

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS -141C *INS/DEL* E
TAQIA DA REGIÃO *DRD2/ANKK1* E O TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO
E HIPERATIVIDADE**

Andressa Nuss

Orientador(a): Tatiana Roman

**Trabalho de Conclusão de curso apresentado ao
Instituto de Biociências – UFRGS, como requisito parcial para
a obtenção do título de Bacharel do Curso de Ciências
Biológicas**

Porto Alegre, Dezembro de 2010

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos

.... agradeço especialmente a minha vó Angela pelo grande exemplo que ela sempre foi, pela dedicação aos netos e pelas minhas melhores lembranças da infância em Nova Prata. Saudades!

.... à minha orientadora Tatiana pelo apoio, dedicação, e estímulo!

.... ao meu Bizão por me fazer companhia nas horas que passei na frente do computador escrevendo esse trabalho de conclusão.

.... ao meu pai por ter me ensinado a dar os primeiros passos no universo da biologia e à minha mãe por ter acreditado e apoiado as minhas escolhas.

.... às colegas de laboratório Angélica, Gabi e Jaque pelos ótimos momentos, e a Gláucia pelo auxílio moral, psicológico e laboratorial. Amizades inesquecíveis!

.... às minhas grandes companheiras Pique, Bibi e Ka por terem sido minhas colegas, amigas e cúmplices nesses anos de graduação e ao Chris por estar sempre ao meu lado.

.... ao Daniel por ter me aberto as portas para o mundo imaginário do DNA, pela paciência em me mostrar como é fascinante a genética e pelo exemplo de grande cientista.

.... a Júlia e a Dânae por terem aceitado participar da minha banca nesse trabalho de conclusão.

Artigo Científico

Em preparação para submissão ao *American Journal of Medical Genetics part B: Neuropsychiatric Genetics*

ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS -141C *INS/DEL* E TAQIA DA REGIÃO *DRD2/ANKKI* E O TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE

Andressa Nuss¹, Gláucia C. Akutagava-Martins¹, Ana Paula Miranda Guimarães³, Angélica Salatino-Oliveira¹, Marcelo Schmitz², Guilherme Polanczyk², Cristian Zeni², Luis A. Rohde², Mara H. Hutz¹, Tatiana Roman¹

¹ Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

² Departamento de Psiquiatria e Medicina Legal, Universidade Federal do Rio Grande do sul

³ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia, campus Camaçari

Título abreviado: Polimorfismos do gene *DRD2/ANKKI* e o TDAH

Palavras-chave: TDAH, *DRD2*, *ANKKI*, sistema dopaminérgico, suscetibilidade

Autor para correspondência:

Prof^a. Dr^a Tatiana Roman

Av. Bento Gonçalves, 9500 - Prédio 43323 M – Sala 115. CEP: 91501-970

Caixa postal 15053 - Porto Alegre, RS, Brasil.

Telefone: 55-51-3308-6720

Fax: 55-51-3308-7311

E-mail: tatiana.roman@ufrgs.br

RESUMO

O Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) é uma doença complexa cuja herdabilidade é estimada em torno de 76%. É comum na infância e adolescência, sendo a prevalência mundial de aproximadamente 5% das crianças em idade escolar. Esse transtorno apresenta três subtipos clínicos: predominantemente desatento, predominantemente hiperativo/impulsivo e combinado, onde sintomas das duas outras áreas estão presentes. Como principais candidatos para estudos moleculares com o TDAH, estão os genes codificadores de componentes do sistema dopaminérgico, dentre eles o gene que codifica o receptor D2 de dopamina (*DRD2*). O estudo tem enfoque em dois polimorfismos: *TaqIA* (rs1800497), SNP originalmente descrito na região flanqueadora 3' do *DRD2* mas localizado no gene *ANKK1* (*ankyrin repeat and kinase domain containing 1*), e -141C *Ins/Del* (rs1799732), inserção/deleção localizada na região promotora do gene *DRD2*. Este estudo verificou a possibilidade de associação destes polimorfismos com o TDAH numa amostra composta por 478 crianças e/ou adolescentes diagnosticados pelo ProDAH-HCPA de acordo com o DSM-IV e seus pais biológicos. Os polimorfismos foram genotipados pela técnica PCR-RFLP. A hipótese de associação foi verificada por método baseado em famílias, através do programa FBAT. As frequências encontradas estão em Equilíbrio de Hardy-Weinberg e de acordo com a literatura. Os resultados não indicaram associação de nenhum dos polimorfismos com o TDAH. Apesar disso, não podemos afirmar que o gene *DRD2* não contribui para a patofisiologia do TDAH, sendo necessário um estudo mais amplo de toda a região genômica *DRD2/ANKK1* para definir se a mesma influencia ou não no TDAH.

Introdução

O Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) é um dos transtornos psiquiátricos mais comuns na infância e na adolescência, sendo caracterizado por sintomas marcantes de desatenção, hiperatividade e impulsividade. Ele afeta em torno de 5% das crianças em idade escolar (Polanczyk e cols., 2007) e em amostras clínicas é cerca de quatro vezes mais comum em meninos do que em meninas (Rohde e Halpern, 2004, Spencer e cols., 2007). De acordo com Manual de Diagnóstico e Estatística de Transtornos Mentais, o DSM-IV (American Psychiatric Association, 1994) são reconhecidos três tipos de TDAH, conforme a presença de um mínimo de seis sintomas em uma ou ambas as áreas de sintomas: predominantemente desatento, predominantemente hiperativo-impulsivo e combinado. Etiologicamente, esta é considerada uma doença complexa, com herdabilidade estimada em torno de 76% (Faraone e Mick, 2010). É provável que a transmissão do TDAH ocorra através de vários genes de pequeno efeito, que conferem suscetibilidade a esse transtorno. Porém, o seu desenvolvimento parece depender ainda da interação destes genes entre si e com diversos outros fatores ambientais (Waldman e Gizer, 2006; Stergiakouli e Thapar, 2010).

Evidências de estudos neurobiológicos indicam que os sintomas e, conseqüentemente, os prejuízos cognitivos e comportamentais no TDAH ocorrem devido a alterações estruturais e funcionais em diferentes regiões e processos cerebrais (Luman e cols., 2010). Entre os sistemas de neurotransmissores possivelmente envolvidos, disfunções no sistema dopaminérgico têm sido consistentemente observadas na literatura (Genro e cols., 2010). Por esta razão, genes que codificam componentes deste sistema são os mais investigados nos estudos de associação com o TDAH (Waldman e Gizer, 2006; Gizer e cols., 2009; Sharp e cols., 2009; Faraone & Mick, 2010).

O gene *DRD2*, que codifica o receptor do tipo 2 de dopamina, foi um dos primeiros locos a serem estudados no TDAH (Rowe e cols., 1999). Ele codifica uma proteína transmembrana que é capaz de se ligar à dopamina inibindo a enzima adenilato ciclase (Rowe e cols., 1999; Nyman e cols., 2007; Kollins e cols., 2008). Receptores D2 de dopamina são expressos em neurônios do mesencéfalo, caudado, sistema límbico e, mais especificamente, no núcleo accumbens, no hipocampo e em partes do córtex cerebral, áreas freqüentemente associadas ao TDAH (Makris e cols., 2009). Esses receptores têm uma elevada afinidade por drogas antipsicóticas e por essa razão acredita-se que a ação terapêutica dessas drogas ocorra nesses locais (Kandel, 1991).

O gene *DRD2* faz parte de um cluster de genes presentes em uma região bem conservada ao longo da evolução dos vertebrados. Esse gene, com aproximadamente 270 Kb, está localizado no cromossomo 11q22-23, contém oito éxons e inclui um intron de aproximadamente 250 Kb separando o primeiro éxon dos éxons que codificam a proteína do receptor (Eubanks e cols., 2002). O *DRD2* tem predominantemente duas isoformas, uma longa e outra curta, as quais são geradas num *splicing* alternativo do exon 6 do mRNA. Ambas isoformas mostram distintas funções *in vivo*, bem como uma capacidade diferencial para aumentar a concentração de receptores D2.

Uma das principais variantes presentes neste loco é o polimorfismo *TaqIA* (rs1800497), caracterizado por uma troca de uma citosina por uma timina, que gera um sítio de restrição usualmente reconhecido pela endonuclease *TaqI*, com frequências variáveis entre as diferentes etnias e populações estudadas (Grandy e cols., 1993). Inicialmente 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 seqüência complementar ao *DRD2* no sentido reverso. A troca C/T leva à substituição Glu713-to-Lys (E713 K) na proteína codificada pelo *ANKK1* (Neville e cols., 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 e cols., 2009).

Apesar da incerteza sobre seu significado funcional, o polimorfismo *TaqIA* do gene *DRD2/ANKK1* é bastante investigado em diferentes doenças complexas, como obesidade (Epstein e cols., 2007), alcoolismo (Blum e cols., 1991; Comings e cols., 1991), tabagismo (Munafo e cols., 2004), abuso de substâncias (Noble, 1994), doença de Alzheimer e transtornos psiquiátricos variados como a esquizofrenia (Parsons e cols., 2007) e a síndrome de Tourette (Comings e cols., 1991). No TDAH, o primeiro estudo foi realizado por Rowe e cols. (1999), mostrando associação da homozigose para o alelo A2 (presença da citosina) e aumento do número de sintomas de TDAH. Depois deste primeiro relato, diferentes resultados foram obtidos. Alguns autores (Kirley e cols., 2002; Kustanovich e cols., 2004) através do teste de desequilíbrio de transmissão, e Huang e cols. (2003) através de um estudo caso-controle, não encontraram associação do polimorfismo *TaqIA* com o TDAH. Por outro lado, sempre através da abordagem caso-controle, Sery e cols. (2006) observaram associação do alelo A1 (presença da timina) e do genótipo A1A1 em homens com TDAH, Drtilkovae e

cols. (2008) e Kopeckova e cols. (2008) encontraram, respectivamente, associação do alelo A1 e do genótipo A1A1 em meninos com a doença, e Paclt e cols. (2010) verificaram um efeito significativo do alelo A1 no aumento do risco para o TDAH em pacientes com o subtipo clínico combinado e sem comorbidades. É interessante observar que estes quatro estudos foram realizados na República Tcheca. Pesquisando uma amostra da Finlândia, Nyman e cols. (2007) também encontraram associação do alelo A1 com o TDAH. Já Waldman (2004), em um estudo bastante refinado, investigou o polimorfismo *TaqIA* em crianças com e sem TDAH e suas mães, juntamente com três variáveis que refletem a estabilidade marital das mães, verificando a possibilidade de interação gene-ambiente. Diferentes efeitos de interação entre as variáveis analisadas e os genótipos para o *DRD2* nas crianças e nas mães foram observados, os quais foram capazes de predizer o diagnóstico de TDAH nas crianças. A metanálise realizada por Gizer e cols. (2009) detectou tanto um efeito positivo (OR = 1,54; P < 0,001) como marginal (OR = 1,65; P = 0,110) para o alelo A1, de acordo com a estatística utilizada. Segundo os autores, a diferença nesses resultados pode ser explicada pela heterogeneidade significativa no tamanho de efeito entre os estudos, sendo necessárias novas investigações para determinar se o *TaqIA* está ou não associado ao TDAH.

Um polimorfismo supostamente funcional presente no gene *DRD2*, embora ainda pouco estudado, é o polimorfismo – 141C *Ins/Del* (rs1799732) localizado a montante do exon 1 na posição 141 da região 5' promotora do gene *DRD2*. Possui dois alelos, sendo que o alelo A1 é uma deleção de citosina e o alelo A2 é uma inserção de citosina. O alelo A2 é o mais freqüente, sendo a forma selvagem do gene. Segundo Ohara e cols. (1998), em esquizofrênicos esse polimorfismo reduz a expressão do receptor D2, além de estar associado com a diminuição desse tipo de receptor na região do estriado em indivíduos portadores do genótipo – 141C *Ins/Ins*. Esse polimorfismo demonstrou ainda resultados interessantes *in vivo*, onde a forma – 141C *Del* apresenta uma diminuição da atividade de transcrição e uma maior densidade de receptores D2 na região do estriado (Arinami e cols., 1997; Johann e cols., 2005). Além de esquizofrenia, esse polimorfismo foi investigado em estudos de associação com suicídio (Johann e cols., 2005), alcoolismo (Prasad e cols., 2010) e na resposta ao tratamento com drogas antipsicóticas (Zhang e cols., 2010). Em uma investigação caso-controle realizada com uma amostra de alcoolistas que apresentavam TDAH, esse polimorfismo não apresentou resultados positivos (Johann e cols., 2005). Além deste, não foram feitos outros estudos de associação do polimorfismo – 141C *Ins/Del* com o TDAH.

O gene *DRD2* parece ter grande importância em outros transtornos externalizadores além do TDAH, como o Transtorno de Conduta (TC) e o Transtorno de oposição desafio (TOD) (Comings e cols., 1997; Lu e cols., 2001; Esposito-Smythers e cols., 2009), estando relacionado com impulsividade e busca de novidades. É importante observar que TOD e TC ocorrem em cerca de 50% dos pacientes com TDAH (Acosta e cols., 2004; Cormier, 2008), o que poderia representar uma relação indireta deste gene com o a doença. O mesmo pode ser dito sobre o abuso/dependência de drogas que freqüentemente está associado ao TDAH na adolescência e idade adulta (Wilens e Dodson, 2004; Newcorn, 2008), dada a participação de receptores do tipo D2 em mecanismos cerebrais de recompensa importantes no reforço ao uso de drogas. Todos esses motivos nos levaram a investigar a associação do gene *DRD2* no TDAH, no intuito de identificar uma possível influência do mesmo nesse transtorno, através da análise dos polimorfismos *TaqIA* e *-141C Ins/Del*.

Material e Métodos

Caracterização amostral

A amostra do atual estudo é composta por 478 famílias, constituídas por casos (crianças e adolescentes afetados por TDAH) e seus respectivos pais biológicos. A mesma foi previamente coletada durante a realização de diferentes projetos de pesquisa vinculados aos Programas de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular e em Psiquiatria, ambos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Os pacientes foram avaliados em diferentes etapas através do Programa do Déficit de Atenção e Hiperatividade (ProDAH), vinculado ao Serviço de Psiquiatria da Infância e Adolescência do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Parte dessa amostra (380 pacientes) foi obtida diretamente através do ProDAH, sendo o restante (100 pacientes) proveniente de triagem em escolas públicas de Porto Alegre, posteriormente avaliados pelo ProDAH.

O diagnóstico dos pacientes obtidos através do ProDAH (n = 380) foi feito de acordo com os critérios do DSM-IV, seguindo um protocolo de três etapas descrito detalhadamente em Roman e cols., (2001), Rohde (2002) e Polanczyk e cols., (2007). Basicamente, o processo diagnóstico compreendeu: a) avaliação com entrevista semi-estruturada (*Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia for School-Age Children, Epidemiological Version*

– K-SADS-E) (Orvaschel, 1985), modificado para avaliar os critérios do DSM-IV e preenchido com os pais por assistentes de pesquisa treinados; b) discussão dos diagnósticos derivados em comitê clínico, coordenado por psiquiatra da infância e adolescência com larga experiência clínica; c) avaliação clínica do TDAH e comorbidades de acordo com critérios do DSM-IV por um psiquiatra da infância e adolescência que recebeu previamente os resultados do K-SADS-E e que conduziu entrevistas com os pais (geralmente a mãe) e a criança ou adolescente. Na ocorrência de uma discrepância no diagnóstico no processo de três fases, deu-se preferência ao diagnóstico derivado de entrevistas clínicas.

Uma avaliação cognitiva baseada nos subtestes cubos e vocabulário do *Weschler Intelligence Scale – Third edition* (WISC-III; Weschler, 1991) foi realizada por um psicólogo treinado para uma estimativa do QI. Ainda, os pais completaram a *Child Behavior Checklist* (CBCL), *Parent Report Form* (Achenbach, 1991), uma lista de sintomas que relata os problemas comportamentais da criança e tem um alto poder discriminatório para o diagnóstico clínico do TDAH. Dados referentes à *Swanson, Nolan and Pelham Scale - version IV* (SNAP-IV), uma escala que mede em escores sintomas das áreas de desatenção, hiperatividade, impulsividade e oposição (Swanson e cols., 2001), também foram coletados em parte da amostra. Para os pacientes que frequentavam a escola, foi enviado para o professor uma Escala de Problemas de Atenção (CBCL – *Teacher Report Form*, TRF) (Achenbach, 1991), que inclui itens relacionados ao TDAH em sala de aula. Informações sócio-demográficas foram sistematicamente coletadas dos pais.

Para a coleta da amostra obtida em escolas públicas (n=100), os professores foram inicialmente treinados por um psiquiatra da infância e adolescência para detectar sintomas de desatenção nos alunos. Os alunos identificados nessa triagem como possíveis casos de TDAH foram convidados à fase diagnóstica do estudo, realizada no ProDAH, que então seguiu o processo de três etapas descrito anteriormente. Maiores detalhes podem ser vistos em Schmitz e cols. (2006).

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do HCPA e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). Aos pais foram prestados esclarecimentos, e, concordando em participar deste projeto, as famílias foram integradas na amostra. Os pais forneceram consentimento informado por escrito e os probandos concordaram verbalmente em participar do estudo. Após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi coletada uma amostra de sangue de 5 mL para extração de DNA de cada membro da família, ou seja, pai, mãe e paciente. Todas as informações necessárias para o andamento do trabalho foram

obtidas durante o atendimento dos pacientes pelo Programa. Nenhum procedimento que não se incluía na rotina de atendimento foi realizado, exceto as coletas das amostras de sangue. É importante ressaltar que as amostras foram identificadas por números específicos colocados nos tubos, de forma que o número do prontuário do HCPA e a identidade do paciente e de seus pais ficaram preservados fora do âmbito do Hospital.

Análises Laboratoriais

O DNA utilizado no estudo foi obtido a partir de sangue periférico e extraído através da técnica de “salting out” descrito por Lahiri e Nurnberger (1991). Para identificação do polimorfismo *TaqIA*, o DNA foi amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR) de acordo com a técnica descrita por Huang e cols (2003), sendo em seguida checado em gel de agarose 1,5% e visualizado sob luz ultravioleta para verificação da presença da banda de DNA amplificado. O polimorfismo *TaqIA* foi genotipado através do uso de 15 microlitros do produto de PCR, seguido de reação de digestão do mesmo com 5 unidades da enzima de restrição *TaqI* (PCR-RFLP), e posterior incubação da clivagem por 3 horas a 65° C. O produto da reação de clivagem foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta para identificação dos genótipos. Os alelos A1 (com a timina, ausência do sítio *TaqI* “A”) e A2 (com a citosina, presença do sítio *TaqI* “A”) foram reconhecidos pela presença de uma banda (com 310 pares de base) e duas bandas no gel (de 130 e 180 pares de base), respectivamente. Para o polimorfismo -141C *Ins/Del* o DNA foi amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR) de acordo com a técnica descrita por Arinami e cols (1997), e em seguida checado em gel de agarose 1,5% e visualizado sob luz ultravioleta para verificação da presença da banda de DNA amplificado. Para a genotipagem foram usados 8 microlitros do produto de PCR, seguido de reação de digestão do mesmo com 5 unidades da enzima de restrição *MvaI* (PCR-RFLP), e posterior incubação da clivagem *overnight* a 37° C. Para a identificação dos genótipos, o produto da reação de clivagem foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2,5% corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta. Os alelos A1 (deleção da citosina) e A2 (inserção da citosina) foram reconhecidos pela presença de uma banda (com 304 pares de base) e duas bandas no gel (de 160 e 144 pares de base), respectivamente

Análises estatísticas

As frequências gênicas e genóticas em indivíduos descendentes de europeus e não-aparentados foram estimadas por contagem direta dos genótipos. O Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi calculado com o teste X^2 . A investigação da hipótese de associação do TDAH com os polimorfismos *TaqIA* e *-141C Ins/Del* foi feita utilizando-se o *software* FBAT 2.0.2, programa que estima as associações genéticas a partir de probabilidades de transmissão de alelos à descendência afetada. Este programa é estatisticamente bastante restritivo, uma vez que ele só utiliza trios completos (pai, mãe e filho), onde pelo menos um dos pais seja heterozigoto, para efetivar os cálculos estatísticos. Assim, a probabilidade de erro tipo I fica reduzida. O *software* MLocus foi utilizado para fazer a estimativa do desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos estudados. Análises dimensionais foram realizadas por ANOVA de uma via, através do *software* SPSS 14.0, utilizando-se escores de sintomas gerados pela escala SNAP-IV. O nível de significância aceito foi de 0,05 em todas as análises.

Resultados

No presente estudo, 478 pacientes puderam ser avaliados. Estes são predominantemente meninos (79,1%) e descendentes de europeus (86,3%), com uma idade média de 10,1 ($\pm 3,0$) anos e QI médio de 92,5 ($\pm 13,8$). O subtipo combinado da doença foi o mais comum (66,8%), seguido dos subtipos predominantemente desatento (26,1%) e predominantemente hiperativo-impulsivo (7,1%). Transtorno de oposição desafio foi a comorbidade mais comum (47,5%), mas transtornos de ansiedade (27,8%), transtorno de conduta (14,4%) e transtornos de humor (13,3%) também foram freqüentes.

As frequências gênicas e genóticas da nossa amostra foram calculadas apenas para os descendentes de europeus não aparentados, resultando num total de 299 indivíduos utilizados nestes cálculos. Para o polimorfismo *-141C Ins/Del*, o alelo mais freqüente foi o A2 (0,89), enquanto o genótipo mais comum foi o A2A2 (0,79). Para o polimorfismo *TaqIA*, o alelo e genótipo mais prevalentes foram o A2 (0,79) e o A2A2 (0,59), respectivamente. Mais detalhes sobre esses dados podem ser vistos na Tabela 1. Para ambos os polimorfismos, as frequências estão em Equilíbrio de Hardy-Weinberg e de acordo com o descrito na literatura para o grupo étnico avaliado.

Todos os pacientes genotipados ($n = 478$) foram incluídos nas análises de associação feitas com o programa FBAT. Entretanto, os mesmos foram investigados em diferentes subgrupos de pacientes: 1) a amostra total obtida pelo ProDAH (amostra clínica total); 2) pacientes do subtipo combinado de TDAH (pacientes com no mínimo 6 sintomas de desatenção e 6 sintomas de hiperatividade/impulsividade, obtidos entre o total de pacientes provenientes do ProDAH); 3) pacientes do subtipo desatento (mínimo de 6 sintomas de desatenção e menos de 6 sintomas de hiperatividade/impulsividade, obtidos entre pacientes provenientes do ProDAH e de escolas públicas); e 4) pacientes com comorbidades com Transtorno de Oposição Desafio (TOD) e/ou Conduta (TC) (obtidos entre o total de pacientes provenientes do ProDAH). É importante observar que cada subgrupo de pacientes contou com um número diferente de indivíduos, de acordo com os critérios de inclusão na análise. Os resultados observados, apresentados na Tabela 2, não indicaram qualquer associação com o TDAH, uma vez que nenhum dos alelos em ambos os polimorfismos foi preferencialmente transmitido para o filho afetado. As análises realizadas pelo programa mLocus não mostraram desequilíbrio de ligação entre o polimorfismo -141C *Ins/Del* e o polimorfismo *TaqIA* ($D'=0.134$; $P \leq 0,006$). Por esta razão, não foi investigada a possibilidade de associação de ambos os polimorfismos em haplótipos. As análises dimensionais realizadas utilizando os escores de desatenção, hiperatividade, impulsividade e oposição da escala SNAP-IV também não apresentaram resultados significativos (Tabela 3).

Discussão

Os resultados de associação utilizando métodos baseados em família apresentados pela literatura (Kirley e cols., 2002; Kustanovich e cols., 2004) corroboram nossos resultados negativos obtidos para o polimorfismo *TaqIA*, indicando que a região *DRD2/ANKK1* não está desempenhando um papel direto na predisposição para o TDAH na amostra estudada. Porém, outros estudos, que utilizaram comparações caso-controle, mostraram associação do alelo A1 do *TaqIA* com o TDAH (Sery e cols., 2006; Kopeckova e cols., 2008; Paclt e cols., 2010). Estudos com análises de associação baseadas em família, especialmente as que utilizam o teste de desequilíbrio de transmissão (TDT) e/ou o programa FBAT, são mais restritivos, uma vez que o número amostral tende a ficar diminuído devido ao fato desses testes utilizarem apenas uma parcela da amostra, considerada informativa. Assim, é possível que os resultados negativos obtidos no presente estudo se devam a um erro estatístico do tipo II ocorrido em

função do método de análise utilizado, o que poderia explicar também as inconsistências da literatura.

Esses resultados já publicados também nos sugerem que, se de fato existe, a influência dessa região no TDAH ainda está longe de ser compreendida. O mecanismo pelo qual o polimorfismo *TaqIA* atua no sistema dopaminérgico permanece ainda pouco esclarecido. De acordo com Ponce e cols (2009), esse SNP pode ser simplesmente um marcador, podendo estar em desequilíbrio de ligação com outros polimorfismos dentro do gene *DRD2*, e disso resultar a associação com os transtornos psiquiátricos e abuso de substâncias descritas na literatura. Por outro lado, os diferentes genótipos do *TaqIA* podem refletir-se em variações funcionais da *ANKK1 kinase*, implicando assim em diferentes fenótipos para uma transmissão dopaminérgica, uma vez que essa proteína pode ser enquadrada na família das proteínas “*receptor interacting protein*” (RIP), que participam nas vias de transdução de sinal. Sabe-se que o polimorfismo *TaqIA* do *DRD2/ANKK1* modula a densidade de receptores D2, estando o alelo A1 associado com a redução do receptor em 30% na região do estriado (Thompson e cols., 1997; Pohjalainen e cols., 1998; Jonsson e cols., 1999; Ritchie e Noble, 2003). Esta redução é particularmente proeminente em partes ventrais do núcleo caudado e putamen. Além disso, a redução do metabolismo de glicose é observada em portadores do alelo A1, não só no corpo estriado, mas também em áreas remotas como a ventral e a medial do córtex pré-frontal (Noble e cols., 1997). Apesar destas evidências, algumas pesquisas utilizando o polimorfismo *TaqIA* para investigar a influência dessa região genômica em pacientes com obesidade, abusos de diferentes substâncias, e diferentes transtornos psiquiátricos, como a esquizofrenia, síndrome de Tourette e personalidade anti-social, têm encontrado resultados positivos porém controversos em relação a qual alelo estaria ocasionando risco (Epstein e cols., 2007; Blum e cols., 1991; Comings e cols., 1991; Munafo e cols., 2004; Noble 1994; Parsons e cols., 2007). Da mesma forma, a literatura não confirma a existência de um alelo de risco para o TDAH, sugerindo que mais estudos devam ser realizados para esclarecer a participação da região genômica *DRD2/ANKK1* neste transtorno.

Para o polimorfismo -141C *Ins/Del*, não havia dados na literatura indicando um alelo de risco associado especificamente ao TDAH. Porém, por se tratar de um polimorfismo localizado na região promotora do gene *DRD2*, sua possível influência foi abordada e testada nesse estudo, a fim de investigar mais detalhadamente sua relação com o TDAH. Entretanto, não foram observados resultados positivos, à semelhança do estudo de Johann e cols. (2005) em alcoolistas com TDAH.

Por se tratar de uma doença complexa, o TDAH implica em muitos genes de pequeno efeito interagindo entre si e com o ambiente para designar uma resposta biológica que chamamos de fenótipo. Isso pode estar intrinsecamente relacionado com a ausência de um efeito significativo para os polimorfismos em questão verificado no presente estudo. Embora esses resultados possam simplesmente significar que nenhuma das variantes está envolvida na etiologia do TDAH na nossa população, é possível que o efeito real de cada uma delas não só seja muito pequeno, como dependa de diferentes polimorfismos atuando conjuntamente (Waldman and Gizer, 2006). Neste sentido, análises de haplótipos poderiam aumentar o poder de detecção de associações sutis, além de ser um método interessante para investigar a forma como diferentes polimorfismos influenciam um fenótipo. Entretanto, não verificamos desequilíbrio de ligação entre as variantes estudadas, não sendo possível realizar tais análises. Um número amostral reduzido também poderia explicar os resultados negativos. Porém, consideramos o tamanho da presente amostra (~ 480 famílias) razoável para a detecção de efeitos pequenos, quando comparado ao dos demais estudos realizados com a região *DRD2/ANKK1* (Gizer e cols., 2009; Sharp e cols., 2009). Outra razão para ausência de associação no presente estudo poderia ser a utilização de métodos de análises não totalmente adequados à investigação da influência de genes de pequeno efeito em doenças multifatoriais. Como já salientado, é possível que uma comparação caso-controle evidenciasse efeitos significativos na presente amostra. Porém, a falta de um grupo controle adequado nos impediu de verificar esta possibilidade, ficando a sugestão para estudos futuros. Apesar de a abordagem do TDAH como categoria discreta em estudos moleculares seja amplamente empregada, a investigação do fenótipo de maneira dimensional também pode ser entendida como uma alternativa metodológica, uma vez que todos os pacientes podem ser incluídos nas análises, e que diferenças fenotípicas menores podem ser acessadas. No entanto, esta abordagem também não evidenciou resultados positivos na nossa amostra.

Problemas de estratificação da amostra e falhas ou diferenças na coleta de dados diagnósticos e clínicos também podem ser fatores que influenciam os resultados em um estudo de associação. Em relação ao TDAH, é bem aceito que a grande heterogeneidade fenotípica da doença represente uma heterogeneidade etiológica também marcante, que supostamente se reflete nos achados divergentes. Investigar a transmissão alélica de cada polimorfismo definindo subamostras de acordo com a sintomatologia e a presença ou não de comorbidades, por exemplo, permite que cada subgrupo amostral se apresente de forma mais homogênea, possivelmente aumentando o poder da análise. Apesar disso, não encontramos

nenhuma associação em subgrupos mais similares de pacientes. É interessante comentar, entretanto, alguns resultados que obtivemos. Para o subgrupo de pacientes com as comorbidades TOD e/ou TC, verificamos um aumento de transmissão do alelo A2 do polimorfismo *TaqIA*, embora não significativo ($P = 0,131$, Tabela 2). Já para o polimorfismo *-141C Ins/Del*, a comparação por um teste *t* de Student entre indivíduos portadores do alelo A2 (genótipos A1A2 e A2A2) e não portadores (genótipo A1A1), grupos bastante diferentes em relação às médias da SNAP-IV na área de oposição (Tabela 3), permitiu observar uma tendência a um aumento dos escores na ausência do alelo A2 ($P = 0,097$). Esses transtornos ou sintomas externalizadores estão relacionados diretamente com a impulsividade e a busca por novidades, focos principais de diversos estudos com o *DRD2/ANKK1* (Comings e cols., 1997; Lu e cols., 2001; Esposito-Smythers e cols., 2009). Além disso, a existência de um subtipo etiológico distinto de TDAH quando TOD e/ou TC ocorrem em comorbidade, em comparação a pacientes sem essas doenças, vem sendo sugerida na literatura (Nadder e cols., 2002; Jain e cols., 2007; Anney e cols., 2008; Christiansen e cols., 2008; Zhou e cols., 2008; Petty e cols., 2009). Isso nos leva a questionar se há uma possível influência desses polimorfismos especificamente nos pacientes que apresentam esses tipos de sintomas, o que poderia ser verificado em novas análises com subamostras maiores e/ou com uma melhor caracterização para sintomas externalizadores além dos do TDAH. Considerando-se ainda a marcante associação clínica entre esses três transtornos, justifica-se a relevância de explorar estas hipóteses em estudos futuros.

Apesar dos resultados negativos obtidos no presente estudo, não podemos considerar nula a participação do gene *DRD2* na etiologia do TDAH, principalmente por não compreendermos de forma clara quais são os mecanismos neurobiológicos que envolvem o *DRD2/ANKK1* e os polimorfismos estudados nesse transtorno. O entendimento do papel que a região *DRD2/ANKK1* exerce no TDAH, e em outros transtornos psiquiátricos, não deve estar restrito apenas à análise de alguns polimorfismos. Essa influência deve ser investigada levando em consideração vários aspectos que envolvem esse sistema biológico, que deve ser entendido como um sistema complexo influenciado por inúmeros fatores para gerar a resposta biológica dada pelo organismo. Estamos ainda distantes de encontrar uma resposta satisfatória para nossas indagações. O estudo envolvendo doenças psiquiátricas e complexas, como é o caso do TDAH, deve ser otimizado, minimizando as falhas metodológicas e procurando analisar diferentes polimorfismos, preferencialmente funcionais, com a finalidade de obter

uma resposta mais completa e objetiva, e assim trazer um melhor esclarecimento sobre a etiologia dessas doenças.

Referências Bibliográficas

Achenbach TM. 1991. Manual for the child behavior checklist. Burlington: University Of Vermont/Department Of Psychiatry.

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

American Psychiatric Association. 1994. Diagnostic and statistical manual of mental disorders, 4. Ed. (DSM-IV). American Psychiatric Association, Washington DC, Biederman J, Faraone SV. 2005. Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Lancet* 366: 237-248.

Anney RJ, Lasky-Su J, O'Dúshláine C, Kenny E, Neale BM, Mulligan A, Franke B, Zhou K, Chen W, Christiansen H, Arias-Vásquez A, Banaschewski T, Buitelaar J, Ebstein R, Miranda A, Mulas F, Oades RD, Roeyers H, Rothenberger A, Sergeant J, Sonuga-Barke E, Steinhausen H, Asherson P, Faraone SV, Gill M. 2008. Conduct disorder and ADHD: evaluation of conduct problems as a categorical and quantitative trait in the international multicentre ADHD genetics study. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 147B(8):1369-78.

Arinami T, Gao M, Hamaguchi H, Toru M. 1997. A functional polymorphism in the promoter region of the dopamine D2 receptor gene is associated with schizophrenia. *Hum Mol Genet* 6:577-582.

Blum K, Noble EP, Sheridan PJ, Finley O, Montgomery A, Ritchie T, Ozkaragoz T, Fitch RJ, Sadlack F, Sheffield D. 1991. Association of the A1 allele of the D2 dopamine receptor gene with severe alcoholism. *Alcohol* 8:409-416.

Christiansen H, Chen W, Oades RD, Asherson P, Taylor EA, Lasky-Su J, Zhou K, Banaschewski T, Buschgens C, Franke B, Gabriels I, Manor I, Marco R, Müller UC, Mulligan A, Psychogiou L, Rommelse NN, Uebel H, Buitelaar J, Ebstein RP, Eisenberg J, Gill M, Miranda A, Mulas F, Roeyers H, Rothenberger A, Sergeant JA, Sonuga-Barke EJ, Steinhausen HC, Thompson M, Faraone SV. 2008. Co-transmission of conduct problems with attention-deficit/hyperactivity disorder: familial evidence for a distinct disorder. : *J Neural Transm.* 115(2):163-75.

Comings DE, Comings BG, Muhleman D, Dietz G, Shahbahrani B, Tast D, Knell E, Kocsis P, Baumgarten R, Kovacs BW. 1991. The dopamine D2 receptor locus as a modifying gene in neuropsychiatric disorders. *Jama* 266:1793-1800.

Comings DE, Gade R, Wu S, Chiu C, Dietz G, Muhleman D, Saucier G, Ferry L, Rosenthal RJ, Lesieur HR, Ruggle LJ, Macmurray P. 1997. Studies of the potential role of the dopamine D1 receptor gene in addictive behaviors. *Mol Psychiatry* 2:44-56.

- Cormier E. 2008. Attention deficit/hyperactivity disorder: a review and update. *J Pediatr Nurs* 23(5):345-57.
- Duan J, Wainwright MS, Comeron JM, Saitou N, Sanders AR, Gelernter J. 2003. Synonymous mutations in the human dopamine receptor D2 (DRD2) affect mRNA stability and synthesis of the receptor. *Hum Mol Genet* 12:205–16.
- Drtilkova I, Sery O, Theiner P, Uhrova A, Zackova M, Balastikova B, Znojil V. 2008. Clinical and molecular-genetic markers of ADHD in children. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 147B(8):1345-54.
- Epstein JN, Casey BJ, Tonev ST, Davidson M, Reiss AL, Garrett A, Hinshaw SP, Greenhill LL, Glover G, Shafritz KM, Vitolo A, Kotler LA, Jarrett MA, Spicer J. 2007. ADHD- and medication-related brain activation effects in concordantly affected parent-child dyads with ADHD. *J Child Psychol Psychiatry* 48:899–913.
- Esposito-Smythers C, Spirito A, Rizzo C, Mcgeary JE, Knopik VS. 2009. Associations of the DRD2 *TaqIA* polymorphism with impulsivity and substance use: preliminary results from a clinical sample of adolescents. *Pharmacol biochem behave* 93(3):306-12.
- 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.
- Faraone SV, Mick E. 2010. Molecular Genetics of Attention Deficit Hyperactivity Disorder. *Psychiatr Clin N Am* 33:159–180.
- Flegontova OV, Khrunin AV, Ilyova OI, Tarskaia LA, Spitsyn VA, Mikulich AI, Limorska SA. 2009. Haplotype frequencies at the DRD2 locus in the populations of the east European plain. *BMC Genet* 10:62.
- Genro JP, Kieling C, Rhode LA, Hutz MH. 2010. Attention-deficit/hyperactivity disorder and the dopaminergic hypotheses. *Expert Review Of Neurotherapeutics* 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.
- Grandy DK, Zhang Y, Civelli O. 1993. PCR detection of the *TaqIA* RFLP at the DRD2 Locus *Hum Mol Genet* 12, 2197.
- Hauge XU, Grandy DK, Eubanks JH, Evans GA, Civelli O, Litt M. 1991. Detection and characterization of additional DNA polymorphisms in the dopamine D2 receptor gene. *Genomics* 10:527–530.
- Huang YS, Lin SK, Wu YY, Chao CC, Chen CK. 2003. A Family based association study of attention-deficit hyperactivity disorder and dopamine D2 receptor *TaqIA* Alleles transmission disequilibrium testing of dopamine-related candidate gene polymorphisms in ADHD: confrmation of association of ADHD with DRD4 and DRD5. *Chang Gung Med J* 26:897–903.

- Jain M, Palacio LG, Castellanos FX, Palacio JD, Pineda D, Restrepo MI, Muñoz JF, Lopera F, Wallis D, Berg K, Bailey-Wilson JE, Arcos-Burgos M, Muenke M. 2007. Attention-deficit/hyperactivity disorder and comorbid disruptive behavior disorders: evidence of pleiotropy and new susceptibility loci. *Biol Psychiatry* 61(12):1329-39.
- Jocham G, Klein TA, Neumann J, Von Cramon DY, Reuter M, Ullsperger M. 2009. Dopamine DRD2 polymorphism alters reversal learning and associated neural activity. *J Neurosci* 29:3695–3704.
- Johann M, Putzhammer A, Eichhammer P, Wodarz N. 2005. Association of the -141C *Del* variant of the dopamine D2 receptor (DRD2) with positive family history and suicidality in German alcoholics. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 132:46-49.
- Jonsson EG, Nothen MM, Grunhage F, Farde L, Nakashima Y, Propping P, Sedvall GC. 1999. Polymorphisms in the dopamine D2 receptor gene and their relationships to striatal dopamine receptor density of healthy volunteers. *Mol Psychiatry* 4:290–29
- Kandel ER. 1991. Disorders of thought: schizophrenia. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM. (Eds.) *Principles Of Neural Science*, 3rd Edn. Pp. 853-868. East Norwalk: Appleton And Lange.
- Kirley A, Hawi Z, Daly G, Mccarron M, Mullins C, Millar N, Waldman I, Fitzgerald M, Gill M. 2002. Dopaminergic system genes in ADHD: toward a biological hypothesis. *Neuropsychopharmacology* 27:607–619.
- Kollins SH, Anastopoulos AD, Lachiewicz AM, Fitzgerald D, Morrissey-Kane E, Garrett ME, Keatts SL, Ashley-Koch AE. 2008. SNPs in dopamine D2 receptor gene (DRD2) and norepinephrine transporter gene (NET) are associated with continuous performance task (CPT) phenotypes in ADHD children and their families. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147b:1580-1588.
- Kopeckova M, Paclt I, Petrasek J, Pacltova D, Malikova M, Zagatova V. 2008. Some ADHD polymorphisms (in genes DAT1, DRD2, DRD3, DBH, 5-HTT) in case-control study of 100 subjects 6–10 age. *Neuroendocrinol Lett* 29:246–251.
- Kustanovich V, Ishii J, Crawford L, Yang M, MCGough JJ, Mccracken JT, Smalley SL, Nelson SF. 2004. Transmission disequilibrium testing of dopamine-related candidate gene polymorphisms in ADHD: Confirmation of association of ADHD with DRD4 and DRD5. *Mol Psychiatry* 9:711–717.
- Lahiri DK, Nurnberger JI. 1991. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 19: 5444.
- Lu RB, Lee JF, Ko HC, Lin WW. 2001. Dopamine D2 receptor gene (DRD2) is associated with alcoholism with conduct disorder. *Alcohol Clin Exp Res* 25:177-184.
- Luman M, Sergeant JA, Knol DL, Oosterlaan J. 2010. Impaired decision making in oppositional defiant disorder related to altered psychophysiological responses to reinforcement. *Biological Psychiatry* 68(4):337-344.

- Makris N, Biederman J, Monuteaux MC, Seidman LJ. 2009. Towards conceptualizing a neural systems-based anatomy of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Dev Neurosci* 31:36-49.
- Munafò M, Clark T, Johnstone E, Murphy M, Walton R. 2004. The genetic basis for smoking behavior: a systematic review and meta-analysis nicotine. *Tob Res* 6(4):583–597.
- Nadder TS, Rutter M, Silberg JL, Maes HH, Eaves LJ. 2002. Genetic effects on the variation and covariation of attention deficit-hyperactivity disorder (ADHD) and oppositional-defiant disorder/conduct disorder (Odd/CD) symptomatologies across informant and occasion of measurement. *Psychol Med* 32(1):39-53.
- 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 JH. 2008. Co-morbidity in adults with ADHD. *CNS Spectr* 13(8 Suppl 12):12-15.
- Noble EP, Gottschalk LA, Fallon JH, Ritchie TL, Wu JC. 1997. D2 dopamine receptor polymorphism and brain regional glucose metabolism. *Am J Med Genet* 74:162–166.
- Noble EP. 1994. Polymorphisms of the D2 dopamine receptor gene and alcoholism and other substance use disorders. *Alcohol Suppl* 2:35–43.
- Nyman ES, Ogdie MN, Loukola A, Varilo T, Taanil, A, Hurtig T, Moilanen IK, Loo SK, McGough JJ, Järvelin MR, Smalley SL, Nelson SF, Peltonen L. 2007. ADHD candidate gene study in a population-based birth cohort: association with DBH and DRD2. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 46:1614-21.
- Ohara K, Nagai M, Tani K, Nakamura Y, Ino A, Ohara K. 1998. Functional polymorphism of –141C *Ins/Del* in the dopamine D2 receptor gene promoter and schizophrenia. *Psychiatry Res* 81:117–123.
- Orvaschel H. 1985. Psychiatric interviews suitable for use in research with children and adolescents. *Psychopharmacol Bull* 21(4):737-45.
- Paclt I, Drtilkova I, Kopeckova M, Theiner P, Serý O, Cermakova N. 2010. The Association between *TaqIA* polymorphism of ANKK1 (DRD2) gene and ADHD in the Czech boys aged between 6 and 13 years. *Neuro Endocrinol Lett* 31(1):131-6.
- Parsian A, Todd RD, Devor EJ, O'Malley KL, Suarez BK, Reich T, Cloninger CR. 1991. Alcoholism and alleles of the human D2 dopamine receptor locus. Studies of association and linkage. *Arch Gen Psychiatry* 48 (7):655–663.
- Parsons MJ, Mata I, Beperet M, Iribarren-Iriso F, Arroyo B, Sainz R, Arranz MJ, Kerwin R. 2007. A dopamine D2 receptor gene-related polymorphism is associated with schizophrenia in a Spanish population isolate. *Psychiatr Genet* 17:159–163.
- Petty CR, Monuteaux MC, Mick E, Hughes S, Small J, Faraone SV, Biederman J. 2009. Parsing the familiarity of oppositional defiant disorder from that of conduct disorder: a familial risk analysis. *J Psychiatr Res*. 2009 Jan;43(4):345-52.

- Pohjalainen T, Rinne JO, Någren K, Lehtikoinen P, Anttila K, Syvä-Lahti EK, Hietala J .1998. The A1 allele of the human D-2 dopamine receptor gene predicts low D-2 receptor availability in healthy volunteers. *Mol Psychiatry* 3:256–260.
- Polanczyk G, De Lima MS, Horta BL, Biederman J, Rohde LA. 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. The ANKK1 Kinase Gene And Psychiatric Disorders. *Neurotox Res* 2009; 16: 50-59.
- Prasad P, Ambekar A, Vaswani M. 2010. Dopamine D2 receptor polymorphisms and susceptibility to alcohol dependence in indian males: a preliminary study. *BMC Medical Genetics* 11:24
- Ritchie T, Noble EP. 2003. Association of seven polymorphisms of the D2 dopamine receptor gene with brain receptor-binding characteristics. *Neurochemical Research* 28:73– 82.
- Rohde LA, Halpern R. 2004. Transtorno de deficit de atenção/hiperatividade: atualização. *J Pediatr* 80 (Supl 2): S61-S70.
- Rohde LA. 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, Schmitz M, Polanczyk G, Eizirik M, Rohde L.A, Hutz MH. 2001. Attention-deficit/hyperactivity disorder: a study of association with both the dopamine transporter gene and the dopamine D4 receptor gene. *Am J Med Genet Neuropsychiatr Genet* 105: 471-478.
- Rowe DC, Van Den Oord EJCG, Stever C, Giedinghagen LN, Gard JMC, Cleveland HH, Gilson M, Terris ST, Mohr JH, Sherman S, Abramovitz A, Waldman ID. 1999. The DRD2 *TaqI* polymorphism and symptoms of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry* 4:580-586.
- Schmitz M, Denardin D, Silva TL, Pianca T, Roman T, Hutz MH, Faraone SV, Rohde LA. 2006. Association between Alpha-2a-adrenergic receptor gene and ADHD inattentive type. *Biol Psychiatry* 60(10):1028-33.
- Sery O, Drtilkova I, Theiner P, Pitelova R, Staif R, Znojil V, LochmanJ, Didden W. 2006. Polymorphism of DRD2 gene and ADHD. *Neuroendocrinol Lett* 27:236–240.
- Sharp S, McQuillin A, Gurling HMD. 2009. Genetics of attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD) *Neuropharmacology* 1–11
- Spencer TJ, Biederman J, Mick E. 2007. Attention-deficit/hyperactivity disorder: diagnosis, lifespan, comorbidities, and neurobiology. *J Pediatr Psychol* 32(6):631-42.
- Stergiakouli E, Thapar A. 2010. Fitting the pieces together: current research on the genetic basis of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). *Neuropsychiatric Disease and Treatment*. 6:551–560.

- Swanson JM, Kraemer HC, Hinshaw SP, Arnold LE, Conners CK, Abikoff HB. 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: 168–179.
- Thompson J, Thomas N, Singleton A, Piggott M, Lloyd S, Perry EK, Morris CM, Perry RH, Ferrier IN, Court JA. 1997. D2 dopamine receptor gene (DRD2) *Taq1A* polymorphism: reduced dopamine D2 receptor binding in the human striatum associated with the A1 Allele. *Pharmacogenetics* 7:479–484.
- Waldman ID, Gizer IR. 2006. The genetics of attention deficit hyperactivity disorder. *Clin Psych Rev* 26(4):396-432.
- Weschler DI. 1991. Examiner's Manual: wechsler intelligence scale for children (3th Ed.). New York: Psychological Corporation.
- Wilens TE, Dodson A. 2004. Clinical perspective of attention-deficit/hyperactivity disorder into adulthood. *J Clin Psychiatry* 65:1301–1313.
- Zhang J, Lencz T, Malhotra AK. 2010. Dopamine D2 receptor genetic variation and clinical response to antipsychotic drug treatment: a meta-analysis. *Am J Psychiatry*. In Press.
- Zhou K, Chen W, Buitelaar J, Banaschewski T, Oades RD, Franke B, Sonuga-Barke E, Ebstein R, Eisenberg J, Gill M, Manor I, Miranda A, Mulas F, Roeyers H, Rothenberger A, Sergeant J, Steinhausen HC, Lasky-Su J, Taylor E, Brookes KJ, Xu X, Neale BM, Rijdsdijk F, Thompson M, Asherson P, Faraone SV. 2008. Genetic heterogeneity in ADHD: DAT1 gene only affects probands without CD. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B(8):1481-7.

Tabela 1. Frequências gênicas e genotípicas dos polimorfismos *TaqIA* e *-141C Ins/Del* em pacientes descendentes de europeus não aparentados (n = 299).

	Frequências Gênicas		Frequências Genotípicas		
	A1	A2	A1A1	A1A2	A2A2
<i>TaqI A</i>	0.21	0.79	0.02	0.38	0.59
<i>-141C ins/del</i>	0.11	0.89	0.01	0.20	0.78

Tabela 2. Resultados da análise de associação verificada através do programa FBAT– amostra clínica total, subtipo clínico combinado, subtipo clínico desatento e pacientes com comorbidade com TOD e/ou TC.

Polimorfismo	Alelo	N ¹	Observado ²	Esperado ³	Z	P
Amostra Clínica Total⁴						
TaqIA	A1	135	86	92	-0.983	0.326
	A2		192	185	0.983	
-141C ins/del	A1	81	50	51	-0.206	0.835
	A2		116	115	0.206	
Subtipo Combinado⁴						
TaqIA	A1	79	48	52	-0.905	0.366
	A2		112	107	0.905	
-141C ins/del	A1	49	29	28	0.277	0.782
	A2		69	70	-0.277	
Subtipo Desatento⁴						
TaqIA	A1	86	63	66	-0.557	0.577
	A2		115	112	0.557	
-141C ins/del	A1	44	25	29	-1.192	0.233
	A2		69	64	-1.192	
TOD e/ou TC⁴						
TaqIA	A1	68	40	47	-1.510	0.131
	A2		96	89	1.510	
-141C ins/del	A1	48	30	29	0.137	0.890
	A2		66	66	-0.137	

¹Nº de famílias informativas incluídas no teste.

²Nº observado de transmissões.

³Nº esperado de transmissões sob a hipótese nula de ausência de associação.

⁴Ver no texto detalhes sobre a definição dos subgrupos.

Tabela 3. Resultado das análises dimensionais (ANOVA de uma via) para os escores de sintomas de desatenção, hiperatividade/impulsividade, oposição e total, obtidos pela escala SNAP-IV.

Genótipos	Desatento¹	Hiperativo/Impulsivo²	Oposição³	Total⁴
-141C ins/del				
11	3.94±1.84	1.58±0.82	0.43±0.01	1.62±0.62
12	3.50±1.98	1.62±0.85	0.27±0.15	1.51±0.56
22	4.21±2.25	1.63±0.76	0.29±0.16	1.61±0.55
<i>F</i>	1,936	0,027	1,387	0,858
<i>P</i>	0,146	0,973	0,255	0,425
TaqI A				
11	2.54±2,619	1,95±0,67	0,36±0,17	1,84±0,46
12	4,15±2,312	1,63±0,83	0,26±0,16	1,58±0,60
22	3,99±2,076	1,61±0,75	0,30±0,15	1,58±0,50
<i>F</i>	0,432	0,288	1,105	0,651
<i>P</i>	0,650	0,750	0,335	0,523

¹Covariáveis incluídas no modelo: Idade, subtipo de TDAH.

²Covariáveis incluídas no modelo: Idade, subtipo de TDAH, etnia.

³Covariáveis incluídas no modelo: Idade, subtipo de TDAH, história familiar de TDAH.

⁴Covariáveis incluídas no modelo: Idade, subtipo de TDAH, etnia.

Neuropsychiatric Genetics

Part B of the *AMERICAN JOURNAL OF MEDICAL GENETICS*

Neuropsychiatric Genetics welcomes and encourages the online submission and peer-review of articles. Authors who would like to submit and be reviewed online are directed to where detailed instructions for this process are given.

Editorial Features

1. *Research Articles*. Reports of novel research on the genetic mechanisms underlying psychiatric and neurological disorders. An Abstract, Materials, Methods, and Results sections are required. There are no restrictions on the number of pages or figures.
2. *Review Articles* review a specific field through an appropriate literature survey. An Abstract is required. Materials and Methods and Results sections are not required. Although there are no restrictions on the number of pages or figures, the Review should be concise as possible.
3. *Editorials* (on general matters) and (invited) *Editorial Comments*. Although Editorials are usually on a matter published in the same issue of the journal, speculative discussions, and proposals of hypotheses amenable for testing may also be submitted for consideration. Editorials should be accompanied by a list of key words for indexing purposes; if necessary, additional words can be circled on page proofs for that purpose. Speculative discussions, and proposals of hypotheses amenable for testing may be submitted for consideration.
4. *Letters to the Editor* are welcomed from all scientists who wish to comment on investigations within the editorial scope and content of *Neuropsychiatric Genetics*. *Letters to the Editor* represent the personal opinions of the authors, and do not necessarily reflect those of the Editor or the Publisher. Space limitations do not enable the journal to publish all letters received; submissions may be altered for space and clarity.
5. *Rapid Publications*. The Journal will publish rapid communications of full-length, critically reviewed papers that report new and important advances in neuropsychiatric genetics. In order to have a manuscript considered for rapid publication, authors must write a letter of intent prior to submission and send an abstract to the Editors for consideration. The letter of intent should outline the author's rationale for publishing the article as a rapid publication. The Editors will respond to the author with a decision on whether the article is eligible for processing as a rapid communication within 48 hours. At that time the author will also be informed of the anticipated length of time from acceptance to publication for the article.

Manuscripts accepted for publication as Rapid articles must adhere to the format of the Journal as specified in the Instructions for Contributors.

Please note that Rapids will not go through the usual copyediting process as do the

regular articles. Therefore, it is the author's responsibility to ensure that all the data in tables, figure legends, and references are complete and accurate. **Galley proofs will be sent to the author for review approximately 1 - 2 weeks after acceptance. Authors are allowed to correct typesetting errors only. Any extensive corrections made at this stage will result in a publication delay. If extensive corrections are made, the Rapid will be treated as a regular manuscript. The author should fax his/her corrections to the production editor within 24 - 48 hours of receipt.**

Please contact the Journal Editorial Office should you need further information.

Editorial Policy on Association Studies

Because *Neuropsychiatric Genetics* receives a large number of association studies, the Editors and Associate Editors have crafted guidelines to help authors understand the considerations that enter into our decisions about whether to accept or reject such studies. These guidelines are as follows:

1. As a field we have systematically underestimated the sample sizes needed to achieve sufficient statistical power and replicable results. Therefore, we give priority to large studies, having a minimum of 500 cases and 500 controls (or equivalent). These numbers are likely to increase in the future. We understand that somewhat smaller samples may be suitable for some applications (e.g., imaging studies, other traits believed to have high effect sizes, studies in special populations, etc.). Smaller studies will be considered but the sample size would need to be justified in the Method section.
2. Ideally, any positive finding would include an adequately powered replication sample.
3. As a field, genotyping coverage has usually been inadequate. With the dramatic decreases in genotyping costs since 2001, it is now within the means of most groups to conduct comprehensive genotyping. The genomic coverage for the genomic region(s) being studied should be justified. Ideally, tagging SNPs will be chosen to cover the complete gene, although replication studies could focus on fewer variants.
4. P-values should be corrected for multiple comparisons.
5. Effect sizes should be presented, especially when claiming a failure to replicate a prior finding.

Manuscript Submissions

Manuscripts should be submitted online at: <http://mc.manuscriptcentral.com/ajmg-b> .
Neuropsychiatric Genetics now requests a copyright transfer agreement be completed and returned to the Editorial Office at the time of manuscript submission.

Editorial office contact information:

Karen Irwin, Editorial Assistant
Neuropsychiatric Genetics
17 Manomet Road

Sagamore Beach, MA 02562
Phone: (508) 888-0199
Fax: (508) 338-4067
neuropsychiatricgenetics@gmail.com

Submit all new manuscripts online. Launch your web browser and go to <http://mc.manuscriptcentral.com/ajmg-b> . Check for an existing account. If you are submitting for the first time, create a new account. Follow all instructions. At the end of a successful submission, a confirmation screen with manuscript number will appear and you will receive an email confirming that the manuscript has been received by the journal. If this does not happen, please check your submission and/or contact tech support at support@scholarone.com .

Field Editors will coordinate the review of manuscripts. Authors may request an appropriate Field Editor to handle the review process; please include any such requests in the cover letter accompanying manuscripts. See the masthead of Part B for a complete listing of Field Editors. **Authors must suggest 5 possible reviewers.**

Manuscripts submitted to the *American Journal of Medical Genetics* that fall within the scope of *Neuropsychiatric Genetics* may, at the discretion of the Editor, be forwarded to the Editor for consideration, in which case the authors will be notified.

Manuscripts for consideration by *Neuropsychiatric Genetics* must be submitted solely to this journal, and in submitting a manuscript the corresponding author warrants that it has been approved for publication by all co-authors and institutions at which the work was performed, and has not been published, either in whole or in part, in another publication of any type, professional or lay. Upon acceptance of a manuscript for publication, the corresponding author will be required to sign an agreement transferring copyright to the publisher. All such manuscripts become the property of the publisher, and no material published in *Neuropsychiatric Genetics* or the *American Journal of Medical Genetics* may be reproduced or published elsewhere without written permission from the publisher, who reserves copyright.

Research performed on human subjects must be accompanied by a statement of compliance with the Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) and the standards established by the author's Institutional Review Board and granting agency. If photographs or any other identifiable data are included, a copy of the signed consent must accompany the manuscript. All statements in, or omissions from, published manuscripts are the responsibility of the authors, who will be asked to review proofs prior to publication. Reprint order forms will be sent with the page proofs. No page charges will be levied against authors or their institutions for publication in the journal.

Authors in Japan, please note: Wiley-Japan can provide authors in Japan with a list of recommended services to check and improve the English of their papers before submission. Please contact Masayo Kobayashi in the Wiley-Japan office by fax (03-5228-3090) or E-mail (wileyjpn@mb.kcom.ne.jp) for more information.

Early View. Beginning with calendar 2001 issues, we are pleased to announce the introduction of Early View ® (<http://www.interscience.wiley.com>) for AJMG. Online

publication of individual articles in full text HTML and PDF format before release of the compiled print issue of the journal. All articles posted online in Early View® are peer-reviewed, copyedited, author corrected, and fully citable. This exciting new feature combines the benefits of fast online availability and issue-based archiving. The official publication date for each article is the date of online posting to facilitate rapid dissemination and will be available approximately 5-6 weeks prior to the print journal.

Format of Manuscript Elements

Manuscripts should contain each of the following elements in sequence:

Title Page. The title page should contain the complete title of the manuscript, names and affiliations of all authors, institution(s) where the work was performed, and the name, address, telephone and telefax numbers of the author responsible for correspondence. Authors should also provide a short title of not more than 45 characters to be used as a running head title.

Abstract. Abstracts, which are not to exceed 250 words, should be a succinct condensation of the contents of the article and the significance of the conclusions.

Key Words. Include up to five key words that reflect the topic of the article, without repeating terms used in the title.

Text. Research articles, although not limited in length, should be concise. The text should include the following sections: Introduction, Materials and Methods, Results, and Discussion. The last element of the text before the References is the Acknowledgments. The use of subheads and paragraph titles is encouraged. Initial definitions should be provided for unusual abbreviations. Units of measurement should be abbreviated according to the Style Manual for Biological Journals, available from the American Institute for Biological Sciences, 1401 Wilson Boulevard, Arlington, VA 22209. All measurements should be in metric units or other internationally accepted units. Authors should use the approved list of pedigree symbols presented at the end of these instructions. Caution should be exercised in using the unmarried/illegitimate dashed lines in identifying such offspring in pedigrees.

References.

Wiley's Journal Styles Are Now in EndNote

EndNote is a software product that we recommend to our journal authors to help simplify and streamline the research process. Using EndNote's bibliographic management tools, you can search bibliographic databases, build and organize your reference collection, and then instantly output your bibliography in any Wiley journal style.

Download Reference Style for this Journal: If you already use EndNote, you can [download the reference style](#) for this journal.

How to Order: To learn more about EndNote, or to purchase your own copy, [click here](#).

Technical Support: If you need assistance using EndNote, contact endnote@isiresearchsoft.com, or visit www.endnote.com/support.

References within the text should be cited by author and year of publication. When referring to a work with more than two authors, the name of the first author should be given, followed by e cols. (e.g., Smith, 1991; Smith and Black, 1991; Smith e cols., 1989a,b). If several papers

by the same author are cited, list in chronological order.

Citations in the reference list are to be arranged alphabetically in the following style: author's name (or names), year of publication, complete title, volume, and inclusive pages.

Abbreviations for journals used in the reference list should conform to Index Medicus. Refer to the following examples when preparing citations:

Journals:

Chitayat D, Hodgkinson KA, Ginsburg O, Dimmick J, Watters GV. 1992. King syndrome: a genetically heterogeneous phenotype due to congenital myopathies. *Am J Med Genet* 43:954-956.

Wright P, Gill M, Murray RM. 1993. Schizophrenia: genetics and the maternal immune response to viral infection. *Am J Med Genet (Neuropsychiatr Genet)* 1:40-46.

Books:

Wilkins AS. 1993. Genetic analysis of animal development. New York: Wiley-Liss. 1223 p.

Chapter in Book:

Whyte MP. 1993. Osteopetrosis and the heritable forms of rickets. In: Royce PM, Steinmann B, editors. *Connective tissue and its heritable disorders*. New York: Wiley- Liss. p 563-589.

Tables. Each table must have a title and should be self-explanatory. Avoid duplicating information in the text. Number tables with Roman numerals in order of their appearance in the text.

Illustrations. Illustrations should be numbered consecutively using Arabic numerals. Figures not properly prepared will be returned for revision. Each figure requires a corresponding legend. Each legend should describe briefly the information presented.

Abbreviations used in figures and photographs must match exactly those used in the text. All color figures will be reproduced in full color in the online edition of the journal at no cost to authors. Authors are requested to pay the cost of reproducing color figures in print (upon acceptance of the manuscript, the publisher will provide price quotes). Authors are encouraged to submit color illustrations that highlight the text and convey essential scientific information. For best reproduction, bright, clear colors should be used. Dark colors against a dark background do not reproduce well; please place your color images against a white background wherever possible.

Supplementary online material. Authors are invited to submit supplementary material for their articles to be posted in the electronic version of the JOURNAL on Wiley Interscience (<http://www.interscience.wiley.com/suppmat/0148-7299/suppmat/>). Supplementary material may include (but is not limited to) video clips, large sections of tabular data, program code, or electronic graphical files that are otherwise not suitable for print media. When submitting material for consideration please follow the guidelines below.

1. Peer review. Supplementary material must be submitted at the time of peer review. Submit a paper copy of the material (in the case of material that exists in electronic form only, please consult the Editor).

2. *Data file types.* Manuscript files AND tables must be submitted in either Microsoft Word (.doc) or Rich Text Format (.rtf). Images (ie: figures, drawings, etc) must be submitted either as .eps or .tiff.

3. *Publication and Access.* Supplementary material for published articles will be made available via the online edition of the JOURNAL (<http://onlinelibrary.wiley.com/resolve/openurl?genre=journal&issn=0148-7299/>). From the table of contents listing, any article that has supplementary material will be noted by a hyperlink that links to a page that describes the material in detail, and to the material itself.

Linking to Databases. Authors may submit genetic and protein database information with their manuscript for the databases listed below and a hypertext link will appear in the online version of the article.

The databases listed below allow hypertext links to records in the database. Authors may submit genetic and protein database information with their manuscript for these databases and a hypertext link will appear in the online version of the article.

[The Genome Database \(GDB\)](#)

[Protein Databank \(PDB\)](#)

[Genbank](#)

[Online Mendelian Inheritance in Man \(OMIM\)](#)

[Molecular Modeling Database \(MMDB\)](#)

[Entrez Genomes](#)

[Entrez Proteins](#)

[European Molecular Biology Laboratory \(EMBL\)](#)

[SpecInfo](#)

[ExPasy](#)

To create hypertext links authors must supply the gene name as it appears in the article, the database where the record appears, and the database specific identification number or name. Please follow the instructions in the Database Linking Submittal form, and submit a copy of that form with your manuscript. It is the responsibility of the author(s) to ensure that the database information that is provided with the manuscript is correct and up to date. The publisher will not submit new information to the databases. Incorrect information will result in the omission of hypertext links in the article. For those articles containing gene and protein sequence information with a corresponding database record (see list of databases) hyperlinked database queries will be added to the online version for the full text HTML and PDF versions of the journal. For the full text HTML, the hypertext links will appear in the Special Content Links section of the Abstract page, the text of the abstract and throughout the full text of the article. For the PDF, the hypertext links will appear only in the Special Content Links section of the abstract page and in the text of the abstract.

Note to NIH Grantees. Pursuant to NIH mandate, Wiley-Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further information, see www.wiley.com/go/nihmandate .

Electronic Proofing

To expedite our publication schedule, page proofs are available in .pdf format. Files in this format are viewed using Adobe Acrobat Reader, which is available as a free download at <http://www.adobe.com>. Page proofs will be available for review approximately 4 weeks from acceptance. You will receive information about file access (via ftp or Internet browser) directly from the typesetters. If you do not wish to receive page proofs in .pdf format, traditional, hard-copy page proofs will be sent via express service. In either case, proof corrections should be returned immediately by fax, e-mail, or express mail. Please notify us of your preferred proof delivery method when submitting your final manuscript. Indicate in your cover letter your page proof choice: ELECTRONIC (pdf) or TRADITIONAL (paper).

Guidelines for Electronic Submission

Text:

Microsoft Word (.doc) or Rich Text Format (.rtf)

Tables:

Microsoft Word (.doc) or Rich Text Format (.rtf)

Please note: This journal does not accept Microsoft WORD 2007 documents at this time. Please use WORD's "Save As" option to save your document as an older (.doc) file type.

Images:

Software and format . All image files should be in TIFF or EPS (with preview) formats. Do not submit native application formats.

All print reproduction requires files for full color images to be in a CMYK color space. If possible, ICC or ColorSync profiles of your output device should accompany all digital image submissions.

Resolution . Journal quality reproduction will require greyscale and color files at resolutions yielding approximately 300 ppi. Bitmapped line art should be submitted at resolutions yielding 600-1200 ppi. These resolutions refer to the output size of the file; if you anticipate that your images will be enlarged or reduced, resolutions should be adjusted accordingly.

File names . Illustration files should be given the 2- or 3-letter extension that identifies the file format used (i.e., .tif, .eps).

Submit the text, tables, figures, etc. of each manuscript in individual files.