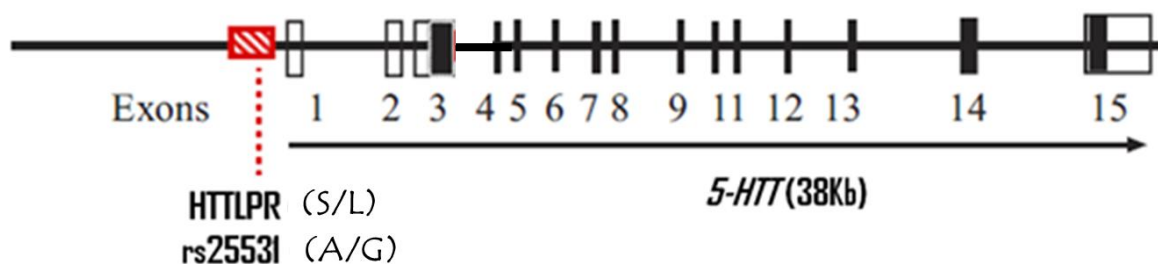


Figura 2. Visão esquemática dos polimorfismos 5HTTLPR, rs25531 dentro do gene 5-HTT. Adaptado de Wray *et al.* (2009)

Diversos estudos em amostras clínicas já investigaram a participação do polimorfismo 5-HTTLPR no TDAH (Faraone & Mick, 2010). O primeiro estudo de associação foi conduzido por Manor *et al.* (2001). Empregando o método de risco relativo de haplótipos (HRR), estes autores encontraram uma frequência significativamente mais baixa do genótipo SS em probandos com TDAH, quando comparados a controles sem o diagnóstico. Assim como para o gene *DRD4*, esse estudo inicial também impulsionou outras investigações com o 5-HTT, tanto com resultados positivos (Seeger *et al.*, 2001; Kent *et al.*, 2002; Cadoret *et al.*, 2003) quanto negativos (Langley *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2005). No geral, as metanálises confirmam a associação do alelo L com o TDAH. Na primeira publicada, houve evidência de associação com o alelo L (OR=1,31; IC95%=1,09–1,59) (Faraone *et al.*, 2005), resultado visto mais recentemente também pela análise de Gizer *et al.* (2009) (OR=1,10; IC95%=1,02–1,17).

É interessante observar que a maioria dos estudos investigou o 5-HTTLPR como um polimorfismo bialélico. O primeiro trabalho, e um dos únicos na literatura do TDAH, a

estudar esta variante como trialélica foi realizado por Tahroor *et al.* (2008), que investigaram se havia associação com a resposta ao tratamento com metilfenidato, não encontrando resultados positivos. Mais recentemente, em 2011, Sonuga-Barke e seus colaboradores estudaram a influência do polimorfismo trialélico sobre uma medida neuropsicológica de aversão à espera, frequentemente vista em pacientes com TDAH, a qual sinaliza a preferência por recompensas imediatas sobre tardias. Nesse trabalho, os autores hipotetizaram que esta característica estaria preferentemente associada a genes serotoninérgicos, o que de fato se confirmou, porém em desacordo com a literatura: portadores do alelo S foram os que se mostraram com mais aversão à espera (alelos L_A e L_G aparentemente sem efeito individual). É possível que a investigação do 5-HTTLPR na forma trialélica modifique os resultados obtidos, contribuindo para o entendimento dos achados controversos. Por essa razão, tem sido sugerido que amostras já analisadas para o sistema bialélico sejam reagentipadas considerando-se também o rs25531 (Hu *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2006; Wendland *et al.*, 2006).

O polimorfismo 5-HTTLPR também vem sendo estudado na nossa população. Zeni *et al.* (2007), ao investigarem os desfechos em crianças com TDAH após o tratamento com metilfenidato, não encontraram qualquer associação do alelo L ou genótipo LL com a resposta ao tratamento ou com a presença de efeitos adversos. Em outro estudo, que verificou a possibilidade de associação do 5-HTT com o TDAH através de uma abordagem baseada em família, também não foi detectada associação. Porém, este mesmo trabalho observou resultados positivos com o gene do receptor 5-HT_{2A} no grupo de meninos afetados com TDAH (Guimarães *et al.*, 2007), o que sugere um possível efeito de genes do sistema serotoninérgico na nossa população, ainda a ser esclarecido. A replicação dos resultados prévios na forma trialélica, portanto, parece ser essencial.

3.3. Interação entre Sistemas Dopaminérgico e Serotoninérgico

Embora os diversos estudos apontem claramente para uma base neurobiológica, os mecanismos patofisiológicos e a natureza exata do desenvolvimento encefálico atípico permanecem pouco compreendidos no TDAH. Recentemente, em concordância com abordagens para outros transtornos, uma mudança nos modelos etiológicos do TDAH tem ocorrido. Estes modelos vêm trocando o foco, passando a sugerir fortemente que a patologia é devida a uma disfunção na organização da circuitaria neuronal em geral, modificando a interação entre os diferentes centros neuronais regionalmente especializados. Como resultado, a análise da interação dos circuitos neuronais, e conseqüentemente dos sistemas de neurotransmissão, tem se tornado cada vez mais importante na pesquisa dos transtornos comportamentais, incluindo o TDAH (Konrad & Eickhof, 2010; Sergeant *et al.*, 2003).

O grande número de evidências obtidas a partir dos mais diferentes tipos de estudos não deixa dúvida sobre as contribuições em separado de funções dopaminérgicas e serotonérgicas no TDAH. No mesmo passo, a inter-relação destes sistemas na origem e manifestação dos sintomas também vem sendo sugerida, o que condiz com a formulação de modelos mais complexos para o entendimento da etiologia deste transtorno (Henríquez-Henríquez *et al.*, 2010). Ambas as vias mesolímbicas e mesocorticais dopaminérgicas recebem inervação serotonérgica vinda dos núcleos da rafe. Estes enviam suas projeções para células dopaminérgicas na área tegmental ventral e na substância negra e para as suas terminações no núcleo accumbens, córtex pré-frontal e estriado (Di Giovanni, 2010). Especificamente, acredita-se que os transportadores dopaminérgicos mesolímbicos e os receptores do tipo D4 mesocorticais possam ser regulados diferencialmente pela serotonina, que inibiria ou ativaria cada uma dessas vias dopaminérgicas dependendo também dos receptores serotonérgicos presentes.

Esses achados neuroanatômicos têm propiciado estudos funcionais, especialmente na área da farmacologia. Investigações iniciais mostraram que a diminuição da função serotonérgica central tende a potencializar os efeitos comportamentais e neuroquímicos de drogas que reforçam a transmissão dopaminérgica, por isso chegando-se à conclusão de que o sistema serotonérgico central inibe as funções dopaminérgicas. O desenvolvimento de um grande número de agentes farmacológicos seletivos para cada tipo de receptor serotonérgico tem permitido aos investigadores compreender melhor o papel funcional desses receptores no controle da transmissão dopaminérgica central e como a serotonina contribui para a regulação

do grande número de processos fisiológicos e comportamentais envolvendo as áreas límbicas, corticais e estriatais das vias dopaminérgicas (Di Giovanni *et al.*, 2010).

Seguindo essa linha, no TDAH sugere-se que os sistemas dopaminérgico e serotoninérgico interajam de maneira anômala, influenciando o aparecimento das características impulsivas dos indivíduos, que se refletem nos comportamentos externalizantes ou em impulsividade cognitiva (Oades, 2008). À semelhança de outros transtornos neuropsiquiátricos, há evidências numerosas indicando que os psicoestimulantes utilizados no tratamento do TDAH agem interferindo tanto na transmissão serotoninérgica como dopaminérgica. Num modelo animal de TDAH, que apresenta hiperlocomoção espontânea devido à inutilização do gene *DAT1*, foi verificado o efeito calmante dos psicoestimulantes por intermédio da neurotransmissão serotoninérgica, o que enfatiza a importância do balanço entre as funções dopaminérgica e serotoninérgica para o controle motor adequado (Gainetdinov *et al.*, 1999; Gainetdinov & Caron, 2000). Esses dados indicam que uma função neuromodulatória da serotonina sobre o sistema dopaminérgico possa ser importante no TDAH.

A implicação de variantes genéticas de diferentes sistemas de neurotransmissão no TDAH sugere que estudos de interação gene-gene podem representar uma estratégia adequada, e em concordância com os modelos mais recentes, para o entendimento da etiologia do TDAH. Estudos deste tipo são relativamente raros no TDAH (Roman *et al.*, 2001, Szobot *et al.*, 2005; Sonuga-Barke *et al.*, 2009; Auerbach *et al.*, 2010; Qian *et al.*, 2010) e mais ainda em relação aos sistemas dopaminérgico e serotoninérgico, a despeito das evidências de interação neuronal e farmacológica. Considerando os achados dos estudos de associação, os genes *DRD4* e *5-HTT* parecem ser os candidatos mais adequados para testar a hipótese de interação entre esses sistemas, já que figuram entre os principais genes sugeridos como de suscetibilidade. Apenas uma investigação pode ser encontrada na literatura até o momento: Seeger *et al.* (2001), investigando os polimorfismos de VNTR de 48pb e 5-HTTLPR, verificaram que a presença do alelo 7R para o *DRD4* e do genótipo LL para o 5-HTTLPR estava associada à pior resposta ao tratamento com metilfenidato.

Apesar da escassez de estudos com o TDAH, muitos artigos investigando efeitos de interação entre os genes *DRD4* e *5-HTT* em relação a diferentes fenótipos e medidas de temperamento ou personalidade associadas com a doença já foram publicados. Em um dos primeiros relatos, Ebstein *et al.* (1998) verificaram que neonatos com duas semanas de vida que eram homozigotos SS e portadores de alelos longos (de 6 a 8 repetições) para o VNTR do

DRD4 mostraram escores mais altos na medida de orientação, um dos quatro *clusters* de temperamento avaliados. Já na presença de alelos curtos para o *DRD4* (de 2 a 5 repetições), o efeito do genótipo SS foi reduzir os escores deste *cluster*, reforçando a importância da interação. Em 2000, o mesmo grupo verificou novamente um efeito de interação entre estes genes em indivíduos adultos não relacionados: a presença do alelo 7R na ausência de alelos curtos para o 5-HTTLPR aumentou significativamente os escores de “busca de novidades”, dimensão de personalidade supostamente aumentada no TDAH (Benjamin *et al.*, 2000). Por outro lado, a ausência do alelo 7R na presença de alelos curtos para o 5-HTTLPR foi associada a um aumento dos escores em outra dimensão, a “prevenção de dano”, em geral baixa no TDAH. Estes mesmos efeitos foram observados através de uma abordagem familiar, quando pares de irmãos foram avaliados.

Ainda em relação a medidas de temperamento e personalidade, Auerbach *et al.* (2001a) verificaram que bebês de 01 ano de idade mostraram escores menores em um teste de atenção sustentada (duração do *looking* – concentração em uma atividade de brincadeira estruturada) quando possuíam o alelo 7R do *DRD4* e o genótipo SS, comparados a crianças com este genótipo mas sem o alelo 7R. Neste mesmo ano, esses autores (Auerbach *et al.*, 2001b) replicaram o achado de interação: bebês com um ano de idade foram avaliados em uma série de episódios que eliciavam medo, raiva, prazer, interesse e atividade. Entre outros efeitos individuais, a presença de alelos longos no *DRD4* e do genótipo SS no 5-HTT foi novamente associada a um *looking* de menor duração em situação de brincadeira estruturada. Um efeito de interação entre estes genes sobre características de temperamento em crianças de um ano de idade foi ainda verificado por Lakatos *et al.* (2003). Bebês com pelo menos uma cópia de ambos, alelo 7R do *DRD4* e alelo L do 5-HTTLPR, mostraram significativamente menos ansiedade diante de um estímulo de novidade e ansiolítico (aproximação de uma pessoa estranha), enquanto que os indivíduos com uma cópia do alelo 7R e homozigotos SS mostraram mais ansiedade e resistência ao contato com o estranho. Em 2004, Szekely *et al.* observaram um resultado um pouco diferente do esperado de acordo com os estudos anteriores: em adultos da população em geral, sem diagnóstico de TDAH, a presença do alelo 7R e do genótipo SS foi associada a escores significativamente mais altos em “prevenção de dano” quando comparados a outros genótipos.

Um efeito de interação sobre comportamentos externalizantes, medidos pelo *Child Behavior Checklist* (CBCL) (Achenbach, 1991), foi verificado por dois outros estudos. Esta escala avalia diferentes problemas de comportamento e competências sociais em crianças e é

amplamente utilizada no TDAH. Em 2007, Nobile *et al.*, avaliando pré-adolescentes, observaram escores maiores de agressividade nos indivíduos que possuíam alelos longos tanto no *DRD4* quanto no *5-HTT*, na presença de baixo nível socioeconômico, o que evidenciou também um efeito de interação gene-ambiente. Resultado semelhante foi observado por Schmidt *et al.* (2007) em crianças de 07 anos de idade: aquelas que possuíam pelo menos uma cópia do alelo S para o *5-HTT* e alelos longos para o *DRD4* mostraram significativamente mais comportamentos internalizadores (características relacionadas a depressão e ansiedade, por exemplo) e externalizadores (características relacionadas ao TDAH, transtorno de conduta e transtorno de oposição-desafio). Interessantemente, a presença do alelo L no *5-HTT*, mesmo em combinação com alelos longos do *DRD4*, foi associada a escores menores em ambos os tipos de comportamentos, indicando que a presença de alelos longos no *5-HTT* pode estar atuando como um fator protetor ao desenvolvimento destes comportamentos em crianças com alelos longos no *DRD4*.

Mais recentemente, Yamamoto *et al.* (2009) demonstraram claramente um efeito de interação gene-gene dos mesmos alelos sobre a atenção sustentada em adultos jovens saudáveis, uma das capacidades normalmente diminuídas no TDAH. Indivíduos homocigotos para os alelos curtos do *DRD4* mostraram índices progressivamente maiores de atenção sustentada à medida que eram adicionados 01 e 02 alelos curtos do *5-HTT*, com um padrão inverso para os portadores de pelo menos um alelo 7R ou maior (a cada alelo S acrescido no genótipo, ocorria uma redução na capacidade de sustentar a atenção). Assim, este trabalho sugeriu que, além de um efeito de interação, pode haver um efeito de dose dos supostos alelos de risco nestes genes. Já no estudo de Hohmann *et al.* (2009), adolescentes com 15 anos de idade relataram, por meio de diferentes escalas de sintomas, escores maiores em agressividade e/ou comportamento delinquente na presença do genótipo SS e do alelo 7R. O efeito do gene *5-HTT* em comportamentos externalizantes apenas na presença de um genótipo específico no loco *DRD4* (presença de alelo 7R) levou os autores a sugerir uma interação do tipo epistasia entre os dois genes.

Todos estes achados mencionados, aliados a resultados positivos tanto para o *DRD4* como para o *5-HTT* em estudos de interação com fatores ambientais (Langley *et al.*, 2008; Sonuga-Barke *et al.*, 2009; Auerbach *et al.*, 2010), sugerem que efeitos gênicos bastante complexos podem estar atuando em pacientes com TDAH, mesmo quando individualmente não são detectadas associações marcantes, ou concordantes com a literatura, com cada um destes genes, como é o caso da nossa população.

Nos últimos 20 anos, um enorme progresso foi empreendido na compreensão da etiologia do Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade (TDAH). Desde o primeiro relato de associação de um marcador genético com essa doença, muitos estudos vêm tentando identificar possíveis genes de susceptibilidade, através de diferentes abordagens. Todavia, isso não tem sido tarefa fácil, com muitos resultados ainda inconsistentes entre os diferentes estudos.

Dado que a heterogeneidade genética existente entre as diferentes populações e amostras estudadas possa ser uma explicação para os achados divergentes, estudos detalhados dos prováveis genes de susceptibilidade, englobando diferentes polimorfismos descritos e mesmo através de re-sequenciamento, têm sido sugeridos na literatura. Especificamente em relação ao gene do transportador de serotonina (*5-HTT*), a descrição de um SNP funcional (rs25531) dentro do *serotonin transporter gene-linked polymorphic region* (5-HTTLPR) sugere que uma reanálise de amostras já investigadas deva ser feita para se confirmar achados prévios e/ou obter resultados que sejam consistentes e replicáveis.

É possível que a grande heterogeneidade fenotípica da doença também esteja contribuindo para a dificuldade de obtenção de resultados que evidenciem a participação exata de cada gene de susceptibilidade na origem do TDAH. A necessidade de contornar essa heterogeneidade tem influenciado sobremaneira a formulação dos modelos etiológicos para o TDAH, ocasionando que esses evoluam desde modelos simples até modelos complexos, que postulam a presença de vias patofisiológicas paralelas e inter-relacionadas no transtorno. Neste sentido, investigações que utilizem abordagens ainda inéditas e/ou ainda pouco utilizadas no TDAH, tais como análises de interação entre genes diferentes e sistemas biológicos diferentes, parecem ser bastante valiosas.

Considerando-se o impacto negativo que o TDAH tem sobre as famílias dos pacientes e a sociedade em geral, aliada ao fato de que o tratamento é paliativo, um melhor conhecimento da etiologia do TDAH é fundamental.

O presente trabalho, portanto, teve como objetivo geral verificar, em pacientes com TDAH, a influência de dois genes codificadores de componentes dos sistemas dopaminérgico e serotoninérgico, sugeridos pela literatura como de susceptibilidade à doença, um deles isoladamente e ambos em um contexto de interação gene-gene.

Para esse fim, os objetivos específicos foram:

- Genotipar uma amostra de 130 crianças e adolescentes com TDAH e seus pais biológicos para o polimorfismo 5-HTTLPR na forma bialélica;

- Genotipar uma amostra de aproximadamente 500 crianças e adolescentes com TDAH e seus pais biológicos para o polimorfismo 5-HTTLPR/rs25531 (forma trialélica).
- Verificar a possibilidade de associação do gene *5-HTT* com o TDAH como um todo e em subgrupos definidos por diferentes variáveis clínicas, através de método baseado em família e análises dimensionais;
- Verificar a possibilidade de interação entre genes codificadores de componentes dos sistemas dopaminérgico e serotoninérgico (respectivamente, gene do receptor D4 de dopamina - *DRD4* - e gene *5-HTT*) na etiologia do TDAH e diferentes aspectos clínicos mencionados, utilizando tanto dados gerados no presente trabalho como dados obtidos em estudos prévios de nosso grupo.

Using *5-HTT* and *DRD4* association data to test the possibility of gene-gene interaction in Attention Deficit/Hyperactivity Disorder

Koppe, TB¹; Akutagava-Martins, GC¹; Ferraz, G¹; Genro, JP¹; Guimarães, APM¹; Salatino-Oliveira, A¹; Zeni, C²; Schmitz, M²; Chazan, R²; Rohde, LA²; Hutz, MH¹ and Roman, T¹.

¹Department of Genetics, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

²Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder Program (ProDAH), Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Running title: Association and interaction between *5-HTT* and *DRD4* in ADHD.

Keywords: *DRD4*, *5-HTT*, 5-HTTLPR/rs25531, association study, gene-gene interaction, ADHD.

Correspondence to:

Prof^a. Dr^a Tatiana Roman

Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
Instituto de Biociências, Departamento de
Genética. CEP: 91501-970 Caixa postal 15053
Porto Alegre, RS, Brazil.

Phone: 55-51-3308-6720

Fax: 55-51-3308-7311

E-mail: tatiana.roman@ufrgs.br

Abstract

Serotonin transporter gene, *5-HTT*, has been implicated as a susceptibility gene for Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD), the major psychiatric disorder of childhood and adolescence. Previous meta-analytic findings with the 44bp indel located into promoter region (5-HTTLPR) suggest the long allele (L) as the risk one. However, the A>G SNP (rs25531) harbored in L allele has hardly been investigated, despite its functional relevance in gene's transcriptional efficiency. In the present study, we investigated the 5-HTTLPR/rs25531 polymorphism in a sample previously genotyped in part for 5-HTTLPR biallelic system. Following literature suggestions, we also sought to analyze *5-HTT* gene in a more sophisticated context. Due to evidences of interaction between serotonergic and dopaminergic systems, we tested the possibility of gene-gene interaction using *5-HTT* and the dopamine D4 receptor gene (*DRD4*), the natural candidate among dopaminergic components. The sample was composed by 478 DSM-IV ADHD children and adolescents, their biological parents whenever possible and 100 control individuals. Patients were obtained from both ADHD Outpatient Program hosted in Hospital de Clínicas de Porto Alegre and public schools; controls were obtained from public schools. The possibility of association with 5-HTTLPR/rs25531 was tested using a family-based method (FBAT) in different subgroups of patients, showing no positive results ($0.152 \leq P \leq 0.902$). To investigate the hypothesis of interaction between 5-HTTLPR/rs25531 and the exon 3 48bp VNTR at *DRD4* three different approaches were employed [Pearson's chi-square test, binary logistic regression model and general linear model (*One-Way ANOVA*)]. For these analyses, patients were classified as 7R-carriers and 7R-noncarriers at *DRD4* locus, and as low (SS; SL_G; L_GL_G), mid (SL_A; L_AL_G) and high (L_AL_A) transcriptional efficiency group for *5-HTT* gene. Nevertheless no statistical gene-

gene interaction was detected ($0.073 \leq P \leq 0.852$). Although we believe there was no effect in our sample, negative results do not exclude a *5-HTT* effect or the interaction possibility either between *5-HTT* and *DRD4* genes or between any of them and other *loci* in ADHD etiology. The pioneering nature of this study in ADHD field would probably work as a stimulus to other researchers to further investigate the issues presented herein.

Keywords: ADHD, *DRD4*, *5-HTT*, rs25531, association, gene-gene interaction.

Introduction

Attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) is a common early-onset neuropsychiatric disorder that shows meta-analytic prevalence estimated of 5.29% (95% CI=5.01–5.56) for school-age children worldwide (Polanczyk et al., 2007a) and persists into adults in approximately two-thirds of cases (Faraone et al., 2006). The current diagnostic criteria presented by the fourth edition of the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV) (American Psychiatric Association – APA –, 1994) involve clinical measures for detecting a persistent pattern of inattention, motor hyperactivity and impulsivity, which is more frequent and severe than usually expected in individuals at a comparable level of development (Wallis et al., 2008). Additionally, due to the high prevalence of comorbidity with oppositional defiant disorder (ODD) and/or conduct disorder (CD), some authors suggest that the comorbid group of patients might represent a more severe subtype of ADHD (Hamilton and Armando, 2008; Connor et al. 2010).

In spite of the enormous impact on patients and families' well-being and on socio-economic issues (National Institute of Health, 2000), ADHD etiology is still poorly understood (Luman et al., 2010). Nevertheless, it seems clear that this disorder arises from the interplay of many genetic and environmental factors (Stergiakouli and Thapar, 2010), with a massive effect of genetic variance in the phenotype [according to Faraone and Mick (2010), the estimated heritability is 76%]. Putatively, these factors interact to different extents contributing to alterations in several neurobiological pathways. The groundwork for ADHD pathophysiology rests on observed dysfunctions in cingulate, frontal, and parietal cortical regions and their relationships with striatum and cerebellum, being these

data collected from a variety of sources, including neuroimaging, neuropsychological, neurochemical, and genetics studies (Bush, 2011).

This neuroanatomical basis is compatible with the widespread innervation through the Central Nervous System (CNS) by fibers containing serotonin (5-HT), what means that, as cause or effect, 5-HT is likely to be involved in these areas and thus in their impaired functions (Oades, 2010). Based on this knowledge, it is widely accepted that serotonin neuromodulation influences a wide spectrum of normal and pathological behaviors (revised in Lucki, 1998), including ADHD itself (Oades, 2010) and phenotypes related to ADHD as cognition, working memory and impulsivity (Enge et al., 2011a; 2011b; Sonuga-Barke et al., 2011).

A key regulator of 5-HT function is the 5-HT transporter (5-HTT) which mediates the re-uptake of 5-HT from the synaptic cleft to the presynaptic nerve terminal, finely regulating synaptic levels of serotonin and ending up the action of this neurotransmitter (Lesch et al., 2002; Popova, 2008). In this way, the gene that codifies the serotonin transporter, *SLC6A4* or *5-HTT* (17q11.1-q12), is a locus of great interest for molecular genetic studies in ADHD. This gene shows a very important functional polymorphism, a 44bp indel located into promoter region (5-HTTLPR). The two allelic variants differ with regard to transcriptional effectiveness, with the short (S) allele resulting in lower transcriptional levels and lower serotonin transporter function than the long (L) allele (Lesch et al., 1995).

Several studies in clinical samples have investigated the involvement of 5-HTTLPR polymorphism in ADHD (Mick & Faraone, 2010). The first association study was conducted by Manor et al. (2001). Applying the method of haplotype relative risk (HRR),

these authors found a significantly lower frequency of genotype SS in probands with ADHD compared to controls without the diagnosis. Since then, many positive (Seeger et al., 2001, Kent et al., 2002, Cadoret et al., 2003) and negative results (Langley et al., 2003; Kim et al., 2005; Xu et al., 2005) have been reported. Despite this divergences, a quite recent meta-analysis (Gizer et al., 2009) support the association of L allele with ADHD, even though with a very small effect (OR = 1.10).

These results, nevertheless, refer to the biallelic variation of *5-HTT* 44bp indel, a former way of investigating this polymorphism. In 2005, Hu et al. identified an A>G SNP (rs25531) harbored in long allele of 5-HTTLPR, also involved in the gene's transcriptional efficiency. Several authors (Hu et al., 2005; Hu et al., 2006; Wendland et al., 2006) have recommended grouping both polymorphisms together and denominating them as a triallelic system, differentiating individuals with a high ($L_A L_A$), intermediate ($L_A L_G$, SLA) or low (SS , SL_G , $L_G L_G$) transcriptional efficiency. There are few studies considering the triallelic system, or 5-HTTLPR/rs25531 polymorphism, in ADHD. Tahroor et al. (2008), the first to use this methodology, have found no association between response to stimulant medication and the triallelic system. The other study performed was conducted by Sonuga-Barke et al. (2011) and reported that S-allele carriers presented more delay aversion, a neuropsychological trait related to ADHD, than non-carriers, an effect not modified by taking into account the SNP. The disagreement of these triallelic studies with previous biallelic meta-analytic results (Gizer et al., 2009) suggests that further investigations must be conducted in order to clarify the role of the *5-HTT* in ADHD. Moreover, even taking the functional relevance of the tri-allelic variation, it is unlikely that this unique locus acts individually on the disease, thus the putative *5-HTT* role must be analyzed in a more sophisticated context.

In this sense, the use of different approaches has been suggested to clarify ADHD etiology. Increasingly in recent years, gene-gene (g-g) interaction studies have been turning out to be more plausible in order to explain complex diseases etiology. This happens because testing genetic variants individually for association with a specific phenotype (ADHD, for example) could be overlooking the existence of many unknown factors that interact and, together, contribute to a complex disease pathophysiology. Considering small effect genes, an interaction could increase their individual effects (Cordell, 2009). In ADHD this has been explored in a few studies, mainly with genes from the same neurotransmitter system, presenting inconclusive results (Roman et al., 2001; Qian et al, 2007; Das et al., 2011; Szobot et al., 2005; 2011).

Many putative loci may interact with *5-HTT*, but dopamine D4 receptor gene (*DRD4*) emerge as a strong *a priori* locus. First, due to the possible interaction between dopamine and serotonin neurons. It has been shown that mesocortical D4 receptors may be differentially regulated by serotonergic innervation coming from the raphe nuclei, which modulates the dopaminergic pathways depending on the serotonin receptors activated (Di Giovanni, 2010). Secondly, the findings depicted fundamentally when *DRD4* locus was analyzed individually support its inclusion in novel studies with different approaches, including interaction studies. This gene encodes a seven-transmembrane domain protein especially located at dopaminergic post-synaptic neurons in pre-frontal cortex and limbic system (Oak et al., 2000). The functional exon 3 48-bp VNTR polymorphism has been extensively investigated in ADHD (Banaschewski et al., 2010), with meta-analyses supporting a small, but significant effect (OR 1.16-2.4) of 7 repeat allele (7R) (Biederman and Faraone, 2005; Gizer et al., 2009; Nikolaidis and Gray, 2010; Smith, 2010). However,

innumerable positive and negative results (listed in Faraone and Mick, 2010) suggest more complex scenarios instead of single-locus analysis strategies.

Both *5-HTT* and *DRD4* genes have been investigated in our population. The 5-HTTLPR, biallelic form, was first studied by Guimarães et al. (2007) in ADHD families. Using Transmit software, no biased transmission of any allele was detected. No associations were also verified by Zeni et al. (2007), when studying both response and side effects to methylphenidate treatment in ADHD patients, also considering the biallelic system. However, positive findings obtained for other serotonergic loci, as serotonin 2A receptor gene and serotonin 1B receptor gene (Guimarães et al., 2007; 2009) suggest that this neurotransmission system might be contributing to ADHD in our population; the investigation in the former biallelic form might have prevented the detection of a *5-HTT* effect. According to the literature, the re-genotyping of previously analyzed samples considering the 5-HTTLPR/rs25531 system is warranted (Hu et al. 2005; Hu et al. 2006; Wendland et al. 2006).

Regarding *DRD4*, the 48bp VNTR was first investigated in our population by Roman et al. (2001). Although negative results were reported when applying a family-based test, an excess of 7R alleles was detected in cases compared to controls. This study also showed an interaction effect: the presence of at least one 7R allele at *DRD4* locus and the homozygosity for the 10R allele at dopamine transporter gene (*DAT1*) 3'UTR VNTR was related to a significant increase in the number of hyperactive/impulsive symptoms. An interaction effect between these genes was further verified by two functional neuroimaging studies with ADHD boys (Szobot et al., 2005) and ADHD patients with comorbid substance use disorders (Szobot et al., 2011). Respectively, the presence of both putative risk genotypes increased the perfusion in the right middle temporal gyrus and reduced the

dopamine transporter occupancy by methylphenidate in caudate and putamen nuclei, after three weeks of treatment. An effect of *DRD4* VNTR was also observed by Kieling et al. (2006), who reported association between 7R allele and poorer performance in a neuropsychological test (Continuous Performance Test), with fewer errors for 4R/4R homozygosity. In 2007, Zeni et al. did not verify associations for any *DRD4* VNTR allele in their pharmacogenetic study. More recently, Akutagava-Martins et al., 2012 also did not report associations with 7R allele using a family-based method (FBAT). However, an under-transmission of 2R allele and an over-transmission of 4R allele were detected in patients of ADHD combined subtype. Overall, these results suggest a probably complex, not well understood contribution of *DRD4* gene in ADHD etiology in our population, demanding further studies with novel, refined analyses approaches.

The aim of the present study was therefore verify the possibility of association between 5-HTTLPR/rs25531 triallelic form and ADHD. Additionally, we sought to analyze the hypothesis of gene-gene interaction between *5-HTT* and *DRD4* loci, using data obtained from both this study and previous investigations carried out by our group.

Material and Methods

Participants

In order to achieve the goals of this study we employed clinical and demographic measures as well as 5-HTTLPR/rs25531 and *DRD4* 48bp VNTR genotype data, acquired from 478 ADHD nuclear families (possessing at least one ADHD offspring) and 100 controls, including both children and adolescents. These participants were enrolled by our research group previously from two different scenarios: 1) the Attention-

Deficit/Hyperactivity Disorder Outpatient Program (ProDAH) hosted in Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) and 2) public schools from Porto Alegre, the capital of Brazil southernmost state.

The 378 probands obtained from ProDAH, named from now on as ProDAH sample, consisted of 16 patients (DNA from parents not available), 93 duos (mother and child), 269 trios (mother, father and child). All patients fulfilled DSM-IV diagnostic criteria for ADHD. The standard assessment protocol involved a three stage procedure described in details in Roman et al. (2001), Rohde (2002) and Polanczyk et al. (2007b). Briefly it comprehended: a) evaluation with a semi-structured interview (Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia for School-Age Children, Epidemiological Version – K-SADS-E) (Orvaschel, 1985), modified to include DSM-IV criteria and filled out with the parents by trained research assistants; b) discussion of derived diagnoses in a clinical committee, coordinated by a child and adolescent psychiatrist with large clinical experience; c) clinical evaluation of ADHD and comorbidities according to DSM-IV by a child and adolescent psychiatrist who had previously received K-SADS-E results and conducted the interviews with parents (generally the mother) and the patient. In case of a diagnostic discrepancy in the three stage procedure, preference was given to the diagnoses derived from clinical interviews. A cognitive evaluation based on cube and vocabulary subtests of Weschler Intelligence Scale – Third edition (WISC-III; Weschler, 1991) was performed by trained psychologists for estimating IQ. Data concerning Swanson, Nolan and Pelham Scale - version IV (SNAP-IV), a scale that measures symptom scores in areas of inattention, hyperactivity, impulsivity and opposition (Swanson et al., 2001) were also obtained in part of the sample. Social-demographic and clinical information was systematically collected from patients and their parents.

The sample obtained from public schools, named from now on as school sample, included 100 nuclear families (27 duos and 73 trios) and 100 controls, being the patients only of ADHD inattentive subtype. Initially students were identified as possible cases by teachers trained by a child and adolescent psychiatrist who teach them to detect symptoms of inattention in individuals. After identification of possible patients, these were sent to ProDAH where they underwent to the same diagnostic protocol described above. Controls were selected at the same school grades the patients came from, also based on teachers' scores in the SNAP-IV. After this step, the individuals were invited to diagnostic phase and, after full clinical assessment by a child psychiatrist, 100 controls without ADHD, mental retardation and psychosis were included in the sample. Social-demographic information was also collected. More details in the enrollment of both patients and controls can be seen in Schmitz et al. (2006).

The backgrounds have made ProDAH patients different from the ones obtained through public schools in regard to clinical and demographic measures (age, ethnicity, ADHD subtype composition and SNAP scores; data not shown, but available upon request). Due to this fact, the samples were joined for analysis only for inattentive patients, and logistic regression analyses, what is well stated in results.

All parents gave written informed consent and the patients and controls agreed verbally to participate. This study was approved by the local Ethics Committee of HCPA.

Genotyping

DNA was essentially acquired from a 5 mL blood sample collected from each patient (and from their biological parents whenever possible) and each control (Roman et al., 2001; Polanczyck et al., 2007b; Salatino-Oliveira et al., 2012; Schmitz et al., 2006),

followed by a DNA extraction carried out in accordance with the Lahiri-Nurnberger salting out method (Lahiri and Nurnberger, 1991). Specific *5-HTT* genomic sequences containing the polymorphisms 5-HTTLPR and rs25531 were amplified by polymerase chain reaction (PCR), using primers described in a previous work (Kaiser et al., 2001). Allelic discrimination based on 5-HTTLPR polymorphism (S and L alleles) was identified directly by electrophoresis in agarose gels stained with ethidium bromide. To genotype SNP rs25531, PCR products from 5-HTTLPR long allele-carriers were additionally incubated with *MspI* restriction endonuclease to discriminate L_A from L_G individuals in a next round of agarose electrophoresis (see details in Stein et al., 2006).

DRD4 VNTR was genotyped previously by Roman et al., (2001) and Akutagava-Martins and colleagues (2012) in accordance with the protocol described in Roman et al., (2001).

Statistical analyses

Allele and genotype frequencies were obtained by counting. Hardy-Weinberg Equilibrium was tested by Genepop 4.0 software (Rousset, 2008). Association hypothesis between *5-HTT* marker and ADHD was ascertained by a family-based approach, through FBAT 2.0.2 software (Laird et al., 2000). The possibility of association between *5-HTT* and ADHD, and the possibility of gene-gene interaction in the disorder were further tested using SPSS 18.0 software.

Initially, a Pearson's chi-square test between both loci was used. This strategy allows verifying if any statistical association exists between both genes, that is, if one allele/genotype at one locus is significantly associated with the presence of a given allele/genotype at the other locus (Yang et al., 2009).

Secondly, we applied a Binary Logistic Regression Model. For this analysis, we fitted patient's data from whole sample (478 cases vs. 100 controls) to a model that contemplated two main effects (both loci), one interaction term (between loci) and potential confounders in predicting the categorical outcome used (ADHD status), and which were reported as odds ratio (OR) with 95 % confidence intervals (CI).

Finally, we performed linear analyses, through *One-Way* ANOVA tests. At first, normality appreciation was carried out for all quantitative variables and variable transformation was performed whenever one has failed to present normal distribution. Association with ADHD and gene-gene interaction hypothesis was performed by fit our data to a General Linear Model with two main effects (*DRD4* and *5-HTT* triallelic genotype data) and one interaction term, controlling possible confounders. Only ProDAH probands (n=378) were included in this analysis and the outcomes of the model were the four possible scores from SNAP-IV scale (inattention, hyperactivity/impulsivity and ODD sub-scores; and total score). All of these measures are quantitative traits supposedly increased in ADHD patients.

In both regression models, Pearson's chi-square test, Student's t-test, Pearson's correlation and *One-Way* ANOVA were used to characterize and compare clinical parameters in different groups (controls and cases). Also, these analyses allowed identifying potential confounders, which were included as covariates in the models when associated with both the study factors (at least one) and outcome, defined by a $P \leq 0.20$.

In all association and gene-gene interaction tests statistical significance was considered when $P < 0.05$.

Results

Demographic and clinical data from both patients and controls were collected throughout the probands' enrollment stage and can be seen elsewhere – i.e. Akutagava-Martins et al. (2012) for ProDAH sample and Schmitz et al. (2006) for school sample (patients and controls). Due to significant differences between patients from both groups regarding some clinical and demographic measures, data from school sample were included only in family-based analyses of predominantly inattentive patients, in Pearson's chi-square test and in logistic regression analysis. The control group was included only in logistic regression tests.

Analyses concerning *DRD4* locus were previously performed by our group (Roman et al., 2001; Akutagava-Martins et al., 2012). Considering later data, four polymorphisms were investigated, three SNPs in promoter region (120bp tandem duplication, rs747302 and rs1800955) and the exon 3 48bp VNTR. For this one, frequencies were 0.083 for 2R, 0.677 for 4R, 0.188 for 7R and 0.052 for the remaining observed alleles (3R, 5R, 6R, 8R and 9R). Allele frequencies were calculated for each locus considering only unrelated patients from European descent (n=371). Both allele and genotype frequencies are in agreement with literature for this ethnic group (for references see Akutagava-Martins et al., 2012). Genotype frequencies did not significantly deviate from expected according to Hardy-Weinberg Equilibrium (data not shown) for all loci. Applying the FBAT methodology, the main results showed significant deviations from the expected number of transmissions from parents to offspring for two alleles, being a deficit for 2R allele and an excess for 4R allele, both in ADHD combined subtype patients. No effect was detected for 7R allele.

All analyses concerning *5-HTT* locus were performed in the present study. The final genotyped data set consisted of 478 patients of which 322 (67.4%) had both biological parents available, 131 (27.4%) had only one, and 24 (5.02%) had no one. Allele frequencies for 5-HTTLPR/rs25531 polymorphism were calculated considering only unrelated patients from European descent (n=363). The L_A allele was the most common, with an observed frequency of 0.50, while the frequencies for S allele and L_G allele were 0.44 and 0.06, respectively. Genotype frequencies for *5-HTT* polymorphisms (Table 1) did not significantly deviate from expected according to Hardy-Weinberg Equilibrium. Both frequencies (for alleles and genotypes) were in agreement with previous reports for this ethnic group (Hu et al., 2006 and Wendland et al., 2008). The frequencies for S and L alleles observed earlier in our population (Guimarães et al., 2007; Guimarães et al., 2009; Segal et al., 2009) are also concordant with the present frequencies, if grouping L_A and L_G.

Association analyses through FBAT were performed for *5-HTT* locus only. All genotyped individuals were included, although in four different groups: 1) ProDAH sample; 2) probands of combined subtype only (from ProDAH sample); 3) probands of inattentive subtype only (from both ProDAH and schools); and 4) probands presenting ODD and/or CD comorbidities (from ProDAH sample). In these four different analyses there was no statistically significant difference between observed and expected transmissions for 5-HTTLPR/rs25531 alleles in ADHD nuclear families, with *P* values ranging from 0.152 to 0.902 (Table2).

To test the hypothesis of interaction, we used three kinds of statistical tests: Pearson's chi-square, Binary Logistic Regression Model and *One-Way* ANOVA. For these analyses, patients were grouped according to the presence of the putative risk allele (7R) at

DRD4 locus, being nominated 7R-carriers and 7R-noncarriers; for 5-*HTT*, patients were grouped according to transcriptional efficiency of 5-HTTLPR/rs25531 genotypes: low (SS; SL_G; L_GL_G), mid (SL_A; L_AL_G) and high (L_AL_A).

The Pearson's chi-square test was performed only in cases, considering the whole sample (ProDAH + school). In this crosstab, rows hosted *DRD4* information (7R-carriers vs. 7R-noncarriers) and columns received 5-*HTT* data (low vs. mid vs. high). As can be seen in Table 3, none genotype/allele group at one locus was significantly associated with any genotype/allele group at the other ($P= 0.565$). The control group was also analyzed by Pearson's chi-square, also showing no associations (data not shown, but available upon request).

In logistic regression model, *DRD4* 7R-carriers (vs. noncarriers) and 5-*HTT* low-carriers (vs. mid vs. high) were the groups compared. Here we fitted the data to our hypothetical model (described in material and methods). However, as depicted in Table 4, there was no statistical significance observed by this approach ($0.400 \leq P \leq 0.852$).

Finally, data on patients were used in four different linear models proposed for each quantitative outcome assessed (total SNAP-IV score and their three sub-scores). Similar to the logistic regression, we hypothesized four linear models where *DRD4* and 5-*HTT* interacts and controlled each model for its possible confounders. No statistical significance was achieved in these approaches and results from these dimensional analyses can be seen in Table 5 ($0.073 \leq P \leq 0.753$).

Discussion

In the present study, for the first time, analyses concerning ADHD children and adolescents and the triallelic form of the polymorphism 5HTTLPR/rs25531 were carried out to investigate the possibility of association with the disease itself. Moreover, our study was the second in the worldwide literature (and the first regarding Brazilian population) to analyze gene-gene interaction between *5-HTT* and *DRD4 loci* in ADHD patients.

In previous studies of our group, there was no detected effect for *5-HTT* gene (Guimarães et al., 2007; Zeni et al. 2007). Investigating the biallelic 5-HTTLPR system, these reports did not show any statistical association with ADHD phenotype and methylphenidate response or side effects, respectively. Even with these results, we further analyzed the *5-HTT* role in our population, increasing the sample size and re-genotyping individuals for 5-HTTLPR/rs25531. The re-genotyping has been proposed to confirm findings obtained with the biallelic system and also to further understand the role of *5-HTT* gene in ADHD samples (Hu et al. 2005; Hu et al. 2006; Wendland et al. 2006; Murphy and Moya, 2011). However, we were not able to find any association of 5-HTTLPR/rs25531 triallelic form with ADHD by FBAT approach either in whole sample or subgroups of patients, corroborating our previous results.

Considering that both genotype analyses showed negative results, we could state that the *5-HTT* gene has no influence in ADHD etiology in our population, diverging from the literature (Gizer et al., 2009). On the other hand, the lack of association with L_A and/or L_G alleles could suggest a type 2 error in the present study, due to, for example, a reduced sample size and different sources of heterogeneity. Although we believe our sample size is quite good for single locus analyses, heterogeneity indeed could have influenced our data. As pointed out by the same metanalytic review (Gizer et al., 2009), the heterogeneity

among different studies might be modifying the results, either for detecting or no detecting association with L alleles. However, it is interesting to note that other studies have failed to observe association with any allele or genotype (Xu et al., 2005; Langley et al., 2003; Kim et al., 2005). It is possible that phenotypic heterogeneity regarding, for example, clinical characteristics of each analyzed sample explain the conflicting findings, including ours. Genetic heterogeneity involving *5-HTT* locus can also contribute for divergent results.

In this sense, the analysis of rs25531 inside 5-HTTLPR could be important. Considering the functional relevance of this SNP, it is possible that previous positive biallelic findings reflect in reality an overestimated or underestimated *5-HTT* effect due to the grouping of L_A and L_G alleles. However, only two studies with ADHD-related phenotypes have given attention to this aspect so far, making more appropriate comparisons very limited (Murphy and Moya, 2011). Although using different approaches (pharmacogenetic x association, and ADHD diagnosis x neuropsychological trait related to ADHD, respectively), our results are in accordance with the data from Tahoor et al. (2008) and in disagreement with the findings from Sonuga-Barke et al (2011). This later study, however, is important to validate the present findings. The association with S allele was verified through both biallelic and triallelic system; thus, although indicated, the re-analyses of 5HTTLPR in a triallelic manner will not necessarily change the results obtained for a previously analyzed sample. That is, we probably could not ascribe our results to methodological errors. Additionally, although positive, the findings from Sonuga-Barke et al. (2011) are in the opposite direction from the literature, indicating that the effect of *5-HTT* may be more complex than a simple association with L alleles.

Genetic heterogeneity involving *5-HTT* locus as a source of inconsistencies among different studies can also be due to allelic heterogeneity. In our population, this has already been suggested by Genro et al. (2008) for dopamine transporter gene (*DAT1*) and by Tovo-Rodrigues et al. (2011) for *DRD4* gene. In the former, an association with a haplotype derived from five SNPs located in 5' region was detected, regardless of no observed effect for the 3' VNTR, strongly suggested as the risk variant. Tovo-Rodrigues et al. (2011), re-sequencing 7R homozygous and 4R homozygous, showed an excess of rare variants in 7R alleles of ADHD patients when compared to controls, a difference not observed in 4R allele. Considering the size and variability level of *5-HTT* gene is reasonable to assume that different alleles could be influencing ADHD etiology in different populations, preventing the detection of association between the common L alleles and ADHD in some of them. On the other hand, the truly functional polymorphism might be in Linkage Disequilibrium (LD) with 5-HTTLPR /rs25531, explaining the positive results in other samples.

The divergences in results obtained from ADHD and *5-HTT* association studies suggest that different, novel approaches of analyses can be very helpful to clarify the putative role of *5-HTT* gene in the disease etiology. In this sense, we applied three statistical tests to investigate the possibility of interaction between 5-HTTLPR/rs25531 at *5-HTT* locus and the 48bp VNTR at *DRD4* locus. However, we were not able to detect any interaction effect, even using different methodologies and both categorical (ADHD status) and quantitative (SNAP-IV scores) outcomes.

To our knowledge, this is the first study to analyze the possibility of interaction between 5-HTTLPR/rs25531 and the 48bp VNTR of *DRD4* in DSM-IV ADHD children and adolescents. There was just one previous report in the literature (Seeger et al, 2001),

which investigated the biallelic 5-HTTLPR system, response to methylphenidate (MPH) and prolactin concentrations in patients with hyperkinetic disorder (HD). The presence of 7R allele and LL genotype was associated to a reduced improvement in general functioning accompanied by different PL levels upon treatment, suggesting that this condition may be helpful in identifying MPH non-responders. Considering methodological issues, it is difficult to compare both studies. However, the opposite results indicate that the possibility of gene-gene interaction between dopaminergic and serotonergic systems should be further explored.

Regardless of negative results for *5-HTT* and conflicting results for *DRD4* in our population, we decided to test gene-gene interaction due to several reasons. The existence of a strong *a priori* biological hypothesis justifies the investigation of interaction even when individually association results are negatives or confuse (Cordell, 2009). The increasing number of evidences showing neurobiological interaction between dopaminergic and serotonergic systems (Oades, 2010; Di Giovanni 2010; Murphy and Moya, 2011) suggest this rationale applies here; *5-HTT* and *DRD4* genes thus seemed to be the obvious candidates due to the putative role both loci play in ADHD (Gizer et al., 2009). Moreover, it has been suggested that when two loci have no effect individually this frequently may be due to the fact these genes do not display marginal effects but present interaction effects. That is, a single-locus analysis would not reach statistical significance, but models with interaction terms would do (Cordell, 2002). Thus, our individual *5-HTT* and *DRD4* negative data can be a false negative, probably because there are several unknown factors contributing to the disease and, therefore, dissembling the effects of *5-HTT* and *DRD4* loci. The necessity of analyses concerning more sophisticated scenarios in

complex disorders, which could increase the power of detecting associations with small effect genes, has been indicated (Cordell, 2009).

The present interaction results must be faced with parsimony because there is no agreement in the literature about the best method to study gene-gene interactions. Regression-based approaches have been widely used and seem to be the most natural models, but they can fail when including several parameters (Cordell, 2009). Furthermore, additionally large sample sizes are needed to detect epistatic effects (Carlborg and Haley, 2004). These facts reduce the power of analysis and can have been a limitation of the present study. It is also important to note that in all interaction tests, for *DRD4* status, patients were grouped according to the presence or absence of 7R allele. This was made because the suggestion of 7R allele as one of the main susceptibility variants in ADHD etiology (Nikolaidis and Gray, 2010; Smith, 2010), and the agreement with some previous results from our group (Roman et al., 2001; Szobot et al., 2005; Szobot et al., 2011; Kieling et al., 2006). However, the findings from Akutagava-Martins et al. (2012) indicate that this assortment might not be the best for our patients. To comprehend *DRD4* genetic structure and function and then study its association with ADHD using phenotypes defined through different approaches might be important to elucidate the true contribution of this locus to the disease in our population, and thus carry on new interaction analyses.

Other important issue concerns to the difference between statistical interaction and biological interaction: one not implies the other. That is, it may seem reasonable to assume that biological interaction is a ubiquitous component of the underlying biological pathways that determine or influence diseases, but this does not mean that gene-gene interactions will be detected as a mathematical or statistical interaction (Greenland, 2009). Therefore,

negative results do not exclude the possibility of interaction between two loci, including 5-*HTT* and *DRD4* genes.

Although the present work had some limitations, it was the first to analyze 5-HTTLPR/rs25531 polymorphism in ADHD itself, and the first to test interaction between 5-*HTT* and *DRD4* in DSM-IV ADHD patients. We believe that, in our sample, current single-locus approaches are ineffective to detect a 5-HTTLPR/rs25531 influence, if it exists. Negative results from both association and interaction analyses do not exclude a 5-*HTT* effect or the interaction possibility either between 5-*HTT* and *DRD4* genes or between any of them and other loci. The pioneering nature of this study in ADHD field would probably work as a stimulus to other researchers to further investigate the issues presented herein.

Acknowledgments

Financial support for this study was provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS, RS, Brazil). The authors are very grateful to Professor Steve Faraone for his suggestions about gene-gene interaction analyses.

Conflict of interest: none declared.

References

Akutagava-Martins GC, Ferraz GR, Genro JP, Guimarães APM, Polanczyk GV, Zeni C, Schmitz M, Chazan R, Rohde LAP, Hutz MH, Roman T. 2012. Dopamine D4 receptor gene: Possible protective and risk alleles for ADHD in Brazilian population. Manuscript submitted to **American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics**.

American Psychiatric Association. 1994. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4. ed. (DSM-IV). **American Psychiatric Association**, Washington D. C.

Banaschewski T, Becker K, Scherag S, Franke B, Coghill D. 2010. Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder: an overview. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 19(3):237-57.

Biederman, J.; Faraone, S.V. 2005. Attention-deficit/hyperactivity disorder. **The Lancet** 366: 237-248.

Bush G. 2011. Cingulate, frontal, and parietal cortical dysfunction in attention-deficit/hyperactivity disorder. **Biol Psychiatry**. 15;69(12):1160-7.

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. **Compr Psychiatry**. 44(2):88-101.

Carlborg O, Haley CS. 2004. Epistasis: too often neglected in complex trait studies? **Nat Rev Genet**. 5(8):618-25.

Connor DF, Steeber J, McBurnett K. 2010. A review of attention deficit/hyperactivity disorder complicated by symptoms of oppositional defiant disorder or conduct disorder. **J Dev Behav Pediatr** 31:427–440.

Cordell HJ. 2009. Detecting gene-gene interactions that underlie human diseases. **Nature Reviews Genetics** 10:392-404.

Das M, Das Bhowmik A, Bhaduri N, Sarkar K, Ghosh P, Sinha S, Ray A, Chatterjee A, Mukhopadhyay K. 2011. Role of gene-gene/gene-environment interaction in the etiology of eastern Indian ADHD probands. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. 30;35(2):577-87.

Di Giovanni, G. 2010. Dopamine Interaction with other Neurotransmitter Systems: Relevance in the Pathophysiology and Treatment of CNS Disorders. **CNS Neuroscience & Therapeutics** 16: 125–126.

Enge S, Fleischhauer M, Lesch KP, Reif A, Strobel A. 2011a. Serotonergic modulation in executive functioning: linking genetic variations to working memory performance. **Neuropsychologia**. 49(13):3776-85.

- Enge S, Fleischhauer M, Lesch KP, Strobel A. 2011b. On the role of serotonin and effort in voluntary attention: evidence of genetic variation in N1 modulation. **Behav Brain Res.** 1;216(1):122-8.
- Faraone SV, Biederman J, Mick E. 2006. The age-dependent decline of attention deficit hyperactivity disorder: a meta-analysis of follow-up studies. **Psychol Med.** 36(2):159-65.
- Faraone, S. V.; Mick, E. 2010. Molecular Genetics of Attention Deficit Hyperactivity Disorder. **Psychiatr Clin N Am** 33:159–180.
- Genro JP, Polanczyk GV, Zeni C, Oliveira AS, Roman T, Rohde LA, Hutz MH. 2008. A common haplotype at the dopamine transporter gene 5' region is associated with attention-deficit/hyperactivity disorder. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet** 147B(8):1568-75.
- Gizer IR, Ficks C, Waldman ID. 2009. Candidate gene studies of ADHD: a meta-analytic review. **Hum Genet.** 126(1):51-90.
- Greenland S. 2009. Interactions in epidemiology: relevance, identification, and estimation. **Epidemiology** 20, 14–17.
- Guimarães AP, Schmitz M, Polanczyk GV, Zeni C, Genro J, Roman T, Rohde LA, Hutz MH. 2009. Further evidence for the association between attention deficit/hyperactivity disorder and the serotonin receptor 1B gene. **J Neural Transm.** 116(12):1675-80.
- Guimarães AP, Zeni C, Polanczyk GV, Genro JP, Roman T, Rohde LA, Hutz MH. 2007. Serotonin genes and attention deficit/hyperactivity disorder in a Brazilian sample: preferential transmission of the HTR2A 452His allele to affected boys. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.** 5;144B(1):69-73.
- Hamilton SS, Armando J. 2008. Oppositional defiant disorder. **Am Fam Physician** 78:861–866.
- Hu X, Oroszi G, Chun J, Smith TL, Goldman D, Schuckit MA. 2005. An expanded evaluation of the relationship of four alleles to the level of response to alcohol and the alcoholism risk. **Alcohol Clin Exp Res.** 29(1):8-16.
- Hu XZ, Lipsky RH, Zhu G, Akhtar LA, Taubman J, Greenberg BD, Xu K, Arnold PD, Richter MA, Kennedy JL, Murphy DL, Goldman D. 2006. Serotonin transporter promoter gain-of-function genotypes are linked to obsessive-compulsive disorder. **Am J Hum Genet.** 78(5):815-26.
- Kaiser R, Tremblay P-B, Schmider J, Henneken M, Dettling M, Müller-Oerlinghausen B, Uebelhack R, Roots I, Brockmüller J. 2001. Serotonin transporter polymorphisms: no association with response to antipsychotic treatment, but associations with the schizoparanoid and residual subtypes of schizophrenia. **Molecular Psychiatry** 6, 179–185
- Kent L, Doerry U, Hardy E, Parmar R, Gingell K, Hawi Z, Kirley A, Lowe N, Fitzgerald M, Gill M, Craddock N. 2002. Evidence that variation at the serotonin transporter gene influences susceptibility to attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): analysis and pooled analysis. **Mol Psychiatry.** 7(8):908-12.

- Kieling C, Roman T, Doyle AE, Hutz MH, Rohde LA. 2006. Association between DRD4 gene and performance of children with ADHD in a test of sustained attention. **Biol Psychiatry**. 15;60(10):1163-5.
- Kim SJ, Badner J, Cheon KA, Kim BN, Yoo HJ, Kim SJ, Cook E Jr, Leventhal BL, Kim YS. 2005. Family-based association study of the serotonin transporter gene polymorphisms in Korean ADHD trios. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet**. 5;139B(1):14-8.
- Lahiri, D.K.; Nurnberger, J.I. 1991. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nuclei Acids Res** 19: 5444.
- Laird N, Horvath S, Xu X. 2000. Implementing a unified approach to family based tests of association. **Genet Epidemiol** 19: S36–S42.
- 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, Greenberg BD, Higley JD. 2002. Serotonin transporter, personality, and behavior: toward dissection of gene–gene and gene–environment interaction. In: Benjamin J, Ebstein RP, Belmaker RH, editors. **Molecular genetics and the human personality**. Washington, D.C.: American Psychiatric Publishing. p. 109–36.
- Lesch KP, Gross J, Franzek E, Wolozin BL, Riederer P, Murphy DL. 1995. Primary structure of the serotonin transporter in unipolar depression and bipolar disorder. **Biol Psychiatry**. 15;37(4):215-23.
- Lucki I. 1998. The spectrum of behaviors influenced by serotonin. **Biol Psychiatry**. 1;44(3):151-62.
- Luman, M.; Tripp, G.; Scheres, A. 2010. Identifying the neurobiology of altered reinforcement sensitivity in ADHD: A review and research agenda. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews** 34: 744–754.
- Manor I, Eisenberg J, Tyano S, Sever Y, Cohen H, Ebstein RP, Kotler M. 2001. Family-based association study of the serotonin transporter promoter region polymorphism (5-HTTLPR) in attention deficit hyperactivity disorder. **Am J Med Genet**. 8;105(1):91-5.
- Murphy DL, Moya PR. 2011. Human serotonin transporter gene (SLC6A4) variants: their contributions to understanding pharmacogenomic and other functional G×G and G×E differences in health and disease. **Curr Opin Pharmacol**. 11(1):3-10.
- National Institute of Health. 2000. National Institute of Health Consensus Development Conference Statement: Diagnosis and treatment of ADHD. **J Am Acad Child Adolesc Psychiatry** 39: 182-193.
- Nikolaidis A, Gray JR (2010) ADHD and the DRD4 exon III 7-repeat polymorphism: an international meta-analysis. **Soc Cogn Affect Neurosci** 5(2-3):188-93.

Oades R. 2010. The Role of Serotonin in Attention-Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD). In Handbook of Behavioral Neuroscience. Volume 21, 2010, Pages 565–584.

Oak, J.N.; Oldenhof, J.; Van Tol, H.H. 2000. The dopamine D(4) receptor: one decade of research. **Eur J Pharmacol.** 29;405(1-3):303-27.

Orvaschel H. 1985. Psychiatric interviews suitable for use in research with children and adolescents. **Psychopharmacol Bull** 21(4):737-45.

Polanczyk G, Zeni C, Genro JP, Guimarães AP, Roman T, Hutz MH, Rohde LA. 2007b. Association of the adrenergic alpha2A receptor gene with methylphenidate improvement of inattentive symptoms in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder. **Arch Gen Psychiatry** 64(2):218-24.

Polanczyk, G., de Lima, M.S., Horta, B.L., Biederman, J., Rohde, L.A. 2007a. The worldwide prevalence of ADHD: a systematic review and metaregression analysis. **Am J Psychiatry** 164:942-8.

Popova NK. 2008. From gene to aggressive behavior: the role of brain serotonin. **Neurosci Behav Physiol.** 38(5):471-5.

Qian Q, Wang Y, Li J, Yang L, Wang B, Zhou R, Glatt SJ, Faraone SV. 2007. Evaluation of potential gene-gene interactions for attention deficit hyperactivity disorder in the Han Chinese population. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.** 5;144B(2):200-6.

Rohde, L.A. 2002. ADHD in Brazil: the DSM-IV criteria in a culturally different population. **J Am Acad Child Adolesc Psychiatry** 41(9):1131-3.

Roman T, Bau CHD, Almeida S, Hutz MH (1999). Lack of association of the dopamine D4 receptor gene polymorphism with alcoholism in a Brazilian population. **Addiction Biology** 4: 203-207.

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.** 8;105(5):471-8.

Rousset, F., 2008. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. **Mol. Ecol. Resources** 8: 103-106.

Salatino-Oliveira A, Genro JP, Guimarães AP, Chazan R, Zeni C, Schmitz M, Polanczyk G, Roman T, Rohde LA, Hutz MH. 2012. Catechol-O-methyltransferase Val (158) Met polymorphism is associated with disruptive behavior disorders among children and adolescents with ADHD. **J Neural Transm.** Jan 21. [Epub ahead of print].

Schmitz M, Denardin D, Laufer Silva T, Pianca T, Hutz MH, Faraone S, Rohde LA. 2006. Smoking during pregnancy and attention-deficit/hyperactivity disorder, predominantly inattentive type: a case-control study. **J Am Acad Child Adolesc Psychiatry** 45(11):1338-45.

- Segal J, Schenkel LC, Oliveira MH, Salum GA, Bau CH, Manfro GG, Leistner-Segal S. 2009. Novel allelic variants in the human serotonin transporter gene linked polymorphism (5-HTTLPR) among depressed patients with suicide attempt. **Neurosci Lett.** 13;451(1):79-82.
- Seeger G, Schloss P, Schmidt MH. 2001. Marker gene polymorphisms in hyperkinetic disorder--predictors of clinical response to treatment with methylphenidate? **Neurosci Lett.** 2;313(1-2):45-8.
- Smith TF (2010) Meta-analysis of the heterogeneity in association of DRD4 7-repeat allele and AD/HD: stronger association with AD/HD combined type. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet** 153B(6):1189-99.
- Sonuga-Barke EJ, Kumsta R, Schlotz W, Lasky-Su J, Marco R, Miranda A, Mulas F, Oades RD, Banaschewski T, Mueller U, Andreou P, Christiansen H, Gabriels I, Uebel H, Kuntsi J, Franke B, Buitelaar J, Ebstein R, Gill M, Anney R, Roeyers H, Rothenberger A, Sergeant J, Steinhausen HC, Asherson P, Faraone SV. 2011. A functional variant of the serotonin transporter gene (SLC6A4) moderates impulsive choice in attention-deficit/hyperactivity disorder boys and siblings. **Biol Psychiatry.**1;70(3):230-6.
- Stein MB, Seedat S, Gelernter J. 2006. Serotonin transporter gene promoter polymorphism predicts SSRI response in generalized social anxiety disorder. **Psychopharmacology.** 187(1):68-72.
- Stergiakouli E, Thapar A. 2010 Fitting the pieces together: current research on the genetic basis of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD).**Neuropsychiatr Dis Treat.** 7;6:551-60.
- Swanson, J.M.; Kraemer, H.C.; Hinshaw, S.P.; Arnold, L.E.; Conners, C.K.; Abikoff, H.B. e cols. 2001. Clinical relevance of the primary findings of the MTA: success rates based on severity of ADHD and ODD symptoms at the end of treatment. **J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.** 40: 168-79.
- Szobot C, Roman T, Cunha R, Acton P, Hutz M, Rohde LA. 2005. Brain perfusion and dopaminergic genes in boys with attention-deficit/hyperactivity disorder. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.** 5;132B(1):53-8.
- Szobot CM, Roman T, Hutz MH, Genro JP, Shih MC, Hoexter MQ, Júnior N, Pechansky F, Bressan RA, Rohde LA. 2011. Molecular imaging genetics of methylphenidate response in ADHD and substance use comorbidity. **Synapse.** 65(2):154-9.
- Tharoor H, Lobos EA, Todd RD, Reiersen AM. 2008. Association of dopamine, serotonin, and nicotinic gene polymorphisms with methylphenidate response in ADHD. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.** 5;147B(4):527-30.
- Tovo-Rodrigues L, Rohde LA, Roman T, Schmitz M, Polanczyk G, Zeni C, Marques FZ, Contini V, Grevet EH, Belmonte-de-Abreu P, Bau CH, Hutz MH. 2011. Is there a role for

rare variants in DRD4 gene in the susceptibility for ADHD? Searching for an effect of allelic heterogeneity. **Mol Psychiatry**. Mar 15.

Wallis, D.; Russell, H.F.; Muenke, M. 2008. Review: Genetics of attention deficit/hyperactivity disorder. **J Pediatr Psychol** 33(10): 1085-1099.

Wechsler, D (1991) The Wechsler intelligence scale for children—third edition. San Antonio, TX: The Psychological Corporation.

Wendland JR, Moya PR, Kruse MR, Ren-Patterson RF, Jensen CL, Timpano KR, Murphy DL. 2008. A novel, putative gain-of-function haplotype at SLC6A4 associates with obsessive-compulsive disorder. **Hum Mol Genet.** 1;17(5):717-23.

Wendland, J.R.; Martin, B.J.; Kruse, M.R.; Lesch, K.P.; Murphy, D.L. 2006. Simultaneous genotyping of four functional loci of human SLC6A4, with a reappraisal of 5-HTTLPR and rs25531. **Mol Psychiatry** 11:224-226.

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.** 5;139B(1):11-3.

Yang Y, He C, Ott J. 2009. Testing association with interactions by partitioning chi-squares. **Ann Hum Genet.** 73(1):109-17.

Zeni CP, Guimarães AP, Polanczyk GV, Genro JP, Roman T, Hutz MH, Rohde LA. 2007. No significant association between response to methylphenidate and genes of the dopaminergic and serotonergic systems in a sample of Brazilian children with attention-deficit/hyperactivity disorder. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.** 5;144B(3):391-4.

Table 1. Genotype frequencies (%) of unrelated patients from European descent (n=363).

5-HTTLPR/rs25531					
SS	SL _A	SL _G	L _A L _A	L _A L _G	L _G L _G
18.5	46.8	4.4	22.6	7.7	0

Table 2. FBAT analyses for 5HTTLPR/rs25531 polymorphism in the total ProDAH sample (all diagnostic subtypes), patients of combined subtype, patients of inattentive subtype and ADHD probands with oppositional defiant disorder (ODD) and/or conduct disorder (CD).

“Sub-samples”	Allele	N ^a	Observed ^b	Expected ^c	Z	P
Total	S	188	165	168.5	-0.435	0.663
ProDAH sample	L _A	186	194	193	0.123	0.902
	L _G	64	38	35.5	0.593	0.592
Combined subtype ^d	S	111	93	100.5	-1.205	0.228
	L _A	111	119	113	0.949	0.342
	L _G	40	25	23.5	0.438	0.661
Inattentive subtype ^e	S	118	117	108	1.432	0.152
	L _A	112	105	113	-1.289	0.197
	L _G	35	18	19	-0.324	0.745
ADHD + ODD and/or CD ^d	S	98	89	87.5	0.254	0.799
	L _A	99	96	99	-0.507	0.612
	L _G	36	21	19.5	0.480	0.630

a Number of informative families included in test.

b Observed number of transmissions.

c Expected number of transmissions under the null hypothesis of association.

d Obtained from ProDAH sample.

e Obtained from ProDAH sample and public schools sample.

Table 3. Pearson’s Chi-square to test interaction between *5-HTT* and *DRD4* loci.in ADHD patients.

<i>DRD4</i>	<i>5-HTT</i> Low	<i>5-HTT</i> Mid	<i>5-HTT</i> High
7R allele noncarriers	78	153	64
7R allele carriers	40	89	44

$P=0.565$. Groups compared: *DRD4*=7R **allele** noncarriers vs.7R **allele** carriers. *5-HTT*= Low: SS or SL_G or L_GL_G **genotype** carriers; Mid: L_AL_G or SL_A **genotype** carriers and High: L_AL_A **genotype** carriers. Cells contain number of individuals that carry each combination of *DRD4* and *5-HTT* alleles/genotypes.

Table 4. Binary logistic regression to verify effects of *DRD4* alleles and *5-HTT* genotypes on ADHD status.

Variables	B	S.E.	Odds Ratio	95% CI	P
<i>DRD4</i> VNTR 48-bp^a	0.088	0.473	1.092	0.432-2.758	0.852
5-HTTLPR/rs25531					
Low group ^b (reference group)	-	-	1	-	-
Mid group ^c	0.278	0.361	1.321	0.650-2.681	0.441
High group ^d	-0.238	0.419	0.789	0.347-1.791	0.570
<i>DRD4</i> VNTR 48-bp * 5-HTTLPR/rs25531					
<i>DRD4</i> VNTR 48-pb * Mid group	-0.487	0.578	0.615	0.198-1.910	0.400
<i>DRD4</i> VNTR 48-pb * High group	0.581	0.730	1.787	0.427-7.474	0.426

543 individuals were included in binary logistic regression analysis (ProDAH sample + schools sample + controls). The ADHD cases were coded as 1 and the controls as 0 (reference category).

Hosmer-Lemeshow Goodness-of-Fit Test $P = 0.454$.

Fully adjusted for gender, ethnicity and oppositional defiant disorder (ODD) and Conduct Disorder (CD) statuses.

^a 7R **allele** noncarriers (reference group) coded as 0 and 7R **allele** carriers = 1.

^b SS or SL_G or L_GL_G **genotype** carriers = 0.

^c L_AL_G or SL_A **genotype** carriers = 1.

^d L_AL_A **genotype** carriers = 2.

Abbreviations: S.E., Standard Error; CI, Confidence Interval.

Table 5. Linear analyses (*One-Way ANOVA*) to verify effects of *DRD4* alleles and *5-HTT* loci on ADHD quantitative measures.

Factors	Inattentive ¹		Hyperactive/ impulsive ²		Oppositional ³		Total ⁴	
	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
<i>DRD4</i> 48bp VNTR	0.099	0.753	0.1444	0.705	0.709	0.401	0.153	0.696
5HTTLPR/rs25531	1.605	0.203	2.640	0.073	0.504	0.605	0.794	0.453
<i>DRD4</i> 48bp VNTR*5HTTLPR/rs25531	1.566	0.211	0.535	0.596	1.569	0.210	1.247	0.289

Groups compared: *DRD4*=7R **allele** noncarriers vs.7R **allele** carriers. *5-HTT*= Low: SS or SL_G or L_GL_G **genotype** carriers; Mid: L_AL_G or SL_A **genotype** carriers and High: L_AL_A **genotype** carriers.

¹Covariables: age, ADHD subtype, ODD, CD, previous treatment and IQ.

²Covariables: age, ADHD subtype, ODD, CD, mood disorders and ethnic group.

³Covariables: age, ADHD subtype, ODD, CD, mood disorders, anxiety disorders and IQ.

⁴Covariables: age, ADHD subtype, ODD, CD, mood disorders and ethnic group.

Ao analisarmos os diferentes estudos de associação do *locus 5-HTT* com o TDAH (quer analisado como diagnóstico categórico, quer analisado por medidas quantitativas), é possível constatar uma clara inconsistência nos resultados publicados. As revisões sistemáticas sugerem o alelo L como de risco para o TDAH, porém com uma grande heterogeneidade entre os tamanhos de efeito (Gizer *et al.*, 2009). Por outro lado, alguns estudos obtiveram associações estatísticas com o alelo S, seja tendo como desfecho o TDAH em si, possíveis endofenótipos (como medidas neuropsicológicas), ou outros fenótipos e comportamentos relacionados ao transtorno, sugerindo que este alelo pode ser um alelo de risco em algumas populações (Li *et al.*, 2007; Sonuga-Barke *et al.*, 2011).

A descrição de uma troca de base (rs25531) dentro da inserção de 44pb do alelo L sugere que tais diferenças poderiam ser devidas à não investigação desse SNP nos estudos prévios com o 5-HTTLPR (Hu *et al.*, 2005; Wendland *et al.*, 2006). De certa forma, essa suposição encontra apoio quando se considera o significado funcional do rs25531. A troca A/G tem um grande impacto na eficácia transcricional do gene, comparável ao exercido pelo próprio indel de 44pb, a ponto de determinar um tipo de alelo longo (L_G) com eficácia similar ao alelo S (Hu *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2006). Essa “partição” do alelo L em diferentes grupos funcionais poderia minimizar os resultados contraditórios e de difícil interpretação, conforme discutido no Capítulo III da presente Dissertação, indicando a necessidade da investigação do sistema trialélico para o esclarecimento da influência desse gene no TDAH. Todavia, o único estudo, além do nosso, que re-geotipou sua amostra para o sistema trialélico (Sonuga-Barke *et al.*, 2011) não observou alteração do resultado bialélico, à semelhança dos resultados encontrados aqui. Isso já havia sido observado na nossa população, embora para um fenótipo totalmente diferente (Segal *et al.*, 2009), sugerindo que a ausência de efeito do rs25531 seja verdadeira. Diante desse quadro, indagamo-nos: o que, de fato, explica os resultados positivos de associação com o alelo S em algumas amostras? Por outro lado, o que justifica não encontrar associação nem com o alelo L (ou alelos L) nem com o S?

Considerando o significado funcional do polimorfismo 5-HTTLPR/rs25531, podemos supor que os resultados observados por Hu *et al.* em 2005 e 2006 sejam espúrios, ou parcialmente reais. Os dados inconsistentes dos estudos funcionais realizados com o VNTR de 48pb do gene *DRD4*, citados na introdução do presente trabalho, apoiam essa ideia. É clara, então, a necessidade de mais estudos funcionais com as variantes geradas pelo 5-HTTLPR/rs25531. Esses, porém, não têm sido tarefa fácil, em virtude da localização

preferencialmente encefálica de seus transcritos, proteínas e metabólitos. Restrições ético-legais óbvias, e mesmo metodológicas, inviabilizam estudos funcionais *in vivo* em humanos, com exceção dos estudos de neuroimagem funcional. Contudo, mesmo sendo uma estratégia viável, estudos de neuroimagem não estão livres de restrições éticas e logísticas importantes (Szobot *et al.*, 2005; Szobot *et al.*, 2011). O contraponto desse tipo de estudo são as estratégias utilizadas *in vitro*, sendo que inúmeros protocolos de culturas de células humanas já foram desenvolvidos para a investigação de genes de importância em sistemas de neurotransmissão. Porém, semelhantemente à neuroimagem, há inúmeras limitações das técnicas. Entre essas, podem se destacar a demora na realização dos protocolos e a laboriosidade das metodologias em si, o que torna o trabalho extremamente susceptível a falhas e desencorajador para pesquisadores que desejam seguir essa linha de investigação. O número reduzido de publicações na área, para diferentes genes, evidencia tais aspectos. (Belfer *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2004;). A bioinformática, com o avanço crescente no número de dados disponíveis e ferramentas desenvolvidas, certamente contribuirá para o estudo da funcionalidade das diferentes variantes gênicas, podendo ser uma das melhores estratégias em estudos futuros (Mooney *et al.*, 2010).

Uma explicação alternativa para os resultados divergentes poderia ser a existência de outro polimorfismo em Desequilíbrio de Ligação (DL) com o 5-HTTLPR/rs25531, ou mesmo outro *locus*, com impacto funcional sobre o gene *5-HTT*, mas apresentando padrões distintos de LD entre as diferentes populações já analisadas. A possibilidade de uma estruturação genética diferenciada na nossa população em relação às demais foi comentada brevemente no Capítulo III, tendo sido extensamente discutida para o *DRD4* (ver Akutagawa-Martins *et al.*, 2012), e parece ocorrer de fato. Então, que outro *locus* poderia influenciar a expressão, ou funcionamento, do gene *5-HTT*? Sabe-se que a região promotora apresenta variação estrutural importante, com outros polimorfismos funcionais além do 5HTTLPR/rs25531 (Murphy & Moya, 2011). Embora o efeito dessa variabilidade sobre o TDAH ainda não tenha sido investigado, polimorfismos como as trocas Ile425Val e Gly56Ala parecem modificar a função da região promotora, podendo, portanto, explicar parte do fenótipo em questão, como evidenciado para o autismo (Ma *et al.*, 2010). Outro polimorfismo que parece ser importante é um VNTR de 17pb presente no intron 2 (STin2). Vários alelos já foram descritos de acordo com o número de repetições presentes, tais como STin2.7, STin2.9, STin2.10, STin2.11 e STin2.12. Embora a função biológica desse polimorfismo seja ainda incerta, os alelos de 10 e de 12 repetições têm sido implicados em vias regulatórias da atividade transcricional, com o

alelo STin2.12 determinando uma transcrição reforçada em comparação aos produtos transcritos pelo STin2.10 (Liu *et al.*, 2011). Este polimorfismo já foi estudado no TDAH e em fenótipos relacionados, sendo o alelo STin2.10 sugerido como de risco (Gizer *et al.*, 2009). O gene *5-HTT* é bastante extenso (38 Kb); assim, é bem possível que diferentes padrões de DL estejam presentes, envolvendo não só a região promotora, mas toda a extensão do gene. Uma caracterização “população-específica” da sequência gênica do *locus 5-HTT*, aliada a novos estudos de funcionalidade, parece ser fundamental para apontar a real significância do sistema trialélico 5-HTTLPR/rs25531 na função gênica do *5-HTT*, e, conseqüentemente, nos fenótipos relacionados, incluindo o TDAH.

Quando se fala em *background* genético é necessário considerar não só o *locus* de interesse em si, mas também outros *loci* vizinhos (localizados um logo após o outro) e/ou sintênicos (localizados no mesmo cromossomo, não necessariamente lado a lado), e mesmo genes situados em diferentes cromossomos, que também podem interagir com a região genômica em questão, modificando seu efeito. Talvez o melhor exemplo para comentar essa suposição seja o do gene do receptor D2 de dopamina, ou *DRD2*. Com aproximadamente 270 Kb, este gene contém oito éxons e inclui um intron de tamanho em torno de 250 Kb separando o primeiro éxon dos demais, que codificam a proteína do receptor (Eubanks *et al.*, 2002). O *DRD2* tem predominantemente duas isoformas, uma longa e outra curta, as quais são geradas num *splicing* alternativo do éxon 6 do RNAm. Ambas isoformas mostram distintas funções *in vivo*, bem como uma capacidade diferencial para aumentar a concentração de receptores D2 (Zhang *et al.*, 2007).

Uma das principais variantes presentes neste *locus*, que também é uma das principais estudadas em psiquiatria, é o polimorfismo *TaqIA* (rs1800497). Este é caracterizado por uma troca C>T, que gera um sítio de restrição usualmente reconhecido pela endonuclease *TaqI*, com frequências variáveis entre as diferentes etnias e populações estudadas (Grandy *et al.*, 1993). Acreditava-se que esse polimorfismo estava localizado na região 3' do gene *DRD2*. Porém, posteriormente verificou-se que esse SNP está na verdade dentro do éxon 9 do gene *ANKK1* (*ankyrin repeat and kinase domain containing 1*), codificado pela sequência complementar ao *DRD2* no sentido reverso. A troca C>T leva à substituição Glu713Lys (E713 K) na proteína codificada pelo *ANKK1* (Neville *et al.*, 2004). A localização do *TaqIA* numa região codificante do *ANKK1* nos leva a questionar as razões pelas quais esse polimorfismo está associado ao receptor D2 de dopamina, uma vez que fica a jusante do códon de terminação deste (Ponce *et al.*, 2009).

Por outro lado, a funcionalidade deste polimorfismo parece estar relacionada à variação presente em outros genes da região cromossômica 11q23 (Yang *et al.*, 2008). Os genes *DRD2* e *ANKK1* formam um *cluster* juntamente com outros dois genes, o *NCAM1* (*neural cell adhesion molecule 1*) e o *TTC12* (*tetratricopeptide repeat domain 12*), bastante conservado ao longo da evolução dos vertebrados. Mais do que sintenia, estes genes apresentam uma vizinhança característica, sendo, de 5' para 3', *NCAM1-TTC12-ANKK1-DRD2* (Vieira, 2012). Embora ainda não se saiba com certeza o efeito de cada um destes polimorfismos sobre as funções biológicas relacionadas, a conservação marcante, tanto da sintenia como da vizinhança, desde aproximadamente o aparecimento dos tetrápodes, sugere que o *cluster* atue como um bloco funcional, o que é corroborado por evidências de interações gene-gene envolvendo estes *loci* (Huang *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2010; Yerushalmi & Teicher, 2007). Todos esses aspectos representam de certa forma uma mudança de paradigma no estudo das doenças psiquiátricas, ao menos em relação ao gene *DRD2*. A participação deste gene na etiologia do TDAH, apoiada por alguns relatos da literatura (Gizer *et al.*, 2009), certamente será entendida de forma mais detalhada e completa se futuros estudos de associação considerarem todo o *cluster*, modelo que pode, e deve, ser aplicado a outros genes candidatos.

O primeiro estudo de interação gene-gene no TDAH foi realizado pelo nosso grupo (Roman *et al.*, 2001), de uma forma bastante simples: o número de sintomas de cada área, i.e., desatenção e hiperatividade/impulsividade, foi comparado através de uma ANOVA entre pacientes que tinham o alelo 7R no *locus DRD4* e a homozigose do alelo 10R no *locus DAT1* e pacientes sem esta condição. Embora sugerido que esse tipo de estudo seja interessante em fenótipos complexos como o TDAH (Waldman & Gizer, 2006; Rommelse *et al.*, 2010; Cordell, 2009), poucos estudos vêm sendo realizados. É possível que isso ocorra devido à falta de consenso sobre a metodologia mais adequada para se testar interações gene-gene, e também devido à dificuldade em relacionar adequadamente interações detectadas estatisticamente a mecanismos biológicos. Porém, resultados de estudos recentes propondo mecanismos moleculares bastante plausíveis podem mudar as perspectivas para esse tipo de abordagem.

González *et al.* (2011) e Borroto-Escuela *et al.* (2011) mostraram que as proteínas receptoras D2 e D4 podem formar heterômeros, que modificam as funções exercidas pelos receptores individualmente. Entretanto, a eficiência do processo de heteromerização e seu impacto funcional são influenciados pelos polimorfismos presentes nos genes *DRD2* e *DRD4*.

Especificamente, a forma curta do D2 originada pelo *splicing* alternativo do éxon 6 formaria heterômeros na presença de alelos 2R e 4R para o *DRD4*, mas não com o alelo 7R, enquanto a forma longa do D2 seria capaz de heteromerizar com as três isoformas do D4, embora com a variante 7R isso se dê de maneira menos eficiente. As possíveis conseqüências biológicas e clínicas dessa heteromerização diferencial foram estudadas na nossa população através da análise do VNTR de 48pb do gene *DRD4* e do SNP rs2283265 (G>T) do gene *DRD2* (Mota *et al.*, 2012). Este SNP altera a expressão balanceada das isoformas longa e curta do *DRD2*, sendo que o alelo T favorece a inclusão do éxon 6, resultando na expressão da forma longa. Comparando alcoolistas e controles, foi observado que, dentre os portadores do alelo 7R do *DRD4*, havia um excesso de indivíduos GG na amostra de alcoolistas se comparada com os controles. Entretanto, entre os não portadores do 7R, a presença concomitante do genótipo GG foi menor dentre os alcoolistas do que nos controles. Considerando que o alelo T altera a taxa de expressão das isoformas do D2, sugeriu-se que a presença concomitante do alelo 7R no *DRD4* e do alelo T no *DRD2* confere proteção ao alcoolismo, já que, possivelmente, uma heteromerização menos eficiente atenuaria os efeitos individuais de cada alelo de risco. Ainda neste estudo, os resultados foram replicados independentemente em uma amostra de adultos com TDAH, que incluiu pacientes com comorbidade com abuso ou dependência de álcool, corroborando os efeitos de interação sugeridos (Mota *et al.*, 2012).

Todos os comentários feitos aqui representam temas e áreas de pesquisa ainda pouco exploradas no TDAH. Acreditamos que muitos estudos ainda são necessários, não só para esclarecer o papel dos diferentes genes de suscetibilidade em diferentes populações, mas também para se aprimorar as metodologias de estudo. Considerando a grande complexidade fenotípica do TDAH e sua importância epidemiológica, esse esforço certamente será contemplado em estudos futuros.

Referências Bibliográficas

Achenbach, T.M. 1991. Manual for the Child Behavior Checklist. **Burlington**: University of Vermont/Department of Psychiatry.

Acosta, M.T.; Arcos-Burgos, M.; Muenke, M. 2004. Attention deficit/hyperactivity disorder: Complex phenotype, single genotype? **Genet Med** 6: 1-15.

Adler, L.A.; Spencer, T.; Faraone, S.V; Reimherr, F.W.; Kelsey, D.; Michelson, D.; Biederman, J. 2005. Training Raters to Assess Adult ADHD: Reliability of Ratings. **Journal of Attention Disorders**. Vol. 8, N° 3: 21-126.

Akutagava-Martins GC, Ferraz GR, Genro JP, Guimarães APM, Polanczyk GV, Zeni C, Schmitz M, Chazan R, Rohde LAP, Hutz MH, Roman T. 2012. Dopamine D4 receptor gene: Possible protective and risk alleles for ADHD in Brazilian population. Manuscript being prepared to submit to American Journal of Medical Genetics Part B: **Neuropsychiatric Genetics**.

Alberts-Corush, J.; Firestone, P.; Goodman, J. T. 1986. Attention and impulsivity characteristics of the biological and adoptive parents of hyperactive and normal control children. **Am J Orthopsychiatry** 56:413–423.

American Psychiatric Association. 2002. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4. ed. (DSM-IV-TR). **American Psychiatric Association**, Washington D. C.

Andrade R, Barnes NM, Baxter G, Bockaert J, Branchek T, Cohen ML, Dumuis A, Eglen RM *et al.* 2010. 5-Hydroxytryptamine receptors, introductory chapter. Last modified on 2010-08-02. Accessed on 2010-10-14. IUPHAR database (IUPHAR-DB), <http://www.iuphar-db.org/DATABASE/FamilyIntroductionForward?familyId=1>.

Antypa, N.; Van der Does, A.J.W. 2010. Serotonin transporter gene, childhood emotional abuse and cognitive vulnerability to depression. **Genes, Brain and Behavior** 9: 615–620.

Arnsten, A.F.T.; Li, B-M. 2005. Neurobiology of executive functions: Catecholamine influences on prefrontal cortical functions. **Biol Psychiatry** 57: 1377-1384.

Asghari, V.; Sanyal, S.; Buchwaldt, S.; Paterson, A.; Jovanovic, V.; Van Tol, H.H. 1995. Modulation of intracellular cyclic AMP levels by different human dopamine D4 receptor variants. **J Neurochem** 65(3):1157-65.

Auerbach JG, Atzaba-Poria N, Berger A, Landau R, Arbelle S, Raz Y, Ebstein R. 2010. Dopamine risk and paternal ADHD symptomatology associated with ADHD symptoms in four and a half-year-old boys. **Psychiatr Genet**. 20(4):160-5.

Auerbach JG, Benjamin J, Faroy M, Geller V, Ebstein R. 2001a. DRD4 related to infant attention and information processing: a developmental link to ADHD? **Psychiatr Genet**. 11(1):31-5.

Auerbach JG, Faroy M, Ebstein R, Kahana M, Levine J. 2001b. The association of the dopamine D4 receptor gene (DRD4) and the serotonin transporter promoter gene (5-HTTLPR) with temperament in 12-month-old infants. **J Child Psychol Psychiatry**. 42(6):777-83.

- Banerjee, T.D.; Middleton, F.; Faraone, S.V. 2007. Environmental risk factors for attention-deficit hyperactivity disorder. **Acta Paediatr** 96:1269-74.
- Barkley RA. 1997. Behavioral inhibition, sustained attention, and executive functions: constructing a unifying theory of ADHD. **Psychol Bull.** 121(1):65-94.
- Barr CL. 2001. Genetics of childhood disorders: XXII. ADHD, Part 6: The dopamine D4 receptor gene. **J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.** 40(1):118-21.
- Belfer, I.; Buzas, B.; Hipp, H.; Phillips, G.; Taubman, J.; Lorincz, I.; Evans, C.; Lipsky, R.H.; Enoch, M-A; Max, M.B.; Goldman, D. 2005. Haplotype-based analysis of alpha 2A, 2B, and 2C adrenergic receptor genes captures information on common functional loci at each gene. **J Hum Genet** 50:12–20.
- Bellgrove, M.A.; Hawi, Z.; Lowe, N.; Kirley, A.; Robertson, I.H.; Gill, M. 2005. *DRD4* Gene Variants and Sustained Attention in Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD): Effects of Associated Alleles at the VNTR and -521 SNP. **Am J Med Genet** 136B: 81–86.
- Benjamin J, Osher Y, Kotler M, Gritsenko I, Nemanov L, Belmaker RH, Ebstein RP. 2000. Association between tridimensional personality questionnaire (TPQ) traits and three functional polymorphisms: dopamine receptor D4 (DRD4), serotonin transporter promoter region (5-HTTLPR) and catechol O-methyltransferase (COMT). **Mol Psychiatry.** 5(1):96-100.
- Benjamin, J.; Greenberg, B.D.; Murphy, D.L.; Li, L.; Patterson, C.; Hamer, D.H. 1996. Population and familial association between the D4 dopamine receptor gene and measures of novelty seeking. **Nat Genet** 12: 81-84.
- Biederman J, Petty CR, Clarke A, Lomedico A, Faraone SV 2011. Predictors of persistent ADHD: an 11-year follow-up study. **J Psychiatr Res.** Feb;45(2):150-5.
- Biederman, J. 2007. Advances in the neurobiology of ADHD. **CNS Spectr** 12:4(Suppl 6):6-7
- Biederman, J.; Faraone, S.V. 2005. Attention-deficit/hyperactivity disorder. **The Lancet** 366: 237-248.
- Biederman, J.; Spencer, T. 1999. Attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) as a noradrenergic disorder. **Biol Psychiatry** 46: 1234-1242.
- Björklund A, Dunnett SB. 2007. Dopamine neuron systems in the brain: an update. **Trends Neurosci.** 30(5):194-202.
- Blakely RD, Berson HE, Fremeau RT Jr, Caron MG, Peek MM, Prince HK, Bradley CC. 1991. Cloning and expression of a functional serotonin transporter from rat brain. **Nature.** 7;354(6348):66-70.
- Blakely RD, De Felice LJ, Hartzell HC. 1994. Molecular physiology of norepinephrine and serotonin transporters. **J Exp Biol.** 196:263-81.
- Borrito-Escuela DO, Van Craenenbroeck K, Romero-Fernandez W, Guidolin D, Woods AS, Rivera A, Haegeman G, Agnati LF, Tarakanov AO, Fuxe K. 2011. Dopamine D2 and D4

- receptor heteromerization and its allosteric receptor-receptor interactions. **Biochem Biophys Res Commun.** 8;404(4):928-34.
- Borycz, J.; Zapata, A.; Quiroz, C.; Volkow, N.D.; Ferré, S. 2008. 5-HT 1B receptor-mediated serotonergic modulation of methylphenidate-induced locomotor activation in rats. **Neuropsychopharmacology** 33: 619-626.
- Brookes KJ, Xu X, Chen CK, Huang YS, Wu YY, Asherson P. 2005. No evidence for the association of DRD4 with ADHD in a Taiwanese population within-family study. **BMC Med Genet.** 5;6:31
- Brust P, Zessin J, Kuwabara H, Pawelke B, Kretschmar M, Hinz R, Bergman J, Eskola O, Solin O, Steinbach J, Johannsen B. 2003. Positron emission tomography imaging of the serotonin transporter in the pig brain using [11C](+)-McN5652 and S-([18F]fluoromethyl)-(+)-McN5652. **Synapse.** 47(2):143-51.
- 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. **Compr Psychiatry.** 44(2):88-101.
- Cantwell DP. 1975 Genetic studies of hyperactive children: psychiatric illness in biologic and adopting parents. *Proc Annu Meet Am Psychopathol Assoc.*(63):273-80.
- Cardo, E.; Nevot, A.; Redondo, M.; Melero, A.; Azua, B.; Banda, G. G. D.; Servera, M. 2010. Trastorno por déficit de atención/hiperactividad: ¿un patrón evolutivo? **Rev Neurol** 50 (Supl 3): S143-S147.
- Chang FM, Kidd JR, Livak KJ, Pakstis AJ, Kidd KK. 1996. The world-wide distribution of allele frequencies at the human dopamine D4 receptor locus. **Hum Genet.** 98(1):91-101.
- Christman, A.K.; Fermo, J.D.; Markowitz, J.S. 2004. Atomoxetine, anovel tratment for attention-deficit/hyperactivity disorder. **Pharmacotherapy** 24: 1020-1036.
- Collier, D.A.; Stöber, G.; Li, T.; Heils, A.; Catalano, M.; Di Bella, D.; Arranz, M.J.; Murray, R.M.; Vallada, H.P.; Bengel, D.; Müller, C.R.; Roberts, G.W.; Smeraldi, E.; Kirov, G.; Sham, P.; Lesch, K.P. 1996. A novel functional polymorphism within the promoter of the serotonin transporter gene: possible role in susceptibility to affective disorders. **Mol Psychiatry** Dec 1(6):453-60.
- Connor, D.F.; Fletcher, K.E.; Swanson, J.M. 1999. A meta-analysis of clonidine for symptoms of ADHD. **J Am Acad Child Adolesc Psychiatry** 38: 1551-1559.
- Cook, E.H.; Stein, M.A.; Krasowski, M.D.; Cox, N.J.; Olkon, D.M.; Kieffer, J.E.; Leventhal, B.L. 1995. Association of attention deficit disorder and the dopamine transporter gene. **Am J Hum Gen** 56: 993-998.
- Cordell HJ. 2009. Detecting gene-gene interactions that underlie human diseases. **Nature Reviews Genetics** 10:392-404.
- Cormier E. 2008. Attention deficit/hyperactivity disorder: a review and update. **J Pediatr Nurs** 23(5): 345-57.

- Counts, C.A.; Nigg, J.T.; Stawicki, J.A.; Rappley, M.D.; Eye, A.V. 2005. Family adversity in DSM-IV ADHD combined and inattentive subtypes and associated disruptive behavior problems. **J Am Acad Child Adolesc Psychiatry** 44: 690-698.
- Cumyn, L.; French, L.; Hechtman, L. 2009. Comorbidity in adults with attention-deficit hyperactivity disorder. **Can J Psychiatry** 54:673– 683.
- Curatolo, P.; Paloscia, C.; D'Agati, E.; Moavero, R.; Pasini, A. 2009. The neurobiology of attention deficit/hyperactivity disorder. **European journal of paediatric neurology** 13: 299-304.
- Daviss, W. B. 2008 A review of co-morbid depression in pediatric ADHD: Etiology, phenomenology, and treatment. **J Child Adolesc Psychopharmacol** 18:565–571.
- De Graaf, R.; Kessler, R.C.; Fayyad, J.; Ten Have, M.; Alonso, J.; Angermeyer, M.; Borges, G.; Demyttenaere, K.; Gasquet, I.; De Girolamo, G.; Haro, J.M.; Jin, R.; Karam, E.G.; Ormel, J.; Posada-Villa, J. 2008. The prevalence and effects of adult attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) on the performance of workers: results from the WHO World Mental Health Survey Initiative. **Occup Environ Med** 65(12): 835-842.
- Deault, L. C. 2010. A Systematic Review of Parenting in Relation to the Development of Comorbidities and Functional Impairments in Children with Attention Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD). **Child Psychiatry Hum Dev** 41:168–192.
- Deutsch CK, Matthyse S, Swanson JM, Farkas LG. 1990. Genetic latent structure analysis of dysmorphology in attention deficit disorder. **J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.** 29(2):189-94.
- Di Giovanni, G. 2010. Dopamine Interaction with other Neurotransmitter Systems: Relevance in the Pathophysiology and Treatment of CNS Disorders. **CNS Neuroscience & Therapeutics** 16: 125–126.
- Di Giovanni, G.; Espósito, E.; Di Matteo, V. 2010. Role of Serotonin in Central Dopamine Dysfunction. **CNS Neuroscience & Therapeutics** 16: 179–194.
- Durston S, de Zeeuw P, Staal WG. 2009. Imaging genetics in ADHD: a focus on cognitive control. **Neurosci Biobehav Rev.** 33(5):674-89.
- Durston, S. 2010. Imaging genetics in ADHD. **NeuroImage** 15;53(3):832-8.
- Ebstein RP, Levine J, Geller V, Auerbach J, Gritsenko I, Belmaker RH. 1998. Dopamine D4 receptor and serotonin transporter promoter in the determination of neonatal temperament. **Mol Psychiatry.** 3(3):238-46.
- Ebstein, R.P.; Novick, O.; Umansky, R.; Priel, B.; Osher, Y.; Blaine, D.; Bennet, E.R.; Nemanov, L.; Katz, M.; Belmaker, R.H. 1996. Dopamine D4 receptor (*DRD4*) exon III polymorphism associated with the human personality trait of Novelty Seeking. **Nat Genet** 12: 78-80.

- Eubanks JH, Djabali M, Selleri L, Grandy DK, Civelli O, Mcelligott DL, Evans GA. 2002. Structure and linkage of the D2 dopamine receptor and neural cell adhesion molecule genes on human chromosome 11q23. **Genomics** 14:1010-1018.
- Eubig PA, Aguiar A, Schantz SL. 2010 Lead and PCBs as Risk Factors for Attention Deficit Hyperactivity Disorder. **Environ Health Perspect**.
- Faraone SV, Perlis RH, Doyle AE, Smoller JW, Goralnick JJ, Holmgren MA, Sklar P. 2005. Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder. **Biol Psychiatry**. 1;57(11):1313-23.
- Faraone, S. V.; Mick, E. 2010. Molecular Genetics of Attention Deficit Hyperactivity Disorder. **Psychiatr Clin N Am** 33:159–180.
- Fernandez-Mayoralas, D. M.; Fernandez-Jaén, A.; García-Segura, J. M.; Quinones-Tapia, D. 2010. Neuroimagen en el trastorno por déficit de atención/hiperactividad. **Rev Neurol** 50 (Supl 3): S125-S133.
- Frank Y, Pergolizzi RG, Perilla MJ. 2004. Dopamine D4 receptor gene and attention deficit hyperactivity disorder. **Pediatr Neurol**. 31(5):345-8.
- Franke, B.; Neale, B. M.; Faraone, S. V. 2009. Genome-wide association studies in ADHD. **Hum Genet** 126:13–50.
- Frazer, A.; Hensler, J. G. 1999. Understanding the neuroanatomical organization of serotonergic cells in the brain provides insight into the functions of this neurotransmitter, in **Basic Neurochemistry**, Siegel, G. J.; Agranoff B.W.; Fisher, S. K.; Albers, R. W.; Uhler, M. D., Sixth ed. Lippincott Williams and Wilkins.
- Freitag, C. M.; Rohde, L. A.; Lempp, T.; Romanos, M. 2010. Phenotypic and measurement influences on heritability estimates in childhood ADHD. **Eur Child Adolesc Psychiatry** 19:311–323.
- Gainetdinov RR, Caron MG. 2000. An animal model of attention deficit hyperactivity disorder. **Mol Med Today**. 6(1):43-4.
- 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**. 15;283(5400):397-401.
- Galera, C.; Fombonne, E.; Chastang, J-F.; Bouvard, M. 2005. Childhood hyperactivity-inattention symptoms and smoking in adolescence. **Drug Alcohol Depend** 78: 101-108.
- Gelernter, J.; Kennedy, J.L.; Van Tol, H.H.; Civelli, O.; Kidd, K.K. 1992. The D4 dopamine receptor (*DRD4*) maps to distal 11p close to HRAS. **Genomics** 13:208–210.
- Genro, J. P.; Kieling, C.; Rohde, L. A.; Hutz, M. H. 2010. Attention-deficit/hyperactivity disorder and the dopaminergic hypotheses. **Expert Rev. Neurother**. 10(4), 587–601.
- Gizer IR, Ficks C, Waldman ID. 2009. Candidate gene studies of ADHD: a meta-analytic review. **Hum Genet**. 126(1):51-90.

González S, Rangel-Barajas C, Peper M, Lorenzo R, Moreno E, Ciruela F, Borycz J, Ortiz J, Lluís C, Franco R, McCormick PJ, Volkow ND, Rubinstein M, Floran B, Ferré S. 2011. Dopamine D(4) receptor, but not the ADHD-associated D(4.7) variant, forms functional heteromers with the dopamine D(2S) receptor in the brain. **Mol Psychiatry**. Aug 16 [Epub ahead of print]

Grandy DK, Zhang Y, Civelli O. 1993. PCR detection of the TaqIA RFLP at the DRD2 Locus. **Hum Mol Genet**. 12, 2197.

Guimarães AP, Zeni C, Polanczyk GV, Genro JP, Roman T, Rohde LA, Hutz MH. 2007. Serotonin genes and attention deficit/hyperactivity disorder in a Brazilian sample: preferential transmission of the HTR2A 452His allele to affected boys. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet**. 5;144B(1):69-73.

Hattori E, Nakajima M, Yamada K, Iwayama Y, Toyota T, Saitou N, Yoshikawa T. 2009. Variable number of tandem repeat polymorphisms of *DRD4*: re-evaluation of selection hypothesis and analysis of association with schizophrenia. **Eur J Hum Genet**. 17(6):793-801.

Henríquez-Henríquez, M.; Zamorano-Mendieta, F.; Rothhammer-Engel, F.; Aboitiz, F. 2010. Modelos neurocognitivos para el trastorno por déficit de atención/hiperactividad y sus implicaciones en el reconocimiento de endofenotipos. **Rev Neurol** 50 (2): 109-116.

Hohmann S, Becker K, Fellingner J, Banaschewski T, Schmidt MH, Esser G, Laucht M. 2009. Evidence for epistasis between the 5-HTTLPR and the dopamine D4 receptor polymorphisms in externalizing behavior among 15-year-olds. **J Neural Transm** 116:1621–1629.

Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR, Humphrey PP. 1994. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). **Pharmacol Rev**. 46(2):157-203.

Hu XZ, Lipsky RH, Zhu G, Akhtar LA, Taubman J, Greenberg BD, Xu K, Arnold PD, Richter MA, Kennedy JL, Murphy DL, Goldman D. 2006. Serotonin transporter promoter gain-of-function genotypes are linked to obsessive-compulsive disorder. **Am J Hum Genet**. 78(5):815-26.

Hu X, Oroszi G, Chun J, Smith TL, Goldman D, Schuckit MA. 2005. An expanded evaluation of the relationship of four alleles to the level of response to alcohol and the alcoholism risk. **Alcohol Clin Exp Res**. 29(1):8-16.

Huang W, Payne TJ, Ma JZ, Beuten J, Dupont RT, Inohara N, Li MD. 2009. Significant association of ANKK1 and detection of a functional polymorphism with nicotine dependence in an African-American sample. **Neuropsychopharmacology**. 34(2):319-30.

Hudziak, J.J.; Derks, E.M.; Althoff, R.R.; Rettew, D.C.; Boomsma, D.I. 2005. The Genetic and Environmental Contributions to Attention Deficit Hyperactivity Disorder as Measured by the Conners' Rating Scales-Revised. **Am J Psychiatry** 162: 1614-1620.

Hutz MH, Almeida S, Coimbra CE Jr, Santos RV, Salzano FM. 2000. Haplotype and allele frequencies for three genes of the dopaminergic system in South American Indians. **Am J Hum Biol** 12(5):638-645

Jacob, C. P.; Nguyen, T.T.; Dempfle, A.; Heine, M.; Windemuth-Kieselbach, C.; Baumann, K.; Jacob, F.; Prechtel, J.; Wittlich, M.; Herrmann, M.J.; Gross-Lesch, S.; Lesch, K.P.; Reif, A. 2010. A gene–environment investigation on personality traits in two independent clinical sets of adult patients with personality disorder and attention deficit/hyperactive disorder. **Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci** 260(4):317-26.

Jensen, P.S.; Hinshaw, S.P.; Kraemer, H.C.; Lenora, N.; Newcorn, J.H.; Abikoff, H.B.; March, J.S.; Arnold, L.E.; Cantwell, D.P.; Conners, C.K.; Elliott, G.R.; Greenhill, L.L., Hechtman, L.; Hoza, B.; Pelham, W.E.; Severe, J.B.; Swanson, J.M.; Wells, K.C.; Wigal, T.; Vitiello, B. 2001. ADHD comorbidity findings from the MTA study: Comparing comorbid subgroups. **J Am Acad Child Adolesc Psychiatry** 40: 147- 158.

Jovanovic, V.; Guan, H.C.; Van Tol, H.H.M. 1999. Comparative pharmacological and functional analysis of the human dopamine D_{4.2} and D_{4.10} receptor variants. **Pharmacogenetics** 9: 561-568.

Kaiser R, Tremblay P-B, Schmider J, Henneken M, Dettling M, Müller-Oerlinghausen B, Uebelhack R, Roots I, Brockmüller J. 2001. Serotonin transporter polymorphisms: no association with response to antipsychotic treatment, but associations with the schizoparanoid and residual subtypes of schizophrenia. **Molecular Psychiatry** 6, 179–185

Kaplan, R. F.; Stevens, M. C. A Review of Adult ADHD: A Neuropsychological and Neuroimaging Perspective. 2002. **CNS Spectr**. Vol. 7, n° 5.

Kent L, Doerry U, Hardy E, Parmar R, Gingell K, Hawi Z, Kirley A, Lowe N, Fitzgerald M, Gill M, Craddock N. 2002. Evidence that variation at the serotonin transporter gene influences susceptibility to attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): analysis and pooled analysis. **Mol Psychiatry**. 7(8):908-12.

Kieling C, Roman T, Doyle AE, Hutz MH, Rohde LA. 2006. Association between DRD4 gene and performance of children with ADHD in a test of sustained attention. **Biol Psychiatry**. 15;60(10):1163-5.

Kieling R, Rohde LA. 2012. ADHD in children and adults: diagnosis and prognosis. **Curr Top Behav Neurosci**. 9:1-16.

Kim SJ, Badner J, Cheon KA, Kim BN, Yoo HJ, Kim SJ, Cook E Jr, Leventhal BL, Kim YS. 2005. Family-based association study of the serotonin transporter gene polymorphisms in Korean ADHD trios. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet**. 5;139B(1):14-8.

Konrad, K.; Eickhoff, S. B. 2010. Is the ADHD Brain Wired Differently? A Review on Structural and Functional Connectivity in Attention Deficit Hyperactivity Disorder. **Human Brain Mapping** 31:904–916

Kosek, E.; Jensen, K.B.; Lonsdorf, T.B.; Schalling, M.; Ingvar, M. 2009. Genetic variation in the serotonin transporter gene (5-HTTLPR, rs25531) influences the analgesic response to the short acting opioid Remifentanyl in humans. **Molecular Pain** 1; 5:37.

Lahiri, D.K.; Nurnberger, J.I. 1991. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nuclei Acids Res** 19: 5444.

- LaHoste, G.J.; Swanson, J.M.; Wigal, S.B.; Glabe, C.; Wigal, T.; King, N.; Kennedy, J.L. 1996. Dopamine D4 receptor gene polymorphism is associated with attention-deficit/hyperactivity disorder. **Mol Psychiatry** 1: 121-124.
- Laird N, Horvath S, Xu X. 2000. Implementing a unified approach to family based tests of association. **Genet Epidemiol** 19: S36–S42.
- 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(1):90-7.
- Landaas, E. T.; Johansson, S.; Jacobsen, K. K.; Ribasés, M.; Bosch, R.; S´anchez-Mora, C.; Jacob, C. P.; Boreatti-Hu`mmer, A.; Kreiker, S.; Lesch, K. P.; Kiemeny, L. A.; Kooij, J. J. S.; Kan, C.; Buitelaar, J. K.; Faraone, S. V.; Halmøy, A.; Ramos-Quiroga, J. A.; Cormand, B.; Reif, A.; Franke, B.; Mick, E.; Knappskog, P. M.; Haavik, J. 2010. An international multicenter association study of the serotonin transporter gene in persistent ADHD. **Genes, Brain and Behavior** 9: 449–458.
- 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.
- Langley K, Turic D, Rice F, Holmans P, van den Bree MB, Craddock N, Kent L, Owen MJ, O'Donovan MC, Thapar A. 2008. Testing for gene x environment interaction effects in attention deficit hyperactivity disorder and associated antisocial behavior. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet**. 5;147B(1):49-53.
- Lara, C.; Fayyad, J.; De Graaf, R.; Kessler, R.C.; Aguilar-Gaxiola, S.; Angermeyer, M.; Demyttenaere, K.; De Girolamo, G.; Haro, J.M.; Jin, R.; Karam, E.G.; Lépine, J.P.; Mora, M.E.; Ormel, J.; Posada-Villa, J.; Sampson, N. 2009. Childhood predictors of adult attention-deficit/hyperactivity disorder: results from the World Health Organization World Mental Health Survey Initiative. **Biol Psychiatry** 65(1): 46-54.
- Lesch KP, Greenberg BD, Higley JD. 2002. Serotonin transporter, personality, and behavior: toward dissection of gene–gene and gene–environment interaction. In: Benjamin J, Ebstein RP, Belmaker RH, editors. **Molecular genetics and the human personality**. Washington, D.C.: American Psychiatric Publishing. p. 109–36.
- Lesch KP, Gross J, Franzek E, Wolozin BL, Riederer P, Murphy DL. 1995. Primary structure of the serotonin transporter in unipolar depression and bipolar disorder. **Biol Psychiatry**. 15;37(4):215-23.
- Lesch KP. 2001. Variation of serotonergic gene expression: neurodevelopment and the complexity of response to psychopharmacologic drugs. **Eur Neuropsychopharmacol**. 11(6):457-74.
- Levy, F. 1991. The dopamine theory of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). **Aust N Z J Psychiatry** 25: 277-283.

- Levy, F.; Swanson, J.M. 2001. Timing, space and ADHD: the dopamine theory revisited. **Aust N Z J Psychiatry** 35: 504-11.
- Li, D.; Sham, P.C.; Owen, M.J.; He, L. 2006. Meta-analysis shows significant association between dopamine system genes and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). **Hum Mol Genetics** 15(14):2276-84.
- Li J, Wang Y, Zhou R, Zhang H, Yang L, Wang B, Faraone SV. 2007. Association between polymorphisms in serotonin transporter gene and attention deficit hyperactivity disorder in Chinese Han subjects. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.** 144B:14–19
- Liu H, Liu M, Wang Y, Wang XM, Qiu Y, Long JF, Zhang SP. 2011. Association of 5-HTT gene polymorphisms with migraine: a systematic review and meta-analysis. **J Neurol Sci.** 15;305(1-2):57-66.
- Louzã Neto M.R. Transtorno de Déficit de Atenção/Hiperatividade: Breve História do Conceito in TDAH [transtorno de déficit de atenção/hiperatividade] ao longo da vida / Mario Rodrigues Louzã Neto e colaboradores. – Porto Alegre : Artmed, 2010.
- Lu RB, Lee JF, Huang SY, Lee SY, Chang YH, Kuo PH, Chen SL, Chen SH, Chu CH, Lin WW, Wu PL, Ko HC. 2010. Interaction between ALDH2*1*1 and DRD2/ANKK1 TaqI A1A1 genes may be associated with antisocial personality disorder not co-morbid with alcoholism. **Addict Biol.** Nov 11.
- Luman, M.; Tripp, G.; Scheres, A. 2010. Identifying the neurobiology of altered reinforcement sensitivity in ADHD: A review and research agenda. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews** 34: 744–754.
- Ma DQ, Rabionet R, Konidari I, Jaworski J, Cukier HN, Wright HH, Abramson RK, Gilbert JR, Cuccaro ML, Pericak-Vance MA, Martin ER. 2010. Association and Gene–Gene Interaction of SLC6A4 and ITGB3 in Autism. **Am J Med Genet Part B** 153B:477–483.
- Madras, B.K.; Miller, G.M.; Fischman, A.J. 2005. The dopamine transporter and attention-deficit/hyperactivity disorder. **Biol Psychiatry** 57: 1397-1409.
- Maher BS, Marazita ML, Moss HB, Vanyukov MM. 1999. Segregation analysis of attention deficit hyperactivity disorder. **Am J Med Genet.**5;88(1):71-8.
- Makris, N.; Biederman, J.; Monuteaux, M.C.; Seidman, L.J. 2009. Towards conceptualizing a neural systems-based anatomy of attention-deficit/hyperactivity disorder. **Dev Neurosci** 31(1-2): 36-49.
- Mannuzza, S.; Klein, R. G.; Bessler, A.; Malloy, P.; Hynes M. E. 1997. Educational and occupational outcome of hyperactive boys grown up. **J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.** 36(9):1222-7.
- Manor I, Eisenberg J, Tyano S, Sever Y, Cohen H, Ebstein RP, Kotler M. 2001. Family-based association study of the serotonin transporter promoter region polymorphism (5-HTTLPR) in attention deficit hyperactivity disorder. **Am J Med Genet.** 8;105(1):91-5.

- Manor I, Tyano S, Eisenberg J, Bachner-Melman R, Kotler M, Ebstein RP. 2002. The short DRD4 repeats confer risk to attention deficit hyperactivity disorder in a family-based design and impair performance on a continuous performance test (TOVA). **Mol Psychiatry**. 7(7):790-4.
- Masellis, M.; Basile, V.S.; Muglia, P.; et al. 2002. Psychiatric pharmacogenetics: personalizing psychostimulant therapy in attention deficit hyperactivity disorder. **Behav Brain Res** 130: 85-90.
- Masson J, Sagné C, Hamon M, El Mestikawy S. 1999. Neurotransmitter transporters in the central nervous system. **Pharmacol Rev**. 51(3):439-64.
- Matsuomoto, M.; Hidaka, K.; Tada, S.; Tasaki, Y.; Yamaguchi, T. 1995. Full-length cDNA cloning and distribution of human dopamine D4 receptor. **Mol Brain Res** 29: 157-162.
- Mcclernon, F.J.; Kollins, S.H. 2008. ADHD and smoking: from genes to brain to behavior. *Ann N Y Acad Sci* 1141: 131-147.
- McGough, J.J. e Barkley, R.S. 2004. Diagnostic controversies in adult attention deficit hyperactivity disorder. **Am J Psychiatry** 161: 1984-56.
- Mick, E.; Faraone, S.V. 2008. Genetics of Attention Deficit Hyperactivity Disorder. **Child Adolesc Psychiatric Clin N Am** 17: 261–284.
- Miller, T.W.; Nigg, J. T.; Faraone, S. V. 2007. Axis I and II comorbidity in adults with ADHD. **J Abnorm Psychol** 116:519 –528.
- Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG. 1998. Dopamine receptors: from structure to function. **Physiol Rev**. 78:189-225
- Mooney, S.D.; Krishnan, V.G.; Evani, U.S. 2010. Bioinformatic tools for identifying disease gene and SNP candidates. **Methods Mol Biol**. 28:307-19.
- Morrison JR, Stewart MA 1974 Bilateral inheritance as evidence for polygenicity in the hyperactive child syndrome. **J Nerv Ment Dis**. 158(3):226-8.
- Morrison, J. R.; Stewart, M. A. 1973. The psychiatric status of the legal families of adopted hyperactive children. **Arch Gen Psychiatry** 28:888–891.
- Mota NR**, et al. 2012. DRD2/DRD4 heteromerization may influence genetic susceptibility to Alcohol Dependence. **Molecular Psychiatry**: in press.
- Murphy DL, Moya PR. 2011. Human serotonin transporter gene (SLC6A4) variants: their contributions to understanding pharmacogenomic and other functional G×G and G×E differences in health and disease. **Curr Opin Pharmacol**. 11(1):3-10.
- Neville MJ, Johnstone EC, Walton RT. 2004. Identification and characterization of ANKK1: a novel kinase gene closely linked to DRD2 on chromosome band 11q23.1 **Hum Mutat** 23:540–545.

- Newcorn, J.H. 2008. Co-morbidity in adults with ADHD. **CNS Spectr** 13 (8 Suppl 12): 12-15.
- Nigg, J.T. 2005. Neuropsychologic theory and findings in attention-deficit/hyperactivity disorder: The state of the field and salient challenges for the coming decade. **Biol Psychiatry** 57: 1424-1435.
- Nobile M, Giorda R, Marino C, Carlet O, Pastore V, Vanzin L, Bellina M, Molteni M, Battaglia M. 2007. Socioeconomic status mediates the genetic contribution of the dopamine receptor D4 and serotonin transporter linked promoter region repeat polymorphisms to externalization in preadolescence. **Dev Psychopathol.** 19(4):1147-60.
- Oades RD. 2008. Dopamine-serotonin interactions in attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD). **Prog Brain Res.** 172:543-65.
- Oak, J.N.; Oldenhof, J.; Van Tol, H.H. 2000. The dopamine D(4) receptor: one decade of research. **Eur J Pharmacol.** 29;405(1-3):303-27.
- O'Malley KL, Harmon S, Tang L, Todd RD. 1992. The rat dopamine D4 receptor: sequence, gene structure, and demonstration of expression in the cardiovascular system. **New Biol.** 4(2):137-46.
- Oquendo MA, Hastings RS, Huang YY, Simpson N, Ogden RT, Hu XZ, Goldman D, Arango V, Van Heertum RL, Mann JJ, Parsey RV. 2007. Brain serotonin transporter binding in depressed patients with bipolar disorder using positron emission tomography. **Arch Gen Psychiatry.** 64(2):201-8.
- Orvaschel, H. 1985. Psychiatric interviews suitable for use in research with children and adolescents. **Psychopharmacol Bull** 21(4):737-45.
- Owens MJ, Nemeroff CB. 1994. Role of serotonin in the pathophysiology of depression: focus on the serotonin transporter. **Clin Chem.** 40(2):288-95.
- Patterson, G. R.; DeGarmo, D. S.; Knutson, N. 2000. Hyperactive and antisocial behaviors: Comorbid or two points in the same process? **Dev Psychopathol** 12:91–106.
- Petronis, A.; Van Tol, H.H.; Lichter, J.B.; Livak, K.J.; Kennedy, J.L. 1993. The D4 dopamine receptor gene maps on 11p proximal to HRAS. **Genomics** 18:161–163.
- Poelmans G, Pauls DL, Buitelaar JK, Franke B. 2011. Integrated genome-wide association study findings: identification of a neurodevelopmental network for attention deficit hyperactivity disorder. **Am J Psychiatry.** Apr;168(4):365-77.
- Polanczyk, G., de Lima, M.S., Horta, B.L., Biederman, J., Rohde, L.A. 2007. The worldwide prevalence of ADHD: a systematic review and meta-regression analysis. **Am J Psychiatry** 164:942-8.
- Ponce G, Perez-Gonzalez R, Aragues M, Palomo T, Rodriguez-Jimenez R, Jimenez-Arriero MA, Hoenicka J. 2009. The ANKK1 Kinase Gene And Psychiatric Disorders. **Neurotox Res.** 16: 50-59.

- Popova NK. 2008. From gene to aggressive behavior: the role of brain serotonin. **Neurosci Behav Physiol.** 38(5):471-5.
- Posner MI; Petersen SE. 1990. The attention system of the human brain. **Annual Review of Neuroscience.** 13:25-42.
- Preuss, U. W.; Soyka, M.; Bahlmann, M.; Wenzel, K.; Behrens, S.; Jonge, S.; Krüger, M.; Bondy, B. 2000. Serotonin transporter gene regulatory region polymorphism (5-HTTLPR), [³H] paroxetine binding in healthy control subjects and alcohol-dependent patients and their relationships to impulsivity. **Psychiatry Research** 96: 51-61.
- Purper-Ouakil, D.; Lepagnol-Bestel, A.M.; Grosbellet, E.; Gorwood, P.; Simonneau, M. 2010. Neurobiology of attention deficit/hyperactivity disorder. **Med Sci (Paris).** 26(5):487-96.
- Puumala T, Sirviö J. 1998. Changes in activities of dopamine and serotonin systems in the frontal cortex underlie poor choice accuracy and impulsivity of rats in an attention task. **Neuroscience.** 83(2):489-99.
- Qian QJ, Yang L, Wang YF, Zhang HB, Guan LL, Chen Y, Ji N, Liu L, Faraone SV. 2010. Gene-gene interaction between COMT and MAOA potentially predicts the intelligence of attention-deficit hyperactivity disorder boys in China. **Behav Genet.** 40(3):357-65.
- Quist JF, Kennedy JL. 2001. Genetics of childhood disorders: XXIII. ADHD, Part 7: The serotonin system. **J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.** 40(2):253-6.
- Ramamoorthy S, Bauman AL, Moore KR, Han H, Yang-Feng T, Chang AS, Ganapathy V, Blakely RD. 1993. Antidepressant- and cocaine-sensitive human serotonin transporter: molecular cloning, expression, and chromosomal localization. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 90(6):2542-6.
- Ravna AW, Edvardsen O. 2001. A putative three-dimensional arrangement of the human serotonin transporter transmembrane helices: a tool to aid experimental studies. **J Mol Graph Model.** 20(2):133-44.
- Rohde, L.A. 2002. ADHD in Brazil: the DSM-IV criteria in a culturally different population. **J Am Acad Child Adolesc Psychiatry** 41(9):1131-3.
- Rohde, L.A.; Halpern, R. 2004. Transtorno de déficit de atenção/hiperatividade: atualização. **J Pediatr** 80 (supl 2): S61-S70.
- Roman T, Rohde LA, Hutz MH. 2009. A role for neurotransmission and neurodevelopment in attention-deficit/hyperactivity disorder. **Genome Med.** 19;1(11):107.
- 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.** 8;105(5):471-8.
- Rommelse, N. N. J.; Franke, B.; Geurts, H. M.; Hartman, C. A.; Buitelaar, J. K. 2010. Shared heritability of attention-deficit/hyperactivity disorder and autism spectrum disorder. **Eur Child Adolesc Psychiatry** 19:281–295.

- Rousset, F., 2008. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. **Mol. Ecol. Resources** 8: 103-106.
- Russell VA. 2002. Hypodopaminergic and hypernoradrenergic activity in prefrontal cortex slices of an animal model for attention-deficit hyperactivity disorder--the spontaneously hypertensive rat. **Behav Brain Res.** 10;130(1-2):191-6.
- Sagvolden, T.; Johansen, E.B.; Aase, H.; Russel, V.A. 2005. A dynamic developmental theory of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) predominantly hyperactive/impulsive and combined subtypes. **Behav Brain Sci.** 28(3):397-419.
- Satterfield JH; Dawson ME. 1971. Electrodermal correlates of hyperactivity in children. **Psychophysiology.** 8(2):191-7.
- Scheffel U, Dannals RF, Cline EJ, Ricaurte GA, Carroll FI, Abraham P, Lewin AH, Kuhar MJ.1992. [123/125I]RTI-55, an in vivo label for the serotonin transporter. **Synapse.** 11(2):134-9.
- Schmidt LA, Fox NA, Hamer DH. 2007. Evidence for a gene-gene interaction in predicting children's behavior problems: association of serotonin transporter short and dopamine receptor D4 long genotypes with internalizing and externalizing behaviors in typically developing 7-year-olds. **Dev Psychopathol.** 19(4):1105-16.
- Schmitz, M.; Denardin, D.; Silva, T.L.; Pianca, T.; Roman, T.; Hutz, M.H.; Faraone, S.V.; Rohde, L.A. 2006. Association between alpha-2a-adrenergic receptor gene and ADHD inattentive type. **Biol Psychiatry.** 60(10):1028-33.
- Seeger G, Schloss P, Schmidt MH. 2001. Marker gene polymorphisms in hyperkinetic disorder--predictors of clinical response to treatment with methylphenidate? **Neurosci Lett.** 2;313(1-2):45-8.
- Seeman P, Van Tol HH. 1994. Dopamine receptor pharmacology. **Trends Pharmacol Sci.** 15(7):264-70.
- Segal J, Schenkel LC, Oliveira MH, Salum GA, Bau CH, Manfro GG, Leistner-Segal S. 2009. Novel allelic variants in the human serotonin transporter gene linked polymorphism (5-HTTLPR) among depressed patients with suicide attempt. **Neurosci Lett.** 13;451(1):79-82.
- Sergeant JA, Geurts H, Huijbregts S, Scheres A, Oosterlaan J. 2003. The top and the bottom of ADHD: a neuropsychological perspective. **Neurosci Biobehav Rev.** 27(7):583-92.
- Shafritz, K.M.; Marchione, K.E.; Gore, J.C.; Shaywitz, S.E.; Shaywitz, B.A. 2004 The effects of methylphenidate on neural systems of attention deficit/hyperactivity disorder. **Am J Psychiatry** 161: 1990-1997.
- Sharp SI, McQuillin A, Gurling HM. 2009. Genetics of attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD). **Neuropharmacology.** 57(7-8):590-600.
- Shiels, K.; Hawk Jr., L. W. 2010. Self-regulation in ADHD: The role of error processing. **Clinical Psychology Review**

- Smith, T.F. 2010. Meta-Analysis of the Heterogeneity in Association of DRD4 7-Repeat Allele and AD/HD: Stronger Association With AD/HD Combined Type. **Am J Med Genet Part B** 153B:1189–1199.
- Sohn, H.; Kim, I.; Lee, W.; Peterson, B. S; Hong, H.; Chae, J. H.; Hong, S.; Jeong, J. 2010. Linear and non-linear EEG analysis of adolescents with attention- deficit/hyperactivity disorder during a cognitive task. Article in press. **Clinical Neurophysiology**.
- Sonuga-Barke EJ, Oades RD, Psychogiou L, Chen W, Franke B, Buitelaar J, Banaschewski T, Ebstein RP, Gil M, Anney R, Miranda A, Roeyers H, Rothenberger A, Sergeant J, Steinhausen HC, Thompson M, Asherson P, Faraone SV. 2009. Dopamine and serotonin transporter genotypes moderate sensitivity to maternal expressed emotion: the case of conduct and emotional problems in attention deficit/hyperactivity disorder. **J Child Psychol Psychiatry**. 50(9):1052-63.
- Sonuga-Barke EJ. 2003. The dual pathway model of AD/HD: an elaboration of neuro-developmental characteristics. **Neurosci Biobehav Rev**. 27(7):593-604.
- Sonuga-Barke EJ. 2005. Causal models of attention-deficit/hyperactivity disorder: from common simple deficits to multiple developmental pathways. **Biol Psychiatry**. Jun 1;57(11):1231-8.
- Sonuga-Barke EJ, Kumsta R, Schlotz W, Lasky-Su J, Marco R, Miranda A, Mulas F, Oades RD, Banaschewski T, Mueller U, Andreou P, Christiansen H, Gabriels I, Uebel H, Kuntsi J, Franke B, Buitelaar J, Ebstein R, Gill M, Anney R, Roeyers H, Rothenberger A, Sergeant J, Steinhausen HC, Asherson P, Faraone SV. 2011. A functional variant of the serotonin transporter gene (SLC6A4) moderates impulsive choice in attention-deficit/hyperactivity disorder boys and siblings. **Biol Psychiatry**.1;70(3):230-6.
- Spencer, T. J. 2008. Neurobiology and Genetics of ADHD in Adults. **CNS Spectr**. 13:9(Suppl 13):5-7.
- Spencer, T.; Biederman, J.; Faraone, S.V.; 1998. Adults with attention-deficit/hyperactivity disorder: A controversial diagnosis. **J Clin Psychiatry** 59 (supplement 7): 59-68.
- Spencer, T.J.; Biederman, J.; Mick, E. 2007. Attention-deficit/hyperactivity disorder: diagnosis, lifespan, comorbidities, and neurobiology. **J Pediatr Psychol**.: 32(6):631-42.
- Sprich S, Biederman J, Crawford MH, Mundy E, Faraone . 2000 Adoptive and Biological Families of Children and Adolescents With ADHD. **SV.J Am Acad Child Adolesc Psychiatry**. 39(11):1432-7.
- Stein DJ, Hollander E, Liebowitz MR. 1993. Neurobiology of impulsivity and the impulse control disorders. **J Neuropsychiatry Clin Neurosci** 5:9–17
- Stein, M.A. 2008. Impairment associated with adult ADHD. **CNS Spectr** 13 (8 Suppl 12): 9-11.
- Stergiakouli E, Thapar A. 2010 Fitting the pieces together: current research on the genetic basis of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD).**Neuropsychiatr Dis Treat**. 7;6:551-60.

Still G. F. 1902. Some Abnormal Psychological Conditions in Children. **The Lancet** 159: 1008-1013.

Swanson J, Oosterlaan J, Murias M, Schuck S, Flodman P, Spence MA, Wasdell M, Ding Y, Chi HC, Smith M, Mann M, Carlson C, Kennedy JL, Sergeant JA, Leung P, Zhang YP, Sadeh A, Chen C, Whalen CK, Babb KA, Moyzis R, Posner MI. 2000. Attention deficit/hyperactivity disorder children with a 7-repeat allele of the dopamine receptor D4 gene have extreme behavior but normal performance on critical neuropsychological tests of attention. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 25;97(9):4754-9.

Swanson, J.M.; Kinsbourne, M.; Nigg, J.; Lanphear, B.; Stefanatos, G.A.; Volkow, N.; Taylor, E.; Casey, B.J.; Castellanos, F.X.; Wadhwa, P.D. 2007. Etiologic subtypes of 26 attention-deficit/hyperactivity disorder: brain imaging, molecular genetics and environmental factors and the dopamine hypothesis. **Neuropsychol Rev** 17: 39-59.

Swanson, J.M.; Kraemer, H.C.; Hinshaw, S.P.; Arnold, L.E.; Conners, C.K.; Abikoff, H.B. e cols. 2001. Clinical relevance of the primary findings of the MTA: success rates based on severity of ADHD and ODD symptoms at the end of treatment. **J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.** 40: 168-79.

Szekely A, Ronai Z, Nemoda Z, Kolmann G, Gervai J, Sasvari-Szekely M. 2004. Human personality dimensions of persistence and harm avoidance associated with DRD4 and 5-HTTLPR polymorphisms. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.** 1;126B(1):106-10.

Szobot C, Roman T, Cunha R, Acton P, Hutz M, Rohde LA. 2005. Brain perfusion and dopaminergic genes in boys with attention-deficit/hyperactivity disorder. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.** 5;132B(1):53-8.

Szobot CM, Roman T, Hutz MH, Genro JP, Shih MC, Hoexter MQ, Júnior N, Pechansky F, Bressan RA, Rohde LA. 2011. Molecular imaging genetics of methylphenidate response in ADHD and substance use comorbidity. **Synapse.** 65(2):154-9.

Tandon M, Pruett JR Jr. 2008. An overview of the use of antidepressants in children and adolescents. **Mo Med.** 105(1):79-84.

Thakur, G. A.; Grizenko, N.; Sengupta, S. M.; Schmitz, N.; Joobar, R. 2010. The 5-HTTLPR polymorphism of the serotonin transporter gene and short term behavioral response to methylphenidate in children with ADHD. **BMC Psychiatry** 10:50.

Thapar, A.; Langley, K.; Owen, M.J.; O'Donovan, M.C. 2007. Advances in genetic findings on attention deficit hyperactivity disorder. **Psychol Med** 17:1-12.

Tharoor H, Lobos EA, Todd RD, Reiersen AM. 2008. Association of dopamine, serotonin, and nicotinic gene polymorphisms with methylphenidate response in ADHD. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.** 5;147B(4):527-30.

Tovo-Rodrigues L, Rohde LA, Roman T, Schmitz M, Polanczyk G, Zeni C, Marques FZ, Contini V, Grevet EH, Belmonte-de-Abreu P, Bau CH, Hutz MH. 2011. Is there a role for rare variants in DRD4 gene in the susceptibility for ADHD? Searching for an effect of allelic heterogeneity. **Mol Psychiatry.** Mar 15. Epub ahead of print

- Tripp, G.; Wickens, J. R. 2009. Neurobiology of ADHD. **Neuropharmacology**. 57: 579–589.
- Vaidya CJ, Austin G, Kirkorian G, Ridlehuber HW, Desmond JE, Glover GH, Gabrieli JD. 1998. Selective effects of methylphenidate in attention deficit hyperactivity disorder: a functional magnetic resonance study. *Proc Natl Acad SciSA*. 95:14494-9.
- Van der Kooij MA, Glennon JC. 2007. Animal models concerning the role of dopamine in attention-deficit hyperactivity disorder. **Neurosci Biobehav Rev**. 31(4):597-618.
- Van Tol, H.; Bunzow, J.R.; Guan, H.; Sunahara, R.; Seeman, P.; Niznik, H.B.; Civelli, O. 1991. Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. **Nature** 350, 610–614.
- Vieira, E. 2012. Evolução molecular de loci associados ao comportamento humano: receptor de serotonina 1B e bloco sintênico do receptor de dopamina D2. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul (dissertação de mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular.
- Volkow ND, Wang G, Fowler JS, Logan J, Gerasimov M, Maynard L, Ding Y, Gatley SJ, Gifford A, Franceschi D. 2001. Therapeutic doses of oral methylphenidate significantly increase extracellular dopamine in the human brain. **J Neurosci**. 5;21(2):RC121.
- Waldman, I.D.; Gizer, I.R. 2006. The genetics of attention deficit hyperactivity disorder. *Clin Psych Rew* 26(4): 396-432
- Wallis, D.; Russell, H.F.; Muenke, M. 2008. Review: Genetics of attention deficit/hyperactivity disorder. **J Pediatr Psychol** 33(10): 1085-1099.
- Walther DJ, Peter JU, Bashammakh S, Hörtnagl H, Voits M, Fink H, Bader M. 2003. Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. **Science**. 3;299(5603):76.
- Wang, E.; Ding, Y.C.; Flodman, P.; Kidd, J.R.; Kidd, K.K.; Grady, D.L.; Ryder, O.A.; Spence, M.A.; Swanson, J.M.; Moyzis, R.K. 2004. The genetic architecture of selection at the human dopamine receptor D4 (*DRD4*) gene locus. **Am J Hum Genet**. 74(5):931-44.
- Wender PH, Epstein RS, Kopin IJ, Gordon EK. 1971. Urinary monoamine metabolites in children with minimal brain dysfunction. **Am J Psychiatry**. 127(10):1411-5.
- Wendland, J.R.; Martin, B.J.; Kruse, M.R.; Lesch, K.P.; Murphy, D.L. 2006. Simultaneous genotyping of four functional loci of human SLC6A4, with a reappraisal of 5-HTTLPR and rs25531. **Mol Psychiatry** 11:224-226.
- Weschler, D.I. 1991. Examiner's manual: Weschler intelligence scale for children (3th ed.). **New York: Psychological Corporation**.
- Whitaker-Azmitia PM. 2001. Serotonin and brain development: role in human developmental diseases. **Brain Res Bull**. 15;56(5):479-85.
- Wilens, T.E.; Dodson, W. 2004. A clinical perspective of attention-deficit/hyperactivity disorder into adulthood. **J Clin Psychiatry** 65: 1301-1313.

World Health Organization. 2007. ICD-10: International statistical classification of diseases and related health problems: tenth revision. - 2nd ed. 3 v. <http://apps.who.int/classifications/apps/icd/icd10online/>, acessado em 21/09/2010

Wray NR, James MR, Gordon SD, Dumenil T, Ryan L, Coventry WL, Statham DJ, Pergadia ML, Madden PA, Heath AC, Montgomery GW, Martin NG. 2009. Accurate, Large-Scale Genotyping of 5HTTLPR and Flanking Single Nucleotide Polymorphisms in an Association Study of Depression, Anxiety, and Personality Measures. **Biol Psychiatry**. 1;66(5):468-76.

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**. 5;139B(1):11-3.

Yamamoto M, McGeary J, Wells T, Beevers C. 2009. Interaction of 5HTTLPR and DRD4 VNTR on sustained attention. in Abstracts of XVII World Congress of Psychiatric Genetics: Surfing the Wave of Discovery. The International Society of Psychiatric Genetics, p141.

Yang BZ, Kranzler HR, Zhao H, Gruen JR, Luo X, Gelernter J. 2008. Haplotypic variants in DRD2, ANKK1, TTC12, and NCAM1 are associated with comorbid alcohol and drug dependence. **Alcohol Clin Exp Res**. 32(12):2117-27.

Yerushalmi U, Teicher M. 2007. Examining emergence of functional gene clustering in a simulated evolution. **Bull Math Biol**. 69(7):2261-80.

Zhang Y, Bertolino A, Fazio L, Blasi G, Rampino A, Romano R, Lee ML, Xiao T, Papp A, Wang D, Sadée W. 2007. Polymorphisms in human dopamine D2 receptor gene affect gene expression, splicing, and neuronal activity during working memory. **Proc Natl Acad Sci USA**. 18;104(51):20552-7.

Zeni CP, Guimarães AP, Polanczyk GV, Genro JP, Roman T, Hutz MH, Rohde LA. 2007. No significant association between response to methylphenidate and genes of the dopaminergic and serotonergic systems in a sample of Brazilian children with attention-deficit/hyperactivity disorder. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet**. 5;144B(3):391-4.

Zepf, F.D.; Holtmann, M.; Stadler, C.; Demisch, L.; Schmitt, M.; Wöckel, L.; Poustka, F. 2008. Diminished Serotonergic Functioning in Hostile Children with ADHD: Tryptophan Depletion Increases Behavioural Inhibition. **Pharmacopsychiatry** 41: 60-65.