

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Biociências

**ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS DO GENE DO RECEPTOR D4 DE DOPAMINA
(*DRD4*) SOBRE A ETIOLOGIA E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DO TRANSTORNO DE DÉFICIT DE
ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE (TDAH)**

Gláucia Chiyoko Akutagava Martins

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

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

Porto Alegre, abril de 2010.

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

Aos meus pais,

por tudo.

Agradecimentos

À minha família, por sempre me apoiar incondicionalmente.

À minha orientadora, Tatiana Roman, pela dedicação, paciência, apoio, orientação e por confiar em mim mais do que eu mesma.

Aos colegas de laboratório, em especial às amigas Andressa, Angélica de Baumont, Angélica Oliveira, Deise, Evelise, Gabriela, Juliana, Luciana, Mariana e TatiG.

Ao Elmo e à Ellen, pela atenção e dedicação aos alunos e ao Programa.

À prof^aDr^a Sídia Maria Callegari-Jacques, pelos valiosos conselhos e ajuda nas análises estatísticas, além da amizade.

Ao prof^oDr. Jeffrey Long, pela atenção e inestimável ajuda nas análises estatísticas.

Aos órgãos financiadores que tornaram a execução desse projeto possível.

Resumo

O Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) é um dos transtornos psiquiátricos mais comuns da infância e adolescência, caracterizado por sintomas de desatenção, hiperatividade e impulsividade. É uma doença bastante complexa, com uma herdabilidade estimada de 76%. A maioria dos estudos moleculares com o TDAH teve como alvo genes codificadores de componentes do sistema dopaminérgico. Entre esses, o gene do receptor D4 de dopamina (*DRD4*) é o loco mais investigado, sendo considerado um gene de suscetibilidade ao TDAH. Entretanto, ainda existem resultados conflitantes. O objetivo do presente estudo foi contribuir para um maior esclarecimento acerca da participação do gene *DRD4* na etiologia e nas manifestações clínicas do TDAH. Para tanto, a hipótese de associação do TDAH com o gene *DRD4* foi testada através do estudo de quatro polimorfismos: a duplicação de 120 pb e os SNPs -616C>G (rs747302) e -521C>T (rs1800955), todos localizados na região promotora, e o VNTR de 48 pb do exon 3. A amostra foi obtida junto ao Programa do Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (ProDAH/HCPA) e em escolas públicas de Porto Alegre, consistindo de 478 crianças e/ou adolescentes com TDAH, diagnosticados de acordo com os critérios do DSM-IV, e seus pais biológicos. Os polimorfismos do gene *DRD4* foram genotipados por PCR convencional seguido de clivagem com endonuclease de restrição quando necessário. A hipótese de associação foi testada por métodos baseados em famílias (Transmit e FBAT) e através de análises dimensionais (PBAT e ANOVA), tanto para cada polimorfismo isoladamente como em haplótipos, tendo-se estimado o desequilíbrio de ligação (DL) entre os polimorfismos estudados (MLocus). Através do método baseado em famílias, nenhuma das três variantes da região promotora foi associada ao TDAH, seja na amostra clínica total ou em subgrupos de pacientes definidos por diferentes características clínicas (valores de *P* entre 0,139 e 1). Em relação ao VNTR, houve evidência de associação entre o TDAH e o alelo 2R: observou-se um déficit de transmissão desse alelo dos pais para a prole, através de ambos os programas Transmit e FBAT (valores de *P* de 0,031 e 0,032, respectivamente), no subgrupo de pacientes do tipo combinado, o que sugere um efeito protetor para esse alelo. Foi detectado um excesso de transmissão do alelo 4R nesse mesmo subgrupo (*P*=0,017) e no grupo de pacientes que apresentavam as comorbidades transtorno de oposição desafio (TOD) e/ou transtorno de conduta (TC) (*P*=0,036), ambos através do Transmit, sugerindo um novo alelo de risco na nossa amostra. Esses achados não foram significantes ao se aplicar o FBAT (valores de *P* de 0,076 e 0,134, respectivamente). As análises dimensionais realizadas não revelaram qualquer associação com nenhum polimorfismo (valores de *P* entre 0,073 e 0,992). Da mesma maneira, o estudo de haplótipos não teve resultados positivos (valores de *P* entre 0,234 e 0,981). Houve uma forte evidência de DL entre a duplicação de 120 pb (polimorfismo de posição 5' mais extrema) e o VNTR de 48 pb (*P*≤0,001/ *D*'=0,425 entre o alelo não-duplicado e 2R e *P*≤0,001/ *D*'=0,521 entre o alelo duplicado e 7R), mas não entre esses marcadores e os SNPs -616C>G e -521C>T. resultados que confirmam uma estrutura gênica bastante complexa. Embora atípicos, uma vez que o alelo 7R é o considerado de risco pela literatura, nossos achados são plausíveis. É possível que alelos diferentes confirmem risco ou proteção ao TDAH em populações diversas. Entender a estrutura e função do gene *DRD4* e então estudar sua associação com o TDAH, usando fenótipos definidos através de diferentes abordagens (como, por exemplo, endofenótipos) e diferentes métodos de análise podem ser estratégias mais produtivas do que as empregadas até o momento para elucidar a verdadeira contribuição do loco *DRD4* a essa doença.

Abstract

Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD) is one of the most common psychiatric disorders of childhood and adolescence, characterized by symptoms of inattention, hyperactivity and impulsivity. It is a very complex disease, with an estimated heritability of 76%. The majority of molecular studies with ADHD had as targets dopaminergic system encoding genes. Among these, dopamine D4 receptor gene (*DRD4*) is the most investigated locus, being considered an ADHD susceptibility gene. However, there are some conflicting results. The aim of the present study was to contribute to a better understanding of *DRD4* role on ADHD etiology and its clinical manifestations. For this, association hypothesis was tested through the study of four polymorphisms: 120 bp tandem duplication, -616C>G (rs747302) and -521C>T (rs1800955) SNPs, all located at promoter region, and 48 bp VNTR of exon 3. The sample was obtained at Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder Program of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (ProDAH/HCPA) and from public schools from Porto Alegre, consisting of 478 children and/or adolescents with ADHD, diagnosed according to DSM-IV criteria, and their biological parents. The polymorphisms were genotyped through conventional PCR followed by restriction endonuclease cleavage when necessary. Association hypothesis was tested by family-based methods (Transmit and FBAT) and through dimensional analyses (PBAT and ANOVA), for each isolated polymorphism as well as for haplotypes, with linkage disequilibrium (LD) estimated between the studied polymorphisms (MLocus). Using family-based methods, none of the three promoter region variants were associated with ADHD, for either total clinical sample or subgroups of patients defined according to different clinical characteristics (*P* values ranging from 0.139 to 1). For the VNTR, there was evidence of association between ADHD and 2R allele: it was observed a transmission deficit of this allele from parents to offspring, by both Transmit and FBAT softwares (*P* values of 0.031 and 0.032, respectively) in the group of combined subtype patients, what suggests a protective effect of this allele. An excess of 4R allele transmission was detected in this same subgroup (*P*=0.017) and in the group of patients presenting oppositional defiant disorder (ODD) and/or conduct disorder (CD) (*P*=0.036), with Transmit, suggesting a new risk allele in our sample. These findings were not significant when applying FBAT (*P* values ranging from 0.076 to 0.134, respectively). Dimensional analyses performed did not reveal association with any polymorphism (*P* values ranging from 0.073 to 0.992). Haplotype study also did not show positive results (*P* values ranging from 0.234 to 0.981). There was strong evidence of LD between 120 bp tandem duplication (the most 5'UTR investigated polymorphism) and 48 bp VNTR ($P \leq 0.001$ / $D' = 0.425$ between non-duplicated allele and 2R and $P \leq 0.001$ / $D' = 0.521$ between duplicated allele and 7R), but not between these markers and -616C>G and -521C>T polymorphisms, results that support a very complex genetic structure. Although unusual, once 7R allele is considered a risk allele by the literature, our findings are plausible. It is possible that different alleles confer risk or protection to ADHD in different populations. To comprehend *DRD4* genetic structure and function and then investigate its association with ADHD, using phenotypes defined through different approaches (as endophenotypes, for example) and different methods of analyses might be more productive than strategies applied until now to elucidate the true contribution of *DRD4* locus to this disease.

Sumário

Capítulo I. Introdução.....	8
1. Caracterização clínica e epidemiológica do TDAH	9
2. Base neurobiológica do TDAH	11
3. Fatores genéticos no TDAH	12
4. TDAH e o gene <i>DRD4</i>	13
Capítulo II. Justificativa e Objetivos	19
Capítulo III. Manuscrito em preparação.....	21
Capítulo IV. Discussão	48
Referências Bibliográficas.....	54

Capítulo I

Introdução

1. Caracterização clínica e epidemiológica do TDAH

O transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) é um dos transtornos psiquiátricos mais comuns da infância e adolescência. Afeta em torno de 5% das crianças em idade escolar (Polanczyk e cols., 2007) e é cerca de quatro vezes mais comum em meninos do que em meninas, em amostras clínicas (Rohde e Halpern, 2004, Spencer e cols., 2007). Os sintomas do TDAH reconhecidos pela quarta edição do Manual de Diagnóstico e Estatística de Transtornos Mentais, o DSM-IV (*American Psychiatric Association*, 1994), dividem-se nas áreas de desatenção e hiperatividade-impulsividade e são apresentados na tabela I.

Tabela I: Sintomas do TDAH de acordo com o DSM-IV.

Desatenção	Hiperatividade	Impulsividade
<ul style="list-style-type: none">• dificuldade em organizar tarefas e atividades	<ul style="list-style-type: none">• é inquieto com as mãos e os pés quando sentado	<ul style="list-style-type: none">• dá respostas impulsivas, sem esperar o final da pergunta
<ul style="list-style-type: none">• dificuldade em seguir instruções e finalizar tarefas	<ul style="list-style-type: none">• parece estar sempre com o “motor ligado”	<ul style="list-style-type: none">• dificuldade em esperar pela sua vez
<ul style="list-style-type: none">• dificuldade em manter a atenção durante atividades ou brincadeiras	<ul style="list-style-type: none">• corre pelo ambiente e “escala” tudo, em momentos inapropriados	<ul style="list-style-type: none">• interrompe os outros facilmente
<ul style="list-style-type: none">• evita se engajar em tarefas que exijam esforço mental sustentado	<ul style="list-style-type: none">• dificuldade em brincar ou se engajar em atividades de lazer quieto	
<ul style="list-style-type: none">• perda freqüente de coisas necessárias a tarefas	<ul style="list-style-type: none">• dificuldade em ficar sentado, em sala de aula e outras situações	
<ul style="list-style-type: none">• parece não estar ouvindo	<ul style="list-style-type: none">• fala excessivamente	
<ul style="list-style-type: none">• fácil distração por estímulos externos		
<ul style="list-style-type: none">• esquecimento em atividades diárias		
<ul style="list-style-type: none">• não dá atenção a detalhes		

Ainda de acordo com o DSM-IV, três tipos clínicos de TDAH podem ser reconhecidos, conforme a presença de um mínimo de seis sintomas na área de desatenção, de hiperatividade/impulsividade ou em ambas áreas: predominantemente desatento, predominantemente hiperativo-impulsivo e combinado. Na maioria das amostras estudadas, o tipo combinado é o mais comum, o tipo desatento é intermediário, e o tipo hiperativo-impulsivo o menos freqüente. Esses subtipos de TDAH diferem também em características como prevalência entre os sexos, idade dos probandos, idade de início da doença, características clínicas e prognóstico (Rohde e Halpern, 2004; Spencer e cols., 2007).

O curso clínico do TDAH é bastante variável. Sintomas de hiperatividade e impulsividade tendem a diminuir mais precocemente, enquanto que os de desatenção, desorganização e distração são os mais persistentes (Acosta e cols., 2004). Apesar de ter sido considerada por muito tempo uma doença tipicamente infantil, o TDAH pode persistir até a adolescência e mesmo até a idade adulta em cerca de 50 a 75% dos casos com início na infância (McGough e Barkley, 2004; Biederman, 2007; Lara e cols., 2009). Geralmente, a persistência dos sintomas está associada a uma série de disfunções significativas na vida do indivíduo, como dificuldades emocionais, de relacionamento e de ajustamento social, falhas acadêmicas e ocupacionais, além de um risco maior para outros problemas de comportamento (Wilens e Dodson, 2004; De Graaf e cols., 2008).

Uma proporção significativa de crianças e adolescentes com TDAH apresentam comorbidades com outros transtornos psiquiátricos. A maioria destes pacientes desenvolve transtorno de oposição desafio ou de conduta (50%), embora transtornos de ansiedade (25%), de humor (15-30%) e de aprendizado (20-30%) também sejam bastante comuns (Jensen e cols., 2001; Acosta e cols., 2004; Cormier, 2008). Comportamentos delinquentes são freqüentes em adolescentes com TDAH (Acosta e cols., 2004; Young, 2008). A presença de tabagismo entre estes pacientes é marcante, atingindo uma prevalência em torno de 30% em ambos os sexos (Sullivan e Rudnik-Levin, 2001; Galera e cols., 2005; McClernon e Kollins, 2008), e estando em geral associada ao uso ou abuso de drogas ilícitas (Wilens e Dodson, 2004). Esse quadro também é visto nos adultos com TDAH, onde, além de problemas por abuso ou dependência de substâncias, é comum personalidade anti-social (Acosta e cols., 2004; Newcorn, 2008; Stein, 2008). A presença de comorbidades parece influenciar na continuidade dos sintomas, além de contribuir para o desenvolvimento de psicopatologias graves em idades posteriores (Wilens e Dodson, 2004; Newcorn, 2008).

A idéia de que o TDAH possa atuar como um fator de risco para tais problemas é bastante enfatizada na literatura (Kessler e cols., 2005; Biederman e cols., 2007). Devido aos prejuízos consideráveis que afetam as áreas acadêmica, social e emocional, ao alto nível de estresse gerado nas famílias e ao grande impacto que causa na sociedade (Barkley, 2002; Stein, 2008), o TDAH foi considerado prioridade em termos de saúde pública nos Estados Unidos (*National Institute of Health*, 2000; De Graaf e cols., 2008). Um maior conhecimento da fisiopatologia e da etiologia do TDAH certamente propiciará um melhor entendimento de todas essas manifestações clínicas, contribuindo para a redução do impacto negativo não só sobre os pacientes e suas famílias, mas também sobre a sociedade.

2. Base neurobiológica do TDAH

A idéia de que os sintomas do TDAH têm origem em disfunções neurológicas é amplamente aceita na literatura. Porém, os mecanismos exatos envolvidos na neurobiologia desse transtorno ainda não estão totalmente esclarecidos (Spencer e cols., 2007). Dados de estudos de neuroimagem sugerem que o TDAH é uma doença fronto-estriato-cerebelar (Curatolo e cols., 2009; Makris e cols., 2009), uma vez que tais regiões parecem ter volume e atividade diminuídos em pacientes com essa patologia. Essas observações são corroboradas pelos dados de estudos neuropsicológicos, que mostraram que crianças com TDAH têm desempenho prejudicado em funções cognitivas e executivas como atenção, percepção, planejamento e organização, além de falhas na inibição comportamental, processos claramente relacionados ao lobo frontal e áreas subcorticais (Arnsten e Li, 2005; Nigg, 2005; Makris e cols., 2009). Uma das principais hipóteses neurobiológicas propostas para essa doença sugere que um déficit na inibição comportamental, e, conseqüentemente, nas demais funções executivas, seja a principal alteração biológica subjacente aos sintomas do TDAH (Barkley, 1997). Aspectos como motivação, processamento temporal da informação, organização motora e percepção temporal também parecem ser importantes na origem da doença (Nigg, 2005; Willcutt e cols., 2005).

As primeiras teorias bioquímicas propostas para explicar o TDAH foram baseadas nas catecolaminas, visto que as regiões implicadas na sua patofisiologia são primariamente innervadas por esses neurotransmissores (Arnsten e Li, 2005; Curatolo e cols., 2009). Evidências farmacológicas e de estudos com animais favoreceram inicialmente a hipótese dopaminérgica do TDAH, onde um déficit de dopamina nas regiões corticais e no estriado seria responsável pela manifestação dos sintomas (Levy, 1991). Porém, dados posteriores sugeriram que o envolvimento desse sistema no TDAH é mais complexo, possivelmente com diferentes alterações nos níveis de neurotransmissão dopaminérgica em cada área implicada, as quais se refletiriam em déficits cognitivos e nas funções executivas, e nos sintomas de hiperatividade motora e impulsividade (Sagvolden e cols., 2005; Swanson e cols., 2007). Acredita-se, ainda, que mecanismos noradrenérgicos e serotoninérgicos também contribuam para a patofisiologia do TDAH, influenciando principalmente em aspectos cognitivos e de atenção seletiva, e na inibição comportamental e comportamentos impulsivos, respectivamente (Arnsten e Li, 2005; Pliszka, 2005; Borycz e cols., 2008; Zepf e cols., 2008).

A ação dos fármacos comumente utilizados no tratamento do TDAH também evidencia a participação do sistema dopaminérgico. Embora o tratamento do TDAH possa envolver intervenções psicossociais, as farmacoterapias são componentes fundamentais do

mesmo (*The MTA Cooperative Group*, 2004). Diferentes grupos de fármacos psicoativos podem ser empregados no manejo dos sintomas do TDAH (Biederman e Spencer, 1999). Porém, vários estudos têm claramente documentado a grande eficácia dos estimulantes em reduzir os sintomas e melhorar a função em uma série de domínios (*The MTA Cooperative Group*, 2004). Entre esses compostos, o metilfenidato é o mais prescrito na prática clínica, sendo efetivo em cerca de 70% dos pacientes (Masellis e cols., 2002; Swanson e cols., 2007). Embora seu mecanismo de ação não esteja ainda totalmente compreendido, ele parece ser um agonista indireto das rotas catecolaminérgicas centrais, facilitando a ação da dopamina e da noradrenalina endógenas através do bloqueio de sua recaptação no neurônio pré-sináptico. Especificamente, o metilfenidato tem uma alta afinidade pelo transportador de dopamina, inibindo essa proteína e, portanto, a recaptação da dopamina na fenda sináptica (Masellis e cols., 2002; Madras e cols., 2005; Swanson e cols., 2007). O aumento nos níveis sinápticos de dopamina causado pelo metilfenidato reflete uma amplificação da dopamina liberada espontaneamente, o que sugere um provável mecanismo para o efeito terapêutico dessa droga (Volkow e cols., 2001; Shafritz e cols., 2004; Swanson e cols., 2007).

3. Fatores genéticos no TDAH

Etiologicamente, o TDAH é considerado uma doença complexa, onde a participação tanto de fatores genéticos como de fatores ambientais é claramente necessária para a manifestação dos sintomas (Biederman e Faraone, 2005; Thapar e cols., 2007). Entretanto, a contribuição genética parece ser substancial, estando entre uma das mais altas já verificadas para os transtornos psiquiátricos (Martin, 2005; Mick e Faraone, 2008). Os diferentes estudos de gêmeos já realizados estimaram uma alta herdabilidade para esse transtorno, estimada em 76% (Biederman e Faraone, 2005; Mick e Faraone, 2008). Tais resultados são corroborados pelas pesquisas com famílias e adotados, que mostram uma prevalência da doença entre pais biológicos cerca de três vezes maior do que a prevalência entre pais adotivos de crianças com TDAH e um risco para a doença de duas a oito vezes maior nos pais biológicos das crianças afetadas do que na população em geral (Thapar e cols., 2007; Mick e Faraone, 2008). Embora alguns relatos tenham sugerido a existência de um gene principal de efeito maior (Acosta e cols., 2004), é bastante provável que a transmissão do TDAH ocorra através de vários genes de pequeno efeito que conferem suscetibilidade a esse transtorno, além de uma possível influência de genes modificadores, e que seu desenvolvimento dependa da interação desses genes entre si e com diversos fatores ambientais (Waldman e Gizer, 2006; Wallis e cols., 2008; Smith e cols., 2009).

A busca pelos genes de suscetibilidade e/ou modificadores vem se baseando em diferentes estratégias, incluindo a investigação de genes candidatos (Waldman e Gizer, 2006; Wallis e cols., 2008). Considerando-se as evidências neurobiológicas, genes que codificam componentes do sistema dopaminérgico parecem estar entre os principais candidatos para estudos moleculares com o TDAH, sendo, de fato, o principal alvo dessas pesquisas (Thapar e cols., 2007; Mick e Faraone, 2008; Wallis e cols., 2008; Gizer e cols., 2009).

4. TDAH e o gene *DRD4*

Embora o candidato inicial tenha sido o gene do transportador de dopamina (*DAT1*) (Cook e cols., 1995), o gene do receptor D4 de dopamina (*DRD4*) é o loco mais intensamente investigado nos estudos moleculares com o TDAH (Mick e Faraone, 2008; Gizer e cols., 2009; Banaschewski e cols., 2010). Esse gene, de aproximadamente 4 kb, está localizado no cromossomo 11p15.5 e é um dos genes humanos mais polimórficos que se conhece (Gelernter e cols. 1992; Petronis e cols., 1993; Li e cols., 2006), o que pode ser visto na Figura I. O loco *DRD4* é responsável pela expressão de uma proteína transmembrana de sete domínios, o receptor do tipo 4 de dopamina (D4). Esse é um dos mais importantes entre os cinco tipos que compõem a classe de receptores dopaminérgicos (D1, D2, D3, D4, D5), principalmente devido à sua alta afinidade pela dopamina e pela clozapina, um antipsicótico atípico. Ele está localizado nos neurônios pós-sinápticos do sistema dopaminérgico, sendo especialmente concentrado no córtex frontal e sistema límbico. Quando ativado, o receptor D4 acopla-se a proteínas G inibitórias, que inibem a enzima adenilil ciclase, responsável pela conversão de ATP à AMP cíclico, dando prosseguimento à resposta intracelular (Van Tol e cols., 1991).

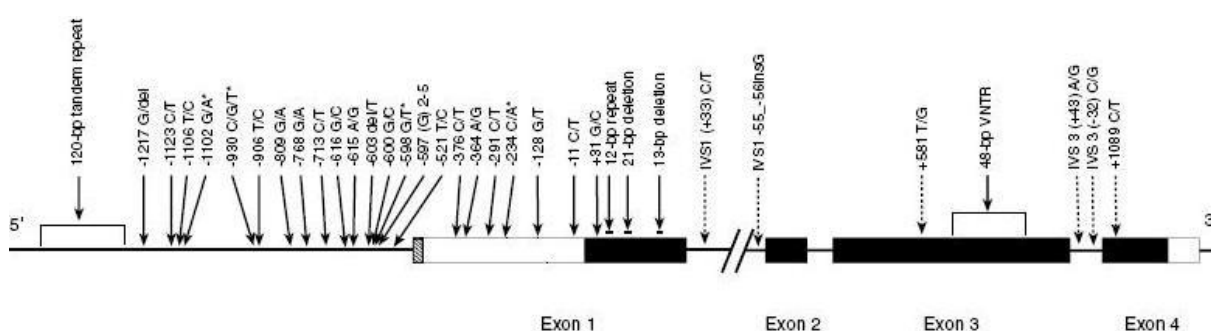


Figura I: Representação esquemática de polimorfismos do gene *DRD4*. Em preto: regiões codificadoras; em branco: não codificadoras; em cinza, múltiplos sítios de iniciação. Adaptado de Mitsuyasu e cols. (2007).

O grande interesse pelo gene *DRD4* no TDAH surgiu a partir da observação de sua associação com a dimensão de personalidade “busca de novidades”, provavelmente relacionada com a doença (Benjamin e cols., 1996; Ebstein e cols., 1996; Strobel e cols.,

2003). Além disso, o produto desse gene concentra-se em áreas do cérebro cujas funções estão implicadas em sintomas do TDAH, tais como o córtex frontal (Matsuomoto e cols., 1995; Barkley, 1997; Oak e cols., 2000).

O principal polimorfismo investigado no gene *DRD4* é um número variável de repetições em tandem (VNTR) de 48 pb, localizado no exon 3 (Van Tol e cols., 1992), região que supostamente codifica a terceira alça intracelular do receptor. Acredita-se que seja através dessa alça que ocorra a ativação da resposta celular quando a dopamina se liga ao receptor extracelularmente (Jovanovic e cols., 1999). Onze alelos, compostos por duas a onze repetições da unidade de 48 pb, já foram descritos (Wang e cols., 2004). Um novo alelo foi recentemente identificado em uma população japonesa, apresentando tamanho intermediário entre quatro e cinco repetições, tendo sido denominado 4.5R (Hattori e cols., 2009). Embora os alelos de 4 (4R) e 7 (7R) repetições sejam os mais comuns, as frequências alélicas são altamente variáveis entre as diferentes populações analisadas (Chang e cols., 1996; Roman e cols., 1999).

Asghari e cols. (1995) estudaram *in vitro* a possível funcionalidade dos principais alelos codificados pelo VNTR (2R, 4R e 7R), em diferentes linhagens celulares. A dopamina, ao se ligar ao receptor que continha o alelo 7R, apresentava capacidade de inibir a formação de cAMP reduzida à metade, quando comparada aos receptores que continham os alelos 2R e 4R. No entanto, Jovanovic e cols. (1999) não observaram diferenças marcantes entre esses alelos, enquanto que o trabalho de Wang e cols. (2004) sugeriu que ambos alelos 2R e 7R têm eficiência reduzida em relação ao 4R. Assim, é provável que o VNTR tenha influência na função do receptor, embora essa ainda não esteja totalmente esclarecida.

LaHoste e cols. (1996) foram os primeiros a detectar associação deste gene com o TDAH, através de um estudo caso-controle, sugerindo o alelo 7R como alelo de risco. Após este relato, diversos estudos foram realizados, utilizando diferentes estratégias e, embora várias investigações realizadas desde então tenham replicado a associação com o gene *DRD4*, os resultados são bastante confusos (Waldman e Gizer, 2006; Gornick e cols., 2007; Mick e Faraone, 2008; Wallis e cols., 2008). A detecção de associação e o tamanho do efeito parecem variar de acordo com o método ou estratégia de análise utilizados. Enquanto alguns estudos revelam associação do alelo 7R com TDAH através de abordagens baseadas em famílias (Barr e cols., 2000; Biederman e Faraone, 2005; Bhaduri e cols., 2006), outros obtêm resultados negativos com esse tipo de método, mas positivos ao se comparar casos e controles (Holmes e cols., 2000; Cheuk e cols., 2006). Ainda, alguns achados positivos referem-se a situações bem específicas, como subgrupos ou sintomas específicos da patologia. Por exemplo, Rowe e cols.

(2001) demonstraram uma influência particular do alelo 7R sobre a dimensão de desatenção. Já Kirley e cols. (2004), ao aplicar o Teste de Desequilíbrio de Transmissão (TDT) à sua amostra de TDAH, obtiveram resultados negativos. Entretanto, quando a amostra foi dividida em subgrupos, o TDT foi positivo para as famílias de probandos com história familiar de TDAH e para as de pacientes que apresentavam a comorbidade transtorno de oposição desafio, demonstrando associação com o alelo 7R nessas condições.

Esses resultados apontam para a possibilidade de que a associação do VNTR com o TDAH seja muito mais complexa do que um simples efeito na doença como um todo, e que, portanto, mais estudos são necessários. Apesar disso, Biederman e Faraone (2005), através de um estudo de metanálise, confirmaram um pequeno, mas significativo, efeito desse polimorfismo no TDAH. Esses autores observaram uma razão de chances combinada de 1,45 em estudos caso-controle e de 1,16 em estudos baseados em família. Resultado semelhante foi obtido em uma metanálise independente de Gizer e cols. (2009), com uma razão de chances de 1,33; entretanto, observou-se uma heterogeneidade substancial na magnitude desse efeito entre as diversas amostras analisadas. Esses resultados fazem com que o *DRD4* já seja aceito como um gene de suscetibilidade ao TDAH (Thapar e cols., 2007; Mick e Faraone, 2008; Smith e cols., 2009). Todavia, o tamanho exato de sua contribuição para a sintomatologia do TDAH e se esta é restrita a algum sintoma, subtipo ou condição clínica característicos, são fatores ainda não esclarecidos, consistindo em um objetivo necessário em futuros estudos moleculares com o TDAH (Wallis e cols., 2008; Smith e cols., 2009).

O VNTR do gene *DRD4* já foi investigado na nossa população. Em um relato inicial, o alelo 7R mostrou associação por uma abordagem caso-controle, mas não pelo método Risco Relativo de Haplótipos (HRR), embora a amostra controle tenha sido derivada da população geral (Roman e cols., 2001). Neste mesmo estudo, um efeito de interação entre o gene *DRD4* e o gene *DAT1* também foi detectado, através de uma abordagem dimensional. Pacientes que tinham pelo menos um alelo 7R para o *DRD4* e a homozigose para o alelo de 10 repetições (10R) gerado por um VNTR da região 3' no gene *DAT1* apresentaram um aumento significativo nos sintomas de hiperatividade/impulsividade, em relação aos demais pacientes. Uma interação entre o alelo 7R e o genótipo 10R/10R foi novamente verificada em estudo posterior do mesmo grupo, em crianças e adolescentes com TDAH submetidos à Tomografia Computadorizada por Emissão de Fótons Únicos (SPECT), um exame de neuroimagem funcional. Tal condição foi associada a um maior fluxo no giro medial temporal direito, uma área relacionada à memória de trabalho e atenção seletiva, aspectos claramente comprometidos no TDAH (Szobot e cols., 2005). Um efeito interessante do VNTR do gene

DRD4 foi ainda observado por Kieling e cols (2006): pacientes com TDAH submetidos a um teste neuropsicológico que avalia flexibilidade cognitiva (Teste de Desempenho Contínuo, CPT) tiveram um melhor desempenho, cometendo um número menor de erros, quando a homozigose para o alelo 4R estava presente, enquanto que a presença de pelo menos um alelo 7R contribuiu para uma frequência maior de erros. Esses achados sugerem a possibilidade de que o VNTR de 48 pb do gene *DRD4* tenha alguma influência sobre o TDAH na nossa população, embora de uma maneira complexa e ainda pouco compreendida.

De acordo com Lowe e cols. (2004), os resultados conflitantes podem indicar que outros polimorfismos além do VNTR de 48 pb em si, em desequilíbrio de ligação com este ou não, podem ser responsáveis pelos efeitos do gene *DRD4* no TDAH. Esta hipótese foi verificada parcialmente em alguns estudos, mostrando ser provável que outras regiões desse loco também estejam implicadas na doença. Barr e cols. (2000) analisaram uma repetição (G)_n no intron 1 e um polimorfismo de inserção/deleção de 12 pb no exon 1, juntamente com o VNTR do exon 3. Embora apenas para este último polimorfismo tenha sido detectado um efeito isolado, foi verificada transmissão preferencial de dois dos possíveis haplótipos, um deles contendo o alelo 7R. Posteriormente, os mesmos autores investigaram três outros polimorfismos localizados na região promotora do gene: uma duplicação de 120 pb e dois polimorfismos de nucleotídeo único (SNP): -616C>G (rs747302) e -521C>T (rs1800955). Nenhuma associação foi verificada com nenhuma dessas variantes, tanto separadamente como em haplótipos. Entretanto, ao serem analisados os haplótipos juntamente com o VNTR do exon 3, os resultados tornaram-se significativos, detectando-se a transmissão preferencial de um deles, que incluía o alelo 7R, aos probandos com TDAH (Barr e cols., 2001).

O resultado de Barr e cols. (2001) em relação à duplicação de 120 pb não replicou o achado obtido por McCracken e cols. (2000), no primeiro estudo que investigou a possibilidade de associação desse polimorfismo com o TDAH. Estes autores observaram um excesso de transmissão do alelo de 240 pb aos probandos, sugerindo-o como alelo de risco, resultado que também foi verificado por Kustanovich e cols. (2004). Todd e cols. (2001), entretanto, não evidenciaram associação em uma amostra de gêmeos obtida da população geral, tanto para o TDAH como um todo como para os subtipos clínicos definidos pelo DSM-IV. Já Kereszturi e cols. (2007) detectaram o alelo de 120 pb em uma frequência significativamente maior nos pacientes, quando comparados a um grupo controle. Esses resultados sugerem uma associação do polimorfismo de repetição de 120 pb com TDAH; entretanto, as divergências observadas nos diferentes estudos indicam a necessidade de mais investigações.

O polimorfismo -616C>G presente na região promotora do gene, já mencionado, também vem sendo alvo de mais pesquisas. No seu trabalho, Barr e cols. (2001), observaram uma tendência à associação do alelo C com o TDAH, achado não replicado por Mill e cols. (2003), também através de uma abordagem baseada em famílias. Entretanto, foi sugerido que estes resultados podem não ser reais, uma vez que a técnica de identificação dos alelos empregada não foi a mais adequada: a presença da troca A>G na posição -615 (rs936462) parece ter sido fonte de erros de genotipagem (Ronai e cols., 2004). Lowe e cols. (2004), em um estudo baseado em famílias, encontraram uma forte associação entre o alelo C do SNP -616C>G e o TDAH, utilizando uma técnica de genotipagem insensível ao SNP -615A>G. Os estudos escassos e inconclusivos sugerem a realização de pesquisas adicionais para determinar se o polimorfismo da posição -616 influencia ou não o desenvolvimento do TDAH.

Mais estudado, porém também não muito bem compreendido, é o outro SNP da região promotora citado, o -521C>T. Assim como Barr e cols. (2001), Payton e cols. (2001) não evidenciaram nenhum efeito significativo desse polimorfismo, enquanto Mill e cols., no seu trabalho de 2003, detectaram uma associação somente quando analisado em haplótipos com outros marcadores da região promotora do gene. Já Lowe e cols. (2004) observaram um aumento de transmissão do alelo T, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa quando analisada isoladamente e em haplótipo com o VNTR de 48 pb do exon 3. Bellgrove e cols. (2005) analisaram o VNTR e o SNP -521C>T, correlacionando os genótipos com o desempenho dos pacientes em um teste de atenção sustentada (Teste de Atenção Sustentada à Resposta, SART). Para o VNTR, os pacientes foram divididos em dois grupos, tendo o alelo 7R como critério de divisão. Os pacientes que não possuíam o alelo 7R cometeram um número significativamente maior de erros no teste quando comparados ao grupo que possuía o alelo 7R e o grupo controle. Entre os pacientes com o alelo 7R e o grupo controle não houve diferença significativa. Para o SNP -521C>T, os pacientes foram divididos conforme possuísem duas cópias do alelo T ou uma/nenhuma cópia. Os indivíduos homocigotos para o alelo T obtiveram resultados significativamente piores que os controles. Yang e cols. (2008), em um estudo caso-controle, verificaram uma associação significativa entre esse polimorfismo e o TDAH, sendo que os pacientes que possuíam o genótipo TT apresentavam escores maiores de desatenção, medidos através de uma escala que permite relatar em escores os 18 sintomas da doença.

Os polimorfismos presentes na região promotora do *DRD4* têm recebido mais atenção recentemente devido à possível influência na regulação da transcrição do gene. Em relação à

duplicação de 120 pb, estudos *in vitro* demonstraram que o alelo longo, de 240 pb, apresenta atividade transcricional reduzida quando comparado ao alelo curto, de 120 pb (D'Souza e cols., 2004). Kereszturi e cols. (2007), também *in vitro*, estudaram um novo alelo, de 480 pb, relatando uma atividade reduzida em comparação ao de 240 pb. Estudos *in vitro* com o SNP -521C>T realizados por Okuyama e cols. (1999) indicaram que o alelo T, quando comparado ao C, é responsável por uma atividade transcricional 40% menor. Contudo, Kereszturi e cols. (2006) não confirmaram essa diferença entre os alelos. Já o SNP -616C>G está localizado numa região de ligação a fatores de transcrição, sinalizando uma possível influência na atividade transcricional do gene. Entretanto, sua funcionalidade não foi verificada por estudos *in vitro* até o presente momento.

Embora os estudos sejam ainda pouco numerosos e reste muito a esclarecer sobre sua funcionalidade real, é possível que os polimorfismos da região promotora do gene *DRD4*, tais como os mencionados, tenham um efeito importante na patofisiologia do TDAH, tornando fundamental o seu estudo na doença. Além disso, ainda existem inconsistências sobre a provável influência do VNTR, particularmente do alelo 7R, tanto isoladamente como em haplótipos, sendo necessárias mais investigações para se definir precisamente sua contribuição para os sintomas observados nos pacientes. A análise de outros polimorfismos localizados em diferentes regiões do loco *DRD4* em estudos de associação, com análises posteriores de desequilíbrio de ligação e análises de haplótipos, pode auxiliar a identificar as verdadeiras variantes causais e seu impacto exato na funcionalidade da doença, ajudando a elucidar de maneira mais completa a participação do gene *DRD4* na etiologia e nas manifestações clínicas do TDAH.

Capítulo II

Justificativa e Objetivos

Embora o desenvolvimento do transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) tenha a influência bem demonstrada de componentes genéticos, os estudos com genes candidatos realizados até o momento não são suficientes para determinar todos os genes que conferem suscetibilidade ao TDAH. Mesmo em relação ao gene *DRD4* resta explicar quais as verdadeiras variantes que influenciam no aparecimento dos sintomas, qual o tamanho exato da contribuição de cada uma delas, se seu efeito é específico para alguns aspectos da sintomatologia deste transtorno e, se sim, quais seriam esses aspectos. O esclarecimento dessas questões é fundamental para uma melhor compreensão da etiologia da doença e poderá contribuir para uma melhor caracterização de diferentes tipos da doença, possibilitando um entendimento mais adequado de cada quadro clínico. Este conhecimento, embora possivelmente sem uma aplicação direta e imediata na prática clínica, poderá ajudar na detecção mais precoce da doença, sobretudo dos casos mais graves, e na determinação de condições mais específicas, e, portanto, mais eficazes de tratamento.

O presente trabalho teve como objetivo geral investigar detalhadamente a participação do gene codificador do receptor D4 de dopamina (*DRD4*) na etiologia do TDAH na população de Porto Alegre (RS), buscando relacionar essa possível influência com diferentes aspectos da sintomatologia da doença. Os objetivos específicos foram:

- Genotipar uma amostra já coletada de pacientes com TDAH para os polimorfismos de duplicação de 120 pb e os SNPs -616C>G (rs747302) e -521C>T (rs1800955) presentes na região promotora do gene *DRD4*;
- Completar a genotipagem dessa mesma amostra para o polimorfismo de VNTR de 48 pb do exon 3 do gene *DRD4*;
- Verificar a possibilidade de associação entre cada uma das variantes estudadas e o TDAH, tanto na amostra total como com os subtipos clínicos combinado e predominantemente desatento, e com o subgrupo de pacientes que apresentam transtorno de oposição desafio e/ou transtorno de conduta, através de diferentes abordagens de análise;
- Investigar a possibilidade de desequilíbrio de ligação entre as variantes estudadas;
- Examinar a possibilidade de associação entre os haplótipos obtidos e o TDAH, tanto na amostra total como com os subtipos clínicos combinado e predominantemente desatento, e com o subgrupo de pacientes que apresentam transtorno de oposição desafio e/ou transtorno de conduta, através da abordagem baseada em famílias.

Capítulo III

Manuscrito em preparação

(a ser submetido para o periódico American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics)

**DOPAMINE D4 RECEPTOR GENE: POSSIBLE PROTECTIVE AND RISK ALLELES
FOR ADHD IN BRAZILIAN POPULATION**

Akutagava-Martins, GC¹; Ferraz, G¹; Genro, JP¹; Guimarães, APM¹; Polanczyk, G²; Zeni, C²; Schmitz, M²; Chazan, R²; Rohde, LAP²; Hutz, MH¹ and Roman, T¹.

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

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

Running title: *DRD4* association with ADHD

Keywords: *DRD4*, dopamine, susceptibility, complex disease, association study.

Correspondence to:

Prof^a. Dr^a Tatiana Roman

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

Phone: 55-51-3308-6720

Fax: 55-51-3308-7311

E-mail: tatiana.roman@ufrgs.br

Abstract

Dopamine D4 receptor gene (*DRD4*) is one of the most investigated loci in attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD), being accepted as a susceptibility gene. In the present study we sought for a possible association between ADHD and *DRD4* gene in a Brazilian sample composed by 478 ADHD patients, diagnosed according to DSM-IV criteria, and their biological parents. The 120 bp tandem duplication, SNPs -616C>G (rs747302) and -521C>T (rs1800955), all located at promoter region, and the 48 bp exon 3 VNTR were investigated individually and in haplotypes by both family based (Transmit, FBAT) and dimensional (PBAT, ANOVA) approaches. Linkage disequilibrium (LD) was estimated (MLocus). There was no evidence of association between any of promoter variants and ADHD by either approach. A deficit of transmission of VNTR 2R allele was detected in patients of combined subtype. An excess of transmission of 4R allele was observed in this same subset and in the subset of patients with oppositional defiant disorder and/or conduct disorder. VNTR dimensional analyses and family based analyses for haplotypes did not show any association. LD analyses confirmed a very complex genetic structure. Although unusual, our positive findings are plausible, especially due to the marked structural complexity of *DRD4*, its high variability among populations and the lack of agreement regarding functional significance of the VNTR. *DRD4* complexity allied to ADHD heterogeneity probably contributes for divergent results. Comprehension of structure and function of this locus and the use of different approaches are needed to elucidate the true involvement of *DRD4* in this disease.

Introduction

Attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) is one of the most common psychiatric disorders of childhood and adolescence, affecting around 5% of school age children in different countries and cultures (Polanczyk et al., 2007a). It is a very heterogeneous condition, with symptoms divided into areas of inattention and hyperactivity/impulsivity, according to the fourth edition of Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV) (American Psychiatric Association, 1994). The DSM-IV recognizes three clinical subtypes of ADHD that can be identified in the presence of at least six symptoms in one or both areas: predominantly inattentive, predominantly hyperactive/impulsive and combined. Although remission of symptoms can occur, 50 to 75% of children diagnosed with ADHD continue to fulfill DSM-IV criteria throughout adolescence and adulthood (Biederman, 2007; Lara et al., 2009).

Etiologically, ADHD is considered a complex disease, where symptoms manifestation depends on environmental and genetic factors. Twin studies estimate a high heritability, around 76% (Biederman and Faraone, 2005). It is likely that ADHD transmission occurs through several small effect genes that confer susceptibility to this disorder, also with a possible influence of modifying genes (Asherson and Image, 2004; Waldman and Gizer, 2006).

Although not totally understood, ADHD neurological commitment is evident. Data of neuroimaging studies suggests ADHD as a frontal-striatum-cerebellum disease (Curatolo et al., 2009; Makris et al., 2009), since these regions present lower volume and activity in patients with this disorder. Such observations are corroborated by neuropsychological data, which show that ADHD children have a poorer performance in cognitive and executive functions and behavioral inhibition failures, processes clearly related to frontal lobe and sub-cortical areas (Arnsten and Li, 2005; Nigg, 2005; Makris et al., 2009). Dysfunction of catecholaminergic systems seems to be involved, especially in those pathways that project to the pre-frontal lobe (Curatolo et al., 2009).

Considering neurobiological evidences, genes encoding components from dopaminergic system are the main candidate loci in molecular studies of ADHD (Biederman and Faraone, 2005; Waldman and Gizer, 2006; Thapar et al., 2007). Among these, the dopamine D4 receptor gene (*DRD4*) is the most extensively investigated locus (Gizer et al., 2009; Banaschewski et al., 2010). It encodes a seven-transmembrane domain

protein, with high affinity for dopamine. This receptor is located at post-synaptic neurons of dopaminergic system being especially concentrated in frontal cortex and limbic system, areas whose functions are implicated in ADHD symptoms (Van Tol et al., 1991; Oak et al., 2000).

The main polymorphism of *DRD4* gene is a variable number of tandem repeats (VNTR) of 48bp, located at exon 3 (Van Tol et al., 1992), region that encodes receptor's third intracellular loop. It is through this loop, supposedly, that the activation of cellular response occurs when dopamine binds to the receptor (Jovanovic et al., 1999). Eleven alleles have already been described, ten composed of two to eleven repeats of the 48bp sequence and one allele of intermediate size between four and five repeats (Wang et al., 2004; Hattori et al., 2009). Although alleles with four (4R) and seven (7R) repeats are the most common, allele frequencies are highly variable among different populations (Chang et al., 1996; Roman et al., 1999).

The first evidence of association between *DRD4* gene and ADHD comes from LaHoste et al. (1996), in a case-control study, suggesting 7R as the risk allele. Since then, numerous studies using different designs have been conducted with contradictory findings. For example, Kirley et al. (2004) reported negative results in their sample of ADHD as a whole, but when particular subgroups of patients were considered, like probands with an ADHD family history or oppositional defiant disorder, results became significant. Despite these inconsistencies, a metanalytic review confirmed a small but significant effect of this polymorphism on ADHD. This study presented an odds ratio of 1.45 for case-control studies and 1.16 for family-based approaches (Biederman and Faraone, 2005). Gizer et al. (2009), in an independent metanalysis, corroborated these results, demonstrating an odds ratio of 1.33 for the same polymorphism. Based on these data, *DRD4* has been considered an ADHD susceptibility gene (Mick and Faraone, 2008; Smith et al., 2009).

Another important finding described by Gizer et al. (2009) is the substantial heterogeneity on effects magnitude of this polymorphism on ADHD among different studies. This marked heterogeneity leads to the hypothesis that other polymorphisms at *DRD4* locus, in linkage disequilibrium or not with the 48bp VNTR, might be responsible for the effects of this gene on ADHD. Polymorphisms located at the promoter region of *DRD4* have been particularly investigated since they might modify transcription regulation of the gene. Among these, the most studied is a 120bp tandem duplication, with the 240bp

allele being considered as the risk allele for ADHD in the majority of the reports (McCracken et al., 2000; Kustanovich et al., 2004; Kereszturi et al., 2007). Two single nucleotide polymorphisms (SNPs) -616C>G (rs747302) and -521C>T (rs1800955) have been analyzed in a smaller number of investigations. Both are located in a region where, theoretically, transcription factors binding occurs, what suggests a possible functional impact of these polymorphisms on gene transcriptional activity. Even though these SNPs have been studied on other psychiatric disorders, only recently studies concerning ADHD have been conducted. Although contradictory results were observed for -616C>G (Barr et al., 2001; Lowe et al., 2004), positive results were detected in most studies with -521C>T (Bellgrove et al., 2005; Yang et al., 2008). The putative effect of this variant was confirmed in the metanalytic review from Gizer et al. (2009), being the T allele the one that confers ADHD susceptibility, with an odds ratio of 1.21.

Despite the large number of studies and the positive results obtained from metanalytic reviews for the VNTR, the exact extent of *DRD4* contribution to the etiology of ADHD and if it is restrict to some symptom or group of symptoms, subtype or specific clinical condition are not clear issues. The aim of the present study was, therefore, contribute to a better understanding of the role of *DRD4* gene on ADHD etiology and specific clinical aspects, through the genotyping of three polymorphisms of promoter region (120bp tandem duplication and SNPs -616C>G and -521C>T) and the 48bp VNTR located at exon 3.

Material and Methods

Sample

The sample consisted of 478 ADHD children and/or adolescents and their biological parents. Part of the sample were obtained through the Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder Program (ProDAH) of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), while the remaining were obtained from public schools of Porto Alegre (capital of Rio Grande do Sul state, Brazil).

The patients obtained through ProDAH were diagnosed according to DSM-IV criteria, following a three stage protocol, described in detail in Roman et al. (2001), Rohde (2002) and Polanczyk et al. (2007b). Basically, the diagnostic procedure comprehended: a) evaluation with a semi-structured interview (Schedule for Affective Disorders and

Schizophrenia for School-Age Children, Epidemiological Version – K-SADS-E) (Orvaschel, 1985), modified to evaluate DSM-IV criteria and filled in with the parents by trained research assistants; b) discussion of the derived diagnosis in a clinical committee, coordinated by a childhood and adolescence psychiatrist with large clinical experience; c) clinical evaluation of ADHD and comorbidities according to DSM-IV by a childhood and adolescence psychiatrist who had previously received K-SADS-E results and conducted the interviews with parents (generally mother) and the patient. In case of a diagnostic discrepancy in the three stage procedure, preference was given to the diagnosis derived of clinical interviews. A cognitive evaluation based on cube and vocabulary subtests of Weschler Intelligence Scale – Third edition (WISC-III; WESCHLER, 1991) were performed by a trained psychologist for estimating IQ. Also, parents filled in the Child Behavior Checklist (CBCL), Parent Report Form (Achenbach, 1991), a list of symptoms that reports behavioral problems of the child and has a highly discriminatory power to clinical diagnosis of ADHD. Data concerning Swanson, Nolan and Pelham Scale - version IV (SNAP-IV), a scale that measures symptom scores in areas of inattention, hyperactivity, impulsivity and opposition (Swanson et al., 2001), were also obtained in part of the sample. To the patients who were attending school, teachers completed the Attention Problem scale (CBCL – Teacher Report Form, TRF) (Achenbach, 1991), which include items related to ADHD in classroom. Social-demographic information was systematically collected from parents.

The hospital sample analyzed herein consisted of 16 patients (DNA from parents not available, therefore, included only in dimensional analyses), 93 duos (mother and child) and 269 trios (mother, father and child). Patients are predominantly male (79.1%) from European descent (86.3%), with a mean age of 10.1(\pm 3.0) years and mean IQ of 92.5 (\pm 13.8). Combined subtype of the disorder was the most prevalent (66.8%), followed by predominantly inattentive subtype (26.1%) and predominantly hyperactive/impulsive subtype (7.1%). Oppositional defiant disorder was the most common comorbidity (47.5%), but anxiety disorders (27.8%), conduct disorder (14.4%) and mood disorders (13.3%) were also common.

To the gathering of the sample obtained from public schools (27 duos and 73 trios), teachers were initially trained by a childhood and adolescence psychiatrist to detect symptoms of inattention in students. Individuals identified as possible ADHD cases were

invited to the diagnostic stage of the study, performed at ProDAH, which then followed the three stage procedure described above. More details about diagnosis and demographic data can be seen in Schmitz et al. (2006). Due to different origin and characteristics (age, ethnicity and SNAP scores) when compared to the sample described previously, these patients were included only in family-based analyses concerning the predominantly inattentive subtype, being excluded of other analyses.

This study was approved by the National Commission of Ethics in Research (CONEP) and by the Ethics Committee of HCPA. Parents gave a written informed agreement and the patients agreed verbally to participate of the study.

Genotyping

A 5 mL blood sample was collected from each patient and, whenever possible, from biological parents. DNA was extracted from whole blood by a salting out method according to Lahiri and Nurnberger (1991). The four studied polymorphisms were genotyped by polymerase chain reaction (PCR). The genotypes of 120bp tandem duplication and 48bp VNTR were identified directly through electrophoresis on agarose gels, following protocols described in detail in Seaman et al. (1999) and Roman et al (1999), respectively. To genotype SNPs -616C>G and -521C>T, PCR was followed by digestion of the amplified products with restriction endonuclease (PCR-RFLP). The change of cytosine (C) to guanine on position -616 creates a restriction site for *Cfr13I* endonuclease, which enables the identification of the alleles, based on the technique of Barr et al. (2001), modified according to Ronai et al. (2004). In the same way, the substitution of a cytosine (C) by a thymine (T) on position -521 generates a restriction site for *FspI* endonuclease (Barr et al., 2001). Alleles of both SNPs were identified through electrophoresis on agarose gel stained with ethidium bromide and visualized under ultraviolet light. The present sample had been partially genotyped for the 48bp VNTR previously (Roman et al., 2001).

Statistical analyses

Allele and genotype frequencies were obtained by counting. Hardy-Weinberg Equilibrium was tested with Genepop 4.0 software (Rousset, 2008). Association hypothesis between *DRD4* markers and ADHD was verified by family based approaches,

using Transmit 2.5.4 (Clayton, 1999) and FBAT 2.0.2 (Laird et al., 2000) softwares. Through these methodologies it is possible to determine if there is a preferential transmission of a particular allele or haplotype from the parents to the ADHD proband, thus detecting linkage/association. Family based analysis using SNAP-IV scores as a quantitative phenotype were performed using FBAT-GEE statistics of P BAT 3.61 software (Lange et al., 2004). Dimensional analyses were also performed by ANOVA one way, comparing SNAP-IV scores in patients with different genotypes, using SPSS 16.0 software. Linkage disequilibrium analysis between the four polymorphisms was performed with M Locus software (Long, 1999). A significance level of 5% was accepted in all analyses.

Results

Allele frequencies were calculated for each locus considering only unrelated patients from European descent (n=371). For the 120bp tandem duplication polymorphism, the duplicated allele (240bp) was the most common, with an observed frequency of 0.764. The C allele from -616C>G SNP was slightly more frequent (0.508) than G allele, while T allele was the most common at -521C>T locus (0.534). For the 48bp VNTR, frequencies were 0.083 for 2R, 0.677 for 4R, 0.188 for 7R and 0.052 for the remaining observed alleles (3R, 5R, 6R, 8R and 9R). Both allele and genotype frequencies in all loci are in agreement with literature for this ethnic group (Roman et al., 1999; Seaman et al., 1999; Barr et al., 2001; Lowe et al., 2004; Ronai et al., 2004). Genotype frequencies did not significantly deviate from expected according to Hardy-Weinberg Equilibrium (data not shown).

Association analyses through Transmit and FBAT were performed for each locus, for the following groups: clinical sample (all diagnostic subtypes), patients of combined subtype, patients of inattentive subtype and probands presenting oppositional defiant disorder (ODD) and/or conduct disorder (CD) comorbidities. There was no significant statistical difference between observed and expected transmissions for any of the promoter region polymorphisms analyzed and ADHD, with *P* values ranging from 0.139 to 1 (data not shown, but available upon request). To perform 48bp VNTR family-based analyses, only most frequent alleles were considered (2R, 4R and 7R). Results are presented in Tables I and II. There was no evidence of association between any of the analyzed alleles and clinical sample or patients of inattentive subtype. Analysis of combined subtype

patients showed a significant deficit of 2R transmission through Transmit and FBAT softwares, with P values of 0.031 and 0.032, respectively. In this group of probands, an excess of 4R transmission was also detected with Transmit ($P=0.017$), although the P value was only nearly significant (0.076) when applying FBAT. ADHD + ODD and/or CD group Transmit analysis showed a significant excess of 4R transmission ($P=0.036$), however, this finding was not supported by FBAT ($P=0.134$).

Linkage disequilibrium (LD) analysis revealed a very complex genetic structure for *DRD4* gene (Table III). Between 120bp tandem duplication and SNPs -616C>G and -521C>T there was no LD ($P=0.634/ D'=0.028$ e $P=0.189/ D'=0.082$, respectively). The comparison of 120bp tandem duplication and 48bp VNTR showed an evidence of LD between non-duplicated allele and 2R ($P\leq 0.001/ D'=0.425$) and between duplicated allele and 7R ($P\leq 0.001/ D'=0.521$), but not between any 120bp tandem duplication allele and 4R allele ($P=0.859/ D'=0.014$). Considering -616C>G and -521C>T SNPs a significant, but weak, LD between alleles G and C, respectively, was detected ($P=0.001/ D'=0.114$). Regarding -616C>G SNP and VNTR it was detected a mild LD between C allele and 2R ($P=0.001/ D'=0.388$), a very weak LD between G allele and 4R ($P=0.022/ D'=0.105$), and no LD between this SNP and 7R allele ($P=0.152/ D'=0.090$). For -521C>T SNP and VNTR there was no evidence of LD in any pairwise comparison ($P=0.419/ D'=0.081$; $P=0.369/ D'=0.037$ e $P=0.092/ D'=0.117$ for comparisons with 2R, 4R and 7R alleles, respectively).

Estimation of possible haplotypes was obtained from FBAT. A total of 31 combinations were observed, being the haplotype composed by duplicated allele from 120bp tandem duplication, C allele from -616C>G, T allele from -521C>T and 4R VNTR allele the most common (14.4%). Haplotype analyses considered only those combinations with a frequency higher than 5%, which resulted in eight valid haplotypes. Analyses were performed for the same groups of patients described above and only through FBAT software. There was no evidence of association between any of the analyzed groups and possible haplotypes, with P values ranging from 0.234 to 0.981 (data not shown, but available upon request).

Dimensional analyses were performed by comparing inattention, hyperactivity, opposition and total SNAP-IV scores between patients of different genotype groups. For the 120bp tandem duplication, -616C>G and -521C>T SNPs there were three groups of

genotypes: the two possible homozygous and the heterozygous. For the VNTR, only more frequent (2R/4R; 4R/4R; 4R/7R) and the putative risk (7R/7R) genotypes were included. The covariates age, presence of ODD and/or CD comorbidities and ADHD subtype were controlled in all analyses. SNAP-IV scores of inattention and opposition were statistically transformed to reach normal distribution. There was no evidence of association between SNAP-IV scores and genotypes, with *P* values ranging from 0.173 for -616C>G to 0.859 for VNTR, both concerning oppositional dimension. Analyses performed through PBAT using SNAP-IV scores as quantitative phenotypes did not show any association, with *P* values ranging from 0.073 to 0.992 (data not shown, but available upon request).

Discussion

LaHoste et al (1996) were the first researchers to detect an association between *DRD4* gene and ADHD in a case-control study, suggesting the 7R allele created from exon 3 48bp VNTR as a risk allele. Following this report, many studies have been conducted using different approaches. Several investigations replicated this association, as can be seen in meta-analytic reviews by Biederman and Faraone (2005) and Gizer et al (2009), but, when observed in detail, these results are quite confusing. Association detection and effect sizes seem to vary according to analysis approach used in each study (Waldman and Gizer, 2006). Moreover, some positive findings arise from very specific situations. For example, Rowe et al (1998) demonstrated greater effects of 7R allele on inattentive dimension. The particular influence of *DRD4* gene on inattention symptoms was later observed by the same group, in a sample of ADHD parents (Rowe et al, 2001). As already mentioned, Kirley et al (2004) obtained negative results when applying the Transmission Disequilibrium Test (TDT) to their whole ADHD sample. Nonetheless, when the sample was split into groups of positive ADHD family history and patients with oppositional defiant disorder, results became significant, showing an association between 7R allele and ADHD under these specific conditions. Cheuk et al (2006) found different results according to statistical methodology. These authors did not detect an association between 7R allele and ADHD using TDT approach, but, when comparing cases and controls, a nearly significant association with 48bp VNTR long alleles was observed.

The present report is the first study to detect an association of ADHD with 2R allele, both by Transmit and FBAT: this allele was preferentially non-transmitted from

parents to offspring. Although unusual, this finding is plausible due to several reasons. It is believed that each VNTR allele has a different effect on receptor function, which seems to depend not only on repetition number but also on variation within each repeat and around VNTR. This genetic structure seems to be highly variable among samples already investigated, so it is possible that in different populations different alleles would confer risk to ADHD (Wang et al., 2004; Waldman et al., 2006). Impact of allele length on receptor functioning is not clear, with just a few studies reporting very contradictory results conducted so far. Asghari et al (1995) observed a blunted response to dopamine in receptors carrying the 7R allele when compared to 2R and 4R receptors. Jovanovic et al (1999), however, did not report any significant difference between these alleles, while Wang et al (2004) suggested that both 2R and 7R have a reduced efficiency compared to 4R. Since there is no consensus about the effect of VNTR on receptor function, our data lead us to hypothesize that 2R allele might be the one with better activity, followed by 4R and 7R, thus contributing to prevent ADHD symptoms. Nevertheless, this hypothesis should be confirmed in future functional studies.

The 7R allele has been associated with the personality trait of Novelty Seeking, characterized by impulsiveness, exploration and irritability (Ebstein et al, 1996; Strobel et al, 2003), which is thought to be related to ADHD. If this allele is in fact associated with ADHD, as described in several studies (Biederman and Faraone, 2005; Gizer et al, 2009), we may assume that these characteristics are intensified in people carrying 7R. This was somewhat observed in part of our sample previously, although in a joint effect with dopamine transporter gene (*DAT1*) (Roman et al, 2001). To test this hypothesis, we compared allele frequencies in parents derived only from trios and only from duos (30% of our sample). In both groups frequencies did not differ significantly from probands. However, in parents from duos it was possible to verify an increase in 2R frequency, from 8.3% to 11.4%, while 7R frequency decays from 18.8% to 14.1%. Since our duos are composed by patient and mother, this increase of 2R allele could be interpreted as lower impulsivity in mothers, who stay and take care of family, whereas deficit of 7R might be attributed to greater impulsivity of fathers who did not stay in familiar environment. The preferential non-transmission of 2R allele in combined group corroborates this idea: patients of combined subtype are considered the most severe cases, thus where we supposedly will find a higher level of ADHD symptoms, including impulsivity. The

putative difference in allele frequencies between families from duos and from trios could have contributed to the inconsistencies among studies and, consequently, to the difficulty in understanding the *DRD4* role on ADHD pathophysiology (Curtis and Sham, 1995; West et al, 2002).

In our report we also found an association with 4R allele in combined subtype patients and those with ODD and/or CD comorbidities, where an excess of transmission was detected through Transmit, although not confirmed by FBAT. Recently has been suggested that 7R allele would be associated with a better ADHD outcome (Gornick et al, 2007). Investigations considering neuropsychological measures also pointed to this direction. Swanson et al (2000), applying a series of neuropsychological tests, verified a poorer performance of ADHD children compared to controls, but when ADHD children were compared according to presence/absence of 7R allele, those who presented at least one copy of this allele performed significantly better. This result was later confirmed by Bellgrove et al (2005) using the Sustained Attention to Response Test, where it was also verified a better performance of children possessing 7R allele. In a healthy sample, Kramer et al (2009) demonstrated that 7R homozygous had a better performance than 4R homozygous in an inhibitory control test (Go/NoGo Task), suggesting an improved cognitive function in 7R carriers. Considering that patients of combined subtype and patients with comorbid ODD and/or CD are considered the most severe ADHD cases, results from the studies listed above support our finding of association with 4R allele.

The overall conflicting results, especially regarding the role of 4R and 7R alleles in ADHD, can be explained by what Lin et al. (2007) named “Flip-Flop Phenomenon”, referring to reports of opposite effects for the same allele: protection for a disease in a population and risk for the same disease in another population. Flip-flop associations may indicate that heterogeneous effects of the same polymorphism are due to environment or genetic background differences. On this last issue, conflicts would be due to a non-evaluated multilocus effect, which would influence a phenotype initially thought to be product of a single locus, leading to confuse associations. Another source of divergent results could be LD patterns of a locus or genomic region, which could differ among populations, ethnic groups and even within samples from a same population and thus contribute to a Flip-flop phenomenon. The direct influence of these scenarios in reported associations could be the case observed herein.

The results observed in the present work can also be understood in light of the so called “differential susceptibility” hypothesis (Belsky et al, 2007; 2009a). This perspective is an alternative, although not exclusive, to the classical diathesis-stress framework that applies to most gene x environment (G X E) interactions detected so far in psychiatric genetics. According to this last model, some individuals, for genetic reasons (e.g., presence of a risk allele), will be most likely to develop a certain outcome in the presence of some specific adversity (e.g., negative life events), while others without this condition (risk allele) will not present the same outcome or will be substantially less likely to do so, even under the same adverse situations (Pluess et al, 2009). The Belsky’s hypothesis stands that these “vulnerable” individuals are in fact more susceptible and responsive to both positive and negative environmental influences, either for a better as for a worse outcome. In other words, individuals vary in their plasticity to environmental conditions according to their genotype. In this sense, the vulnerability genes would be in reality “plasticity genes” (Belsky et al, 2009b). This hypothesis has been already discussed for *DRD4* G X E literature. For example, the work from Neuman et al (2008) showed that individuals with the 7R allele are more vulnerable to adverse effects of prenatal smoking than children without this allele. However, as highlighted by Pluess et al (2009), in the absence of *in utero* exposition to nicotine, the same genotype also contributes for better outcomes (i.e., least likely to present ADHD) (for a more comprehensive review, see Belsky et al, 2009b). Environmental risk factors were not evaluated in the present study. However, it can be argued that the conditions responsible for turning the 7R into a susceptibility allele to ADHD are not strongly present in our families, preventing us to detect a role for this variant in ADHD susceptibility. In this scenario, slighter, other alleles’ effects could be emphasized, thus detected.

Although there are some reasonable explanations, the hypothesis of spurious results observed for both 2R and 4R alleles cannot be ruled out. First of all, the sample size is not extremely big, what could contribute to alfa and beta errors when not detecting association with 7R allele and detecting associations with 2R and 4R alleles respectively. However, data presented here does not seems to be spurious, particularly 2R result, once it has been observed by two different approaches (Transmit and FBAT). Associations with 4R detected using Transmit in combined subtype and in comorbid ODD and/or CD subgroups were not replicated by FBAT, but this lack of association could be due to robustness of the

last approach. Another important source of spurious results that must be considered is genotyping errors. It has been demonstrated by Mitchell et al (2003) that genotyping errors can bias TDT results towards a detection of overtransmission of common alleles, which is the case of 4R. Repeat polymorphisms, especially STRs and VNTRs, are particularly difficult to genotype, since identification of alleles by eye is not easy and totally objective. Moreover, inaccurate PCRs support selective amplification of alleles. Thus, a heterozygous genotype could be easily interpreted as homozygous, since there is preferential amplification of the shortest allele leading to allelic dropout of the longest (Kaiser et al, 2002). Amplification of a high GC-content fragment, as is the case of *DRD4* VNTR (Van Tol et al., 1992), is even more difficult and requires an optimized PCR and adequate human resources. All these could have been altered our gene frequencies, consequently our findings.

The dimensional analyses performed in this study did not reveal any association or trend, but power of these analyses was fairly low, because SNAP-IV scores, used as phenotypes, were not available for all patients. Family based analysis using SNAP-IV scores as a quantitative phenotype were performed using PBAT. Through this approach it is possible to identify subsets of phenotypes that have optimal power when tested for association. Considering the robustness of the method along with the lack of phenotype data from some patients, which led to a small number of informative families (ranging from 85 to 140 according to polymorphism), it is not surprising that all tests were underpowered (values ranging from 0.050 to 0.445). Therefore, this lack of association could be a false-negative result. However, the dimensional analyses performed using ANOVA confirmed this negative association of *DRD4* with a quantitative ADHD phenotype.

According to Lowe et al (2004), conflicting results might indicate that other polymorphisms than 48bp VNTR, in LD with this or not, could be responsible for the effects of *DRD4* gene on ADHD. Contribution of different variants of the same gene conferring susceptibility to a disease in different populations can be understood as allele heterogeneity. This possibility was already verified in our population for the dopamine transporter gene (*DAT1*) (Genro et al, 2008). On the attempt to clarify *DRD4* gene role on ADHD etiology, three other polymorphisms located at promoter region were studied. First, a 120bp tandem duplication located at a promoter region comprising transcription factors

binding sites. Theoretically, the duplicated allele would be responsible for changes in these sites, altering transcriptional activity of the gene. *In vitro* studies demonstrated a 50% lower activity for 240bp allele when compared to 120bp (D'Souza et al, 2004; Kereszturi et al, 2007). The variants -616C>G and -521C>T SNPs are also located on a region of transcription factors binding, although their functionality is not clear. Okuyama et al (1999), *in vitro*, suggested T allele of -521C>T as responsible for a 40% lower transcriptional activity; but this result was not corroborated by a similar study (Kereszturi et al, 2006). The -616C>G SNP functionality was not evaluated *in vitro* so far. Through bioinformatic tools, Barr et al (2001) sought for potential transcription factors binding sites. According to their searches, the C to G change would result in creation of a binding site for AP-2, a family of transcription factors with activation and repression properties, signaling a possible functional effect of this polymorphism. Even with evidences of functionality, none of these three variants were associated with ADHD in our sample, both as a whole or subsets, and either by family-based or dimensional analyses.

Negative findings concerning these promoter polymorphisms might simply mean that they are not involved in ADHD etiology in our population. However, it is possible that the effect of each one is so small that it is not been detected and that the real effect depends of several variants acting mutually (Waldman and Gizer, 2006). The same applies to 48bp VNTR 7R allele: even though it confers susceptibility in large part of analyzed samples, this association is confuse and has not been detected in the present study. In this sense, haplotype analyses would increase power to detect subtle associations, but there was no difference between transmitted and non-transmitted haploypes from parents to proband in both the whole clinical sample and subsets. The existence of a great number of haplotypes may have reduced the chance of a positive result, though only those haplotypes with a frequency higher than 5% were included in analysis.

The unusual complexity and structure of *DRD4* locus could be responsible for the difficulty of clarifying the role of this gene on ADHD pathophysiology. It is suggested that 48bp VNTR 7R allele has arisen recently as a product of a rare mutational event, later positively selected, leading to an increase of observed frequencies more than expected by chance (Ding et al, 2002). The fact that this allele is present in significantly higher frequencies in ADHD probands is not understood. It is suggested that an adjacent locus in strong linkage disequilibrium with 7R allele is, in fact, associated with ADHD or it is the

target of selection. Wang et al (2004) argue that, even if VNTR is in fact the target of selection, strong LD on this region could lead to a hitchhiking event, when the truly ADHD predisposing allele was carried out along with 7R, being both of them segregated together. In fact, these events seem to be common, given the high SNPs density in human genome. The same authors report a LD in a 50 – 100kb region around 7R allele and the surprising presence of a site where this pattern is broken, on promoter region. This observation is corroborated by our data, which showed different patterns of LD between promoter region polymorphisms and different VNTR alleles. It is also suggested that this site is recombination prone, what might lead even to gene conversion events (Wang et al, 2004; Ardlie et al, 2001). A better knowledge of *DRD4* locus structure through a dense examination of polymorphisms is required before continuing with investigation of possible effects of *DRD4* haplotypes on ADHD.

Despite innumerous studies investigating *DRD4* gene and possible associations with ADHD, no satisfactory explanation was presented until now. Great gene structural complexity allied to heterogeneity of the disease probably contributes for many confuse and contradictory results. Regarding *DRD4* gene, before clearly understand its influence on ADHD etiology, it is necessary a better knowledge of functional aspects of the whole genomic region. In our opinion, this can be achieved through two approaches: a) genotyping a higher number of polymorphisms in order to understand gene's organization, and b) expression studies of main polymorphisms to determine how they affect gene function as a whole. Concerning ADHD, dealing with it as a unique category or disease may not be an adequate strategy, given its heterogeneity. To comprehend *DRD4* genetic structure and function and then study its association with ADHD using phenotypes defined through different approaches and different methods of analysis might be more productive than strategies used until now to elucidate the true contribution of *DRD4* locus to this disease.

Acknowledgments

Financial support for this study was provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS, RS, Brazil). The authors thank Fernanda Irma Remus Hamester and Elisa Vasconcellos Soares for helping with

genotyping. We are also very grateful to professors Sídia Maria Callegari-Jacques and Jeffrey Long for their advices in statistical analyses, and James Swanson for his overall suggestions.

Conflict of interest: none declared.

References

- Achenbach TM. 1991. Manual for the Child Behavior Checklist. Burlington: University of Vermont/Department of Psychiatry.
- American Psychiatric Association. 1994. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4. ed. (DSM-IV). Washington DC: American Psychiatric Association.
- Ardlie K, Liu-Cordero SN, Eberle MA, Daly M, Barrett J, Winchester E, Lander ES, Kruglyak L. 2001. Lower-than-expected linkage disequilibrium between tightly linked markers in humans suggests a role for gene conversion. *Am J Hum Genet.* 69(3):582-9.
- Arnsten AFT, Li BM. 2005. Neurobiology of executive functions: Catecholamine influences on prefrontal cortical functions. *Biol Psychiatry* 57: 1377-1384.
- Asghari V, Sanyal S, Buchwaldt S, Paterson A, Jovanovic V, Van Tol HH. 1995. Modulation of intracellular cyclic AMP levels by different human dopamine D4 receptor variants. *J Neurochem* 65(3):1157-65.
- Asherson P, Image Consortium. 2004. Attention– Deficit/Hyperactivity Disorder in the post-genomic era. *Eur Child Adolesc Psychiatry (Suppl 1):* I50-I70.
- Banaschewski T, Becker K, Scherag S, Franke B, Coghill D. 2010. Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder: an overview. *Eur Child Adolesc Psychiatry.* Epub.
- Barr CL, Feng Y, Wigg KG, Schachar R, Tannock R, Roberts W, Malone M, Kennedy JL. 2001. 5'-untranslated region of the dopamine D4 receptor gene and attention-deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet.* 8;105(1):84-90.
- Bellgrove MA, Hawi Z, Lowe N, Kirley A, Robertson IH, Gill M. 2005. *DRD4* Gene Variants and Sustained Attention in Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD): Effects of Associated Alleles at the VNTR and -521 SNP. *Am J Med Genet* 136B: 81–86.
- Belsky J, Pluess M. 2009a. Beyond diathesis stress: differential susceptibility to environmental influences. *Psychol Bull* 135(6):885-908.
- Belsky J, Jonassaint C, Pluess M, Stanton M, Brummett B, Williams R. 2009b. Vulnerability genes or plasticity genes? *Mol Psychiatry* 14(8):746-54.
- Biederman J, Faraone SV. 2005. Attention-deficit/hyperactivity disorder. *Lancet* 366: 237-248.
- Biederman J. 2007. Advances in the neurobiology of ADHD. *CNS Spectr* 12:4(Suppl 6):6-7.
- Chang FM, Kidd JR, Livak KJ, Pakstis AJ, Kidd KK. 1996. The world-wide distribution of allele frequencies at the human dopamine D4 receptor locus. *Hum Genet* 98: 91-101.
- Cheuk DK, Li SY, Wong V. 2006. Exon 3 polymorphisms of dopamine D4 receptor (*DRD4*) gene and attention deficit hyperactivity disorder in Chinese children. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 141(8):907-11.
- Clayton D. A generalization of the transmission/disequilibrium test for uncertain-haplotype transmission. 1999. *Am J Hum Genet.* 65(4):1170-7.

- Curatolo P, Paloscia C, D'Agati E, Moavero R, Pasini A. 2009. The neurobiology of attention deficit/hyperactivity disorder. *Eur J Paediatr Neurology*. 13(4):299-304.
- Curtis D, Sham PC. 1995. A note on the application of the transmission disequilibrium test when a parent is missing. *Am J Hum Genet* 56(3):811-2.
- D'Souza UM, Russ C, Tahir E, Mill J, McGuffin P, Asherson PJ, Craig IW. 2004. Functional effects of a tandem duplication polymorphism in the 5' flanking region of the *DRD4* gene. *Biol Psychiatry*. 56(9):691-7.
- Ding YC, Chi HC, Grady DL, Morishima A, Kidd JR, Kidd KK, Flodman P, Spence MA, Schuck S, Swanson JM, Zhang YP, Moyzis RK. 2002. Evidence of positive selection acting at the human dopamine receptor D4 gene locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(1):309-14.
- Ebstein RP, Novick O, Umansky R, Priel B, Osher Y, Blaine D, Bennett ER, Nemanov L, Katz M, Belmaker RH. 1996. Dopamine D4 receptor (*D4DR*) exon III polymorphism associated with the human personality trait of Novelty Seeking. *Nat Genet* 12(1):78-80.
- Genro JP, Polanczyk GV, Zeni C, Oliveira AS, Roman T, Rohde LA, Hutz MH. 2008. A common haplotype at the dopamine transporter gene 5' region is associated with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B(8):1568-75.
- Gizer IR, Ficks C, Waldman ID. 2009. Candidate gene studies of ADHD: a meta-analytic review. *Hum Genet* 126(1):51-90.
- Gornick MC, Addington A, Shaw P, Bobb AJ, Sharp W, Greenstein D, Arepalli S, Castellanos FX, Rapoport JL. 2007. Association of the dopamine receptor D4 (*DRD4*) gene 7-repeat allele with children with attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD): an update. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 144B(3):379-82.
- Hattori E, Nakajima M, Yamada K, Iwayama Y, Toyota T, Saitou N, Yoshikawa T. 2009. Variable number of tandem repeat polymorphisms of *DRD4*: re-evaluation of selection hypothesis and analysis of association with schizophrenia. *Eur J Hum Genet*. 17(6):793-801.
- Jovanovic V, Guan HC, Van Tol HH. 1999. Comparative pharmacological and functional analysis of the human dopamine D_{4.2} and D_{4.10} receptor variants. *Pharmacogenetics* 9: 561-568.
- Kaiser R, Tremblay PB, Roots I, Brockmüller J. 2002. Validity of PCR with emphasis on variable number of tandem repeat analysis. *Clin Biochem* 35(1):49-56.
- Kereszturi E, Kiraly O, Barta C, Molnar N, Sasvari-Szekely M, Csapo Z. 2006. No direct effect of the -521 C/T polymorphism in the human dopamine D4 receptor gene promoter on transcriptional activity. *BMC Mol Biol* 7:18.
- Kereszturi E, Kiraly O, Csapo Z, Tarnok Z, Gadoros J, Sasvari-Szekely M, Nemoda Z. 2007. Association between the 120-bp duplication of the dopamine D4 receptor gene and attention deficit hyperactivity disorder: genetic and molecular analyses. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 144(2):231-6.
- Kirley A, Lowe N, Mullins C, McCarron M, Daly G, Waldman I, Fitzgerald M, Gill M, Hawi Z. 2004. Phenotype studies of the *DRD4* gene polymorphisms in ADHD: association

with oppositional defiant disorder and positive family history. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 131(1):38-42.

Krämer UM, Rojo N, Schüle R, Cunillera T, Schöls L, Marco-Pallarés J, Cucurell D, Camara E, Rodriguez-Fornells A, Münte TF. 2009. ADHD candidate gene (*DRD4* exon III) affects inhibitory control in a healthy sample. *BMC Neurosci* 10:150.

Kustanovich V, Ishii J, Crawford L, Yang M, McGough JJ, McCracken JT, Smalley SL, Nelson SF. 2004. Transmission disequilibrium testing of dopamine-related candidate gene polymorphisms in ADHD: confirmation of association of ADHD with *DRD4* and *DRD5*. *Mol Psychiatry* 9(7):711-7.

Lahiri DK, Nurnberger JI. 1991. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 19: 5444.

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

Laird N, Horvath S, Xu X. 2000. Implementing a unified approach to family based tests of association. *Genet Epidemiol* 19: S36–S42.

Lange C, DeMeo D, Silverman EK, Weiss ST, Laird NM. 2004. PBAT: tools for family-based association studies. *Am J Hum Genet.* 74(2):367-9.

Lara C, Fayyad J, DeGraaf R, Kessler RC, Aguilar-Gaxiola S, Angermeyer M, Demyttenaere K, DeGirolamo G, Haro JM, Jin R, Karam EG, Lépine JP, Mora ME, Ormel J, Posada-Villa J, Sampson N. 2009. Childhood predictors of adult attention-deficit/hyperactivity disorder: results from the World Health Organization World Mental Health Survey Initiative. *Biol Psychiatry* 65(1): 46-54.

Lin PI, Vance JM, Pericak-Vance MA, Martin ER. 2007. No gene is an island: the flip-flop phenomenon. *Am J Hum Genet* 80(3):531-8.

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.

Lowe N, Kirley A, Mullins C, Fitzgerald M, Gill M, Hawi, Z. 2004. Multiple marker analysis at the promoter region of the *DRD4* gene and ADHD: evidence of linkage and association with the SNP -616. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 131(1):33-7.

Makris N, Biederman J, Monuteaux MC, Seidman LJ. 2009. Towards conceptualizing a neural systems-based anatomy of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Dev Neurosci* 31(1-2): 36-49.

McCracken JT, Smalley SL, McGough JJ, Crawford L, Del’Homme M, Cantor RM, Liu A, Nelson SF. 2000. Evidence for linkage of a tandem duplication polymorphism upstream of the dopamine D4 receptor gene (*DRD4*) with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Mol Psychiatry* 5(5):531-6.

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

- Mitchell AA, Cutler DJ, Chakravarti A. 2003. Undetected genotyping errors cause apparent overtransmission of common alleles in the transmission/disequilibrium test. *Am J Hum Genet* 72(3):598-610.
- Neuman RJ, Lobos E, Reich W, Henderson CA, Sun LW, Todd RD. 2007. Prenatal smoking exposure and dopaminergic genotypes interact to cause a severe ADHD subtype. *Biol Psychiatry* 61(12):1320-8.
- Nigg JT. 2005. Neuropsychologic theory and findings in attention-deficit/hyperactivity disorder: The state of the field and salient challenges for the coming decade. *Biol Psychiatry* 57: 1424-1435.
- Oak JN, Oldenhof J, Van Tol HH. 2000. The dopamine D(4) receptor: one decade of research. *Eur J Pharmacol.* 29;405(1-3):303-27.
- Okuyama Y, Ishiguro H, Toru M, Arinami T. 1999. A genetic polymorphism in the promoter region *DRD4* associated with expression in schizophrenia. *Biochem Biophys Res Commun* 258(2):292-5.
- Orvaschel H. 1985. Psychiatric interviews suitable for use in research with children and adolescents. *Psychopharmacol Bull* 21(4):737-45.
- Pluess M, Belsky J, Neuman RJ. 2009. Prenatal smoking and attention-deficit/hyperactivity disorder: *DRD4-7R* as a plasticity gene. *Biol Psychiatry* 66(4):e5-6.
- Polanczyk G, de Lima MS, Horta BL, Biederman J, Rohde LA. 2007a. The worldwide prevalence of ADHD: a systematic review and metaregression analysis. *Am J Psychiatry* 164:942-8.
- Polanczyk G, Zeni C, Genro JP, Guimarães AP, Roman T, Hutz MH, Rohde LA. 2007b. Association of the adrenergic alpha2A receptor gene with methylphenidate improvement of inattentive symptoms in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Arch Gen Psychiatry* 64(2):218-24.
- Rohde LA. 2002. ADHD in Brazil: the DSM-IV criteria in a culturally different population. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 41(9):1131-3.
- Roman T, Bau CHD, Almeida S, Hutz MH. 1999. Lack of association of the dopamine D4 receptor gene polymorphism with alcoholism in a Brazilian population. *Addiction Biology* 4: 203-207.
- Roman T, Schmitz M, Polanczyk G, Eizirik M, Rohde LA, Hutz MH. 2001. Attention-deficit/hyperactivity disorder: A study of association with both the dopamine transporter gene and the dopamine D4 receptor gene. *Am J Med Genet Neuropsychiatr Genet* 105: 471-478.
- Ronai Z, Szantai E, Szmola R, Nemoda Z, Szekely A, Gervai J, Guttman A, Sasvari-Szekely M. 2004. A novel A/G SNP in the -615th position of the dopamine D4 receptor promoter region as a source of misgenotyping of the -616 C/G SNP. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 126(1):74-8.
- Rousset F. 2008. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Resources* 8: 103-106.

- Rowe DC, Stever C, Chase D, Sherman S, Abramowitz A, Waldman ID. 2001. Two dopamine genes related to reports of childhood retrospective inattention and conduct disorder symptoms. *Mol Psychiatry*. 6(4): 429-33.
- Rowe DC, Stever C, Giedinghagen LN, Gard JM, Cleveland HH, Terris ST, Mohr JH, Sherman S, Abramowitz A, Waldman ID. 1998. Dopamine *DRD4* receptor polymorphism and attention deficit hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry*. 3(5): 419-26.
- Schmitz M, Denardin D, Laufer Silva T, Pianca T, Hutz MH, Faraone S, Rohde LA. 2006. Smoking during pregnancy and attention-deficit/hyperactivity disorder, predominantly inattentive type: a case-control study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 45(11):1338-45.
- Seaman MI, Fisher JB, Chang F, Kidd KK. 1999. Tandem duplication polymorphism upstream of the dopamine D4 receptor gene (*DRD4*). *Am J Med Genet* 88(6):705-9.
- Smith AK, Mick E, Faraone SV. 2009. Advances in genetic studies of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Curr Psychiatry Rep* 11(2): 143-148.
- Strobel A, Lesch KP, Jatzke S, Paetzold F, Brocke B. 2003. Further evidence for a modulation of Novelty Seeking by *DRD4* exon III, *5-HTTLPR*, and *COMT* val/met variants. *Mol Psychiatry* 8(4):371-2.
- Swanson J, Oosterlaan J, Murias M, Schuck S, Flodman P, Spence MA, Wasdell M, Ding Y, Chi HC, Smith M, Mann M, Carlson C, Kennedy JL, Sergeant JA, Leung P, Zhang YP, Sadeh A, Chen C, Whalen CK, Babb KA, Moyzis R, Posner MI. 2000. Attention deficit/hyperactivity disorder children with a 7-repeat allele of the dopamine receptor D4 gene have extreme behavior but normal performance on critical neuropsychological tests of attention. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(9):4754-9.
- Swanson JM, Kraemer HC, Hinshaw SP, Arnold LE, Conners CK, Abikoff HB, Clevenger W, Davies M, Elliott GR, Greenhill LL, Hechtman L, Hoza B, Jensen PS, March JS, Newcorn JH, Owens EB, Pelham WE, Schiller E, Severe JB, Simpson S, Vitiello B, Wells K, Wigal T, Wu M. 2001. Clinical relevance of the primary findings of the MTA: success rates based on severity of ADHD and ODD symptoms at the end of treatment. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 40: 168–179.
- Thapar A, Langley K, Owen MJ, O'Donovan MC. 2007. Advances in genetic findings on attention deficit hyperactivity disorder. *Psychol Med* 17:1-12.
- Van Tol HH, Bunzow JR, Guan H, Sunahara R, Seeman P, Niznik HB, Civelli O. 1991. Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature* 350, 610–614.
- Van Tol HH, Wu CM, Guan HC, Ohara K, Bunzow JR, Civelli O, Kennedy J, Seeman P, Niznik HB, Jovanovic V. 1992 Multiple dopamine D4 receptor variants in the human population. *Nature* 358: 149-152.
- Waldman ID, Gizer IR. 2006. The genetics of attention deficit hyperactivity disorder. *Clin Psych Rew* 26(4):396-432.

Wang E, Ding YC, Flodman P, Kidd JR, Kidd KK, Grady DL, Ryder OA, Spence MA, Swanson JM, Moyzis RK. 2004. The genetic architecture of selection at the human dopamine receptor D4 (*DRD4*) gene locus. *Am J Hum Genet.* 74(5):931-44.

West A, Langley K, Hamshere ML, Kent L, Craddock N, Owen MJ, O'Donovan M, Thapar A. 2002. Evidence to suggest biased phenotypes in children with Attention Deficit Hyperactivity Disorder from completely ascertained trios. *Mol Psychiatry* 7(9):962-6.

Yang JW, Jang WS, Hong SD, Ji YI, Kim DH, Park J, Kim SW, Joung Y. 2008. A case-control association study of the polymorphism at the promoter region of the *DRD4* gene in Korean boys with attention deficit hyperactivity disorder: Evidence of association with the -521 C/T SNP. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* Jan 1;32(1):243-8.

Table I. Transmit¹ analyses for *DRD4* VNTR polymorphism in the clinical sample (all diagnostic subtypes), patients of combined subtype, patients of inattentive subtype and ADHD probands with oppositional defiant disorder (ODD) and/or conduct disorder (CD).

Sample	Allele	N ²	Observed ³	Expected ⁴	χ^2	P
Clinical sample	2R	346	50	57.622	2.355	0.139
	4R	330	467	453.220	2.848	0.095
	7R	329	116	119.440	0.264	0.640
Combined subtype	2R	220	29	37.820	4.843	0.031
	4R	212	303	286.890	5.655	0.017
	7R	215	74	78.900	0.785	0.347
Inattentive subtype ⁵	2R	182	28	28	1.9 ⁻¹⁵	1.000
	4R	191	256	258.190	0.123	0.754
	7R	191	78	78	1.9 ⁻¹⁵	1.000
ADHD + ODD and/or CD	2R	190	29	33.340	1.248	0.268
	4R	193	279	266.170	4.378	0.036
	7R	187	60	64.970	1.002	0.298

¹ Tested based on a 10,000 bootstrap.

² Number of informative families included in tests.

³ Observed number of transmissions.

⁴ Expected number of transmissions under the null hypothesis of association.

⁵ Inattentive subtype clinical sample and school sample.

Table II. FBAT analyses for *DRD4* VNTR polymorphism in the clinical sample (all diagnostic subtypes), patients of combined subtype, patients of inattentive subtype and ADHD probands with oppositional defiant disorder (ODD) and/or conduct disorder (CD).

Sample	Allele	N ¹	Observed ²	Expected ³	Z	P
Clinical sample	2R	72	38	42.500	-0.988	0.323
	4R	167	207	204.500	0.333	0.738
	7R	130	85	80.500	0.723	0.469
Combined subtype	2R	52	21	29	-2.138	0.032
	4R	114	148	137	1.773	0.076
	7R	85	49	50	-0.202	0.839
Inattentive subtype ⁴	2R	33	22	20	0.632	0.527
	4R	81	102	102	0.000	1.000
	7R	67	45	45.500	-0.110	0.912
ADHD + ODD and/or CD	2R	48	22	26.500	-1.236	0.216
	4R	99	130	121.500	1.497	0.134
	7R	77	46	45.500	0.107	0.914

¹Number of informative families included in test.

²Observed number of transmissions.

³Expected number of transmissions under the null hypothesis of association.

⁴Inattentive subtype clinical sample and school sample.

Table III. Linkage Disequilibrium (LD) analysis performed through MLocus¹.

	120bp	-616C>G	-521C>T	VNTR		
				2R	4R	7R
120bp	-	$P = 0.634$ $D' = 0.028$	$P = 0.189$ $D' = 0.082$	$P \leq 0.001$ $D' = 0.425$	$P = 0.859$ $D' = 0.014$	$P \leq 0.001$ $D' = 0.521$
-616C>G	$P = 0.634$ $D' = 0.028$	-	$P = 0.001$ $D' = 0.114$	$P = 0.001$ $D' = 0.388$	$P = 0.022$ $D' = 0.105$	$P = 0.152$ $D' = 0.090$
-521C>T	$P = 0.189$ $D' = 0.082$	$P = 0.001$ $D' = 0.114$	-	$P = 0.419$ $D' = 0.081$	$P = 0.369$ $D' = 0.037$	$P = 0.092$ $D' = 0.117$

¹ See text for details on alleles in LD at each bi-allelic polymorphism.

Capítulo IV

Discussão

Ainda que seja considerado um gene de suscetibilidade ao TDAH de acordo com metanálises e revisões recentes (Biederman e Faraone, 2005; Gizer e cols., 2009; Banaschewski e cols., 2010) a contribuição do loco *DRD4* na etiologia do TDAH é confusa e resta muito a ser esclarecido, como pode ser visto nos capítulos anteriores. A seguir, analisamos em mais detalhes algumas questões levantadas anteriormente, que julgamos importantes, além de considerar outros pontos pertinentes em relação ao gene *DRD4* e à genética do TDAH.

Uma das características mais notáveis do gene *DRD4*, juntamente com o grande número de polimorfismos encontrados, é o padrão de distribuição geográfica dos alelos do VNTR de 48 pb. Os alelos 2R, 4R e 7R são os mais comuns, mas a frequência é bastante variável entre as populações. Como demonstrado por Chang e cols. (1996), o alelo 4R é o mais comum, embora em algumas populações indígenas nativas da América do Sul o alelo mais frequente seja o 7R (Hutz e cols., 2000), seguido do 4R. Já em populações asiáticas detectou-se uma frequência maior de alelos 2R, sendo o segundo alelo mais comum. Recentemente, um novo alelo de tamanho intermediário entre quatro e cinco repetições foi descrito, estando presente tanto em uma amostra de esquizofrênicos quanto de controles saudáveis da população japonesa (Hattori e cols., 2009). Até o momento, não houve relatos de detecção desse alelo em outras populações. Como salientado por Chang e cols. (1996), essa diversidade de frequências dos alelos do VNTR entre diferentes populações deve ser considerada em estudos de associação, uma vez que resultados positivos (e negativos) podem ser devidos a essa variação populacional e não à etiologia da doença. Em outras palavras, como já comentado, amostras de TDAH de diferentes países podem diferir quanto à composição genética referente ao VNTR, devido a particularidades étnico-populacionais, o que pode contribuir para erros tipo I e tipo II nos estudos moleculares com essa doença em algumas populações (Wang e cols., 2004; Waldman e cols., 2006).

Os estudos de Ding e cols. (2002) e Wang e cols. (2004) apresentam evidências de que o alelo 4R é o mais antigo, sugerindo que o alelo 7R tenha surgido através de um grande evento mutacional ou uma série de recombinações desiguais, sendo cinco a dez vezes mais recente. Em favor dessa hipótese há dados de desequilíbrio de ligação (DL), que mostram uma região de DL muito forte em torno do alelo 7R, enquanto que isso não é observado em relação ao alelo 4R. Ainda de acordo com esses mesmos autores, a grande maioria dos alelos 2R seria derivada do alelo 7R ou de uma recombinação 4R/7R, sendo, portanto, um alelo mais recente. Se de fato o alelo 2R é mais recente, esperar-se-ia que a intensidade do DL em torno desse alelo fosse igual ou superior ao observado para o alelo 7R. No presente trabalho não foi

observada nenhuma evidência de DL entre a duplicação de 120 pb da região promotora e o alelo 4R, mas entre o alelo não duplicado e o alelo 2R foi detectado um DL de média intensidade ($P \leq 0,001$ / $D' = 0,425$), enquanto um DL de intensidade maior entre o alelo duplicado e o 7R foi observado ($P \leq 0,001$ / $D' = 0,521$). Por outro lado, no trabalho de Mitsuyasu e cols. (2007), que considerou apenas alelos 2R e 4R do VNTR e outros 26 polimorfismos em uma população de esquizofrênicos e controles sadios japoneses, as análises revelaram um padrão de DL muito fraco ao longo de todo gene. Assim, a diferença entre populações em relação ao VNTR do *DRD4* pode e parece não estar restrita à notável diferença de frequência dos alelos, mas sim a toda arquitetura do gene. Considerando que uma parte da região promotora está em DL com o VNTR e outra é anormalmente recombinante, espera-se que a expressão do gene também seja diferenciada, uma vez que há evidências de que os polimorfismos dessa região alteram sua atividade transcricional (Okuyama e cols., 1999; D'Souza e cols., 2004; Kereszturi e cols., 2007). Talvez seja devido a essas particularidades estruturais, e possivelmente funcionais, que os resultados de estudos de associação entre marcadores do gene *DRD4* e o TDAH tenham resultados contraditórios. Entretanto, há um número reduzido de pesquisas considerando essas questões. A compreensão da estrutura e função de toda essa região genômica certamente será fundamental não só em novos estudos com o TDAH, mas também em estudos de associação com outros fenótipos.

O advento de técnicas de genotipagem em larga escala modificou permanentemente o modo como estudos de associação são conduzidos e interpretados. Os *genome-wide association studies* (GWAS) têm se revelado uma valiosa estratégia para identificação de novos genes de suscetibilidade a doenças complexas, enquanto que os clássicos estudos de associação com genes candidatos vêm ocupando menos espaço na literatura. A existência de um número crescente de SNPs descritos nos bancos genômicos impulsiona a realização desses estudos. Outra razão para a escolha por genotipagens em larga escala é a existência de consórcios e estudos colaborativos internacionais, os quais vêm recrutando amostras cada vez maiores, geralmente na casa dos milhares. Essas mudanças na estratégia de pesquisa em genética de doenças complexas têm um impacto considerável, por exemplo, gerando uma série de novas possibilidades de investigação, já que resultados interessantes com genes inusitados vêm sendo observados. Em relação ao TDAH, os poucos GWAS conduzidos até o momento não reportaram nenhuma associação significativa após correção, nem mesmo com os genes relacionados aos sistemas dopaminérgico, noradrenérgico e serotoninérgico, alvos dos clássicos estudos de associação (Franke e cols., 2009). Porém, há sugestão de envolvimento de genes relacionados a outros sistemas de neurotransmissão e de comunicação célula-célula

(Roman e cols., 2009). A tentativa de replicação dos achados positivos obtidos nos *GWAS* parece ser uma estratégia promissora na genética molecular do TDAH e já direciona novos estudos de associação. O gene que codifica o membro nove da família nove de carreadores de soluto (troca sódio/hidrogênio), *SLC9A9*, é um dos novos alvos dessas pesquisas, tendo sido identificado como um loco de suscetibilidade por *GWAS* (Franke e cols., 2009; Mick e cols., 2009). Estudos posteriores, entretanto, têm resultados divergentes: não houve evidência de associação entre esse gene e o TDAH em uma amostra irlandesa testada através de TDT (Hill e cols., 2009), mas Markunas e cols. (2010) relataram resultados positivos ao analisar medidas de sintomas do TDAH.

A despeito da irrevogável contribuição dos *GWAS* ao estudo de doenças complexas, é importante salientar que essas investigações, na sua maioria, consideram apenas SNPs que, quando associados à doença em estudo, explicam somente uma parcela muito pequena do risco genético (Cantor e cols., 2010). Polimorfismos como VNTRs e STRs têm sido preteridos em estudos de associação atuais, dando lugar aos SNPs, menos informativos, mas cuja genotipagem em larga escala é possível. Então, se por um lado os *GWAS* proporcionam novas linhas de investigação, por outro questões científicas importantes e ainda não totalmente esclarecidas estão sendo desconsideradas, seja devido à novidade em genes candidatos ou à dificuldade de inclusão de outro tipo de polimorfismo que não SNPs em genotipagens de larga escala. Especificamente em relação ao gene *DRD4*, isto parece estar de fato acontecendo tanto para o TDAH como para outros fenótipos possivelmente associados, sobretudo em relação ao VNTR, cuja genotipagem é bastante demorada e difícil tecnicamente. É possível que a realização de varreduras genômicas em amostras consideravelmente grandes esteja gerando um viés na literatura, onde resultados não usuais como os obtidos no presente trabalho não estejam sendo relatados.

A dificuldade em se identificar genes de suscetibilidade e entender o papel dos mesmos na etiologia do TDAH certamente não é devida somente à complexidade estrutural e funcional de alguns deles, mas também à heterogeneidade do próprio TDAH. A definição do fenótipo da doença e seus subtipos como categorias clínicas é amplamente aceita, sendo de fato, a principal abordagem em estudos de associação (Wallis e cols., 2008). Entretanto, Levy e cols. (1997), sugeriram a definição do transtorno como um contínuo, sendo o extremo de um comportamento que varia na população. De fato, certos comportamentos inerentes ao TDAH, como características de desatenção e impulsividade, ocorrem na população como um todo sem que o critério para diagnóstico seja preenchido. Alguns estudos, como os de Roman e cols. (2006) e Lasky-Su e cols. (2008), encontraram resultados interessantes analisando o

TDAH como uma dimensão ou contínuo de sintomas, os quais não foram observados numa abordagem categórica. Além disso, é possível que o TDAH em amostras que diferem em características como curso clínico e presença de comorbidades tenha uma origem etiológica diversa, estando sob influência de diferentes genes e fatores ambientais (Thapar e cols., 2007; Wallis e cols., 2008). O estudo de Kirley e cols. (2004) é um exemplo, uma vez que resultados positivos foram obtidos apenas em pacientes com história familiar de TDAH e com transtorno de oposição desafio comórbido. Entretanto, embora ambas as abordagens do TDAH pareçam ser boas estratégias de investigação, ainda são pouco exploradas na literatura, o que abre espaço para uma gama de novos estudos, mesmo com genes intensamente analisados como o *DRD4*.

Uma das soluções propostas para contornar a questão da heterogeneidade do TDAH seria o uso de endofenótipos ao invés de apenas o diagnóstico categórico. Endofenótipos podem ser definidos como construtos biológicos possivelmente vinculados ao substrato neurobiológico da doença, sendo, portanto, mais direta e fortemente influenciados pelos genes candidatos do que as doenças propriamente ditas. Assim, usando um fenótipo específico associado com comportamentos mais elementares, teoricamente o número de genes envolvidos na expressão desse traço seria menor (Gottesman e Gould, 2003), tornando a interpretação de dados mais simples do que se a doença fosse estudada como um todo. Apesar de não ser um conceito novo, apenas recentemente estudos sugerindo endofenótipos para o TDAH começaram a ser conduzidos de modo mais consistente. Os possíveis endofenótipos propostos incluem medidas neuropsicológicas de funções executivas, como resposta inibitória, memória de trabalho e variabilidade no tempo de resposta (Nigg, 2005; Waldman e Gizer., 2006; Goos e cols., 2009; Uebel e cols., 2010). Apesar de promissor, a investigação de endofenótipos como uma abordagem para o estudo da genética do TDAH é ainda pouco utilizada, sendo necessária também a definição consensual dos mesmos na literatura (Kebir e cols., 2009).

O uso de dimensões de personalidade como possíveis endofenótipos para o TDAH também já foi sugerido (Lynn e cols., 2005). Um dos primeiros sistemas de classificação proposto, e ainda bastante utilizado é o *Tridimensional Personality Questionnaire* (TPQ) (Cloninger, 1987; Cloninger e cols., 1993). De acordo com esse autor, as quatro dimensões genéticas que fundamentariam a personalidade seriam Busca de Novidades, Evitação de Dano, Dependência de Recompensa e Persistência. Muitos dos genes associados ao TDAH, incluindo o *DRD4*, estão associados a dimensões de personalidade em amostras populacionais. Por exemplo, o alelo 7R do VNTR já foi relacionado à dimensão Busca de

Novidades, tanto isoladamente (Benjamin e cols., 1996; Ebstein e cols., 1996) como em conjunto com os genes do transportador de serotonina (*5-HTT*) e da catecol-O-metiltransferase (*COMT*) (Strobel e cols., 2003). Também há relatos de associação com o SNP -521C>T em amostras populacionais do Japão (Okuyama e cols., 2000) e Hungria (Ronai e cols., 2001): os indivíduos homozigotos para o alelo C apresentavam escores significativamente mais altos de Busca de Novidades. É importante salientar que esta dimensão é caracterizada pela excitabilidade frente a novos estímulos, busca de potenciais recompensas e aversão à monotonia e potencial punição (Cloninger, 1993), o que condiz com os sintomas centrais do TDAH. Martel e cols. (2010) propõem traços de personalidade como possíveis mediadores entre o risco genético e o TDAH. Nesse trabalho, houve evidência de que dimensões de personalidade predizem significativamente o TDAH, mas não houve evidência de associação entre os polimorfismos de duplicação de 120 pb do *DRD4*, VNTR de 40 pb do *DAT1* e SNP *DraI* (rs553668) do gene do receptor adrenérgico alfa-2A (*ADRA2A*) e o transtorno. No entanto, ao serem analisados como “composto catecolaminérgico de risco”, ou seja, grupos contendo os alelos de risco de cada marcador versus demais, foi verificada associação, tanto para o TDAH quanto para as dimensões de personalidade. Baseado nesses achados, a possibilidade de mediação entre o risco genético e o TDAH foi proposta, com resultados significativos. Assim, dimensões de personalidade poderiam ser utilizadas não só como endofenótipos, mas também como ferramentas na identificação precoce de crianças predispostas ao TDAH.

Muitos temas sobre a etiologia do TDAH permanecem não elucidados. Além dos mencionados anteriormente, a investigação de interações gene-gene, interações gene-ambiente e estudos aprofundados de aspectos neurobiológicos e sua relação com a genética é fundamental, mas ainda necessita de maior desenvolvimento. Contudo, ainda que todas as questões apresentadas ao longo desse trabalho sejam respondidas, dificilmente darão origem a intervenções diretas no manejo clínico do paciente e, com menor probabilidade, a um diagnóstico molecular para TDAH, havendo uma grande lacuna a ser preenchida entre a teoria e a prática. O conhecimento gerado servirá antes para o entendimento da patologia, de modo que profissionais da saúde, professores e familiares possam trabalhar para que os prejuízos sociais e intelectuais dessas crianças, e também adultos, sejam minimizados, tornando sua adaptação ao ambiente menos desgastante.

Referências Bibliográficas

- Acosta MT, Arcos-Burgos M, Muenke M. 2004. Attention deficit/hyperactivity disorder: Complex phenotype, single genotype? *Genet Med* 6: 1-15.
- American Psychiatric Association. 1994. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 4. ed. (DSM-IV). Washington DC: American Psychiatric Association.
- Arnsten AFT, Li B-M. 2005. Neurobiology of executive functions: Catecholamine influences on prefrontal cortical functions. *Biol Psychiatry* 57: 1377-1384.
- Asghari V, Sanyal S, Buchwaldt S, Paterson A, Jovanovic V, Van Tol HH. 1995. Modulation of intracellular cyclic AMP levels by different human dopamine D4 receptor variants. *J Neurochem* 65(3):1157-65.
- Banaschewski T, Becker K, Scherag S, Franke B, Coghill D. 2010. Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder: an overview. *Eur Child Adolesc Psychiatry*. Epub.
- Barkley R. 2002. Major life activity and health outcomes associated with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *J Clin Psychiatry* 63 (supl. 12): 10-15.
- Barkley RA. 1997. Behavioral inhibition, sustained attention and executive functions: Constructing a unifying theory of ADHD. *Psychol Bull* 121: 65-94.
- Barr CL, Feng Y, Wigg KG, Schachar R, Tannock R, Roberts W, Malone M, Kennedy JL. 2001. 5'-untranslated region of the dopamine D4 receptor gene and attention-deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet*. 8;105(1):84-90.
- Barr CL, Wigg KG, Bloom S, Schachar R, Tannock R, Roberts W, Malone M, Kennedy JL. 2000. Further evidence from haplotype analysis for linkage of the dopamine D4 receptor gene and attention-deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet*. 96(3):262-7.
- Bellgrove MA, Hawi Z, Lowe N, Kirley A, Robertson IH, Gill M. 2005. *DRD4* Gene Variants and Sustained Attention in Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD): Effects of Associated Alleles at the VNTR and -521 SNP. *Am J Med Genet* 136B: 81–86.
- Benjamin J, Greenberg BD, Murphy DL, Li L, Patterson C, Hamer DH. 1996. Population and familial association between the D4 dopamine receptor gene and measures of novelty seeking. *Nat Genet* 12: 81-84.
- Bhaduri N, Das M, Sinha S, Chattopadhyay A, Gangopadhyay PK, Chaudhuri K, Singh M, Mukhopadhyay K. 2006. Association of Dopamine D4 Receptor (*DRD4*) Polymorphisms with Attention Deficit Hyperactivity Disorder in Indian Population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 141B:61–66.
- Biederman J, Faraone SV. 2005. Attention-deficit/hyperactivity disorder. *Lancet* 366: 237-248.
- Biederman J, Spencer T. 1999. Attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) as a noradrenergic disorder. *Biol Psychiatry* 46: 1234-1242.
- Biederman J, Wilens TE, Spencer TJ, Adler LA. 2007. Diagnosis and treatment of adults with attention-deficit/hyperactivity disorder. *CNS Spectrum* 12(4 Suppl 6):1-15.
- Biederman J. 2007. Advances in the neurobiology of ADHD. *CNS Spectr* 12:4(Suppl 6):6-7
- Borycz J, Zapata A, Quiroz C, Volkow ND, Ferré S. 2008. 5-HT1B receptor-mediated serotonergic modulation of methylphenidate-induced locomotor activation in rats. *Neuropsychopharmacology* 33: 619-626.

- Cantor RM, Lange K, Sinsheimer JS. 2010. Prioritizing GWAS results: A review of statistical methods and recommendations for their application. *Am J Hum Genet.* 86(1):6-22.
- Chang FM, Kidd JR, Livak KJ, Pakstis AJ, Kidd KK. 1996. The world-wide distribution of allele frequencies at the human dopamine D4 receptor locus. *Hum Genet* 98: 91-101.
- Cheuk DK, Li SY, Wong V. 2006. Exon 3 polymorphisms of dopamine D4 receptor (*DRD4*) gene and attention deficit hyperactivity disorder in Chinese children. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 141(8):907-11.
- Cloninger CR, Svrakic DM, Przybeck TR. 1993. A psychobiological model of temperament and character. *Arch Gen Psychiatry* 50(12):975-90.
- Cloninger CR. 1987. A systematic method for clinical description and classification of personality variants. A proposal. *Arch Gen Psychiatry* 44(6):573-88.
- Cook EH, Stein MA, Krasowski MD, Cox NJ, Olkon DM, Kieffer JE, Leventhal BL. 1995. Association of attention deficit disorder and the dopamine transporter gene. *Am J Hum Gen* 56: 993-998.
- Cormier E. 2008. Attention deficit/hyperactivity disorder: a review and update. *J PediatrNurs* 23(5): 345-57.
- Curatolo P, Paloscia C, D'Agati E, Moavero R, Pasini A. 2009. The neurobiology of attention deficit/hyperactivity disorder. *Eur J Paediatr Neurology.* 13(4):299-304.
- D'Souza UM, Russ C, Tahir E, Mill J, McGuffin P, Asherson PJ, Craig IW. 2004. Functional effects of a tandem duplication polymorphism in the 5' flanking region of the *DRD4* gene. *Biol Psychiatry.* 56(9):691-7.
- De Graaf R, Kessler RC, Fayyad J, Ten Have M, Alonso J, Angermeyer M, Borges G, Demyttenaere K, Gasquet I, De Girolamo G, Haro JM, Jin R, Karam EG, Ormel J, Posada-Villa J. 2008. The prevalence and effects of adult attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) on the performance of workers: results from the WHO World Mental Health Survey Initiative. *Occup Environ Med* 65(12): 835-842.
- Ding YC, Chi HC, Grady DL, Morishima A, Kidd JR, Kidd KK, Flodman P, Spence MA, Schuck S, Swanson JM, Zhang YP, Moyzis RK. 2002. Evidence of positive selection acting at the human dopamine receptor D4 gene locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(1):309-14.
- Ebstein RP, Novick O, Umansky R, Priel B, Osher Y, Blaine D, Bennett ER, Nemanov L, Katz M, Belmaker RH. 1996. Dopamine D4 receptor (*D4DR*) exon III polymorphism associated with the human personality trait of Novelty Seeking. *Nat Genet* 12(1):78-80.
- Franke B, Neale BM, Faraone SV. Genome-wide association studies in ADHD. 2009. *Hum Genet* 126(1):13-50.
- Galera C, Fombonne E, Chastang J-F, Bouvard M. 2005. Childhood hyperactivity-inattention symptoms and smoking in adolescence. *Drug Alcohol Depend* 78: 101-108.
- Gelernter J, Kennedy JL, Van Tol HH, Civelli O, Kidd KK. 1992. The D4 dopamine receptor (*DRD4*) maps to distal 11p close to *HRAS*. *Genomics* 13:208-210.
- Gizer IR, Ficks C, Waldman ID. 2009. Candidate gene studies of ADHD: a meta-analytic review. *Hum Genet* 126(1):51-90.

- Goos LM, Crosbie J, Payne S, Schachar R. 2009. Validation and extension of the endophenotype model in ADHD patterns of inheritance in a family study of inhibitory control. *Am J Psychiatry* 166(6):711-7.
- Gornick MC, Addington A, Shaw P, Bobb AJ, Sharp W, Greenstein D, Arepalli S, Castellanos FX, Rapoport JL. 2007. Association of the dopamine receptor D4 (*DRD4*) gene 7-repeat allele with children with attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD): an update. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 144B(3):379-82.
- Gottesman II, Gould TD. 2003. The endophenotype concept in psychiatry: etymology and strategic intentions. *Am J Psychiatry*. 160(4):636-45.
- Hattori E, Nakajima M, Yamada K, Iwayama Y, Toyota T, Saitou N, Yoshikawa T. 2009. Variable number of tandem repeat polymorphisms of *DRD4*: re-evaluation of selection hypothesis and analysis of association with schizophrenia. *Eur J Hum Genet*. 17(6):793-801.
- Hill M, Hawi Z, Gill M, Anney R. 2009. A cis-acting polymorphism in *SLC9A9* is not associated with ADHD in an Irish sample. XVII World Congress of Psychiatric Genetics: Book of Abstracts, pp 115. California, USA.
- Holmes J, Payton A, Barret JH, Hever T, Fitzpatrick H, Trumper AL, Harrington R, McGuffin P, Owen M, Ollier W, Worthington J, Thapar A. 2000. A family-based and case-control association study of the dopamine D4 receptor gene and dopamine transporter gene in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry* 5: 523-530.
- Hutz MH, Almeida S, Coimbra CE Jr, Santos RV, Salzano FM. 2000. Haplotype and allele frequencies for three genes of the dopaminergic system in South American Indians. *Am J Hum Biol* 12(5):638-645.
- Jensen OS, Hinshaw SP, Kraemer HC, Lenora N, Newcorn JH, Abikoff HB, March JS, Arnold LE, Cantwell DP, Conners CK, Elliot GR, Greenhill LL, Hechtman L, Hoza B, Pelham WE, Severe JB, Swanson JM, Wells KC, Wigal T, Vitiello B. 2001. ADHD comorbidity findings from the MTA study: Comparing comorbid subgroups. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 40: 147-158.
- Jovanovic V, Guan HC, Van Tol HH. 1999. Comparative pharmacological and functional analysis of the human dopamine D_{4.2} and D_{4.10} receptor variants. *Pharmacogenetics* 9: 561-568.
- Kebir O, Tabbane K, Sengupta S, Joober R. 2009. Candidate genes and neuropsychological phenotypes in children with ADHD: review of association studies. *J Psychiatry Neurosci* 34(2):88-101.
- Kereszturi E, Kiraly O, Barta C, Molnar N, Sasvari-Szekely M, Csapo Z. 2006. No direct effect of the -521 C/T polymorphism in the human dopamine D4 receptor gene promoter on transcriptional activity. *BMC Mol Biol* 7:18.
- Kereszturi E, Kiraly O, Csapo Z, Tarnok Z, Gadoros J, Sasvari-Szekely M, Nemoda Z. 2007. Association between the 120-bp duplication of the dopamine D4 receptor gene and attention deficit hyperactivity disorder: genetic and molecular analyses. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 144(2):231-6.
- Kessler RC, Adler LA, Barkley R, Biederman J, Conners CK, Faraone SV, Greenhill LL, Jaeger S, Secnik K, Spencer T, Ustun TB, Zaslavsky AM. 2005. Patterns and predictors of

attention-deficit/hyperactivity disorder persistence into adulthood: results from the national comorbidity survey replication. *Biol Psychiatry* 57: 1442-51.

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

Kirley A, Lowe N, Mullins C, McCarron M, Daly G, Waldman I, Fitzgerald M, Gill M, Hawi Z. 2004. Phenotype studies of the *DRD4* gene polymorphisms in ADHD: association with oppositional defiant disorder and positive family history. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*.131(1):38-42.

Kustanovich V, Ishii J, Crawford L, Yang M, McGough JJ, McCracken JT, Smalley SL, Nelson SF. 2004. Transmission disequilibrium testing of dopamine-related candidate gene polymorphisms in ADHD: confirmation of association of ADHD with *DRD4* and *DRD5*. *Mol Psychiatry* 9(7):711-7.

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

Lara C, Fayyad J, DeGraaf R, Kessler RC, Aguilar-Gaxiola S, Angermeyer M, Demyttenaere K, DeGirolamo G, Haro JM, Jin R, Karam EG, Lépine JP, Mora ME, Ormel J, Posada-Villa J, Sampson N. 2009. Childhood predictors of adult attention-deficit/hyperactivity disorder: results from the World Health Organization World Mental Health Survey Initiative. *Biol Psychiatry* 65(1): 46-54.

Lasky-Su J, Lange C, Biederman J, Tsuang M, Doyle AE, Smoller JW, Laird N, Faraone S. 2008. Family-based association analysis of a statistically derived quantitative traits for ADHD reveal an association in *DRD4* with inattentive symptoms in ADHD individuals. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B(1):100-6.

Levy F, Hay DA, McStephen M, Wood C, Waldman I. 1997. Attention-deficit hyperactivity disorder: a category or a continuum? Genetic analysis of a large-scale twin study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 36(6):737-44.

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

Li D, Sham PC, Owen MJ, He L. 2006. Meta-analysis shows significant association between dopamine system genes and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Hum Mol Genetics* 15(14):2276-84.

Lowe N, Kirley A, Mullins C, Fitzgerald M, Gill M, Hawi, Z. 2004. Multiple marker analysis at the promoter region of the *DRD4* gene and ADHD: evidence of linkage and association with the SNP -616. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 131(1):33-7.

Lynn DE, Lubke G, Yang M, McCracken JT, McGough JJ, Ishii J, Loo SK, Nelson SF, Smalley SL. 2005. Temperament and character profiles and the dopamine D4 receptor gene in ADHD. *Am J Psychiatry*. 162(5):906-13.

Madras BK, Miller GM, Fischman AJ. 2005. The dopamine transporter and attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 57: 1397-1409.

- Makris N, Biederman J, Monuteaux MC, Seidman LJ. 2009. Towards conceptualizing a neural systems-based anatomy of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Dev Neurosci* 31(1-2): 36-49.
- Markunas CA, Quinn KS, Collins AL, Garrett ME, Lachiewicz AM, Sommer JL, Morrissey-Kane E, Kollins SH, Anastopoulos AD, Ashley-Koch AE. 2010. Genetic variants in *SLC9A9* are associated with measures of Attention-deficit/hyperactivity disorder symptoms in families. *Psychiatric Genetics* Volume 20 - Issue 2 - pp 73-81
- Martel MM, Nikolas M, Jernigan K, Friderici K, Nigg JT. 2010. Personality Mediation of Genetic Effects on Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *J Abnorm Child Psychol*. Epub
- Martin A. 2005. The hard work of growing up with ADHD. *Am J Psychiatry* 162: 1575-1577.
- Masellis M, Basile VS, Muglia P, Ozdemir V, Macciardi FM, Kennedy JL. 2002. Psychiatric pharmacogenetics: personalizing psychostimulant therapy in attention deficit hyperactivity disorder. *Behav Brain Res* 130: 85-90.
- Matsuomoto M, Hidaka K, Tada S, Tasaki Y, Yamaguchi T. 1995. Full-length cDNA cloning and distribution of human dopamine D4 receptor. *Mol Brain Res* 29: 157-162.
- McClernon FJ, Kollins SH. 2008. ADHD and smoking: from genes to brain to behavior. *Ann N Y Acad Sci* 1141: 131-147.
- McCracken JT, Smalley SL, McGough JJ, Crawford L, Del'Homme M, Cantor RM, Liu A, Nelson SF. 2000. Evidence for linkage of a tandem duplication polymorphism upstream of the dopamine D4 receptor gene (*DRD4*) with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Mol Psychiatry* 5(5):531-6.
- McGough JJ, Barkley RS. 2004. Diagnostic controversies in adult attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Psychiatry* 161: 1984-56.
- Mick E, Faraone SV. 2008. Genetics of attention deficit hyperactivity disorder. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am* 17: 261-284.
- Mick E, Todorov A, Loo S, Hu X, Dechairo B, Hall S, Nelson S, Shtir C, Smalley S, Todd R, Neale B, Faraone S. 2009. Family-based genome-wide association study of attention deficit/hyperactivity disorder. XVII World Congress of Psychiatric Genetics: Book of Abstracts, pp 112. California, USA.
- Mill J, Fisher N, Curran S, Richards S, Taylor E, Asherson P. 2003. Polymorphisms in the dopamine D4 receptor gene and attention-deficit hyperactivity disorder. *Neuroreport* 14(11):1463-6.
- Mitsuyasu H, Kawasaki H, Ninomiya H, Kinukawa N, Yamanaka T, Tahira T, Stanton VP, Springett GM, Hayashi K, Tashiro N, Kanba S. 2007. Genetic structure of the dopamine receptor D4 gene (*DRD4*) and lack of association with schizophrenia in Japanese patients. *J Psychiatr Res*. 41(9):763-75.
- National Institute of Health. 2000. National Institute of Health Consensus Development Conference Statement: Diagnosis and treatment of ADHD. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 39: 182-193.
- Newcorn JH. 2008. Co-morbidity in adults with ADHD. *CNS Spectr* 13 (8 Suppl 12): 12-15.

- Nigg JT. 2005. Neuropsychologic theory and findings in attention-deficit/hyperactivity disorder: The state of the field and salient challenges for the coming decade. *Biol Psychiatry* 57: 1424-1435.
- Oak JN, Oldenhof J, Van Tol HH. 2000. The dopamine D(4) receptor: one decade of research. *Eur J Pharmacol.* 29;405(1-3):303-27.
- Okuyama Y, Ishiguro H, Nankai M, Shibuya H, Watanabe A, Arinami T. 2000. Identification of a polymorphism in the promoter region of *DRD4* associated with the human novelty seeking personality trait. *Mol Psychiatry.* 5 (1):64-9.
- Okuyama Y, Ishiguro H, Toru M, Arinami T. 1999. A genetic polymorphism in the promoter region *DRD4* associated with expression in schizophrenia. *Biochem Biophys Res Commun* 258(2):292-5.
- Payton A, Holmes J, Barrett JH, Hever T, Fitzpatrick H, Trumper AL, Harrington R, McGuffin P, O'Donovan M, Owen M, Ollier W, Worthington J, Thapar A. 2001. Examining for association between candidate gene polymorphisms in the dopamine pathway and attention-deficit/hyperactivity disorder: A family-based study. *Am J Med Genet Neuropsychiatr Genet* 105: 464-470.
- Petronis A, Van Tol HH, Lichter JB, Livak KJ, Kennedy JL. 1993. The D4 dopamine receptor gene maps on 11p proximal to *HRAS*. *Genomics* 18:161-163.
- Pliszka SR. 2005. The neuropsychopharmacology of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 57: 1385-1390.
- Polanczyk G, de Lima MS, Horta BL, Biederman J, Rohde LA. 2007. The worldwide prevalence of ADHD: a systematic review and metaregression analysis. *Am J Psychiatry* 164:942-8.
- Rohde LA, Halpern R. 2004. Transtorno de déficit de atenção/hiperatividade: atualização. *J Pediatr* 80 (supl 2): S61-S70.
- Roman T, Bau CHD, Almeida S, Hutz MH. 1999. Lack of association of the dopamine D4 receptor gene polymorphism with alcoholism in a Brazilian population. *Addiction Biology* 4: 203-207.
- Roman T, Polanczyk GV, Zeni C, Genro JP, Rohde LA, Hutz MH. 2006. Further evidence of the involvement of alpha-2A-adrenergic receptor gene (*ADRA2A*) in inattentive dimensional scores of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry* 11(1):8-10.
- Roman T, Rohde LA, Hutz MH. A role for neurotransmission and neurodevelopment in attention-deficit/hyperactivity disorder. 2009. *Genome Med.* 1(11):107.
- Roman T, Schmitz M, Polanczyk G, Eizirik M, Rohde LA, Hutz MH. 2001. Attention-deficit/hyperactivity disorder: A study of association with both the dopamine transporter gene and the dopamine D4 receptor gene. *Am J Med Genet Neuropsychiatr Genet* 105: 471-478.
- Ronai Z, Szantai E, Szmola R, Nemoda Z, Szekely A, Gervai J, Guttman A, Sasvari-Szekely M. 2004. A novel A/G SNP in the -615th position of the dopamine D4 receptor promoter region as a source of misgenotyping of the -616 C/G SNP. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 126(1):74-8.

- Ronai Z, Szekely A, Nemoda Z, Lakatos K, Gervai J, Staub M, Sasvari-Szekely M. 2001. Association between Novelty Seeking and the -521 C/T polymorphism in the promoter region of the *DRD4* gene. *Mol Psychiatry* 6(1):35-8.
- Rowe DC, Stever C, Chase D, Sherman S, Abramowitz A, Waldman ID. 2001. Two dopamine genes related to reports of childhood retrospective inattention and conduct disorder symptoms. *Mol Psychiatry*. 6(4): 429-33.
- Sagvolden T, Johansen EB, Aase H, Russel VA. 2005. A dynamic developmental theory of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) predominantly hyperactive/ impulsive and combined subtypes. *Behav Brain Sci*. 28(3):397-419.
- Shafritz KM, Marchione KE, Gore JC, Shaywitz SE, Shaywitz BA. 2004 The effects of methylphenidate on neural systems of attention deficit/hyperactivity disorder. *Am J Psychiatry* 161: 1990-1997.
- Smith AK, Mick E, Faraone SV. 2009. Advances in genetic studies of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Curr Psychiatry Rep* 11(2): 143-148.
- Spencer TJ, Biederman J, Mick E. 2007. Attention-deficit/hyperactivity disorder: diagnosis, lifespan, comorbidities, and neurobiology. *J Pediatr Psychol*.: 32(6):631-42.
- Stein MA. 2008. Impairment associated with adult ADHD. *CNS Spectr* 13 (8 Suppl 12): 9-11.
- Strobel A, Lesch KP, Jatzke S, Paetzold F, Brocke B. 2003. Further evidence for a modulation of Novelty Seeking by *DRD4* exon III, *5-HTTLPR*, and *COMT* val/met variants. *Mol Psychiatry* 8(4):371-2.
- Sullivan MA, Rudnik-Levin F. 2001. Attention deficit/hyperactivity disorder and substance abuse: diagnostic and therapeutic considerations. *Ann N Y Acad Sci* 931: 251-270.
- Swanson JM, Kinsbourne M, Nigg J, Lanphear B, Stefanatos GA, Volkow N, Taylor E, Casey BJ, Castellanos FX, Wadhwa PD. 2007. Etiologic subtypes of attention-deficit/hyperactivity disorder: brain imaging, molecular genetics and environmental factors and the dopamine hypothesis. *Neuropsychol Rev* 17: 39-59.
- Szobot C, Roman T, Cunha R, Acton P, Hutz M, Rohde LA. 2005. Brain perfusion and dopaminergic genes in boys with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 132(1):53-8.
- Thapar A, Langley K, Owen MJ, O'Donovan MC. 2007. Advances in genetic findings on attention deficit hyperactivity disorder. *Psychol Med* 17:1-12.
- The MTA Cooperative Group. 2004. National Institute of Mental Health Multimodal Treatment Study of ADHD Follow-up: 24-month outcomes of treatment strategies for attention-deficit/hyperactivity disorder. *Pediatrics* 113: 754-761.
- Todd RD, Neuman RJ, Lobos EA, Jong YJ, Reich W, Heath AC. 2001. Lack of association of dopamine D4 receptor gene polymorphisms with ADHD subtypes in a population sample of twins. *Am J Med Genet* 105(5):432-8.
- Uebel H, Albrecht B, Asherson P, Börger NA, Butler L, Chen W, Christiansen H, Heise A, Kuntsi J, Schäfer U, Andreou P, Manor I, Marco R, Miranda A, Mulligan A, Oades RD, van der Meere J, Faraone SV, Rothenberger A, Banaschewski T. 2010. Performance variability, impulsivity errors and the impact of incentives as gender-independent endophenotypes for ADHD. *J Child Psychol Psychiatry* 51(2):210-8.

- Van Tol HH, Bunzow JR, Guan H, Sunahara R, Seeman P, Niznik HB, Civelli O. 1991. Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature* 350, 610–614.
- Van Tol HH, Wu CM, Guan HC, Ohara K, Bunzow JR, Civelli O, Kennedy J, Seeman P, Niznik HB, Jovanovic V. 1992 Multiple dopamine D4 receptor variants in the human population. *Nature* 358: 149-152.
- Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Logan J, Gerasimov M, Maynard L, Ding Y, Gatley SJ, Gifford A, Franceschi D. 2001. Therapeutic doses of oral methylphenidate significantly increase extracellular dopamine in the human brain. *J Neurosci* 21: (RC21): 1-5.
- Waldman ID, Gizer IR. 2006. The genetics of attention deficit hyperactivity disorder. *Clin Psych Rev* 26(4):396-432.
- Wallis D, Russell HF, Muenke M. 2008. Review: Genetics of attention deficit/hyperactivity disorder. *J Pediatr Psychol* 33(10): 1085-1099.
- Wang E, Ding YC, Flodman P, Kidd JR, Kidd KK, Grady DL, Ryder OA, Spence MA, Swanson JM, Moyzis RK. 2004. The genetic architecture of selection at the human dopamine receptor D4 (*DRD4*) gene locus. *Am J Hum Genet.* 74(5):931-44.
- Wilens TE, Dodson W. 2004. A clinical perspective of attention-deficit/hyperactivity disorder into adulthood. *J Clin Psychiatry* 65: 1301-1313.
- Willcutt EG, Doyle AE, Nigg JT, Faraone SV, Pennington BF. 2005. Validity of the executive function theory of attention-deficit/hyperactivity disorder: a meta-analytic review. *Biol Psychiatry.* 57(11):1336-46.
- Yang JW, Jang WS, Hong SD, Ji YI, Kim DH, Park J, Kim SW, Joung Y. 2008. A case-control association study of the polymorphism at the promoter region of the *DRD4* gene in Korean boys with attention deficit hyperactivity disorder: Evidence of association with the -521 C/T SNP. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* Jan 1;32(1):243-8.
- Young J. 2008. Common comorbidities seen in adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Adolesc Med State Art Rev* 19(2): 216-28, vii.
- Zepf FD, Holtmann M, Stadler C, Demisch L, Schmitt M, Wöckel L, Poustka F. 2008. Diminished Serotonergic Functioning in Hostile Children with ADHD: Tryptophan Depletion Increases Behavioural Inhibition. *Pharmacopsychiatry* 41: 60-65.