

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

Genes da via Serotoninérgica e o Transtorno de Déficit de Atenção e  
Hiperatividade/ Impulsividade (TDAH) em Adultos

Verônica Contini

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

Orientador: Prof. Dr. Claiton H. D. Bau

Porto Alegre, outubro de 2007.

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.

**Instituições financiadoras:**

CNPq

FAPERGS

PRONEX

## **Agradecimentos**

**Ao meu orientador**, Claiton, por toda dedicação, incentivo e paciência. Por ter acreditado em mim, por estar sempre disposto e, mesmo quando cheio de trabalho, ainda ter todo o tempo para as minhas inúmeras dúvidas. Por ser um exemplo de professor, pesquisador e orientador. Por ter despertado em mim o amor pela pesquisa.

**À Evelise e à Elisa**, pela ajuda em todos os momentos. Por toda disposição, paciência e mariolas. Por serem pessoas muito especiais e alegres, que tornaram alguns momentos difíceis muito mais leves.

**Aos colegas dos laboratórios 114 e 116**, pelos momentos de convivência e descontração. Pela paciência e ajuda em alguns momentos fundamentais.

**À professora Mara**, por ter me acolhido com carinho e amizade em seu grupo de pesquisas.

**Às amigas mais que especiais**, Júlia, Verônica e Fabi, por estarem ao meu lado durante todo este tempo. Pela companhia e pelos inúmeros momentos de bate-papo, descontraídos, sérios ou, na maioria das vezes, as duas coisas. Pelas receitas, conselhos e assessoria científica. Enfim, por terem se tornado tão importantes e indispensáveis na minha vida.

**Aos meus amigos**, de longe e de perto, antigos e recentes, por existirem simplesmente. Por estarem sempre por perto, tornando a minha vida muito mais leve e feliz.

**Aos meus pais e às minhas irmãs**, pelo amor, carinho, dedicação, preocupação. Por ouvirem com entusiasmo minhas descobertas e curiosidades desde a faculdade. Por terem me incentivado a prosseguir, quando foi difícil ficar longe de

casa ou quando tudo parecia estar dando errado. Por terem sempre acreditado em mim e confiado no meu trabalho. Pela segurança de saber que, sempre que eu precisar, eles vão estar por perto.

**A todos da minha família** que, mesmo entendendo pouco do que eu faço, sempre me apoiaram e incentivaram. Em especial a minha tia Sílvia, que foi meu guia aqui em Porto Alegre (quando não sabia nem de que lado da parada pegar o ônibus), e aos meus padrinhos, pela presença constante.

**Ao André**, pelo carinho e companheirismo. Por ter entendido meus momentos de estresse e me estimulado a seguir em frente. Pela companhia e ajuda nos sábados de trabalho. Por ser parte fundamental da minha vida e estar presente em todas as horas.

**Por fim**, mas não por último, ao Elmo e à Ellen por toda dedicação e paciência.

## Sumário

Resumo.....	6
Abstract.....	7
<i>Capítulo 1</i> <i>Introdução.....</i>	<i>8</i>
1.1 Caracterização Clínica e Epidemiológica.....	9
1.2 Critérios Diagnósticos e Subtipos.....	11
1.3 Comorbidades.....	13
1.4 Neurobiologia.....	14
1.5 Etiologia e Heterogeneidade.....	15
1.6 Fatores Ambientais.....	15
1.7 Fatores Genéticos.....	16
1.8 O gene MAOA.....	17
1.9 Genes HTR2A e HTR1B.....	19
<i>Capítulo 2</i> <i>Justificativas e objetivos.....</i>	<i>22</i>
2.1 Justificativas.....	23
2.2 Objetivos.....	23
<i>Capítulo 3</i> <i>Manuscrito 1.....</i>	<i>25</i>
<i>Capítulo 4</i> <i>Manuscrito 2.....</i>	<i>44</i>
<i>Capítulo 5</i> <i>Discussão.....</i>	<i>63</i>
<i>Capítulo 6</i> <i>Referências Bibliográficas.....</i>	<i>66</i>
<i>Capítulo 7</i> <i>Anexos.....</i>	<i>78</i>

## Resumo

O transtorno de déficit de atenção e hiperatividade/ impulsividade (TDAH) é um transtorno bastante comum, afetando aproximadamente 5.3% das crianças em idade escolar e 4.4% dos adultos. O Manual Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais (DSM-IV) da Associação Norte-Americana de Psiquiatria divide os sintomas do TDAH em dois grupos: desatenção e hiperatividade/ impulsividade. A contribuição genética é substancial no TDAH e, embora muitos genes sejam considerados como possíveis fatores de susceptibilidade ao transtorno, poucos apresentam claras evidências de associação. No presente estudo, foram abordados polimorfismos em genes candidatos do sistema serotoninérgico. Selecionamos para tanto o polimorfismo MAOA-uVNTR, no gene que codifica a enzima monoamino oxidase A (MAOA), e os polimorfismos HTR2A A-1438G, HTR1B -A161T, T-261G e G861C nos genes codificadores dos receptores de serotonina 2A e 1B. A amostra foi composta por 377 adultos com TDAH. As entrevistas psiquiátricas seguiram os critérios do DSM-IV, utilizando o K-SADS-E para o TDAH e transtorno de oposição desafiante e o SCID-I e MINI para as comorbidades. Os grupos controle foram compostos por 235 homens doadores de sangue e 217 mulheres avaliadas no laboratório de análises da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os polimorfismos foram genotipados com técnicas envolvendo reação em cadeia da polimerase (PCR), digestão enzimática e eletroforese em gel. Nenhum dos polimorfismos analisados mostrou-se diretamente associado com o TDAH na nossa amostra. No entanto, foi evidenciada associação do alelo de 3 repetições do polimorfismo MAOA-uVNTR com escores mais baixos de QI estimado na amostra de adultos com TDAH ( $P=0.02$ ). Além disto, a análise haplotípica dos polimorfismos no gene HTR1B evidenciou uma frequência maior de um haplótipo específico nos pacientes com TDAH e um segundo haplótipo mais freqüente no grupo controle. Nossos resultados sugerem que os polimorfismos analisados neste trabalho não influenciam diretamente o TDAH em adultos. No entanto, apóiam evidências prévias de uma associação entre um haplótipo no gene HTR1B com o TDAH e do envolvimento do gene MAOA em funções cognitivas.

## Abstract

Attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD) affects approximately 5.3% of school age children and 4.4% of adults. The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV) distinguishes two groups of ADHD symptoms, inattention and hyperactivity/ impulsivity. The genetic contribution in ADHD is substantial and, although many genes are considered as possible susceptibility factors for the disorder, few have shown clear evidences of association. This study investigated polymorphisms in candidate genes of the serotonergic system. We selected the MAOA-uVNTR, in the gene that codes the monoamine oxidase A enzyme (MAOA), and the polymorphisms HTR2A A-1438G, HTR1B -A161T, T-261G and G861C in the genes that code for the serotonin 2A and 1B receptors. The sample was composed by 377 adults with ADHD. The interviews followed the DSM-IV criteria, using the K-SADS-E for ADHD and oppositional defiant disorder, and SCID-I and MINI for comorbidities. The control groups were composed by 235 blood donor men and 217 women recruited from the clinical analysis laboratory of the Pharmacy School of the Federal University of Rio Grande do Sul. The polymorphisms were genotyped with standard techniques comprising PCR, enzymatic digestion and gel electrophoresis. None of the polymorphisms analyzed showed direct association with ADHD. However, there is an association between the 3-repeat allele of the MAOA-uVNTR polymorphim and lower estimated IQ scores in the sample of adult ADHD ( $P=0.02$ ). Moreover, the haplotype analysis of the polymorphisms in the HTR1B gene showed a high frequency of a specific haplotype in ADHD patients and a second haplotype more frequent in the control group. Our results suggest that the polymorphisms analyzed in this study do not influence directly the ADHD in adults. However, support previous evidences of an association between ADHD and a haplotype in the HTR1B gene and the involvement of the MAOA gene in cognitive functions.

**Capítulo 1**  
**Introdução**



## 1. 1 Caracterização Clínica e Epidemiológica

O transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) é um dos transtornos psiquiátricos infantis mais comuns e tem uma longa tradição na história da medicina. Foi primeiramente descrito em 1902 por George Still e Alfred Tredgold e recebeu vários nomes durante a sua existência, tais como lesão cerebral mínima, transtorno hipercinético, transtorno de déficit de atenção e transtorno de déficit de atenção e hiperatividade, sendo também uma das condições infantis mais estudadas pela psiquiatria (Still e Tredgold, 1902).

É reconhecido como um transtorno comum, caracterizado por sintomas de desatenção e/ou hiperatividade e impulsividade, afetando aproximadamente 5.3% das crianças em idade escolar (Polanczyk e cols., 2007).

Ao contrário do que se acreditava no passado, quando se supunha que o TDAH raramente persistiria durante a adolescência e a vida adulta, estudos prospectivos que seguiram crianças com TDAH mostram uma persistência do diagnóstico na adolescência e na vida adulta em grande parte dos indivíduos (Weiss e cols., 1985; Barkley e cols., 1990; Wender, 1995; Manuzza e cols., 2003). Estima-se uma prevalência do problema em torno de 4% dos adultos (Wilens e cols. 2004; Biederman, 2005; Kessler e cols., 2006; Polanczyk e Rohde, 2007).

Paralelamente ao decréscimo na prevalência do TDAH em adultos, quando comparados com as crianças, há uma substancial mudança na proporção de afetados quanto ao sexo. Enquanto que em amostras clínicas de crianças a proporção de afetados varia de 6 meninos para 1 menina até 9 meninos para 1 menina (Gittelman e cols., 1985; Weiss e cols., 1985, Arnold, 1996; Faraone e cols., 1998) em adultos a razão entre homens e mulheres é próxima de 1:1 (Wender e cols., 1985; Murphy e Barkley, 1996). Alguns estudos longitudinais têm sugerido um declínio nos sintomas de meninos com o passar dos anos (Hill e Schoener, 1996; Biederman e cols., 2000). Entretanto, há uma carência de estudos longitudinais com amostras de meninas, provavelmente devido à sua pequena proporção em centros de tratamento.

Um estudo do nosso grupo comparou amostras transversais de adultos e crianças (Grevet e cols., 2006a), sugerindo que o declínio dos sintomas de TDAH com o avançar da idade é restrito apenas aos meninos. Meninas tendem a persistir com a mesma representação clínica na vida adulta. Esta diferença, portanto, poderia explicar as taxas similares de homens e mulheres com TDAH na vida adulta.

Conforme as diferentes fases do desenvolvimento, a sintomatologia do TDAH sofre algumas alterações. Nas crianças há uma combinação variável de sintomas de desatenção, hiperatividade e impulsividade. Na vida adulta, a hiperatividade motora converte-se em uma sensação subjetiva de inquietude. Em contrapartida, o prejuízo provocado pelas alterações da atenção que estão ligadas à desorganização e déficits na função executiva pode se intensificar, em função da maior complexidade das demandas na vida adulta (atividades ocupacionais e acadêmicas) (Biederman e cols., 2000; Rohde e Mattos, 2003).

O TDAH na infância e adolescência está associado com um risco aumentado de baixo desempenho escolar, repetência, expulsões e suspensões escolares, relações difíceis com familiares e colegas, desenvolvimento de ansiedade, depressão, baixa auto-estima, problemas de conduta e delinquência, experimentação e abuso de drogas (Rohde e Halpen, 2004).

Adultos com TDAH tendem a ter déficits cognitivos, especificamente déficits de funções executivas (agir antes de pensar), os quais incluem problemas de entendimento e aproveitamento de informações e dificuldades com organização e administração do tempo (Wilens e Dodson, 2004). Além disso, tendem a ter uma alta frequência de trocas de empregos, maiores dificuldades no trabalho, maiores taxas de separações e divórcios e problemas no trânsito (Barkley e cols., 2002; Wilens e cols., 2004).

O TDAH também está associado a déficits neuropsicológicos que interferem no funcionamento acadêmico, social e profissional dos indivíduos (Klorman e cols., 1999). Disfunções cognitivas, especificamente, têm sido associadas ao TDAH tanto em crianças (Berlin, 2004; Biederman e cols., 2004; Lawrence e cols., 2004), como em adultos (Biederman e cols., 2004, Murphy e cols., 2002). Dentre as medidas neuropsicológicas, o QI (quociente de

inteligência) tem recebido grande destaque, provavelmente porque está mais correlacionado com os desfechos educacionais e ocupacionais do que qualquer outro traço (Plomin, 2004). Seidman (2006a) realizou uma ampla revisão que inclui os estudos sobre o QI em pacientes com TDAH em diferentes idades. O conjunto geral de resultados demonstra que o QI total estimado é geralmente mais baixo em pacientes com TDAH do que em controles, tanto em crianças como em adultos.

O tratamento do TDAH envolve uma abordagem múltipla, englobando intervenções psicossociais e psicofarmacológicas. No âmbito das intervenções psicossociais é fundamental que o médico possa educar a família sobre o transtorno, através de informações claras e precisas. No caso de crianças, intervenções no âmbito escolar também são importantes. Em relação às intervenções psicofarmacológicas, a literatura claramente apresenta os estimulantes como a medicação de primeira escolha (Schachter e cols., 2001; Bouffard e cols., 2003; Kooij e cols., 2004; Brown e cols., 2005; Spencer e cols., 2005). Entre os estimulantes, a droga mais utilizada é o metilfenidato. O mecanismo de ação do metilfenidato, embora não completamente esclarecido, envolve o bloqueio dos transportadores de dopamina e noradrenalina (Solanto, 1998; Krause e cols., 2000).

## **1.2 Critérios Diagnósticos e Subtipos**

Com relação aos critérios diagnósticos, existem dois sistemas classificatórios utilizados em psiquiatria: a Classificação Internacional de Doenças (CID-10) da Organização Mundial da Saúde (OMS, 1993) e o Manual Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais (DSM-IV) da Associação Norte-Americana de Psiquiatria (APA, 1994). Esse último é o utilizado como critério diagnóstico operacional da maioria das pesquisas científicas em TDAH, incluindo o presente trabalho.

Os sintomas do TDAH reconhecidos pelo DSM-IV se dividem em sintomas de desatenção e de hiperatividade-impulsividade (tabela em anexo, incluindo os

critérios diagnósticos). De acordo com o DSM-IV, são critérios diagnósticos para esse transtorno seis ou mais sintomas em um ou ambos os grupos, por no mínimo seis meses, com caracterização de prejuízo em função destes sintomas em mais de um ambiente (casa e escola/trabalho, por exemplo) e início do prejuízo antes dos sete anos. Assim, três subtipos de TDAH podem ser reconhecidos: predominantemente desatento, predominantemente hiperativo/impulsivo e combinado (presença de pelo menos seis sintomas em ambos os grupos).

A subdivisão do TDAH em subtipos permite uma compreensão mais clara do problema, sendo que a validação dos mesmos têm sido reafirmada tanto em estudos com crianças (Biederman et al., 2005; Baeyens e cols., 2006), quanto com adultos (Grevet e cols., 2006b).

O subtipo desatento parece estar relacionado com um déficit cognitivo mais intenso (Biederman, 1998). As crianças desatentas também apresentam um maior isolamento social e retraimento, além de taxas mais altas de depressão e ansiedade (Biederman, 1998; Pfiffner e cols., 2000). Por outro lado, os indivíduos do subtipo combinado e hiperativo apresentam um maior comprometimento nos relacionamentos sociais e índices mais elevados de agressividade e de transtorno de conduta (Crystal e cols., 2001). Os pacientes do subtipo combinado parecem apresentar um maior comprometimento no funcionamento global do que os desatentos (Carson e Mann, 2002).

Quanto à distribuição dos subtipos, em uma amostra clínica de crianças no nosso meio, Rohde (2002) encontrou a prevalência de 62,5% para o subtipo combinado; 26,5% para desatento e 11,2% para o hiperativo. Em amostras de pacientes adultos, os estudos em amostras clínicas têm apontado para uma proporção de aproximadamente 60% dos pacientes do subtipo combinado, 38% desatentos e apenas 2% hiperativos (Milstein e cols., 1997; Murphy e cols., 2002). As frequências observadas na amostra que serve de base a este trabalho também são similares às já relatadas (Grevet e cols., 2006b).

### 1.3 Comorbidades

Além dos sintomas básicos do transtorno, estima-se que 70% dos adultos com TDAH apresentam comorbidades, sendo mais prevalentes a depressão maior, transtornos de ansiedade, transtorno bipolar, abuso de substâncias e alterações de conduta (Biederman, 2004; Torgersen e cols., 2006; Kesller e cols., 2006).

O padrão de comorbidades varia de acordo com o sexo. Enquanto as mulheres tendem a apresentar mais transtornos do humor, transtornos de ansiedade generalizada e múltiplos transtornos de ansiedade, os homens apresentam com mais frequência o transtorno de personalidade anti-social e os transtornos decorrentes do uso de substâncias (Biederman, 2004; McGough e cols., 2005).

Com relação à presença de comorbidades na amostra que foi utilizada neste trabalho, podemos observar que, ao longo da vida, as mulheres apresentaram uma prevalência maior de transtornos de ansiedade múltiplos e transtorno de ansiedade generalizada e os homens apresentaram mais frequentemente diagnósticos de transtornos por uso de substância, dependência de álcool e abuso de álcool. Os diagnósticos de depressão maior, transtorno de humor bipolar, transtorno do pânico, agorafobia, fobia social, transtorno obsessivo compulsivo, transtorno do estresse pós-traumático, abuso de substâncias e dependência de substâncias não diferiram em relação ao sexo. No que se refere as comorbidades atuais, nessa mesma amostra as mulheres apresentaram maior frequência de fobias específicas e transtorno de ansiedade generalizada. Os homens apresentaram mais frequentemente transtorno de uso de substâncias, abuso de álcool e transtorno de personalidade anti-social. Não houve diferenças entre os sexos quanto à presença de depressão maior, distímia, transtorno de humor bipolar, transtornos de ansiedade múltiplos, transtorno do pânico, agorafobia, fobia social, transtorno obsessivo-compulsivo, dependência de álcool e dependência e abuso de substâncias (Grevet e cols., 2006b).

## 1.4 Neurobiologia

As evidências atuais obtidas a partir de estudos de neuroimagem, neuropsicologia e neuroquímicos, além dos estudos genéticos, têm sugerido fortemente o envolvimento de anormalidades nos circuitos fronto-estriatais na fisiopatologia do TDAH (Tannock, 1998; Bush e cols., 2005; Seidman e cols., 2006b). De acordo com essas investigações, o lobo frontal (córtex frontal e pré-frontal), os núcleos da base, especificamente o *striatum* (caudado) e o globo pálido, parecem ter volume e atividade diminuídos em pacientes com esta patologia.

No que se refere aos neurotransmissores implicados, evidências farmacológicas e de estudos com animais favoreceram inicialmente a teoria dopaminérgica do TDAH, onde um déficit de dopamina nas regiões corticais e do *striatum* seria responsável pela manifestação dos sintomas desse transtorno (Levy, 1991). Posteriormente, refinamentos dessa teoria passaram a incluir as funções noradrenérgicas (Swanson e cols., 1998), uma vez que as regiões implicadas na fisiopatologia do TDAH são ricas tanto em dopamina como em noradrenalina (Faraone e Biederman, 1998). Além disso, a eficácia clínica dos estimulantes, usados no tratamento do TDAH, provavelmente depende de alterações em funções dopaminérgicas e noradrenérgicas (Seeman e Madras, 1998). Outros fármacos psicoativos eficientes no tratamento também têm ação noradrenérgica (Biederman e Spencer, 1999).

Diversos estudos vêm sugerindo que o sistema serotoninérgico também pode ser importante na fisiopatologia do TDAH. A hipótese de um envolvimento da serotonina surgiu a partir de evidências que indicam o seu papel em patologias que também são caracterizadas por déficits na inibição comportamental, como abuso de álcool, personalidade anti-social, transtorno de conduta e agressão. Um estudo com ratos nocaute para o gene do transportador de dopamina (DAT) mostrou que a intensa hiperatividade motora apresentada por estes animais pôde ser revertida tanto com a administração de metilfenidato como de agentes serotoninérgicos (Gainetdinov e cols., 1999). Esses achados sugerem que, em humanos, o metilfenidato pode ter outros sítios de ação além do transportador de

dopamina no controle dos sintomas do TDAH, e que a hiperatividade seja mediada pela serotonina, pelo menos em algumas formas da doença.

Outros estudos mostraram ainda que parece existir uma interação considerável entre os sistemas dopaminérgico e serotoninérgico (Quist e Kennedy, 2001). Alterações nestas interações poderiam ser importantes na manifestação de alguns sintomas da doença.

### **1.5 Etiologia e Heterogeneidade**

A contribuição genética é substancial no TDAH, assim como ocorre na maioria dos transtornos psiquiátricos. Acredita-se que vários genes de pequeno efeito sejam responsáveis por uma vulnerabilidade genética ao transtorno, à qual somam-se diferentes agentes ambientais. Dessa forma, o surgimento e a evolução do TDAH em um indivíduo parecem depender de quais alelos estão presentes, de quanto cada um deles contribui para a doença e das inter-relações desses genes entre si e com o ambiente (Biederman, 2005).

A definição de tipos de TDAH pelo DSM-IV, assim como as diferentes formas de tratamento e as várias doenças que podem coexistir com este transtorno mostram que, pelo menos ao nível fenotípico, o TDAH é um diagnóstico bastante heterogêneo. Isso nos sugere também uma possível heterogeneidade etiológica, com fatores genéticos e ambientais diferentes atuando na manifestação das características que compõem os seus vários quadros clínicos (Todd, 2000).

### **1.6 Fatores Ambientais**

Agentes psicossociais que atuam no funcionamento adaptativo e na saúde emocional geral da criança, como desentendimentos familiares e presença de transtornos mentais nos pais, parecem ter participação importante no surgimento e manutenção do TDAH. Complicações na gestação e no parto (como toxemia,

eclampsia, pós-maturidade fetal, duração do parto, estresse fetal, baixo peso ao nascer, hemorragia pré-parto, doença materna) também têm sido implicados no desenvolvimento da doença (Biederman, 2005).

Outros fatores como a exposição ao fumo e álcool durante a gravidez também estão relacionados com o risco de TDAH nos filhos (Button e cols., 2005; Langley e cols., 2005; Bhatara e cols., 2006; Schmitz e cols., 2006).

É importante, no entanto, ressaltar que a maioria dos estudos sobre possíveis agentes ambientais apenas evidenciaram uma associação destes fatores com o TDAH, não sendo possível estabelecer uma relação direta de causa e efeito entre eles. Além disso, os agentes psicossociais parecem atuar mais como preditores universais do funcionamento adaptativo e emocional das crianças do que como preditores específicos do TDAH. Dessa forma, eles podem ser considerados como gatilhos não específicos de uma predisposição latente ou como modificadores do curso da doença (Biederman, 2005).

## **1.7 Fatores Genéticos**

Faraone e cols. (2005), revisando 20 estudos com gêmeos, estimaram uma herdabilidade de 76% para o TDAH, sugerindo que este seja talvez o distúrbio psiquiátrico com maior componente hereditário.

Os estudos de ligação e, mais recentemente, os estudos de associação têm surgido como ferramentas poderosas na busca de genes envolvidos no transtorno. No entanto, embora não haja dúvidas quanto ao forte componente genético do TDAH apenas alguns genes têm um papel mais firmemente estabelecido.

Faraone e Khan (2006), em um estudo de revisão, encontraram que dos 8 genes para os quais há uma mesma variante estudada em 3 ou mais estudos de associação do tipo caso-controle ou baseados em famílias, 7 apresentem evidência de associação, estatisticamente significativa, com o TDAH. São eles o gene do receptor D4 de dopamina (DRD4), do receptor D5 (DRD5), da proteína transportadora de dopamina (DAT), da enzima dopamina-beta hidroxilase (DBH),



da proteína transportadora de serotonina (5-HTT), do receptor 1B de serotonina (HTR1B) e o gene da proteína associada ao sinaptossoma de 25 kDa (SNAP25) .

Como a maior parte da variância atribuível aos genes ainda não pode ser explicada apenas pelos genes acima mencionados, ainda são necessários muitos estudos nessa direção. Nesse sentido, a estratégia mais utilizada tem sido a realização de estudos de associação (caso-controle ou baseados em famílias) com genes candidatos, escolhidos principalmente, mas não exclusivamente, pelo seu papel nas rotas dopaminérgicas, noradrenérgicas e serotoninérgicas (Thapar e cols., 2005).

No presente estudo foram abordados genes candidatos possivelmente envolvidos com comportamentos de impulsividade e agressividade, portanto relacionados com as características de externalização do TDAH. Selecionamos para tanto o gene que codifica a enzima monoamino oxidase A (MAOA) e os genes codificadores dos receptores de serotonina 2A e 1B (HTR2A e HTR1B).

## **1.8 O gene MAOA**

A monoamino oxidase A (MAO A) é uma enzima mitocondrial envolvida na degradação de várias aminas biogênicas, incluindo os neurotransmissores serotonina, dopamina e noradrenalina, o que sugere, portanto, um papel importante na manutenção da homeostase desses neurotransmissores (Chen, 2004).

Estudos moleculares sugerem que o gene (localizado em Xp11.23) possui um papel importante em características relacionadas à impulsividade, agressividade e comportamentos aditivos. A doença de Norrie, causada por microdeleções no cromossomo X, está associada com retardo mental, comportamento autista, hiperatividade motora e distúrbios do sono, os quais são, ao menos em parte, atribuídos à deficiência na atividade de MAO A (Sims e cols.,1989; Murphy e cols.,1990). Uma mutação identificada no éxon 8 do gene MAOA, em homens de uma família alemã, causa completa deficiência da enzima, levando a um fenótipo que inclui comportamentos de agressividade/impulsividade

(Brunner, 1993). Além disso, camundongos transgênicos que possuem o gene MAOA deletado apresentam níveis elevados de serotonina no cérebro e um fenótipo que inclui comportamentos agressivos (Cases, 1995).

O gene possui vários polimorfismos, incluindo um VNTR (polimorfismo de número variável de repetições) de 30pb localizado na região promotora (MAOA-uVNTR – MAOA upstream VNTR) (Sabol, 1998). Seis variantes do polimorfismo já foram identificadas, contendo 2, 3, 3.5, 4, 5 ou 6 repetições, sendo os alelos de 3 e 4 repetições os mais comuns em diferentes populações (Sabol, 1998; Huang e cols., 2004; Jacob e cols., 2005). Estudos funcionais mostram que o polimorfismo afeta a atividade transcricional do gene (Sabol, 1998; Deckert, 1999, Denney, 1999). Os três trabalhos de funcionalidade concordam que os alelos de 3.5 e 4 repetições transcrevem mais eficientemente do que o alelo de 3 repetições. Com relação ao alelo de 5 repetições não há consenso. Os alelos de 2 e 6 repetições não foram incluídos nos estudos, por serem bastante raros.

Uma série de estudos abordando o polimorfismo MAOA-uVNTR têm sido realizada em diversos transtornos mentais (Deckert e cols., 1999; Jonsson e cols., 2003; Preisig e cols., 2005), transtornos de abuso de substâncias (Parsian e cols., 2003; Vanyukov e cols., 2004; Contini e cols., 2006) e comportamento agressivo/anti-social (Samochowiec et al., 1999; Manuck e cols., 2000; Craig, 2005). Um conjunto de publicações com grande repercussão na literatura, iniciada com Caspi e cols. (2002) sugere também uma interação entre o polimorfismo e fatores ambientais, onde o alelo de 3 repetições potencializaria o efeito de ambiente de infância adverso no risco para transtornos de conduta e impulsividade, comportamento anti-social, agressividade e violência na fase adulta (Caspi e cols. 2002; Foley e cols. 2004; Huang e cols. 2004; Widom e Brzustowicz, 2006; Kim-Cohen e cols. 2006; Frazzetto e cols., 2007).

Alguns estudos também têm sugerido o envolvimento do gene MAOA em funções cognitivas. Cohen e cols. (2003), em um estudo com meninos autistas, encontrou uma associação entre a presença do alelo de 3 repetições do polimorfismo MAOA-uVNTR e escores de QI estimado mais baixos. Além disto, estas crianças também apresentavam um quadro mais grave da doença. Posteriormente, a associação envolvendo o alelo de 3 repetições e a diminuição

dos escores de QI estimado também foi encontrada em uma amostra de mulheres saudáveis (Yu e cols., 2005). Mulheres portadoras do genótipo 3/3 apresentaram escores de QI mais baixos do que as mulheres portadoras do genótipo 4/4.

Com relação ao TDAH, o primeiro trabalho investigando o polimorfismo MAOA-uVNTR foi realizado por Manor e cols. (2002). Usando o teste de desequilíbrio de ligação (TDT) e um teste de associação caso-controle, o estudo sugeriu o envolvimento do alelo de 4 repetições (alta atividade enzimática) no TDAH, possivelmente mediado pela impulsividade. Lawson e cols. (2003), em um estudo do tipo caso-controle também sugeriram o envolvimento do polimorfismo MAOA-uVNTR no TDAH. No entanto, a associação encontrada envolveu o alelo de 3 repetições (baixa atividade enzimática) e um sub-grupo de crianças com transtorno de conduta. Embora os trabalhos citados acima apóiem uma participação do polimorfismo MAOA-uVNTR no TDAH, ainda não é possível determinar um alelo de risco. Outros dois trabalhos encontraram resultados também positivos (Domschke e cols., 2005; Das e cols., 2006), envolvendo os alelos de 3 e 3.5 repetições, respectivamente.

## **1.9 Genes HTR2A e HTR1B**

Os receptores de serotonina são divididos em sete classes principais, HTR1 a HTR7, dentre estas, a classe HTR1 é subdividida nas subclasses A, D, E e F, com base em diferenças de propriedades bioquímicas e farmacológicas (Sun e cols., 2002). O grupo de receptores HTR1D é ainda subdividido em duas categorias,  $\alpha$  e  $\beta$ , sendo que o gene humano do receptor HTR1D $\beta$  (HTR1DB) possui mais homologia com o gene do receptor HTR1B de roedores (HTR1B) do que com o gene humano do receptor HTR1D $\alpha$  (HTR1DA) (Mochizuki e cols. 1992). Assim, ambos os receptores, de humanos e de roedores, são chamados de HTR1B, acompanhados quando necessário, da identificação da espécie (Hartig e cols., 1996).

O gene HTR2A, que codifica o receptor de serotonina 5-HT<sub>2A</sub>, já foi estudado em diversos transtornos psiquiátricos (revisão em Norton e Owen,

2005). Foi relacionado ao TDAH através de estudos de ligação e de associação (Quist e cols., 2000; Levitan e cols., 2002; Hawi e cols., 2002 e Zoroglu e cols., 2003), envolvendo diferentes polimorfismos.

Estudos de funcionalidade sugerem que o polimorfismo HTR2A A-1438G, que será abordado neste trabalho, teria um efeito funcional, afetando a atividade na região promotora (Parsons e cols., 2004). Na presença do alelo A é evidenciado um aumento significativo na atividade do promotor.

Com relação ao TDAH, diversos trabalhos envolvendo o polimorfismo HTR2A A-1438G foram realizados até o momento, sendo que na maioria deles não foi encontrada nenhuma associação com o TDAH (Zoroglu e cols., 2003; Bobb e cols., 2005; Li e cols., 2006a; Guimarães e cols., 2007; Heisser e cols., 2007). Um trabalho recente encontrou uma associação entre o alelo A e a remissão de sintomas do TDAH em adolescentes (Li e cols., 2006b).

O gene humano HTR1B tornou-se alvo de uma atenção especial porque animais sem um receptor 5-HT<sub>1B</sub> funcional revelaram várias características de comportamento associadas com distúrbios neuropsiquiátricos (Searce-Levie e cols., 1999). Camundongos sem o gene HTR1B apresentam comportamento desinibido, hiperatividade e agressividade (Zhuang e cols., 1999; Bouwknecht e cols., 2001).

Diversos polimorfismos já foram descritos para o gene HTR1B. Duan e cols. (2003) demonstraram que os polimorfismos HTR1B A-161T e T-261G, ambos localizados na região promotora, afetam a atividade transcricional do gene, sendo que a presença do alelo A do polimorfismo A-161T e do alelo G do polimorfismo T-261G resultaria em maior atividade. Análises de haplótipos revelaram que o alelo -161T pode atuar revertendo o efeito do alelo -261G, quando presentes no mesmo haplótipo. Desta forma, os autores sugerem que a genotipagem dos dois SNPs (polimorfismos de nucleotídeo único) pode ser necessária em estudos de associação.

Nenhum resultado positivo de associação envolvendo os polimorfismos HTR1B A-161T e T-261G, que foram abordados neste estudo, e o TDAH foi encontrado até o momento. No entanto, diversos estudos têm demonstrado que os polimorfismos HTR1B A-161T e HTR1B T-261G estão em desequilíbrio de

ligação com o polimorfismo HTR1B G861C, que também foi incluído nas análises (Huang e cols., 1999; Sanders e cols., 2001; Cigler e cols., 2001; Kranzler e cols., 2002; Duan e cols., 2003). O polimorfismo G861C já se mostrou associado com o TDAH (Hawi e cols., 2002; Quist e cols., 2003; Li e cols., 2005; Smoller e cols., 2006). Faraone e cols. (2005), em uma meta-análise de 6 estudos baseados em famílias, encontraram uma associação positiva entre o polimorfismo G861C e o TDAH.

Embora o polimorfismo HTR1B G861C seja um SNP sinônimo, Huang e cols. (1999) observaram uma modesta tendência dos indivíduos homozigotos G861 possuírem uma densidade aumentada de receptores 5-HT<sub>1B</sub>, quando comparados com heterozigotos. No entanto, nenhum efeito funcional direto do polimorfismo foi encontrado. Os resultados positivos de associação envolvendo este polimorfismo, portanto, podem ser devido a outros polimorfismos que estejam em desequilíbrio de ligação. Desta forma, uma abordagem haplotípica envolvendo o polimorfismo HTR1B G861C e outros polimorfismos, especialmente os polimorfismos na região promotora do gene para os quais existe evidência de funcionalidade, pode ser mais informativa.

## **Capítulo 2**

### **Justificativas e Objetivos**

## **2.1 Justificativas**

O transtorno de déficit de atenção e hiperatividade é um transtorno comum em adultos, com impacto importante na vida dos indivíduos. Está associado com uma vida profissional irregular, prejuízo nas relações sociais e econômicas, predispondo o indivíduo a um desempenho abaixo do seu potencial.

Embora já esteja claro que o desenvolvimento do TDAH sofre a influência de componentes genéticos, muito ainda resta a ser descoberto quanto ao papel de cada um dos genes envolvidos no transtorno. O TDAH é um problema extremamente complexo e heterogêneo, onde certamente vários genes de diferentes sistemas contribuem na variabilidade clínica.

O estudo dos fatores genéticos no TDAH tem se dado tanto em abordagens de larga escala, ou seja, varreduras genômicas de ligação ou de associação, como também abordagens de genes candidatos, voltadas para um detalhamento do papel de genes com uma grande probabilidade de envolvimento no transtorno.

É nessa segunda categoria que se insere a presente dissertação. Ela visa um detalhamento do papel de um conjunto de polimorfismos do sistema serotoninérgico no TDAH em adultos. A escolha de tais genes se deveu ao seu possível papel em sintomas ou transtornos associados de externalização em portadores de TDAH, além do envolvimento em déficits cognitivos comuns nos pacientes.

## **2.2 Objetivos**

### **Geral**

O objetivo geral deste trabalho é avaliar um possível efeito de três genes importantes da genética psiquiátrica (MAOA, HTR2A e HTR1B) nas dimensões relacionadas com características externalizadoras em uma amostra de adultos com TDAH.

## **Específicos**

- 1.** Investigar a possível associação dos polimorfismos MAOA-uVNTR, HTR2A A-1438G, HTR1B A-161T, HTR1B T-261G e HTR1B G861C com o TDAH e sua gravidade em uma amostra de adultos.
- 2.** Estimar haplótipos derivados dos três polimorfismos do gene HTR1B e verificar se existe alguma influência no TDAH.
- 3.** Avaliar se o polimorfismo MAOA-uVNTR está associado a medidas de inteligência em adultos com TDAH.



### **Capítulo 3**

**Manuscrito em preparação 1**

**The MAOA-uVNTR polymorphism is associated  
with estimated IQ in adults with attention  
deficit/hyperactivity disorder**

**The MAOA-uVNTR polymorphism is associated with estimated IQ in adults  
with attention-deficit/hyperactivity disorder**

Verônica Contini<sup>1</sup>, Katiane L.S. Kalil<sup>2</sup>, Evelise R. Polina<sup>1</sup>, Luciana Nerung, Nyvia O. Souza<sup>2</sup>, Rafael Karam<sup>2</sup>, Carlos A. I. Salgado<sup>2</sup>, Eugenio H. Grevet<sup>2</sup>, Paulo Belmonte-de-Abreu<sup>2,3</sup>, Claiton H. D. Bau<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>2</sup>Adult ADHD Outpatient Clinic, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>3</sup>Departamento de Psiquiatria, Faculdade de Medicina, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

**Correspondence:** Dr. Claiton H. D. Bau, Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UFRGS, Caixa Postal:15053, CEP:91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil. Email: [claiton.bau@ufrgs.br](mailto:claiton.bau@ufrgs.br)

**Abstract:**

The MAOA gene has been associated with several behavior characteristics, including attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) and cognitive function. The aim of this study is verify if the MAOA-uVNTR polymorphism is associated with adult ADHD and related characteristics, including comorbidities and IQ scores. This study evaluated 372 Brazilian patients with ADHD; 248 of them were submitted to a neuropsychological evaluation. The control group is composed of 451 subjects. The diagnoses were based on the DSM-IV criteria. The cognitive performance was evaluated with the vocabulary and block design subtests of the Wechsler Adult Intelligence Scale-Revised (WAIS-R). The evaluation of the influence of the MAOA-uVNTR on IQ scores was performed by ANOVA with adjustment for possible confounders. No significant differences were found in frequencies of the low (3-repeats) and high-activity (3.5 and 4-repeats) alleles of the MAOA-uVNTR polymorphism between patients and controls ( $P=0.29$  for men and  $P=0.19$  for women). Male patients with the low-activity allele presented lower estimated IQ scores than patients with the high-activity allele ( $P=0.02$ ). The pattern among females is more complex. Women that are heterozygous 4/3 presented lower IQ than homozygous 4/4, but the higher IQ scores were observed in the patients with the 3/3 genotype ( $P=0.05$ ). Our results favor the hypothesis that the 3-repeats allele is associated with lower IQ, but additional studies with higher sample sizes are needed to evaluate possible gender differences in the association between the MAOA gene and IQ.

**Keywords:** Attention-deficit/hyperactivity; Monoamine oxidase A; intelligence quotients

## Introduction

The MAOA gene is one of the most intensely studied genes in human behavior. In addition to its involvement in a gene X environmental interaction on violent behavior (Caspi et al., 2002; Foley et al., 2004; Huang et al., 2004; Widom e Brzustowicz, 2006; Kim-Cohen et al., 2006; Frazzetto et al., 2007), there are reports of association with other psychiatry disorders, such as depression (Yu et al., 2005a; Barefoot et al., 2007), schizophrenia (Jönsson et al., 2003), bipolar disorders (Gutiérrez et al., 2004; Müller et al., 2007), autism (Cohen et al., 2003), substance abuse disorders (Vanyukov et al., 2004; Contini et al., 2006) and attention-deficit/hyperactivity disorder (Manor et al., 2002; Lawson et al., 2003; Domschke et al., 2005; Das et al., 2006). Most of these studies focused on a well-characterized polymorphism (MAOA-uVNTR), comprising a 30 bp repeat existing in 2, 3, 3.5, 4 or 5 copies (Sabol et al., 1998), in the promoter region, where the most common alleles have 3 or 4 copies. The MAOA-uVNTR polymorphism influences transcription level and therefore enzymatic activity. Enzyme expression is higher for carriers of alleles of 3.5 and 4-repeats and lower for carries of 3-repeats (Sabol et al., 1998; Deckert et al., 1999; Denney et al., 1999). The main role of the enzyme MAO A is thought to be in degrading serotonin, although it is also capable of degrading norepinephrine and dopamine (Chen, 2004). It therefore plays a key role in the regulation of synaptic activity and alterations in its activity produced by pharmacological intervention, or through genetic variants, are likely to have profound effects on the behavior (Craig, 2005).

There is evidence that the MAOA-uVNTR polymorphism may be involved in cognitive function. Autistic boys with the low-activity allele (3-repeats) had both lower intelligence quotients (IQ) and more severe autistic behavior than children with the high-activity allele (4-repeats) (Cohen et al., 2003). Similar results were obtained in a cohort of healthy young females, where subjects bearing the 4/4 repeats genotype had significantly higher full IQ than subjects bearing the 3/3 repeats genotype (Yu et al., 2005b).

ADHD is associated with cognitive function, both in children (Berlin, 2004; Biederman et al., 2004; Lawrence et al., 2004), and adults (Biederman et al.,

2004; Murphy et al., 2002). Hervey et al. (2004) in a meta-analysis reviewed 33 adult ADHD studies and verified that the neuropsychological deficits are similar to those described in children studies. Although ADHD patients present an IQ in the normal range, the estimated full scale IQ is usually slightly lower in children or adult ADHD patients than controls (Seidman, 2006).

Several studies focused on the association between children ADHD and the MAOA-uVNTR polymorphism. However, while some studies reported an association with the high-activity alleles (3.5 and 4-repeats) (Manor et al., 2002; Das et al., 2006), others found association with the low-activity allele (3-repeats) (Lawson et al., 2003; Dosmchke et al., 2005) and there are also negative findings (Lung et al., 2006). Interestingly, there are no association studies with the MAOA-uVNTR polymorphism in adult ADHD samples.

Given the importance of the MAOA-uVNTR polymorphism in psychiatric disorders and the suggestive influence in the variation of IQ scores, the aim of this study is verify if the polymorphism is associated with adult ADHD and other characteristics of patients with ADHD, especially variations in IQ scores.

## **Materials and Methods**

### **Subjects**

This study included 372 Brazilian patients (199 men and 173 women) that were recruited in the adult ADHD outpatient clinic of the Hospital Clínicas de Porto Alegre. The exclusion criteria were evidence of clinically significant neurological diseases that might affect cognition and current or past history of psychosis and IQ  $\leq 70$  (Kaplan et al., 1991).

The diagnostic procedures for ADHD and Oppositional Defiant Disorder (ODD) followed the DSM-IV criteria (American Psychiatric Association, 1994) using the Portuguese version of K-SADS-E (Mercadonte et al., 1995). The K-SADS-E is a semi-structured interview for children and adolescents aged 6–18 years which assesses current episodes and the severest episode in the past (lifetime) of DSM-IV psychiatric disorders in children (Ambrosini, 2000). The Kappa

coefficients of inter-rater agreement for the K-SADS-E were 1.00 for the childhood ADHD diagnosis, 1.00 for current ADHD diagnosis and 0.95 for current ADHD subtype diagnosis (Grevet et al. 2005).

The Axis I psychiatric comorbidities were evaluated using the SCID-IV-R structured interview system (First et al., 1998). The diagnosis of conduct and antisocial personality disorder was obtained using the appropriate sections of the Mini-International Neuropsychiatric Interview (M.I.N.I.) (Sheehan et al., 1998). The severity of current ADHD and ODD symptoms was assessed by the SNAP-IV Rating Scale (Swanson, 1992). A detailed description of the severity and comorbidity profile of this sample is in Grevet et al. (2006) and Fischer et al. (2007).

A trained psychologist (K.L.S.K.) performed the neuropsychological evaluation of 248 patients (men: 125; women: 123). The vocabulary and block design subtests and the estimated IQ score of the Wechsler Adult Intelligence Scale - Revised (WAIS-R) were used to evaluate the cognitive performance. The WAIS-R is used essentially to evaluate personal strategies for problem solution and specific cognitive deficits. The vocabulary subtest evaluates the premorbid conditions of intelligence, learning capacity, comprehension and general intelligence, while the block design subtest measures the spatial/visual orientation, speed of execution, perceptual integration, capacity of planning and organization (Wechsler, 1981).

The control group for allele and genotype frequencies is composed of 235 Brazilian blood donor men and 217 Brazilian women recruited from a Clinical Analysis Laboratory where they undergone routine blood tests. The control sample was designed to be non-screened and therefore not interviewed for psychiatric diagnoses.

All subjects included in the sample (patients and controls) are European descendents. The population from Southern Brazil, where this study was performed, is mainly of European descent, predominantly Portuguese, but Italians, Spaniards, Germans, as well as Africans and Amerindians have also contributed to its genetic composition (Salzano and Bortolini, 2002). However, no significant population structure was found in the European derived population of Rio Grande

do Sul (Zembrzuski et al., 2006), making population stratification unlikely to occur in this situation (Hutchison et al., 2004). The allele frequencies of several genetic polymorphisms are equal in the present control group and control groups from studies from European populations (Bau et al., 1999, 2000, 2001; Contini et al., 2006; Marques et al., 2006; Prestes et al., 2007a,b).

All subjects (patients and controls) signed an informed consent approved by the Ethics Committees of the Hospital and the Federal University of Rio Grande do Sul.

### **Laboratory Methods**

The DNA was extracted by the method of Lahiri and Nurnberger (1991) and the MAOA-uVNTR polymorphism was amplified using the polymerase chain reaction (PCR) conditions adapted from Manor et al. (2002). The PCR products were analyzed on a 6% acrylamide gel stained with ethidium bromide. They were then visualized under U.V light to determine the fragment sizes by comparison with a 100 bp DNA ladder.

### **Statistical Analyses**

Allele frequencies were estimated by gene counting. The 3-repeats allele was classified as low-activity and the 3.5 and 4-repeats alleles were classified as high-activity. Considering that the MAOA gene is located on the X-chromosome, all the analyses were performed separately for men and women.

Categorical comparisons (patients vs. controls and presence of comorbidities) were analyzed by chi-square. Continuous measures (SNAP-IV scores and IQ scores) were analyzed by ANOVA. All analyses with preliminary positive results were also adjusted for potential confounders defined by a statistical cut-off criterion (association with both the independent and dependent variables at a  $p \leq 0.20$ ) (Maldonado and Greenland, 1993).

## Results

We identified five different alleles with 2, 3, 3.5, 4 and 5 repeats of the MAOA-uVNTR polymorphism. The rare 2-repeats allele observed was not included in the statistical analysis because the functionality has not been addressed in previous studies. The 5-repeats allele was also excluded because of the conflicting findings regarding its functionality (Sabol et al., 1998; Deckert et al., 1999). Allele and genotype frequencies of the polymorphism are seen in table 1. The genotype distribution for the women group are in Hardy-Weinberg equilibrium.

No differences were found in frequencies of the low (3-repeats) and high-activity (3.5 and 4-repeats) alleles between patients and controls ( $\chi^2 = 1.12$ ,  $P=0.29$  for men and  $\chi^2 = 1.76$ ,  $P=0.19$  for women). The genotype frequencies in women also did not present significant differences ( $\chi^2 = 1.56$   $P=0.46$ ).

Male patients with the low-activity allele presented lower estimated IQ scores than patients with the high-activity alleles ( $F=6.0$ ,  $P=0.02$ ). The pattern among females is more complex. The higher IQ scores were observed in the patients with the 3/3 genotype ( $n=13$ ). The group with the 4/4 genotype presented intermediate values and females with the 4/3 genotype presented the lowest scores ( $F=3.2$ ,  $P=0.04$ ). The IQ scores, stratified according to the MAOA-uVNTR genotype, are present in table 2. None of the analyses on comorbid disorders or SNAP-IV scores evidenced associations with the MAOA-uVNTR polymorphism.

## Discussion

This study reports the first analysis of the MAOA-uVNTR polymorphism in a sample of adults with ADHD, with negative results. However, we replicated previous evidence (Cohen et al., 2003, Yu et al., 2005b) for association between the MAOA-uVNTR polymorphism and IQ scores.

The fact that MAOA is an X-linked gene implies a separate analysis for men and women. In the present study, few women were homozygous for the 3/3



genotype (n=13), precluding to conclude if they really have a paradoxically higher IQ or if this is a chance finding. It is noteworthy that women that are heterozygous 4/3 present lower IQ than homozygous 4/4, which is in the same direction observed in Yu et al. (2005b), which is the only previous report of association between IQ and the MAOA-uVNTR in Taiwanese females. In that study, women with the 3/3 and 4/3 genotypes had lower IQ. Taken together, these results favor the hypothesis that the 3-repeats allele is associated with lower IQ, but additional studies with higher sample sizes are needed to rule out possible gender differences in the association between the MAOA gene and IQ.

The MAOA gene may be involved in the dopaminergic modulation of the cognitive functions of the prefrontal cortex, which include working memory and have been linked to general cognitive ability and IQ. However, it could also be hypothesized that the present association between MAOA-uVNTR polymorphism and IQ might actually be a proxy of the association between the MAOA-uVNTR and conduct disorder symptoms. However, we could not detect such association with comorbid disorders, possibly because this is an adult sample of referred patients with a low prevalence of antisocial behavior (Grevet et al., 2006). On the other hand, the association between the MAOA-uVNTR polymorphism and IQ scores might actually be a confounder in the association between the polymorphism and ADHD, and could explain the conflicting findings observed before (Brookes et al., 2006).

The association with IQ might be better understood as an association that may also be found in non-ADHD, healthy samples (Yu et al., 2005b) or in other psychiatric disorders, such as autism (Cohen et al., 2003). Future association studies between ADHD and MAOA polymorphisms should take both antisocial behavior and IQ into account.

Unfortunately, the present cross-sectional study design precludes the proper analysis of gene X environment interactions on IQ. Future follow-up studies could address this possibility. Despite IQ is a strongly heritable variable (Devlin et al., 1997), few genes have already been associated with its variation. The present findings support the role of the MAOA gene in human behavior phenotypes.

### **Acknowledgments**

Thanks are due to Aline G. Fischer, Christiane R. Garcia, Flávio Vicente, Felipe Picon, Marcelo M. Victor, Eduardo Vitola for help in the sample collection of ADHD patients. Mara Helena Hutz provided DNA samples for the control group of women. CNPq and FAPERGS funded this study.

## References

- Ambrosini PJ. Historical development and present status of the schedule for affective disorders and schizophrenia for school-age children (K-SADS). *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2000. 39:49-58.
- American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition*. 1994. American Psychiatric Association. Washington.
- Barefoot JC, Williams RB. Associations of a regulatory polymorphism of monoamine oxidase-A gene promoter (MAOA-uVNTR) with symptoms of depression and sleep quality. *Psychosom Med*. 2007. 69(5):396-401.
- Berlin L, Bohlin G, Nyberg L, Janols LO. How well do measures of inhibition and other executive functions discriminate between children with ADHD and controls? *Neuropsychol Dev Cogn C Child Neuropsychol*. 2004. 10:1-13.
- Bau CH, Roman T, Almeida S, Hutz MH. Dopamine D4 receptor gene and personality dimensions in Brazilian male alcoholics. *Psychiatr Genet*. 1999. 9(3):139-43.
- Bau CHD, Almeida S, Hutz MH. The TaqI A1 allele of the dopamine D2 receptor gene and alcoholism in Brazil: association and interaction with stress and harm avoidance on severity prediction. *Am J Med Genet (Neuropsychiatr Genet)*. 2000. 12;96(3):302-6.
- Bau CHD, Almeida S, Costa FT, Garcia CE, Elias EP, Ponso AC, Spode A, Hutz MH. DRD4 and DAT1 as modifying genes in alcoholism: interaction with novelty seeking on level of alcohol consumption. *Mol Psychiatry*. 2001. 6(1):7-9.
- Biederman J, Monuteaux MC, Doyle AE, Seidman LJ, Wilens TE, Ferrero F, Morgan CL, Faraone SV. Impact of executive function deficits and attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) on academic outcomes in children. *J Consult Clin Psychol*. 2004. 72:757-766.
- Brookes K, Xu X, Chen W, Zhou K, Neale B, Lowe N, Anney R, Franke B, Gill M, Ebstein R, Buitelaar J, Sham P, Campbell D, Knight J, Andreou P, Altink M, Arnold R, Boer F, Buschgens C, Butler L, Christiansen H, Feldman L,

- Fleischman K, Fliers E, Howe-Forbes R, Goldfarb A, Heise A, Gabriëls I, Korn-Lubetzki I, Johansson L, Marco R, Medad S, Minderaa R, Mulas F, Müller U, Mulligan A, Rabin K, Rommelse N, Sethna V, Sorohan J, Uebel H, Psychogiou L, Weeks A, Barrett R, Craig I, Banaschewski T, Sonuga-Barke E, Eisenberg J, Kuntsi J, Manor I, McGuffin P, Miranda A, Oades RD, Plomin R, Roeyers H, Rothenberger A, Sergeant J, Steinhausen HC, Taylor E, Thompson M, Faraone SV, Asherson P. The analysis of 51 genes in DSM-IV combined type attention deficit hyperactivity disorder: association signals in DRD4, DAT1 and 16 other genes. *Mol Psychiatry*. 2006.11(10):934-53.
- Caspi A, McClay J, Moffitt TE, Mill J, Martin J, Craig IW, Taylor A, Poulton R. Role of genotype in the cycle of violence in maltreated children. *Science*. 2002. 297:851-854.
- Chen K. Organization of MAO A and MAO B promoters and regulation of gene expression. *Neurotoxicology*. 2004. 25:31-36.
- Cohen IL, Liu X, Schutz C, White BN, Jenkins EC, Brown WT, Holden JJ. Association of autism severity with a monoamine oxidase A functional polymorphism. *Clin Genet*. 2003. 64(3):190-7.
- Contini V, Marques FZ, Garcia CE, Hutz MH, Bau CH. MAOA-uVNTR polymorphism in a Brazilian sample: further support for the association with impulsive behaviors and alcohol dependence. *Am J Med Genet (Neuropsychiatr Genet)*. 2006. 141:305-308.
- Craig IW. The role of monoamine oxidase A, MAOA, in the aetiology of antisocial behaviour: the importance of gene-environment interactions. *Novartis Found Symp*. 2005. 268:227-237. Discussion 237-241, 242-253.
- Das M, Bhowmik AD, Sinha S, Chattopadhyay A, Chaudhuri K, Singh M, Mukhopadhyay K. MAOA promoter polymorphism and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) in Indian children. *Am J Med Genet (Neuropsychiatr Genet)*. 2006. 141:637-642.
- Deckert J, Catalano M, Sygailo YV, Bosi M, Okladnova O, Di Bella D, Nothen MM, Maffei P, Franke P, Fritze J, Maier W, Propping P, Beckmann H, Bellodi L, Lesch KP. Excess of high activity monoamine oxidase A gene promoter

- alleles in female patients with panic disorder. *Hum Mol Genet.* 1999. 8:621-624.
- Denney RM, Koch H, Craig IW. Association between monoamine oxidase A activity in human male skin fibroblasts and genotype of the MAOA promoter-associated variable number tandem repeat. *Hum Genet.* 1999. 105:542-551.
- Devlin B, Daniels M, Roeder K. The heritability of IQ. *Nature.* 1997. 31;388(6641):468-71.
- Domschke K, Sheehan K, Lowe N, Kirley A, Mullins C, O'sullivan R, Freitag C, Becker T, Conroy J, Fitzgerald M, Gill M, Hawi Z. Association analysis of the monoamine oxidase A and B genes with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) in an Irish sample: preferential transmission of the MAO-A 941G allele to affected children. *Am J Med Genet (Neuropsychiatr Genet).* 2005. 134:110-114.
- Fischer AG, Bau CH, Grevet EH, Salgado CA, Victor MM, Kalil KL, Sousa NO, Garcia CR, Belmonte-de-Abreu P. The role of comorbid major depressive disorder in the clinical presentation of adult ADHD. *J Psychiatr Res.* 2007. 41(12):991-6.
- First MB, Spitzer RL, Gibbon M, William JBW. Structured clinical interview for DSM-IV axis I disorders-Patient Edition (SCID-I/P, version 2.0, 8/98 revision). 1998. Biometrics Research Department, New York Psychiatry Institute.
- Foley DL, Eaves LJ, Wormley B, Silberg JL, Maes HH, Kuhn J, Riley B. Childhood adversity, monoamine oxidase a genotype, and risk for conduct disorder. *Arch Gen Psychiatry.* 2004. 61:738-744.
- Frazzetto G, Di Lorenzo G, Carola V, Proietti L, Sokolowska E, Siracusano A, Gross C, Troisi A. Early trauma and increased risk for physical aggression during adulthood: the moderating role of MAOA genotype. *PLoS ONE.* 2007. 30;2:e486.
- Grevet EH, Bau CA Salgado CA, Fischer A, Victor MM, Garcia C, de Souza NO, Nerung L, Belmonte-de-Abreu P. Interrater reliability for diagnosis in adults of attention deficit hyperactivity disorder and oppositional defiant disorder using K-SADS-E. *Arq Neuropsiquiatr.* 2005. 63:307-10.

- Grevet EH, Bau CH, Salgado CA, Fischer AG, Kalil K, Victor MM, Garcia CR, Sousa NO, Rohde LA, Belmonte-de-Abreu P. Lack of gender effects on subtype outcomes in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder: support for the validity of subtypes. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2006. 256(5):311-9.
- Gutiérrez B, Arias B, Gastó C, Catalán R, Papiol S, Pintor L, Fañanás L. Association analysis between a functional polymorphism in the monoamine oxidase A gene promoter and severe mood disorders. 2004. *Psychiatr Genet*. 14(4):203-8.
- Hervey AS, Epstein JN, Curry JF. Neuropsychology of adults with attention-deficit/hyperactivity disorder: a meta-analytic review. *Neuropsychology*. 2004. 18:485-503.
- Huang YY, Cate SP, Battistuzzi C, Oquendo MA, Brent D, Mann JJ. An association between a functional polymorphism in the monoamine oxidase a gene promoter, impulsive traits and early abuse experiences. *Neuropsychopharmacology*. 2004. 29:1498-1505.
- Hutchison KE, Stallings M, McGueary J, Bryan A. Population stratification in the candidate gene study: fatal threat or red herring? *Psychol Bull*. 2004. 130(1):66-79.
- Jonsson EG, Norton N, Forslund K, Mattila-Evenden M, Rylander G, Asberg M, Owen MJ, Sedvall GC. Association between a promoter variant in the monoamine oxidase A gene and schizophrenia. *Schizophr Res*. 2003. 61:31-37.
- Kaplan E, Fein D, Morris R, Delis DC. *WAIS-R: Manual*. Psychological Corporation. 1991. San Antonio.
- Kim-Cohen J, Caspi A, Taylor A, Williams B, Newcombe R, Craig IW, Moffitt TE. MAOA, maltreatment, and gene-environment interaction predicting children's mental health: new evidence and a meta-analysis. *Mol Psychiatry*. 2006. 11:903-913.
- Lahiri DK, Nurnberger JI Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res*. 1991. 11;19(19):5444.

- Lawrence V, Houghton S, Douglas G, Durkin K, Whiting K, Tannock R. Executive function and ADHD: a comparison of children's performance during neuropsychological testing and real-world activities. *J Atten Disord*. 2004. 7:137-149.
- Lawson DC, Turic D, Langley K, Pay HM, Govan CF, Norton N, Hamshere ML, Owen MJ, O'Donovan MC, Thapar A. Association analysis of monoamine oxidase A and attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet (Neuropsychiatr Genet)*. 2003. 116:84-89.
- Lung FW, Yang P, Cheng TS, Kao WT. No allele variation of the MAOA gene promoter in male Chinese subjects with attention deficit hyperactivity disorder. *Neuropsychobiology*. 2006. 54(3):147-51.
- Maldonado G, Greenland S. Simulation study of confounder-selection strategies. *Am J Epidemiol*. 1993. 1;138(11):923-36.
- Manor I, Tyano S, Mel E, Eisenberg J, Bachner-Melman R, Kotler M, Ebstein RP. Family-based and association studies of monoamine oxidase A and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): preferential transmission of the long promoter-region repeat and its association with impaired performance on a continuous performance test (TOVA). *Mol Psychiatry*. 2002. 7:626-632.
- Marques FZ, Hutz MH, Bau CH. Influence of the serotonin transporter gene on comorbid disorders among alcohol-dependent individuals. *Psychiatr Genet*. 2006.16(3):125-31.
- Mercadante MT, Asbarh F, Rosário MC, et al. K-SADS, entrevista semi-estruturada para diagnóstico em psiquiatria da infância, versão epidemiológica. 1 Ed.1995. São Paulo: PROTOC – Hospital das Clínicas da FMUSP.
- Muller DJ, Serretti A, Sicard T, Tharmalingam S, King N, Artioli P, Mandelli L, Lorenzi C, Kennedy JL. Further evidence of MAO-A gene variants associated with bipolar disorder. *Am J Med Genet B (Neuropsychiatr Genet)*. 2007. 5;144(1):37-40.
- Murphy K, Barkley RA, Bush T. Young adults with attention deficit hyperactivity disorder: subtype differences in comorbidity, educational, and clinical history. *J Nerv Ment Dis*. 2002. 190:147-157.

- Prestes AP, Marques FZ, Hutz MH, Bau CH. The GNB3 C825T polymorphism and depression among subjects with alcohol dependence. *J Neural Transm.* 2007a.114(4):469-72.
- Prestes AP, Marques FZ, Hutz MH, Roman T, Bau CH. Tobacco smoking and the ADRA2A C-1291G polymorphism. *J Neural Transm.* 2007b. Jul 6; [Epub ahead of print]
- Sabol SZ, Hu S, Hamer D. A functional polymorphism in the monoamine oxidase A gene promoter. *Hum Genet.* 1998. 103:273-279.
- Salzano FM, Bortolini MC. The evolution and genetics of Latin American populations. 2002. Cambridge University Press.
- Seidman LJ. Neuropsychological functioning in people with ADHD across the lifespan. *Clin Psychol Rev.* 2006. 26(4):466-85.
- Sheehan DV, Lecrubier Y, Sheehan KH, Amorim P, Janavs J, Weiller E, Hergueta T, Baker R, Dunbar GC. The Mini-International Neuropsychiatric Interview (M.I.N.I.): the development and validation of a structured diagnostic psychiatric interview for DSM-IV and ICD-10. *J Clin Psychiatry.* 1998. 59 Suppl 20:22-33;quiz 34-57.
- Swanson J.M. School-based assessments and interventions for ADD students. 1992. KC Publishing, Irvine.
- Wechsler D. WAIS-R – Manual for the Wechsler Adult Intelligence Scale – Revised. 1981. San Antonio, Texas: The Psychological Corporation.
- Widom CS, Brzustowicz LM. MAOA and the "cycle of violence:" childhood abuse and neglect, MAOA genotype, and risk for violent and antisocial behavior. *Biol Psychiatry.* 2006. 1;60(7):684-9.
- Yu YW, Tsai SJ, Hong CJ, Chen TJ, Chen MC, Yang CW. Association study of a monoamine oxidase a gene promoter polymorphism with major depressive disorder and antidepressant response. *Neuropsychopharmacology.* 2005a. 30(9):1719-23.
- Yu YW, Tsai SJ, Hong CJ, Chen MC, Yang CW, Chen TJ. Association study of a functional MAOA-uVNTR gene polymorphism and cognitive function in healthy females. *Neuropsychobiology.* 2005b. 52(2):77-82.



Vanyukov MM, Maher BS, Devlin B, Tarter RE, Kirillova GP, Yu LM, Ferrell RE. Haplotypes of the monoamine oxidase genes and the risk for substance use disorders. *Am J Med Genet (Neuropsychiatr Genet)*. 2004. 125:120-125.

Zembruski VM, Callegari-Jacques SM, Hutz MH. Application of an African Ancestry Index as a genomic control approach in a Brazilian population. *Ann Hum Genet*. 2006. 70(Pt 6):822-8.

**Table 1. Allele and genotype frequencies of the MAOA-uVNTR polymorphism in adult ADHD subjects and controls**

Allele	Men		Women	
	Patients N=199 N (%)	Controls N= 235 N (%)	Patients N=173 N (%)	Controls N=216 N (%)
2R	1 (0.50)	1 (0.43)	1 (0.29)	1 (0.23)
3R	70 (35.18)	73 (31.06)	123 (35.55)	173 (40.05)
3.5R	3 (1.50)	1 (0.43)	3 (0.87)	2 (0.46)
4R	118 (59.30)	156 (66.38)	215 (62.13)	250 (57.87)
5R	7 (3.52)	4 (1.70)	4 (1.16)	6 (1.39)
Total	199 (100)	235 (100)	346 (100)	432 (100)

  

Genotype*	N (%)	N (%)
3/3	-	-
3/3.5	-	-
3/4	-	-
3.5/4	-	-
4/4	-	-
Total	-	-

2R, 3R, 3.5, 4R and 5R: alleles of 2-, 3-, 3.5-, 4- and 5-repeats.

ADHD males X controls:  $\chi^2=1.12$   $P=0.29$  (high-activity alleles -3.5 and 4R X low-activity 3R allele).

ADHD females X controls:  $\chi^2=1.76$   $P=0.19$  (high-activity alleles -3.5 and 4R X low-activity 3R allele); Genotypes:  $\chi^2=1.56$   $P=0.46$

\*Only the genotypes with alleles with known functional activity are presented. Other genotypes include 2/4 (N=2); 3/5 (N=4); 4/5 (N=4) and 5/5 (N=1).

**Table 2. WAIS-R scores for ADHD patients categorized by MAOA-uVNTR genotypes**

WAIS-R	Men				Women				
	3.5R/4R (N=84)	3R (N=40)	F	P	4/*R (N=49)	3/*R (N=61)	3/3R (N=13)	F	P
	Mean (SE)	Mean (SE)			Mean (SE)	Mean (SE)	Mean (SE)		
Vocabulary subtest**	11.1 (2.0)	10.1 (1.8)	3.6	0.01	11.2 (1.6)	10.5 (1.8)	11.3(1.2)	2.7	0.07
Block design subtest**	10.3 (2.6)	9.7 (2.4)	1.5	0.22	9.0 (2.3)	8.6 (2.3)	9.8 (2.5)	1.9	0.16
Estimated full scale IQ	103.3 (9.1)	99.1 (8.6)	6.0	0.02	100.4 (7.6)	97.7 (8.3)	102.7 (6.6)	3.2	0.04

3R, 3.5 and 4R: alleles 3-, 3.5- and 4-repeats

\* Including the 4R allele and the rare 3.5R allele (N=3)

\*\* WAIS-R subtest scores are recorded as scaled scores

Alcohol abuse and anxiety disorder were included as covariates in the ANOVA since they were associated with  $P \leq 0.20$  for both all WAIS-R scores and genotypes

**Capítulo 4**

**Manuscrito em preparação 2**

**Association between a haplotype in the serotonin 1B  
receptor gene (HTR1B) and adult attention  
deficit/hyperactivity disorder**

**Association between a haplotype in the serotonin 1B receptor gene (HTR1B)  
and adult attention deficit/hyperactivity disorder**

Verônica Contini<sup>1</sup>, Eugenio H. Grevet<sup>2</sup>, Elisa M. Hendler<sup>1</sup>, Christiane R. Garcia<sup>2</sup>, Flávio Vicente<sup>2</sup>, Felipe Picon<sup>2</sup>, Marcelo M. Victor<sup>2</sup>, Carlos A. I. Salgado<sup>2</sup>, Evelise R. Polina<sup>1</sup>, Paulo Belmonte-de-Abreu<sup>2,3</sup>, Claiton H. D. Bau<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>2</sup>Adult ADHD Outpatient Clinic, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>3</sup>Departamento de Psiquiatria, Faculdade de Medicina, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

**Correspondence:** Dr. Claiton H. D. Bau, Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UFRGS, Caixa Postal:15053, CEP:91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil. Email: claiton.bau@ufrgs.br

## Abstract

There is evidence that the serotonergic system is responsible, at least in part, for mediating the hyperactive and impulsive components of ADHD. In this study we investigated the HTR2A A-1438G, HTR1B A-161T, HTR1B T-261G and HTR1B G861C polymorphisms in 377 adults ADHD patients of European descent. The interviews followed the DSM-IV criteria, using the K-SADS-E for ADHD and oppositional defiant disorder, and SCID-I and MINI for comorbidities. The control group for allele and genotype frequencies is composed of 235 Brazilian blood donor men. The characterization of the linkage disequilibrium and the estimation of haplotypes in the HTR1B gene were performed with the MLOCUS program. The genotype and allele frequencies between patients and controls did not differ in any polymorphism. The haplotype analysis in the HTR1B gene revealed that the A-161T, T-261G and G861C polymorphisms are in strong linkage disequilibrium ( $P < 0.0001$ ). Patients and controls presented significant differences in haplotype frequencies ( $P < 0.0001$ ). The chi-square residual analysis revealed a specific haplotype that was more frequent in patients (-261G -161T 861G) ( $P = 0.04$ ) and a haplotype that was more frequent in the control group (-261T -161T 861C) ( $P < 0.0001$ ). Our findings are consistent with previous findings, providing support for the HTR1B gene as an important risk factor for the development of ADHD. However the causal variant (s) remains to be definitely established.

**Keywords:** Attention-deficit/hyperactivity; association study; serotonin; 5-HT receptors

## Introduction

Attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD) is a heterogeneous and highly heritable disorder manifesting itself in symptoms of inattention and/or hyperactivity/impulsivity that arise during childhood, are frequently persistent across development, and result in impairment in multiple domains of adaptive functioning (Spencer et al., 2007). Epidemiological studies indicate that ADHD is a worldwide disorder affecting approximately 5.29% of children and 4.4% of adults (Polanczky et al., 2007; Polanczky and Rohde, 2007). Adults with ADHD are at risk for developing other psychiatric difficulties such as antisocial disorders, mood and anxiety disorders, and substance abuse disorders (Biederman, 2004; Secnik et al., 2005; Grevet et al., 2006).

Although serotonin has been less thoroughly studied in the neurobiology of ADHD, its role in the pathophysiology of this disorder has become an area of intense investigation. There is evidence that serotonin is responsible, at least in part, for mediating the hyperactive and impulsive components of ADHD (Quist and Kennedy, 2001). It is therefore possible that genes involved in the serotonin receptors function are good candidates for molecular genetics studies of ADHD. Among the at least 14 different types of serotonin receptors mediate serotonergic activity, serotonin 1B (5-HT<sub>1B</sub>) and 2A receptors (5-HT<sub>2A</sub>) are the most investigated in association studies of ADHD (Heiser et al., 2007).

The serotonin HTR2A gene codes for a G protein-coupled receptor of particular interest in biological psychiatric. The gene has been implicated as a functional candidate in many neuropsychiatric phenotypes (Norton and Owen, 2005). Antagonism of the 5-HT<sub>2A</sub> receptor has been shown to reduce dopamine-induced hyperactivity in mice, providing support for the interaction of serotonergic and dopaminergic systems in mediating hyperactivity behavior (O' Neill et al., 1999).

The A-1438G polymorphism in the promoter region of the HTR2A gene has been previously analyzed in ADHD association studies (Zoroglu et al., 2003; Bobb et al., 2005; Li et al., 2006a,b; Guimarães et al., 2007; Heisser et al., 2007) and may be a functional SNP, modulating the promoter activity (Parsons et al., 2004).

The variant A-1438G is in perfect linkage disequilibrium with the HTR2A T102C polymorphism which has also been studied in ADHD (Quist et al., 2000; Levitan et al., 2002; Zoroglu et al., 2003; Bobb et al., 2005; Heiser et al., 2007). However, the results of the association studies with these variants are not conclusive. There are some positive findings (Levitan et al., 2002; Li et al., 2006b), but the majority are negative (Quist et al., 2000; Zoroglu et al., 2003; Bobb et al., 2005; Li et al., 2006a; Guimarães et al., 2007; Heisser et al., 2007).

Animal studies have shown that HTR1B knockout mice display a variety of interesting behaviors, such as increased aggression, decreased anxiety behavior, increased impulsivity, elevated alcohol consumption and increased cocaine seeking (Brunner and Hen, 1997; Sanders et al., 2002). Several association studies between polymorphism in the HTR1B gene and ADHD have been published (Heiser et al., 2007). Faraone et al. (2005), in a pooled analysis of eight genes that have been subject of association studies, found modest evidence for ADHD to be associated with the HTR1B gene. The G861C, a synonymous SNP, has been the most widely studied and the positive results suggest the involvement of the G861 allele in the risk for ADHD (Hawi et al., 2002; Quist et al., 2003; Li et al., 2005; Mill et al., 2005; Smoller et al., 2006; Ickowicz et al., 2007; Heiser et al., 2007).

Although the polymorphism G861C was the most frequently tested in HTR1B ADHD association studies, other polymorphisms have also been reported in the gene (Sanders et al., 2001; Duan et al., 2003; Proudnikov et al., 2006). Duan et al. (2003) showed that the common SNPs A-161T and T-261G in the HTR1B promoter region are functional in reporter gene assay and exhibit opposing effects on gene expression: their functional effect on transcription is null when alleles -261G and -161T are in the same haplotype. These results provide evidence of a complex balancing regulation of HTR1B transcription by common polymorphisms in its promoter and suggest that typing both SNPs would be necessary in association experiments. Several studies have shown that the polymorphisms A-161T, T-261G and G861C are in linkage disequilibrium (Huang et al., 1999; Sanders et al., 2001; Cigler et al., 2001; Kranzler et al., 2002; Duan et al., 2003). Therefore, this is a case where haplotype analysis is clearly needed.



The aim of this study was to investigate genetic variants in the genes that code for the 5-HT<sub>1B</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptors in a sample of adults with ADHD. We investigated the A-1438G variant in the HTR2A gene and the A-161T, T-261G and G861C polymorphisms in the HTR1B gene.

## **Materials and Methods**

### **Subjects**

Three hundred and seventy seven adult ADHD patients comprised the sample. They were evaluated in the adult ADHD outpatient clinic of the Hospital Clínicas de Porto Alegre. The exclusion criteria were evidence of clinically significant neurological diseases that might affect cognition and current or past history of psychosis and IQ  $\leq$  70 (Kaplan et al., 1991).

The diagnostic procedures for ADHD and Oppositional Defiant Disorder (ODD) followed the DSM-IV criteria (American Psychiatric Association, 1994) using the Portuguese version of K-SADS-E (Mercadonte et al., 1995). The K-SADS-E is a semi-structured interview for children and adolescents aged 6–18 years which assesses current episodes and the severest episode in the past (lifetime) of DSM-IV psychiatric disorders in children (Ambrosini, 2000). The Kappa coefficients of inter-rater agreement for the K-SADS-E were 1.00 for the childhood ADHD diagnosis, 1.00 for current ADHD diagnosis and 0.95 for current ADHD subtype diagnosis (Grevet et al. 2005).

The Axis I psychiatric comorbidities were evaluated using the SCID-IV-R structured interview system (First et al., 1998). The diagnosis of conduct and antisocial personality disorder was obtained using the appropriate sections of the Mini-International Neuropsychiatric Interview (M.I.N.I.) (Sheehan et al., 1998). The severity of current ADHD and ODD symptoms was assessed by the SNAP-IV Rating Scale (Swanson, 1992). A detailed description of the severity and comorbidity profile of this sample is in Grevet et al. (2006) and Fischer et al. (2007).

The control group for allele and genotype frequencies is composed of 235 Brazilian blood donor men. The control sample was designed to be non-screened and therefore not interviewed for psychiatric diagnoses. The expected frequency of ADHD in this group is the same as in the general population.

All subjects included in the sample (patients and controls) are European descendents. Considering the lack of population structure among the European descendents from the state of Rio Grande do Sul (Zembruski et al., 2006) population stratification unlikely to occur in this situation.

All subjects (patients and controls) signed an informed consent approved by the Ethics Committees of the Hospital and the Federal University of Rio Grande do Sul.

### **Laboratory Methods**

The DNA was extracted by the method of Lahiri and Nurnberger (1991). The polymorphic region A-1438G in the HTR2A gene and T-261G in the HTR1B gene were amplified by the polymerase chain reaction (PCR) using primers and amplifications protocols adapted from Arranz et al. (1998) and Nöthen et al. (1994), respectively. The HTR1B A-161T and G861C polymorphisms were genotyped using primers described by Sun et al. (2002).

### **Statistical Analyses**

Allele frequencies were estimated by gene counting. Differences in the genotype and allele frequencies of the polymorphisms between patients and controls subjects were tested for significance using the chi-square test. The association with the presence of comorbidities with considerable frequency in our sample was also tested by chi-square. Continuous measures (SNAP-IV scores) were analyzed by ANOVA.

The characterization of the linkage disequilibrium and the estimation of haplotypes in the HTR1B gene were performed with the MLOCUS program (Long et al., 1995; Long, 1999). Differences in the haplotype frequency between patients and controls were analyzed by chi-square.

## Results

The genotype distributions among the groups (patients and controls) did not deviate from those expected according to Hardy-Weinberg equilibrium in any polymorphisms analyzed (HTR2A A-1438G; HTR1B A-161T; HTR1B T-261G and HTR1B G861C).

Genotype and allele frequencies of the HTR2A A-1438G variant in patients and controls are presented in table 1. The genotype and allele frequencies among patients and controls did not differ (genotype  $\chi^2=1.30$ ,  $P=0.52$ ; alleles  $\chi^2=1.03$ ,  $P=0.31$ ).

No significant differences were found in the genotype and allele frequencies between patients and controls in any HTR1B polymorphisms (all  $P>0.1$ ). Table 2 shows the genotype and allele frequencies of the A-161T, T-261G and G861C polymorphisms in the HTR1B gene.

The haplotype analysis of the polymorphisms in the HTR1B gene revealed that the A-161T, T-261G and G861C polymorphisms are in strong linkage disequilibrium in patients and controls. The  $D'$  was 0.85 between A-161T and T-261G ( $P<0.0001$ ), 0.98 between A-161T and G861C ( $P<0.0001$ ) and 0.90 between T-261G and G861C ( $P<0.0001$ ) in the patients group. The  $D'$  values in the control group are very similar.

Patients and controls presented significant differences in haplotype frequencies ( $\chi^2=34.99$ ,  $DF=6$ ,  $P<0.0001$ ) (Table 3). The chi-square residual analysis revealed a specific haplotype that was more frequent in patients (-261G - 161T 861G) ( $P=0.04$ ) and a haplotype that was more frequent in the control group (-261T -161T 861C) ( $P<0.0001$ ).

The presence of comorbid disorders and ADHD severity as measured by SNAP-IV scores were not associated with the polymorphisms or haplotypes investigated here.

## Discussion

This study found no evidence for association between the HTR2A A-1438G, HTR1B A-161T, HTR1B T-261G and HTR1B G861C polymorphisms and ADHD in adults. However, we detected an association between a specific haplotype in the HTR1B gene and ADHD.

The findings on the HTR2A A-1438G polymorphism are similar to most ADHD association studies with this polymorphism (Zoroglu et al., 2003; Bobb et al., 2005; Li et al., 2006a; Guimarães et al., 2007; Heisser et al., 2007). Therefore, it is reasonable to exclude a major role for this polymorphism in the risk for ADHD. However, we cannot rule out that other polymorphisms in the HTR2A gene might be important. Guimarães et al. (2007) reported an association between the 452His>Tyr polymorphism of this gene with ADHD by TDT analysis. A preferential transmission of the His542 allele was observed only in families with affected boys, suggesting that findings from ADHD association studies for the HTR2A gene might be understood in the context of a gender effect.

Previous family-based studies reported a modest association between the HTR1B G861C polymorphism and ADHD (Hawi et al., 2002; Quist et al., 2003; Li et al., 2005; Smoller et al., 2006). This gene is both a biological and positional candidate gene for ADHD. A linkage analysis revealed a genomewide significant linkage peak for ADHD in the region containing the HTR1B locus and a meta-analysis of association studies found a significant association between ADHD and the G861C polymorphism (Ogdie et al., 2004; Faraone et al., 2005).

Two previous family-based ADHD studies reported an overtransmitted haplotype that contains the G861 allele (Li et al., 2005; Smoller et al., 2006). Our results provide additional evidence for a role for an HTR1B haplotype in ADHD. Although this haplotype contains the G861 allele in this and previous studies (Li et al., 2005; Smoller et al., 2006), it is possible that another functional polymorphism might be responsible for the association with ADHD. This hypothesis emerges considering that all results are similar regarding the significant effect of the G861 containing haplotype, but, despite the positive meta-analysis, no individual study got significant results when the G861C polymorphism is analyzed alone.

Moreover, this SNP is synonymous with respect to amino acid sequence and thus unlikely to be directly functional. Huang et al. (1999) showed a weak correlation between 5-HT<sub>1B</sub> receptor number and the HTR1B genotype. The authors observed that the binding to 5-HT<sub>1B</sub> is slightly increased in subjects homozygous for the G861 allele, but no direct functional effects of this polymorphism have been identified.

Therefore, our results should be interpreted in the context of some limitations. Although we included two others possible functional SNPs in our analysis (HTR1B A-161T and HTR1B T-261G), there are several others polymorphisms in the HTR1B gene that were not investigated (Sanders et al., 2001; Duan et al., 2003; Proudnikov et al., 2006). These polymorphisms could help to explain our haplotype results.

In conclusion, ours findings provide support for the HTR1B gene as an important risk factor for the development of ADHD, although the causal variant (s) remains to be definitely established. Further studies, preferentially including more polymorphisms in the HTR1B gene, are required to substantiate these findings.

### **Acknowledgments**

Thanks are due to Aline G. Fischer, Katiane L.S. Kalil, Nyvia O. Souza, Rafael Karam and Eduardo Vitola for help in the sample collection of ADHD patients. CNPq and FAPERGS funded this study.

## References

- Ambrosini PJ. Historical development and present status of the schedule for affective disorders and schizophrenia for school-age children (K-SADS). *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2000. 39:49-58.
- American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition*. 1994. American Psychiatric Association. Washington.
- Arranz MJ, Munro J, Owen MJ, Spurlock G, Sham PC, Zhao J, Kirov G, Collier DA, Kerwin RW. Evidence for association between polymorphism in the promoter and coding regions of the 5-HT<sub>2A</sub> receptor gene and response to clozapine. *Mol Psychiatry*. 1998. 3:61-66.
- Biederman J. Impact of comorbidity in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Clin Psychiatry*. 2004;65 Suppl 3:3-7.
- Bobb AJ, Addington AM, Sidransky E, Gornick MC, Lerch JP, Greenstein DK, Clasen LS, Sharp WS, Inoff-Germain G, Wavrant-De Vriège F, Arcos-Burgos M, Straub RE, Hardy JA, Castellanos FX, Rapoport JL. Support for association between ADHD and two candidate genes: NET1 and DRD1. *Am J Med Genet B (Neuropsychiatr Genet)*. 2005. 5;134(1):67-72.
- Brunner D, Hen R. Insights into the neurobiology of impulsive behavior from serotonin receptor knockout mice. *Ann N Y Acad Sci*. 1997. 29;836:81-105.
- Cigler T, LaForge KS, McHugh PF, Kapadia SU, Leal SM, Kreek MJ. Novel and previously reported single-nucleotide polymorphisms in the human 5-HT<sub>1B</sub> receptor gene: no association with cocaine or alcohol abuse or dependence. *Am J Med Genet*. 2001. 8;105(6):489-97.
- Duan J, Sanders AR, Molen JE, Martinolich L, Mowry BJ, Levinson DF, Crowe RR, Silverman JM, Gejman PV. Polymorphisms in the 5'-untranslated region of the human serotonin receptor 1B(HTR1B) gene affect gene expression. *Mol Psychiatry*. 2003. 8(11):901-10.
- Faraone SV, Perlis RH, Doyle AE, Smoller JW, Goralnick JJ, Holmgren MA, Sklar P. Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry*. 2005. 1;57(11):1313-23.

- First MB, Spitzer RL, Gibbon M, Williams JBW. Structured clinical interview for DSM-IV axis I disorders-Patient Edition (SCID-I/P, version 2.0, 8/98 revision). 1998. Biometrics Research Department, New York Psychiatry Institute.
- Fischer AG, Bau CH, Grevet EH, Salgado CA, Victor MM, Kalil KL, Sousa NO, Garcia CR, Belmonte-de-Abreu P. The role of comorbid major depressive disorder in the clinical presentation of adult ADHD. *J Psychiatr Res*. 2007. 41(12):991-6.
- Grevet EH, Bau CA Salgado CA, Fischer A, Victor MM, Garcia C, de Souza NO, Nerung L, Belmonte-de-Abreu P. Interrater reliability for diagnosis in adults of attention deficit hyperactivity disorder and oppositional defiant disorder using K-SADS-E. *Arq Neuropsiquiatr*. 2005. 63:307-10.
- Grevet EH, Bau CH, Salgado CA, Fischer AG, Kalil K, Victor MM, Garcia CR, Sousa NO, Rohde LA, Belmonte-de-Abreu P. Lack of gender effects on subtype outcomes in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder: support for the validity of subtypes. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2006. 256(5):311-9.
- Guimarães AP, Zeni C, Polanczyk GV, Genro JP, Roman T, Rohde LA, Hutz MH. 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)*. 2007.5;144(1):69-73.
- Hawi Z, Dring M, Kirley A, Foley D, Kent L, Craddock N, Asherson P, Curran S, Gould A, Richards S, Lawson D, Pay H, Turic D, Langley K, Owen M, O'Donovan M, Thapar A, Fitzgerald M, Gill M. Serotonergic system and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): a potential susceptibility locus at the 5-HT(1B) receptor gene in 273 nuclear families from a multi-centre sample. *Mol Psychiatry*. 2002;7(7):718-25.
- Heiser P, Dempfle A, Friedel S, Konrad K, Hinney A, Kiefl H, Walitza S, Bettecken T, Saar K, Linder M, Warnke A, Herpertz-Dahlmann B, SchÃ¶nfelder H, Remschmidt H, Hebebrand J. Family-based association study of serotonergic candidate genes and attention-deficit/hyperactivity disorder in a German sample. *J Neural Transm*. 2007. 114(4):513-21.

- Huang YY, Grailhe R, Arango V, Hen R, Mann JJ. Relationship of psychopathology to the human serotonin1B genotype and receptor binding kinetics in postmortem brain tissue. *Neuropsychopharmacology*. 1999. 21(2):238-46.
- Ickowicz A, Feng Y, Wigg K, Quist J, Pathare T, Roberts W, Malone M, Schachar R, Tannock R, Kennedy JL, Barr CL. The serotonin receptor HTR1B: gene polymorphisms in attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2007. 5;144(1):121-5.
- Kaplan E, Fein D, Morris R, Delis DC. *WAIS-R: Manual*. Psychological Corporation. 1991. San Antonio.
- Kranzler HR, Hernandez-Avila CA, Gelernter J. Polymorphism of the 5-HT1B receptor gene (HTR1B): strong within-locus linkage disequilibrium without association to antisocial substance dependence. *Neuropsychopharmacology*. 2002. 26(1):115-22.
- Lahiri DK, Nurnberger JI Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res*. 1991. 11;19(19):5444.
- Levitan RD, Masellis M, Basile VS, Lam RW, Jain U, Kaplan AS, Kennedy SH, Siegel G, Walker ML, Vaccarino FJ, Kennedy JL. Polymorphism of the serotonin-2A receptor gene (HTR2A) associated with childhood attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) in adult women with seasonal affective disorder. *J Affect Disord*. 2002.71(1-3):229-33.
- Li J, Wang Y, Zhou R, Zhang H, Yang L, Wang B, Khan S, Faraone SV. Serotonin 5-HT1B receptor gene and attention deficit hyperactivity disorder in Chinese Han subjects. *Am J Med Genet B (Neuropsychiatr Genet)*. 2005. 5;132(1):59-63.
- Li J, Wang Y, Zhou R, Wang B, Zhang H, Yang L, Faraone SV. No association of attention-deficit/hyperactivity disorder with genes of the serotonergic pathway in Han Chinese subjects. *Neurosci Lett*. 2006a. 31;403(1-2):172-5.
- Li J, Kang C, Wang Y, Zhou R, Wang B, Guan L, Yang L, Faraone SV. Contribution of 5-HT2A receptor gene -1438A>G polymorphism to outcome of



- attention-deficit/hyperactivity disorder in adolescents. *Am J Med Genet B (Neuropsychiatr Genet)*. 2006b. 5;141(5):473-6.
- Long JC, Williams RC, Urbanek M. An E-M algorithm and testing strategy for multiple locus haplotypes. *Am J Hum Genet*. 1995. 56: 799-810.
- Long, JC. Multiple Locus Haplotype Analysis, version 3.0. Software and documentation distributed by the author. 1999. Department of Human Genetics, University of Michigan Medical School, 4909 Buhl Bldg., Ann Arbor, MI 4819-0618.
- Mercadante MT, Asbarh F, Rosário MC, et al. K-SADS, entrevista semi-estruturada para diagnóstico em psiquiatria da infância, versão epidemiológica. 1 Ed.1995. São Paulo: PROTOC – Hospital das Clínicas da FMUSP.
- Mill J, Xu X, Ronald A, Curran S, Price T, Knight J, Craig I, Sham P, Plomin R, Asherson P. Quantitative trait locus analysis of candidate gene alleles associated with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) in five genes: DRD4, DAT1, DRD5, SNAP-25, and 5HT1B. *Am J Med Genet B (Neuropsychiatr Genet)*. 2005. 5;133(1):68-73.
- Norton N, Owen MJ. HTR2A: association and expression studies in neuropsychiatric genetics. *Ann Med*. 2005. 37:121-129.
- Nothen M. M., Erdmann J., Shimronabarbanell D. and Propping P. Identification of genetic variation in the human serotonin 1D beta receptor gene.1994.*Biochem Biophys Res Commun*. 15;205(2):1194-200.
- Ogdie MN, Fisher SE, Yang M, Ishii J, Francks C, Loo SK, Cantor RM, McCracken JT, McGough JJ, Smalley SL, Nelson SF. Attention deficit hyperactivity disorder: fine mapping supports linkage to 5p13, 6q12, 16p13, and 17p11. *Am J Hum Genet*. 2004. 75(4):661-8.
- O'Neill MF, Heron-Maxwell CL, Shaw G. 5-HT2 receptor antagonism reduces hyperactivity induced by amphetamine, cocaine, and MK-801 but not D1 agonist C-APB. *Pharmacol Biochem Behav*. 1999. 63(2):237-43.
- Parsons MJ, D'Souza UM, Arranz MJ, Kerwin RW, Makoff AJ. The -1438A/G polymorphism in the 5-hydroxytryptamine type 2A receptor gene affects promoter activity. *Biol Psychiatry*. 2004.15;56(6):406-10.

- Polanczyk G, Rohde LA. Epidemiology of attention-deficit/hyperactivity disorder across the lifespan. *Curr Opin Psychiatry*. 2007. 20(4):386-92.
- Polanczyk G, de Lima MS, Horta BL, Biederman J, Rohde LA. The worldwide prevalence of ADHD: a systematic review and metaregression analysis. *Am J Psychiatry*. 2007. 164(6):942-8.
- Proudnikov D, LaForge KS, Hofflich H, Levenstien M, Gordon D, Barral S, Ott J, Kreek MJ. Association analysis of polymorphisms in serotonin 1B receptor (HTR1B) gene with heroin addiction: a comparison of molecular and statistically estimated haplotypes. *Pharmacogenet Genomics*. 2006. 16(1):25-36.
- Quist JF, Barr CL, Schachar R, Roberts W, Malone M, Tannock R, Basile VS, Beitchman J, Kennedy JL. Evidence for the serotonin HTR2A receptor gene as a susceptibility factor in attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Mol Psychiatry*. 2000.5(5):537-41.
- Quist JF, Kennedy JL. Genetics of childhood disorders: XXIII. ADHD, Part 7: The serotonin system. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2001. 40(2):253-6.
- Quist JF, Barr CL, Schachar R, Roberts W, Malone M, Tannock R, Basile VS, Beitchman J, Kennedy JL. The serotonin 5-HT1B receptor gene and attention deficit hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry*. 2003. 8(1):98-102.
- Sanders AR, Cao Q, Taylor J, Levin TE, Badner JA, Cravchik A, Comeron JM, Naruya S, Del Rosario A, Salvi DA, Walczyk KA, Mowry BJ, Levinson DF, Crowe RR, Silverman JM, Gejman PV. Genetic diversity of the human serotonin receptor 1B (HTR1B) gene. *Genomics*. 2001.15;72(1):1-14.
- Sanders AR, Duan J, Gejman PV. DNA variation and psychopharmacology of the human serotonin receptor 1B (HTR1B) gene. *Pharmacogenomics*. 2002. 3(6):745-62.
- Secnik K, Swensen A, Lage MJ. Comorbidities and costs of adult patients diagnosed with attention-deficit hyperactivity disorder. *Pharmacoeconomics*. 2005;23(1):93-102.
- Sheehan DV, Lecrubier Y, Sheehan KH, Amorim P, Janavs J, Weiller E, Hergueta T, Baker R, Dunbar GC. The Mini-International Neuropsychiatric Interview (M.I.N.I.): the development and validation of a structured diagnostic psychiatric

- interview for DSM-IV and ICD-10. *J Clin Psychiatry*. 1998. 59 Suppl 20:22-33;quiz 34-57.
- Smoller JW, Biederman J, Arbeitman L, Doyle AE, Fagerness J, Perlis RH, Sklar P, Faraone SV. Association between the 5HT1B receptor gene (HTR1B) and the inattentive subtype of ADHD. *Biol Psychiatry*. 2006.1;59(5):460-7.
- Spencer TJ, Biederman J, Mick E. Attention-deficit/hyperactivity disorder: diagnosis, lifespan, comorbidities, and neurobiology. *J Pediatr Psychol*. 2007. 32(6):631-42.
- Sun HF, Chang YT, Fann CS, Chang CJ, Chen IH, Hsu YP, Yu WY, Cheng AT. Association Study of novel human serotonin 5-HT(1B) polymorphisms with alcohol dependence in Taiwanese Han. *Biological Psychiatry*. 2002. 51:896-901.
- Swanson J.M. School-based assessments and interventions for ADD students. 1992. KC Publishing, Irvine.
- Zembrzuski VM, Callegari-Jacques SM, Hutz MH. Application of an African Ancestry Index as a genomic control approach in a Brazilian population. *Ann Hum Genet*. 2006. 70(Pt 6):822-8.
- Zoroglu SS, Erdal ME, Erdal N, Ozen S, Alasehirli B, Sivasli E. No evidence for an association between the T102C and 1438 G/A polymorphisms of the serotonin 2A receptor gene in attention deficit/hyperactivity disorder in a Turkish population. *Neuropsychobiology*. 2003. 47(1):17-20.

**Table 1. Genotype and allele frequencies of the HTR2A A-1438G polymorphism in adult ADHD patients and controls:**

HTR2A A-1438G Genotypes	Patients (N=377)		Controls (N=235)	
	N	%	N	%
AA	65	17.2	49	20.9
GA	191	50.7	116	49.4
GG	121	32.1	70	29.8
Alleles				
A	321	43	214	46
G	433	57	256	54

Genotypes  $\chi^2=1.30$ , P=0.52; Alleles  $\chi^2=1.03$ , P=0.31

**Table 2. Genotype and allele frequencies of the HTR1B polymorphisms in adult ADHD patients and controls:**

Polymorphism	Patients		Controls	
	N	%	N	%
<b>HTR1B T-261G</b>				
Genotypes				
TT	103	28.4	72	31.7
TG	182	50.1	113	49.8
GG	78	21.5	42	18.5
Total	363	100	227	100
Alleles				
T	388	53	257	57
G	338	47	197	43
<b>HTR1B A-161T</b>				
Genotypes				
AA	169	45.8	118	50.2
AT	151	40.9	96	40.9
TT	49	13.3	21	8.9
Total	369	100	235	100
Alleles				
A	489	66	332	70
T	249	34	138	30
<b>HTR1B G861C</b>				
Genotypes				
GG	199	53.1	110	46.6
GC	151	40.3	106	44.9
CC	25	6.7	20	8.5
Total	375	100	236	100
Alleles				
G	549	73	326	69
C	201	27	146	31

T-261G: Genotypes  $\chi^2=1.14$ ,  $P=0.57$ ; Alleles  $\chi^2=1.13$ ,  $P=0.29$

A-161T: Genotypes  $\chi^2=2.93$ ,  $P=0.23$ ; Alleles  $\chi^2=2.53$ ,  $P=0.11$

G861C: Genotypes  $\chi^2=2.58$ ,  $P=0.28$ ; Alleles  $\chi^2=2.43$ ,  $P=0.12$

**Table 3. Haplotypes in the HTR1B gene in adult ADHD patients and controls:**

Polymorphism			Haplotype frequency	
T-261G	A-161T	G861C	Patients (N=353)	Controls (N=162)
T	A	G	0.25	0.27
T	A	C	0.25	0.29
G	A	G	0.14	0.14
G	A	C	0.01	0.01
T	T	G	0.03	0.01
G	T	G	0.31	0.24
G	T	C	0.01	0
T	T	C	0	0.04

$\chi^2_{7FD} = 34.99, P < 0.0001$

$\chi^2$  residual analysis: GTG (P=0.04) and TTC (P<0.0001)

**Capítulo 5**  
**Discussão**

Os aspectos mais específicos referentes aos resultados obtidos nesta dissertação foram discutidos nos artigos científicos (capítulos 3 e 4). No presente capítulo serão mencionados alguns aspectos mais gerais deste trabalho que não puderam ser incluídos nos artigos.

A hipótese de trabalho inicial dessa dissertação de mestrado é a de que os polimorfismos escolhidos poderiam estar associados a sintomas e transtornos de externalização (tais como sintomas de impulsividade ou a presença de transtorno de personalidade anti-social) em pacientes com TDAH. Isso considerando as evidências de envolvimento do sistema serotoninérgico com tais fenótipos (Scearce-Levie e cols., 1999; Zhuang e cols., 1999; Bouwknecht e cols., 2001). Essa hipótese não se confirmou. No entanto, os resultados apóiam as evidências prévias de envolvimento dos genes candidatos estudados com o TDAH em si e déficits cognitivos relacionados.

Uma das perspectivas abertas pelos estudos de associação do tipo caso-controle é a exploração de fenótipos intermediários entre o efeito do gene e o transtorno mental propriamente dito. Na genética psiquiátrica, o termo mais usado para essas características é o de endofenótipos. Eles podem ser definidos como traços intermediários em uma cadeia de causalidade com origens genéticas, tendo por desfecho um transtorno multifatorial (Gunzerath e Goldman, 2003). Esse tipo de investigação é fundamental para tentar minimizar a perda de poder estatístico gerada pela heterogeneidade fenotípica.

Testes neuropsicológicos são usados tanto na área clínica do TDAH, a fim de contribuir no processo diagnóstico e identificar condições comórbidas, como em pesquisa, com o objetivo de caracterizar os prejuízos reais que o transtorno impõe. Além disso, a herdabilidade significativa apresentada por várias medidas neuropsicológicas credencia as mesmas como candidatas a endofenótipos no TDAH (Doyle et al., 2005).

A associação encontrada neste estudo, portanto, envolvendo o polimorfismo MAOA-uVNTR e variações nos escores de QI poderia ajudar na compreensão dos múltiplos resultados contraditórios e até uma varredura genômica (Brookes et al., 2006) envolvendo este gene e o TDAH. Isso porque tais resultados poderiam estar refletindo não uma relação direta com o transtorno em



si, mas com um endofenótipo neuropsicológico manifesto no QI, ou ainda uma interação gene-ambiente. De fato, diversos estudos de grande impacto na literatura têm mostrado uma interação entre o gene MAOA, mais especificamente do polimorfismo MAOA-uVNTR, e um ambiente de infância adverso (Caspi e cols., 2002; Huang e cols., 2004; Widom e Brzustowicz, 2006; Kim-Cohen e cols. 2006; Frazzetto e cols., 2007).

A falta de associação encontrada no polimorfismo HTR2A A-1438G não exclui a possibilidade de que existam outros polimorfismos associados com o TDAH nesse gene. Na realidade, uma perspectiva de investigação futura é replicar o achado de Guimarães e cols. (2007) envolvendo o polimorfismo HTR2A His452Tyr. Tendo em conta a baixa frequência do alelo Tyr452, optamos por aumentar o tamanho amostral para atingir em uma investigação futura um poder estatístico capaz de oferecer uma interpretação mais segura. Além disso, levando em conta a heterogeneidade da doença, também não podemos descartar que este gene possa mediar outras características não incluídas neste estudo, que poderiam influenciar de alguma forma o curso clínico da doença, ou ainda algum endofenótipo.

Quanto aos resultados envolvendo o gene HTR1B, o panorama geral da literatura, somado ao presente trabalho, aponta para a necessidade de mais pesquisas, visto a forte associação envolvendo os haplótipos do gene. Resta saber qual ou quais exatamente são os polimorfismos responsáveis pela associação encontrada.

Enfim, o presente trabalho reforça consideravelmente as evidências prévias de envolvimento de genes do sistema serotoninérgico no QI e no TDAH.

## **Capítulo 6**

### **Referências Bibliográficas da Introdução e Discussão**

- American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition. 1994. American Psychiatric Association. Washington.
- Arnold L. Sex differences in ADHD: conference summary. *J Abnorm Child Psychol.* 1996. 24: 555-569.
- Baeyens D, Roeyers H, Walle JV. Subtypes of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD): distinct or related disorders across measurement levels? *Child Psychiatry Hum Dev.* 2006. 36:403-417.
- Barkey RA, Fischer M, Edelbrock CS, Smallish L. The adolescent outcome of hyperactive children diagnosed by research criteria: I. an 8-year prospective follow-up study. *J Am Acad Child and Adolesc Psychiatry.* 1990. 29:546-557.
- Barkey RA, Murphy KR, Dupaul GI, Bush T. Driving in young adults with attention deficit hyperactivity disorder: knowledge, performance, adverse outcomes, and the role of executive functioning. *J Int Neuropsychol Soc.* 2002. 8: 655-672.
- Bhatara V, Loudenberg R, Ellis R. Association of attention deficit hyperactivity disorder and gestational alcohol exposure: an exploratory study. *J Atten Disord.* 2006. 9:515-522.
- Berlin L, Bohlin G, Nyberg L, Janols LO. How well do measures of inhibition and other executive functions discriminate between children with ADHD and controls? *Dev Cogn C Child Neuropsychol.* 2004.10:1-13.
- Biederman J. Attention-deficit/hyperactivity disorder: a life-span perspective. *J Clin Psychiatry.* 1998.59:4-16.
- Biederman J, Spencer T. Attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) as a noradrenergic disorder. *Biol Psychiatry.* 1999. 46:1234-1242.
- Biederman J, Mick E, Faraone SV. Age-dependent decline of symptoms of Attention-deficit/hyperactivity disorder: impact of remission definition and symptoms type. *Am J Psychiatry.* 2000. 157:816-818.
- Biederman, J. Impact of comorbidity in adults with attention deficit/hyperactivity disorder. *J Clin Psychiatry.* 2004. 65:3-7.
- Biederman J, Monuteaux MC, Doyle AE, Seidman LJ, Wilens TE, Ferrero F, Morgan CL, Faraone SV. Impact of executive function deficits and attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) on academic outcomes in children. *J Consult Clin Psychol.* 2004. 72:757-766.
- Biederman J. Attention-deficit/hyperactivity disorder: a selective overview. *Biol Psychiatry.* 2005. 57:1215-1220.

- Biederman J, Kwon A, Aleardi M, Chouinard V, Marino T, Cole H, Mick E, Faraone S V. Absence of gender effects on attention deficit hyperactivity disorder: findings in nonreferred subjects. *Am J Psychiatry*. 2005. 162:1083-1089.
- Bobb AJ, Addington AM, Sidransky E, Gornick MC, Lerch JP, Greenstein DK, Clasen LS, Sharp WS, Inoff-Germain G, Wavrant-De Vri ze F, Arcos-Burgos M, Straub RE, Hardy JA, Castellanos FX, Rapoport JL. Support for association between ADHD and two candidate genes: NET1 and DRD1. *Am J Med Genet B (Neuropsychiatr Genet)*. 2005. 5;134(1):67-72.
- Bouffard R, Hechtman L, Minde K, Iaboni-Kassab F. The efficacy of 2 different dosages of methylphenidate in treating adults with attention-deficit hyperactivity disorder. *Can J Psychiatry*. 2003. 48(8):546-54.
- Bouwknicht JA, Hijzen TH, van der Gugten J, Maes RA, Hen R, Olivier B. Absence of 5-HT(1B) receptors is associated with impaired impulse control in male 5-HT(1B) knockout mice. *Biol Psychiatry*. 2001. 49:557-568.
- Brookes K, Xu X, Chen W, Zhou K, Neale B, Lowe N, Anney R, Franke B, Gill M, Ebstein R, Buitelaar J, Sham P, Campbell D, Knight J, Andreou P, Altink M, Arnold R, Boer F, Buschgens C, Butler L, Christiansen H, Feldman L, Fleischman K, Fliers E, Howe-Forbes R, Goldfarb A, Heise A, Gabri ls I, Korn-Lubetzki I, Johansson L, Marco R, Medad S, Minderaa R, Mulas F, M ller U, Mulligan A, Rabin K, Rommelse N, Sethna V, Sorohan J, Uebel H, Psychogiou L, Weeks A, Barrett R, Craig I, Banaschewski T, Sonuga-Barke E, Eisenberg J, Kuntsi J, Manor I, McGuffin P, Miranda A, Oades RD, Plomin R, Roeyers H, Rothenberger A, Sergeant J, Steinhausen HC, Taylor E, Thompson M, Faraone SV, Asherson P. The analysis of 51 genes in DSM-IV combined type attention deficit hyperactivity disorder: association signals in DRD4, DAT1 and 16 other genes. *Mol Psychiatry*. 2006.11(10):934-53.
- Brown RT, Amler RW, Freeman WS, Perrin JM, Stein MT, Feldman HM, Pierce K, Wolraich ML; Treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder: overview of the evidence. *Pediatrics*. 2005. 115(6):e749-57.
- Brunner HG, Nelen M, Breakefield XO, Ropers HH, van Oost BA. Abnormal behavior associated with a point mutation in the structural gene for monoamine oxidase A. *Science*. 1993. 262:578-580.
- Bush G, Valera EM, Seidman LJ. Functional neuroimaging of attention-deficit/hyperactivity disorder: a review and suggested future directions. *Biol Psychiatry*. 2005. 57:1273-1284.
- Button TM, Thapar A, McGuffin P. Relationship between antisocial behaviour, attention-deficit hyperactivity disorder and maternal prenatal smoking. *Br J Psychiatry*. 2005.187:155-160.

- Carlson CL, Mann M. Sluggish cognitive tempo predicts a different pattern of impairment in the attention deficit hyperactivity disorder, predominantly inattentive type. *J Clin Child Adolesc Psychol*. 2002. 31:123-129.
- Cases O, Seif I, Grimsby J, Gaspar P, Chen K, Pournin S, Muller U, Aguet M, Babinet C, Shih JC, et al. Aggressive behavior and altered amounts of brain serotonin and norepinephrine in mice lacking MAOA. *Science*. 1995. 268:1763-1766.
- Caspi A, McClay J, Moffitt TE, Mill J, Martin J, Craig IW, Taylor A, Poulton R. Role of genotype in the cycle of violence in maltreated children. *Science*. 2002. 297:851-854.
- Chen K. Organization of MAO A and MAO B promoters and regulation of gene expression. *Neurotoxicology*. 2004. 25:31-36.
- Contini V, Marques FZ, Garcia CE, Hutz MH, Bau CH. MAOA-uVNTR polymorphism in a Brazilian sample: further support for the association with impulsive behaviors and alcohol dependence. *Am J Med Genet (Neuropsychiatr Genet)*. 2006. 141:305-308.
- Cigler T, LaForge KS, McHugh PF, Kapadia SU, Leal SM, Kreek MJ. Novel and previously reported single-nucleotide polymorphisms in the human 5-HT(1B) receptor gene: no association with cocaine or alcohol abuse or dependence. *Am J Med Genet*. 2001. 8;105(6):489-97.
- Cohen IL, Liu X, Schutz C, White BN, Jenkins EC, Brown WT, Holden JJ. Association of autism severity with a monoamine oxidase A functional polymorphism. *Clin Genet*. 2003. 64(3):190-7.
- Craig IW. The role of monoamine oxidase A, MAOA, in the aetiology of antisocial behaviour: the importance of gene-environment interactions. *Novartis Found Symp*. 2005. 268:227-237. Discussion 237-241, 242-253.
- Crystal DS, Ostrander R, Chen RS, August GJ. Multimethod assessment of psychopathology among DSM-IV subtypes of children with attention-deficit/hyperactivity disorder: self-, parent, and teacher reports. *J Abnorm Child Psychol*. 2001. 29:189-205.
- Das M, Bhowmik AD, Sinha S, Chattopadhyay A, Chaudhuri K, Singh M, Mukhopadhyay K. MAOA promoter polymorphism and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) in Indian children. *Am J Med Genet (Neuropsychiatr Genet)*. 2006. 141:637-642.
- Deckert J, Catalano M, Syagailo YV, Bosi M, Okladnova O, Di Bella D, Nothen MM, Maffei P, Franke P, Fritze J, Maier W, Propping P, Beckmann H, Bellodi L, Lesch KP. Excess of high activity monoamine oxidase A gene promoter

- alleles in female patients with panic disorder. *Hum Mol Genet.* 1999. 8:621-624.
- Denney RM, Koch H, Craig IW. Association between monoamine oxidase A activity in human male skin fibroblasts and genotype of the MAOA promoter-associated variable number tandem repeat. *Hum Genet.* 1999. 105:542-551.
- Domschke K, Sheehan K, Lowe N, Kirley A, Mullins C, O'sullivan R, Freitag C, Becker T, Conroy J, Fitzgerald M, Gill M, Hawi Z. Association analysis of the monoamine oxidase A and B genes with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) in an Irish sample: preferential transmission of the MAO-A 941G allele to affected children. *Am J Med Genet (Neuropsychiatr Genet).* 2005. 134:110-114.
- Doyle AE, Faraone SV, Seidman LJ, Willcutt EG, Nigg JT, Waldman ID, Pennington BF, Peart J, Biederman J. Are endophenotypes based on measures of executive functions useful for molecular genetic studies of ADHD? *J Child Psychol Psychiatry.* 2005. 46:774-803.
- Duan J, Sanders AR, Molen JE, Martinolich L, Mowry BJ, Levinson DF, Crowe RR, Silverman JM, Gejman PV. Polymorphisms in the 5'-untranslated region of the human serotonin receptor 1B (HTR1B) gene affect gene expression. *Molecular Psychiatry.* 2003. 8:901-910.
- Faraone SV, Biederman J. Neurobiology of attention-deficit hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry.* 1998. 44:951-958.
- Faraone SV, Biederman J, Weber W, Russell RL. Psychiatric, neuropsychological, and psychosocial features of DSM-IV subtypes of attention-deficit/hyperactivity disorder: results from a clinically referred sample. *J Am Acad Child and Adolesc Psychiatry.* 1998. 37:185-193.
- Faraone SV, Perlis RH, Doyle AE, Smoller JW, Goralnick JJ, Holmgren MA, Sklar P. Molecular Genetics of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Biol Psychiatry.* 2005. 57:1313-1323.
- Faraone SV, Khan SA. Candidate gene studies of attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Clin Psychiatry.* 2006. 8:13-20.
- Foley DL, Eaves LJ, Wormley B, Silberg JL, Maes HH, Kuhn J, Riley B. Childhood adversity, monoamine oxidase a genotype, and risk for conduct disorder. *Arch Gen Psychiatry.* 2004. 61:738-744.
- Frazzetto G, Di Lorenzo G, Carola V, Proietti L, Sokolowska E, Siracusano A, Gross C, Troisi A. Early trauma and increased risk for physical aggression during adulthood: the moderating role of MAOA genotype. *PLoS ONE.* 2007. 30;2:e486.

- Gainetdinov RR, Jones SR, Caron MG. Functional hyperdopaminergia in dopamine transporter knock-out mice. *Biol Psychiatry*. 1999. 46:303-311.
- Gittelman R, Mannuzza S, Shenker R, Bonagura N. Hyperactive boys almost grown up: I Psychiatric status. *Arch Gen Psychiatry*. 1985. 42: 937-994.
- Grevet EH, Marques FZC, Salgado CAI, Victor MM, Kalil KL, Garcia C, Souza NO, Belmonte-de-Abreu PS, Bau CHD. 2006a. The influence of gender in the age-dependent decline of ADHD symptoms. Abstracts, 17th Eunethydis Meeting, Bruges.
- Grevet EH, Bau CH, Salgado CA, Ficher A, Kalil K, Victor MM, Garcia C, Sousa NO, Belmonte-de-Abreu P. Lack of gender effects on subtype outcomes in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder: support for the validity of subtypes. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2006b. 256:311-9.
- Guimarães AP, Zeni C, Polanczyk GV, Genro JP, Roman T, Rohde LA, Hutz MH. 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)*. 2007.5;144(1):69-73.
- Gunzerath L, Goldamn D. G X E: A NIAAA workshop on gene-environment interactions. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*.2003. 27:1-23.
- Hartig PR, Hoyer D, Humphrey PP, Martin GR. Alignment of receptor nomenclature with the human genome: classification of 5-HT1B and 5-HT1D receptor subtypes. *Trends in Pharmacological Sciences*.1996. 17:103-105.
- Hawi Z, Dring M, Kirley A, Foley D, Kent L, Craddock N, Asherson P, Curran S, Gould A, Richards S, Lawson D, Pay H, Turic D, Langley K, Owen M, O'Donovan M, Thapar A, Fitzgerald M e Gill M Serotonergic system and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): a potential susceptibility locus at the 5-HT1B receptor gene in 273 nuclear families from a multi-centre sample. *Mol Psychiatry*. 2002. 718-725.
- Heiser P, Dempfle A, Friedel S, Konrad K, Hinney A, Kiefl H, Walitza S, Bettecken T, Saar K, Linder M, Warnke A, Herpertz-Dahlmann B, SchÄ¶fer H, Remschmidt H, Hebebrand J. Family-based association study of serotonergic candidate genes and attention-deficit/hyperactivity disorder in a German sample. *J Neural Transm*. 2007. 114(4):513-21.
- Hill JC, Schoener EP. Age-dependent decline of attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Psychiatry*. 1996. 153:1143-1146.
- Huang YY, Grailhe R, Arango V, Hen R, Mann JJ. Relationship of psychopathology to the human serotonin1B genotype and receptor binding kinetics in postmortem brain tissue. *Neuropsychopharmacology*. 1999. 21(2):238-46.

- Huang YY, Cate SP, Battistuzzi C, Oquendo MA, Brent D, Mann JJ. An association between a functional polymorphism in the monoamine oxidase a gene promoter, impulsive traits and early abuse experiences. *Neuropsychopharmacology*. 2004. 29:1498-1505.
- Jacob CP, Muller J, Schmidt M, Hohenberger K, Gutknecht L, Reif A, Schmidtke A, Mossner R, Lesch KP. Cluster B Personality Disorders are Associated with Allelic Variation of Monoamine Oxidase A Activity. *Neuropsychopharmacology*. 2005. 4:1-8.
- Jonsson EG, Norton N, Forslund K, Mattila-Evenden M, Rylander G, Asberg M, Owen MJ, Sedvall GC. Association between a promoter variant in the monoamine oxidase A gene and schizophrenia. *Schizophr Res*. 2003. 61:31-37.
- Kessler R, Adler L, Barkley R, Bierderman J, Conners C, Demler O, Faraone S, et al. The prevalence and correlates of adult ADHD in the United States: Results from the National Comorbidity Survey Replication. *Am J Psychiatry*. 2006. 163:716-723.
- Kim-Cohen J, Caspi A, Taylor A, Williams B, Newcombe R, Craig IW, Moffitt TE. MAOA, maltreatment, and gene-environment interaction predicting children's mental health: new evidence and a meta-analysis. *Mol Psychiatry*. 2006. 11:903-913.
- Kooij JJ, Burger H, Boonstra AM, Van der Linden PD, Kalma LE, Buitelaar JK. Efficacy and safety of methylphenidate in 45 adults with attention-deficit/hyperactivity disorder. A randomized placebo-controlled double-blind cross-over trial. *Psychol Med*. 2004. 34(6):973-82.
- Kranzler HR, Hernandez-Avila CA, Gelernter J. Polymorphism of the 5-HT1B receptor gene (HTR1B): strong within-locus linkage disequilibrium without association to antisocial substance dependence. *Neuropsychopharmacology*. 2002. 26(1):115-22.
- Krause KH, Dresel SH, Krause J, Kung HF, Tatsch K. Increased striatal dopamine transporter in adult patients with attention deficit hyperactivity disorder: effects of methylphenidate as measured by single photon emission computed tomography. *Neurosci Lett*. 2000. 285:107-110.
- Langley K, Rice F, van den Bree MB, Thapar A. Maternal smoking during pregnancy as an environmental risk factor for attention deficit hyperactivity disorder behaviour. A review. *Minerva Pediatr*. 2005. 57:359-371.
- Lawson DC, Turic D, Langley K, Pay HM, Govan CF, Norton N, Hamshere ML, Owen MJ, O'Donovan MC, Thapar A. Association analysis of monoamine



- oxidase A and attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet (Neuropsychiatr Genet)*. 2003. 116:84-89.
- Lawrence V, Houghton S, Douglas G, Durkin K, Whiting K, Tannock R. Executive function and ADHD: a comparison of children's performance during neuropsychological testing and real-world activities. *J Atten Disorders* 2004; 7:137-149.
- Levitan RD, Masellis M, Basile VS, Lam RW, Jain U, Kaplan AS, Kennedy SH, Siegel G, Walker ML, Vaccarino FJ, Kennedy JL. Polymorphism of the serotonin-2A receptor gene (HTR2A) associated with childhood attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) in adult women with seasonal affective disorder. *J Affect Disord*. 2002. 71:229-233.
- Levy F. The dopamine theory of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Aust N Z J Psychiatry*. 1991. 25:277-283.
- Li J, Wang Y, Zhou R, Zhang H, Yang L, Wang B, Khan S, Faraone SV. Serotonin 5-HT1B receptor gene and attention deficit hyperactivity disorder in Chinese Han subjects. *Am J Med Genet B (Neuropsychiatr Genet)*. 2005. 5;132(1):59-63.
- Li J, Wang Y, Zhou R, Wang B, Zhang H, Yang L, Faraone SV. No association of attention-deficit/hyperactivity disorder with genes of the serotonergic pathway in Han Chinese subjects. *Neurosci Lett*. 2006a. 403:172-175.
- Li J, Kang C, Wang Y, Zhou R, Wang B, Guan L, Yang L, Faraone SV. Contribution of 5-HT2A receptor gene -1438A>G polymorphism to outcome of attention-deficit/hyperactivity disorder in adolescents. *Am J Med Genet (Neuropsychiatr Genet)*. 2006b. 141:473-476.
- Mannuzza S, Klein RG, Moulton JL 3rd. Persistence of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder into adulthood: what have we learned from the prospective follow-up studies? *J Atten Disord*. 2003. 7:93-100.
- Manor I, Tyano S, Mel E, Eisenberg J, Bachner-Melman R, Kotler M, Ebstein RP. Family-based and association studies of monoamine oxidase A and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): preferential transmission of the long promoter-region repeat and its association with impaired performance on a continuous performance test (TOVA). *Mol Psychiatry*. 2002. 7:626-632.
- Manuck SB, Flory JD, Ferrell RE, Mann JJ, Muldoon MF. A regulatory polymorphism of the monoamine oxidase-A gene may be associated with variability in aggression, impulsivity, and central nervous system serotonergic responsivity. *Psychiatry Res*. 2000. 95:9-23.

- McGough JJ, Smalley SL, McCracken JT, Yang M, Del'home M, Lynn DE, Loo S. Psychiatric comorbidity in adult attention deficit hyperactivity disorder: findings from multiplex families. *Am J Psychiatry*. 2005. 62:1621-1627.
- Millstein RB, Wilens TE, Biederman J, Spencer TJ. Presenting ADHD symptoms and subtypes in clinically referred adults with ADHD. *J Attention Disord*. 1997. 2:159-166.
- Mochizuki D, Yuyama Y, Tsujita R, Komaki H, Sagai H. . Cloning and expression of the human 5-HT1B-type receptor gene. *Biochemical and biophysical research communications*.1992. 185:517-532.
- Murphy DL, Sims KB, Karoum F, de la Chapelle A, Norio R, Sankila EM et al. Marked amine and amine metabolite changes in Norrie disease patients with a C-chromosomal deletion affecting monoamine oxidase. *J neurochem*. 1990. 54:242-247.
- Murphy K, Barkley RA. Attention deficit hyperactivity disorder adults: comorbidities and adaptive impairments. *Comp Psychiatry* 1996. 37:393-401.
- Murphy KR, Barkley RA, Bush T. Young adults with attention deficit hyperactivity disorder: subtype differences in comorbidity, educational, and clinical history. *J Nerv Ment Dis* 2002; 190:147-157.
- Norton N, Owen MJ. HTR2A: association and expression studies in neuropsychiatric genetics. *Ann Med*. 2005. 37:121-129.
- Organização Mundial da Saúde. 1993. *Classificação de transtornos mentais e de comportamento da CID-10*. Artes Médicas, Porto Alegre, 351pp.
- Parsian A, Cloninger CR, Sinha R, Zhang ZH. Functional variation in promoter region of monoamine oxidase A and subtypes of alcoholism: haplotype analysis. *Am J Med Genet (Neuropsychiatr Genet)*. 2003. 117:46-50.
- Parsons MJ, D'Souza UM, Arranz MJ, Kerwin RW, Makoff AJ. The -1438A/G polymorphism in the 5-hydroxytryptamine type 2A receptor gene affects promoter activity. *Biol Psychiatry*. 2004. 56:406- 410.
- Pfiffner LJ, Calzada E, Mc Burnett K. Interventions to enhance enhancesocial competence. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am*.2000. 9:689-709.
- Plomin R, Spinath FM. Intelligence: genetics, genes, and genomics. *J Pers Soc Psychol* 2004; 86:112-129.
- Polanczyk G, de Lima MS, Horta BL, Biederman J, Rohde LA. The worldwide prevalence of ADHD: a systematic review and metaregression analysis. *Am J Psychiatry*. 2007. 164(6):942-8.

- Polanczyk G, Rohde LA. Epidemiology of attention-deficit/hyperactivity disorder across the lifespan. *Curr Opin Psychiatry*. 2007. 20(4):386-92.
- Preisig M, Ferrero F, Malafosse A. Monoamine oxidase a and tryptophan hydroxylase gene polymorphisms: are they associated with bipolar disorder? *Am J Pharmacogenomics*. 2005.5:45-52.
- Quist JF, Barr CL, Schachar R, Roberts W, Malone M, Tannock R, Basile VS, Beitchman J e Kennedy JL. Evidence for the serotonin HTR2A receptor gene as a susceptibility factor in attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Mol Psychiatry*. 2000. 5:537-541.
- Quist JF, Kennedy JL. Genetics of childhood disorders: XXIII. ADHD, Part 7: The serotonin system. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2001. 40:253-256.
- Quist JF, Barr CL, Schachar R, Roberts W, Malone M, Tannock R, Basile VS, Beitchman J, Kennedy JL. The serotonin 5-HT1B receptor gene and attention deficit hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry*. 2003. 8:98-102.
- Rohde LA. ADHD in Brazil: the DSM-IV criteria in a culturally different population. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 2002. 159: 36-42.
- Rohde, LA. & Mattos, P. (Ed.). *Princípios e práticas em TDAH - Transtorno de deficit de atenção/hiperatividade*. Porto Alegre: Artmed, 2003.
- Rohde LA e Halpen R. Transtorno de déficit de atenção/hiperatividade: atualização. *Jornal de Pediatria*. 2004. 80:61-70.
- Sabol SZ, Hu S, Hamer D. A functional polymorphism in the monoamine oxidase A gene promoter. *Hum Genet*. 1998. 103:273-279.
- Samochowicz J, Lesch KP, Rottmann M, Smolka M, Syagailo YV, Okladnova O, Rommelspacher H, Winterer G, Schmidt LG, Sander T. Association of a regulatory polymorphism in the promoter region of the monoamine oxidase A gene with antisocial alcoholism. *Psychiatry Res*. 1999. 86:67-72.
- Sanders AR, Cao Q, Taylor J, Levin TE, Badner JA, Cravchik A, Comeron JM, Naruya S, Del Rosario A, Salvi DA, Walczyk KA, Mowry BJ, Levinson DF, Crowe RR, Silverman JM, Gejman PV. Genetic diversity of the human serotonin receptor 1B (HTR1B) gene. *Genomics*. 2001.15;72(1):1-14.
- Scearce-Levie K, Chen JP, Gardner E, Hen R. 5-HT receptor knockout mice: pharmacological tools or models of psychiatric disorders. *Annals of the New York Academy of Sciences*.1999. 868:701-715.
- Seeman P, Madras BK. Anti-hyperactivity medication: methylphenidate and amphetamine. *Mol Psychiatry*. 1998. 3:386-96.

- Seidman LJ. Neuropsychological functioning in people with ADHD across the lifespan. *Clin Psychol Rev.* 2006a. 26(4):466-85.
- Seidman LJ, Valera EM, Makris N, Monuteaux MC, Boriol DL, Kelkar K, Kennedy DN, Caviness VS, Bush G, Alvardi M, Faraone SV, Biederman J. Dorsolateral prefrontal and anterior cingulate cortex volumetric abnormalities in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder identified by magnetic resonance imaging. *Biol Psychiatry.* 2006b.15;60(10):1071-80.
- Schachter HM, Pham B, King J, Langford S, Moher D. How efficacious and safe is short-acting methylphenidate for the treatment of attention-deficit disorder in children and adolescents? A meta-analysis. *CMAJ.* 2001. 27;165(11):1475-88.
- Schmitz M, Denardin D, Laufer Silva T, Pianca T, Hutz MH, Faraone S, Rohde LA. Smoking during pregnancy and attention-deficit/hyperactivity disorder, predominantly inattentive type: a case-control study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2006. 45(11):1338-45.
- Sims KB, de la Champelle A, Norrio R, Sankila EM, Hsu YP, Rinehart WB et al. Monoamine oxidase deficiency in males with an X chromosome deletion. *Neuron.* 1989. 2:1069-1076.
- Smoller JW, Biederman J, Arbeitman L, Doyle AE, Fagerness J, Perlis RH, Sklar P, Faraone SV. Association between the 5HT1B receptor gene (HTR1B) and the inattentive subtype of ADHD. *Biol Psychiatry.* 2006.1;59(5):460-7.
- Solanto MV. Neuropsychopharmacological mechanisms of stimulant drug action in attention-deficit hyperactivity disorder: a review and integration. *Behav Brain Res.* 1998. 94:127-152.
- Still G, Tredgold A. Some abnormal psychical conditions in children. *Lancet.* 1902. 1: 1008-1012, 1077-1082, 1163-1168.
- Spencer T, Biederman J, Wilens T, Doyle R, Surman C, Prince J, Mick E, Alvardi M, Herzig K, Faraone S. A large, double-blind, randomized clinical trial of methylphenidate in the treatment of adults with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry.* 2005. 1;57(5):456-63.
- Swanson JM, Sergeant JA, Taylor E, Sonuga-Barke EJ, Jensen PS, Cantwell DP. Attention-deficit hyperactivity disorder and hyperkinetic disorder. *Lancet.* 1998. 351:429-433.
- Tannock R. Attention deficit hyperactivity disorder: advances in cognitive, neurobiological, and genetic research. *J Child Psychol Psychiatry.* 1998.39(1):65-99.
- Thapar A, O'Donovan M, Owen MJ. The genetics of attention deficit hyperactivity disorder. *Hum Mol Genet.* 2005.15: 275-282.

- Todd RD. Genetics of childhood disorders: XXI. ADHD, part 5: a behavioral genetic perspective. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2000. 39:1571-1573.
- Torgersen T, Gjervan B, Rasmussen K. ADHD in adults: a study of clinical characteristics, impairment and comorbidity. *Nord J Psychiatry*. 2006. 60:38-43.
- Yu YW, Tsai SJ, Hong CJ, Chen MC, Yang CW, Chen TJ. Association study of a functional MAOA-uVNTR gene polymorphism and cognitive function in healthy females. *Neuropsychobiology*. 2005. 52(2):77-82.
- Wender PH, Wood DR, Reimherr FW. Pharmacological treatment of attention deficit disorder, residual type (ADD, RT, "minimal brain dysfunction", "hyperactivity") in adults. *Psychopharmacol Bull*. 1985. 21: 222-231.
- Wender PH. *Attention-Deficit Hyperactivity Disorder in Adults*. New York: Oxford University Press, 1995.
- Weiss G, Hechtman L., Milroy T., Perlman T. Psychiatric status of hyperactives as adults: A controlled prospective 15-year follow-up of 63 hyperactive children. *J Am Acad Child Psychiatry*. 1985. 24: 211-220.
- Wilens T and Dodson W. A clinical perspective of Attention-deficit/Hyperactivity Disorder into adulthood. *J Clin Psychiatry*. 2004. 65: 1301-1313.
- Wilens T, Faraone S, Biederman J. Attention-Deficit Hyperactivity Disorder in Adults. *Jama*. 2004. 292: 619-623.
- Widom CS, Brzustowicz LM. MAOA and the "Cycle of Violence." Childhood Abuse and Neglect, MAOA Genotype, and Risk for Violent and Antisocial Behavior. *Biol Psychiatry*. 2006. 60:684-689.
- Vanyukov MM, Maher BS, Devlin B, Tarter RE, Kirillova GP, Yu LM, Ferrell RE. Haplotypes of the monoamine oxidase genes and the risk for substance use disorders. *Am J Med Genet (Neuropsychiatr Genet)*. 2004. 125:120-125.
- Zhuang X, Gross C, Santarelli L, Compan V, Trillat AC, Hen R. Altered emotional states in knockout mice lacking 5-HT1A or 5-HT1B receptors. *Neuropsychopharmacology*. 1999. 21:52-60.
- Zoroglu SS, Erdal ME, Erdal N, Ozen S, Alasehirli B e Sivasli E. No Evidence for an Association between the T102C and 1438G/A Polymorphisms of the Serotonin 2A Receptor Gene in Attention Deficit/Hyperactivity Disorder in a Turkish Population. *Biol Psychiatry*. 2003. 47:17-20.

**Capítulo 7**  
**Anexos**

## **Critérios diagnósticos do DSM-IV para o transtorno de déficit de atenção/hiperatividade (APA, 1994).**

---

### **Critérios diagnósticos do DSM-IV para transtorno de déficit de atenção/hiperatividade (APA, 1994)**

---

#### **A. Tanto (1) ou (2)**

---

**(1)** Seis ou mais dos seguintes sintomas de desatenção persistiram pelo período mínimo de 6 meses, em grau mal adaptativo e inconsistente com o nível de desenvolvimento:

##### **Desatenção:**

- (a) Frequentemente não presta atenção a detalhes ou comete erros por omissão em atividades escolares, de trabalho ou outros
- (b) Frequentemente tem dificuldades de manter a atenção em tarefas ou atividades lúdicas
- (c) Frequentemente parece não ouvir quando lhe dirigem a palavra
- (d) Frequentemente não segue instruções e não termina seus deveres escolares, tarefas domésticas ou deveres profissionais (não é devido a comportamento opositor ou incapacidade de entender as instruções).
- (e) Frequentemente tem dificuldades para organizar tarefas e atividades
- (f) Frequentemente evita, reluta, detesta se envolver em tarefas que exijam esforço mental contínuo (como tarefas escolares ou deveres de casa)
- (g) Frequentemente perde coisas necessárias para tarefas ou atividades (p. ex., brinquedos, tarefas escolares, lápis, livros ou outros materiais)
- (h) Frequentemente é distraído por estímulos ambientais alheios à tarefa
- (i) Frequentemente é esquecido em atividades diárias

**(2)** Seis ou mais dos seguintes sintomas de Hiperatividade persistiram pelo período mínimo de 6 meses, em grau mal adaptativo e inconsistente com o nível de desenvolvimento:

##### **Hiperatividade:**

- (a) Frequentemente agita as mãos ou os pés ou se remexe na cadeira
- (b) Frequentemente abandona sua cadeira em sala de aula ou em situações nas quais se espera que permaneça sentado
- (c) Frequentemente corre ou escala em demasia em situações impróprias (em adolescentes ou adultos pode ser apenas sensações subjetivas de inquietude)
- (d) Frequentemente tem dificuldades de brincar ou se envolver silenciosamente em atividades de lazer
- (e) Frequentemente está "a mil" ou muitas vezes age como se estivesse "a todo vapor"
- (f) Frequentemente fala em demasia

##### **Impulsividade**

- (g) Frequentemente dá respostas precipitadas antes das perguntas terem sido completamente formuladas
- (h) Frequentemente tem dificuldades de esperar a sua vez
- (i) Frequentemente interrompe ou se intromete em assuntos alheios (p.ex., em conversas ou brincadeiras)

**B.** Alguns sintomas de hiperatividade/impulsividade ou desatenção causadores de comprometimento estavam presentes antes dos sete anos de idade.

**C.** Algum comprometimento causado pelos sintomas está presente em dois ou mais contextos (p.ex., na escola e em casa).

**D.** Deve haver claras evidências de comprometimento clinicamente importante no funcionamento social, acadêmico ou oposicional.

**E.** Os sintomas não ocorrem exclusivamente durante o curso de um transtorno global do desenvolvimento, esquizofrenia ou outro transtorno psicótico, nem são melhor explicados por outro transtorno mental (p.ex., transtorno do humor, transtorno de ansiedade, transtorno dissociativo ou transtorno de personalidade).

#### **Codificar com base no tipo:**

**314.00 Transtorno de déficit de atenção/hiperatividade, tipo combinado:** se tanto o critério A1 quanto o critério A2 são satisfeitos durante os últimos seis meses.

**314.01 Transtorno de déficit de atenção/hiperatividade, tipo predominantemente desatento:** se o critério A1 é satisfeito, mas o Critério A2 não é satisfeito durante os últimos seis meses

**314.02 Transtorno de déficit de atenção/hiperatividade, tipo predominantemente hiperativo/impulsivo:** se o critério A2 é satisfeito, mas o critério A1 não é satisfeito durante os últimos seis meses.

**Nota para codificação:** Para indivíduos (em especial adolescentes e adultos) que atualmente apresentam sintomas que não mais satisfazem todos os critérios, especificar "em remissão parcial".

---

**TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO HIPERATIVIDADE /  
K-SADS (DSM-IV)**

- ATUAL -

**A) DESATENÇÃO**

**A1. INCAPACIDADE DE PRESTAR ATENÇÃO AOS DETALHES**

Você freqüentemente não consegue prestar atenção aos detalhes?

Você freqüentemente comete erros nas tarefas, no trabalho, durante outras atividades?

*Você comete erros banais por falta de atenção?*

0) Ausente 1) Presente

**A2. DIFICULDADE EM MANTER A ATENÇÃO (FOCO)**

Você tem dificuldades em manter a atenção?

Você em geral tem problemas em fixar a atenção nas tarefas, em projetos ou em atividades recreativas? (ex. *Ler por muito tempo*)

0) Ausente 1) Presente

**A3. PARECE NÃO OUVIR**

Você freqüentemente parece não escutar o que lhe está sendo dito?

Seus familiares, colegas e amigos freqüentemente se queixam que você parece não estar prestando atenção (devaneando) ou não ouvindo o que lhe dizem?

As pessoas se queixam que você não ouve o que lhe dizem?

**A4. NÃO SEGUE AS INSTRUÇÕES**

Você freqüentemente não segue as instruções que lhe são dadas?

Você freqüentemente não consegue terminar uma tarefa, deveres ou obrigações no trabalho? (ex. *seguir corretamente uma receita, ler um manual de instruções?*)

0) Ausente 1) Presente

**A5. DIFICULDADES DE SE ORGANIZAR**

Você freqüentemente tem dificuldades de se organizar em tarefas, no trabalho ou nas atividades?

0) Ausente 1) Presente

**A6. EVITAÇÃO OU DESAGRADO PROFUNDO POR TAREFAS MENTAIS**

Você tem a tendência a evitar ou não gostar de tarefas que demandem esforço mental contínuo (ex. *leitura, trabalhos burocráticos, escrever, estudar*)?



0)Ausente 1) Presente

### **A7. FREQUENTEMENTE PERDE OU ESTRAVIA COISAS**

Você perde coisas com frequência? Especialmente aquelas que são necessárias para realizar tarefas e atividades (ex. chaves, ferramentas, contas, material de escritório).

0)Ausente 1) Presente

### **A8. FACILMENTE DISTRAÍDO**

Você se distrai facilmente por estímulos externos?  
Qualquer coisa consegue lhe tirar a atenção do que está realizando?  
( ex. *Em lugares públicos não consegue conversar por se distrair facilmente*)

0)Ausente 1) Presente

### **A9. MUITAS VEZES ESQUECE**

Você se esquece facilmente de coisas que tem que realizar tais como encontros, pagar contas, entregar coisas no prazo certo?

0)Ausente 1) Presente

## **B) HIPERATIVIDADE/IMPULSIVIDADE**

### **HIPERATIVIDADE**

#### **B1. IRREQUIETO**

Você frequentemente fica remexendo com suas mãos ou pés?  
Você frequentemente se contorce na sua cadeira?

0)Ausente 1) Presente

#### **B2. DIFICULDADES EM PERMANECER SENTADO**

Você tem dificuldade de ficar sentado por muito tempo em sua cadeira trabalhando, estudando, fazendo as refeições ou no cinema?

0)Ausente 1) Presente

### **B3. HIPERATIVIDADE/INQUIETAÇÃO**

Você sente a necessidade de ficar constantemente em movimento, ficar mexendo em coisas sem muita objetividade?

Você vivencia situações de inquietação? (ex. *sensação subjetiva de inquietação*)

0) Ausente 1) Presente

### **B4. DIFICULDADES DE REALIZAR ATIVIDADES DE LAZER CALMAMENTE**

Você tem dificuldades em empreender atividades de lazer calmamente ou sozinho?

0) Ausente 1) Presente

### **IMPULSIVIDADE**

### **B5. DISPARA RESPOSTAS**

Você freqüentemente responde antes que alguém tenha acabado de fazer as perguntas (afobado)?

0) Ausente 1) Presente

### **B6. DIFICULDADES DE ESPERAR SUA VEZ**

Você tem dificuldades de esperar em filas ou esperar a sua vez em atividades ou situações em grupo?

0) Ausente 1) Presente

### **B7. MUITAS VEZES “LIGADO NA TOMADA” OU AGE COMO “SE TIVESSE UM MOTORZINHO DENTRO DE VOCÊ”**

Você freqüentemente se sente “ligado na tomada” ou como se “tivesse um motorzinho”?

0) Ausente 1) Presente

### **B8. FREQUENTEMENTE FALA DEMAIS**

Você fala demais o tempo todo, mais do que as outras pessoas? Isto é um problema para você?

0) Ausente 1) Presente

### ***B9. INTERROMPE OU SE INTROMETE MUITAS VEZES***

Você fala ou interrompe os outros quando estes estão falando, sem esperar que tenham terminado? Frequentemente?

0) Ausente 1) Presente

## ***C. CONTEXTOS***

### ***C1. COLÉGIO OU FACULDADE***

Esses sintomas são percebidos no seu local de estudo? Você tem dificuldades no seu local de estudo?

0) Ausente 1) Presente

### ***C2. TRABALHO***

Esses sintomas são percebidos no seu local de trabalho? Você tem problemas no trabalho?

0) Ausente 1) Presente

### ***C3. CASA***

Esses sintomas são percebidos em casa? Você tem problemas em casa?

0) Ausente 1) Presente

## ***CRITÉRIOS PARA O DIAGNÓSTICO***

### **1) Seis (ou mais) dos sintomas de desatenção (A1 a A9)**

0) Ausentes 1) Presentes

OU/E

### **2) Seis (ou mais) dos sintomas de Hiperatividade/Impulsividade (B1 a B9).**

0) Ausentes 1) Presentes

### **3) prejuízo em dois ou mais contextos;**

0) Ausentes 1) Presentes

## **Diagnóstico TDAH**

0) Ausente      1) Sublimiar      2) Presente

## **Diagnóstico Subtipo**

1) Desatento      2) Hiperativo      3) Combinado

## TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

### Informação sobre o Estudo com Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade em Adultos (TDAHA)

Prezado(a) Senhor(a):

Somos um grupo de pesquisadores da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e pretendemos estudar a relação entre **Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade no Adulto** (identificado com a sigla **TDAHA**) e suas características genéticas. Este é um transtorno freqüente em adultos, acometendo cerca de 3 em cada 100 pessoas. O TDAHA tende a prejudicar o rendimento e o progresso da pessoa em diferentes áreas da vida, como trabalho e relacionamento social, mas raramente é visto como transtorno (em geral as pessoas acham que é falta de força de vontade, de caráter, etc.). É um problema que com freqüência também se associa a outros, como uso de drogas e álcool ou alterações cíclicas de humor (altos e baixos, também descritos como Transtorno Bipolar de Humor). Existe uma impressão de que o tipo de maior complicação, que é o com Hiperatividade, tenha bases genéticas diferentes daquele que tem somente Desatenção.

As pessoas selecionadas para o estudo serão submetidas a uma avaliação psiquiátrica que será mantida sob sigilo absoluto. Se houver um diagnóstico psiquiátrico (Síndrome Psiquiátrica) esse será comunicado ao paciente. Esforços serão feitos no sentido de orientá-lo e encaminhá-lo para o tratamento adequado, dentro dos recursos do HCPA e da comunidade. O aconselhamento genético, quando necessário, será oferecido pela equipe sob supervisão do geneticista membro da Equipe Professor Dr. Claiton Henrique Dotto Bau.

Caso o paciente preencha os critérios para o diagnóstico de TDAHA, será coletada 1 (uma) amostra de 10 mililitros (ml) de sangue no Laboratório do HCPA. Esta amostra será utilizada para a separação do material genético nela contido na forma de Ácido Desoxirribonuclêico, conhecido como DNA, ou ADN. A partir deste material extraído, serão estudadas mutações que fazem que seu portador possua um funcionamento mental alterado. O material coletado será guardado no Laboratório de Biologia Molecular do Professor Claiton Bau, no Campus do Vale da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, de uma forma especial sem descrição de nome, e com um número de código com chave de conhecimento exclusivo dos pesquisadores, para estudos posteriores de associação de outros genes como subtipos especiais desta doença. Quaisquer novos estudos serão submetidos previamente à aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

Em caso de qualquer dúvida, os pacientes são orientados a entrar em contato com o pesquisador Responsável, Dr. Paulo S. Belmonte de Abreu (fones 3316-8413 e 9191-1644) ou os executores deste trabalho, Dr. Eugênio Horacio Grevet (fone 3333-3734) e Dr. Carlos Alberto Iglesias Salgado (fone 3330-7818). Uma Cópia do Consentimento Informado ficará com o paciente.

Porto Alegre, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 200\_\_.

Eu, \_\_\_\_\_ recebi as orientações necessárias para entender o presente estudo, assim como li a Informação do mesmo.

\_\_\_\_\_  
Paciente

\_\_\_\_\_  
Responsável

\_\_\_\_\_  
Pesquisador