Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Biociências

Estudo de Associação entre o Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade/Impulsividade e o Gene da Enzima Dopamina β-Hidroxilase (DβH)

Elisa Maggi Hendler

Orientador: Claiton Henrique Dotto Bau

Trabalho apresentado como requisito para obtenção do grau de Bacharel no Curso de Ciências Biológicas, Ênfase Molecular, Celular e Funcional.

Porto Alegre, julho de 2010.

Resumo

O transtorno de déficit de atenção e hiperatividade/impulsividade (TDAH) é um dos transtornos neuropsiquiátricos mais comuns da infância, afetando em torno de 5.3% das crianças em idade escolar e 2.5% dos adultos. O TDAH caracteriza-se por sintomas de desatenção, hiperatividade e impulsividade, de acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais (DSM-IV) da Associação Norte-Americana de Psiquiatria, proporcionando prejuízos significativos para a vida do indivíduo. O TDAH possui contribuição genética considerável e muitos genes, que participam dos sistemas de neurotransmissores catecolaminérgicos e serotoninérgicos, são considerados como possíveis fatores de suscetibilidade ao transtorno. Neste estudo, foram analisados os polimorfismos *TaqI* e C-1021T no gene que codifica a enzima dopamina β-hidroxilase (*DBH*). A amostra foi composta por 452 adultos com TDAH coletados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e 233 homens doadores de sangue do Hemocentro do Rio Grande do Sul. Os polimorfismos foram genotipados com técnicas envolvendo reação em cadeia da polimerase (PCR), digestão enzimática e eletroforese em gel. Nenhum dos polimorfismos analisados, *TaqI* e C-1021T, mostrou-se diretamente associado com o TDAH na nossa amostra. Nossos resultados sugerem que os polimorfismos analisados neste trabalho não influenciam o TDAH em adultos.

Sumário

1. Introdução 4
1.1 O transtorno de déficit de atenção e hiperatividade/impulsividade (TDAH) 4
1.2 Etiologia e fatores de risco do TDAH 9
1.3 O gene *DBH* 11
2. Justificativa 15
3. Objetivos 16
4. Material e métodos 17
5. Resultados 19
6. Discussão 21
7. Referências bibliográficas 24

1. Introdução

1.1. O transtorno de déficit de atenção e hiperatividade/ impulsividade (TDAH)

O transtorno de déficit de atenção e hiperatividade/ impulsividade (TDAH) é uma síndrome neurobiológica que se caracteriza pelo aparecimento ainda na infância de sintomas como desatenção, hiperatividade e impulsividade. Tais características estão associadas com um prejuízo funcional significativo para a vida dos indivíduos. O TDAH está entre os diagnósticos psiquiátricos mais comuns da infância, com prevalência mundial estimada em 5.29% em crianças e de 3% em adolescentes (Polanczyk, 2007).

Historicamente, se imaginava que o TDAH só existisse na infância e que no início da adolescência houvesse a remissão dessa condição clínica. Hoje, sabe-se que cerca de 50% das crianças com TDAH continuam com os sintomas durante a vida adulta (Faraone e cols., 2006). A prevalência de TDAH em adultos, na população geral, encontra-se em torno de 2.5% (Simon e cols., 2009).

Os sintomas do TDAH têm conseqüências significativas e os prejuízos podem ser notáveis em diversas áreas da vida dos indivíduos afetados e de suas famílias. Em crianças, o TDAH está associado com maiores prejuízos no ambiente escolar (expulsões, repetência, baixo desempenho e suspensões), conflitos em relacionamentos com familiares e colegas, e efeitos negativos na auto-estima (Barkley e cols., 2002). Já nos indivíduos adultos, o transtorno contribui para desempenho ocupacional e vocacional disfuncional e prejuízos nas relações sociais e afetivas. Adultos com TDAH estão sujeitos a níveis socioeconômicos mais baixos, maiores níveis de desemprego ou mudanças de emprego, maiores riscos de pior desempenho acadêmico, dificuldades emocionais como separações ou divórcios, piores padrões nos relacionamentos e

problemas com a justiça (Barkley e cols., 2002; Wilens e cols., 2004; Barkley e cols., 2006; Biederman e cols., 2006). Os prejuízos nos pacientes estão associados com sintomas como desatenção, inquietude, labilidade de humor, desorganização, sensibilidade ao estresse, impulsividade e hiperatividade.

Os sintomas tendem a se modificar ao longo da vida do indivíduo. Na fase adulta, os problemas relacionados à atenção persistem enquanto os sintomas de hiperatividade e impulsividade diminuem ou terminam (Biederman e cols., 2000). Os sintomas de desatenção podem se intensificar e tornar-se mais problemáticos quando alcançam a fase adulta em função da complexidade de todas as demandas da vida adulta como atividades ocupacionais e acadêmicas (Biederman e cols., 2000). Quando presente, a hiperatividade na vida adulta pode ser canalizada para a realização simultânea de várias atividades ou trabalhos. Além disso, a hiperatividade pode permanecer como uma sensação subjetiva de inquietude. A presença da impulsividade, na fase adulta, pode ser responsável por prejuízos significativos como brigas conjugais, perda de empregos, gastos impensados, negócios mal feitos, uso de drogas ilícitas, atitudes intempestivas, práticas sexuais inseguras, direção perigosa de veículos e aumento de doenças sexualmente transmissíveis (Barkley e cols., 1996 e 2004).

Assim, o TDAH torna-se um problema relevante para a sociedade e para o individuo uma vez que os sintomas adquirem importância por estarem associados ao desempenho funcional do indivíduo.

Com relação ao gênero, há diferentes proporções entre os sexos ao longo da vida. Enquanto a razão entre meninos e meninas em amostras clínicas está em torno de 4:1 (Rodhe e Halpern, 2004); em adultos, os dois sexos possuem prevalências semelhantes com razão próxima a 1:1 (Biederman e cols, 2004). Os motivos para tais diferenças nas prevalências entre os sexos seriam que os homens

podem ser menos diagnosticados, devido ao declínio dos sintomas de hiperatividade e de impulsividade com o passar do tempo, ou que as meninas do tipo desatento não necessitaram de tratamento durante a infância e estariam procurando tratamento somente na idade adulta.

O diagnóstico do TDAH é fundamentalmente clínico, com base nos dois sistemas classificatórios utilizados na psiquiatria: a Classificação Internacional de Doenças (CID-10) da Organização Mundial da Saúde (OMS, 1993) e o Manual Diagnóstico e Estatístico dos Transtornos Mentais (DSM-IV) da Associação Norte-Americana de Psiquiatria (APA, 1994). De acordo com a CID-10, a doença recebe o nome de Transtorno Hipercinético e segundo o DSM-IV, o TDAH apresenta-se sob três subtipos: predominantemente desatento, predominantemente hiperativo/impulsivo ou combinado. O diagnóstico do transtorno requer sintomas de TDAH e prejuízos relacionados a eles.

O DSM-IV é o critério diagnóstico utilizado pela maioria das pesquisas científicas e de acordo com este sistema, os sintomas devem causar prejuízos em dois ou mais contextos, ter início antes dos sete anos de idade, e causar interferência no funcionamento social, acadêmico ou ocupacional do indivíduo. Os critérios exigem, ainda, a presença de pelo menos seis de nove sintomas de desatenção e/ou de hiperatividade/impulsividade pelo período mínimo de seis meses, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Sintomas do TDAH de acordo com o DSM-IV (APA, 1994).

Desatenção	**Hiperatividade**	**Impulsividade**
▪ Dificuldade em manter a atenção durante atividades ou brincadeiras; ▪ Dificuldade para organizar tarefas e atividades; ▪ Dificuldade em seguir instruções e terminar tarefas; ▪ Evita se envolver em tarefas que exijam esforço mental sustentado; ▪ Fácil distração por estímulos externos alheios à tarefa; ▪ Não presta atenção a detalhes; ▪ Perda freqüente de coisas necessárias a tarefas; ▪ Esquecimento em atividades diárias; ▪ Parece não ouvir.	▪ Dificuldade em ficar sentado em sala de aula e em outras situações; ▪ Inquieto com as mãos e os pés quando sentado; ▪ Corre ou escala o ambiente em momentos inapropriados; ▪ Fala excessivamente ▪ Parece estar sempre "a todo vapor"; ▪ Dificuldade em brincar ou se envolver em atividades de lazer quieto.	▪ Dá respostas precipitadas, sem esperar o final da pergunta; ▪ Interrompe ou se intromete nos assuntos alheios; ▪ Dificuldade em esperar a sua vez.

Estima-se que 70% dos adultos com TDAH apresentam pelo menos uma outra doença psiquiátrica (Biederman, 2004). Dentre as

comorbidades presentes, há maior prevalência de depressão maior, transtornos de ansiedade, transtorno bipolar, abuso de substâncias, transtorno de personalidade anti-social e transtornos de personalidade (Spencer e cols., 1999). Muitos desses transtornos têm seu início na infância e quando não são tratados, as comorbidades tendem a piorar o prognóstico do TDAH (Biederman, 2004).

A subdivisão do TDAH em subtipos tem permitido uma compreensão mais clara do transtorno. Os subtipos podem apresentar diferenças na apresentação clínica e no perfil de comorbidades.

Em crianças e adolescentes, o subtipo combinado está associado com sintomas como violência, agressividade e delinqüência, enquanto o subtipo desatento está associado com sintomas de ansiedade, de humor e com dificuldades cognitivas (Levy e cols., 2005).

O subtipo combinado possui problemas mais significativos na vida acadêmica e social do adulto. Além disso, possui maiores freqüências de transtorno opositor desafiante, bipolaridade e transtornos decorrentes do uso de substâncias (Murphy e Barkley, 2002). Os indivíduos dos subtipos combinado e hiperativo apresentam maior comprometimento nos relacionamentos sociais, agressividade e transtorno de conduta (Crystal e cols., 2001). O subtipo desatento parece ser mais afetado com relação ao prejuízo cognitivo, ou melhor, parece ter um déficit cognitivo mais intenso.

Pode-se ressaltar que uma das dificuldades diagnósticas no TDAH em adultos está nos sintomas que se parecem com vários outros transtornos mentais. Além disso, muitos desses transtornos podem ser comórbidos ao TDAH.

O padrão de comorbidades pode diferir de acordo com o sexo no TDAH. Em crianças, os meninos têm maior probabilidade de apresentar sintomas disruptivos ou de externalização, enquanto as meninas tendem a apresentar problemas com ansiedade e depressão

(Biederman e cols, 2002). Em relação aos adultos, as mulheres apresentam incidência maior de bipolaridade, depressão e transtornos de ansiedade, já os homens apresentam maior freqüência de transtornos de personalidade anti-social e transtornos decorrentes do uso de substâncias (Biedermam, 2004, McGough e cols, 2005).

A principal forma de tratamento para o TDAH é a farmacoterapia. Para tanto, encontra-se disponível para esses pacientes os antidepressivos, como desipramina e bupropiona, e os estimulantes metilfenidato e sais de anfetamina.

O metilfenidato é o estimulante mais estudado e mostra grande eficácia no tratamento do TDAH. No cérebro, as medicações estimulantes regulam os sistemas dopaminérgico e noradrenérgico fazendo o bloqueio da recaptação de noradrenalina e dopamina no neurônio pré-sináptico aumentando, assim, a biodisponibilidade de catecolaminas na fenda sináptica (Arnsten, 2006).

Durante o tratamento há diferenças na resposta clínica entre os pacientes podendo-se ter quadros de melhora parcial, ausência de resposta e toxicidade quanto ao uso da medicação (Kolar e cols., 2008).

Por fim, a grande heterogeneidade relacionada a vários fatores como gênero, comorbidades, intensidade dos sintomas e resposta ao tratamento estão contribuindo para a variabilidade na apresentação clínica do TDAH.

1.2 Etiologia e fatores de risco do TDAH

O TDAH possui etiologia multifatorial que resulta da interação complexa entre fatores ambientais e genéticos, que contribuirão para a apresentação clínica da doença. Embora as causas precisas do TDAH ainda não sejam bem conhecidas, há consenso em dizer-se que não existe um único fator causal.

Dentre os fatores ambientais que podem conferir algum risco ao TDAH, estão conflitos familiares, psicopatologia nos pais e algumas adversidades psicossociais (Biederman, 2005). As complicações gestacionais também podem predispor ao transtorno, por exemplo, toxemia, prematuridade, problemas de parto, hipoxia, eclampsia, baixo peso ao nascer, má saúde materna e danos cerebrais ao lobo frontal. Além disso, há evidências de que o uso de substâncias, durante a gravidez, como o tabaco e o álcool, podem aumentar o risco para o TDAH (Banerjee e cols., 2007).

Estudos com gêmeos, família e adotados (Mick e cols., 2008) mostraram que há um forte componente genético que contribui para a etiologia do TDAH. Estudos com gêmeos foram consistentes em determinar uma herdabilidade de aproximadamente 75% (Faraone e cols., 2005). Acredita-se que essa contribuição genética se dê através de vários genes de suscetibilidade com pequeno efeito que interagem entre si e com o ambiente.

Estudos funcionais e de neuroimagem evidenciaram alterações nas conexões entre as áreas frontais e estruturas das regiões subcorticais (Cummings, 1993). Estudos neurofuncionais demonstram que cérebros de pacientes com TDAH possuem anormalidades estruturais como diminuição de volume das áreas frontais, de regiões subcorticais e do cerebelo (Castellanos, 2002). E estas estruturas são importantes porque são ricas em catecolaminas.

Estudos de neuroimagem, farmacológicos e baseados em modelos animais sugerem que alterações na neurotransmissão dopaminérgica, noradrenérgica e serotoninérgica contribuem para a fisiopatologia do transtorno (Sharp e cols., 2009).

Para tanto, vários genes que codificam proteínas nesses sistemas de neurotransmissão, têm sido propostos como candidatos para o TDAH. Assim sendo, os genes do sistema dopaminérgico (DAT1, DRD4, DRD5), noradrenérgico (*DBH*) e serotoninérgico

(HTR1B, 5HTT) possivelmente participam da transmissão genética do transtorno (Faraone e cols., 2005).

Apesar dos diversos estudos realizados, os resultados têm sido contraditórios. Isto pode se dar pela grande heterogeneidade genética e clínica associada a doença (subtipos de TDAH, gênero, exposição a fatores de risco ambiental).

1.3 O Gene DBH

O gene *DBH* que é considerado um dos genes candidatos para o TDAH (Faraone, 2005), localiza-se no cromossomo 9q34, contém 12 éxons que se estendem por aproximadamente 23 Kb e é responsável por codificar a dopamina β-hibroxilase (DβH). Esta enzima tem a função de catalisar a conversão da dopamina a noradrenalina, tendo assim, um papel importante em conectar o sistema noradrenérgico ao dopaminérgico e em manter um balanço na disponibilidade das catecolaminas (Greene e cols., 2009).

A DβH situa-se em vesículas sinápticas de neurônios noradrenérgicos centrais e periféricos. Durante a atividade sináptica, estas vesículas liberam o neurotransmissor noradrenalina e a DβH, juntamente com outros conteúdos vesiculares, no espaço extracelular. É desse modo que a enzima pode ser detectada no plasma, ou soro, e no líquido cérebro-espinhal (CSF) e a sua atividade pode ser medida (Cubells e Zabetian, 2004).

A atividade da DβH ocorre no plasma como um traço herdável, ou seja, é geneticamente determinada, sendo fortemente relacionado com a variação genética na expressão do *DBH* (Cubells e Zabetian, 2004). Com isso, uma diminuição da atividade da enzima poderia afetar a taxa de catecolaminas no córtex pré-frontal e modificar seu funcionamento, resultando em um estado hiperdopaminérgico (Coccaro e cols., 2003).

Existe uma doença que é responsável pela falha na conversão de dopamina a noradrenalina pela enzima DβH. Esta doença denomina-se síndrome de deficiência de DβH, e tem como características a ausência de DβH no plasma, concentrações praticamente indetectáveis de noradrenalina e adrenalina e elevada concentração de dopamina. Um estudo realizado por Kim e cols. (2002) identificou duas mutações no gene *DBH* que foram associadas com esta síndrome.

Zabetian e cols. (2001) identificaram um polimorfismo promissor no gene *DBH*. Este polimorfismo foi associado com a variação na atividade da DβH e considerado o maior lócus de traço quantitativo do *DBH*. O polimorfismo é um SNP C/T na posição -1021 na região promotora do gene que seria responsável por 35-52% da variação na atividade da enzima no plasma (Zabetian e cols., 2001). O alelo T é menos freqüente que o alelo C em populações de origem européia e os indivíduos homozigotos para o alelo T mostraram níveis muito baixos de atividade de DβH no plasma (Zabetian e cols., 2001). Além disso, o alelo T no lócus C-1021T resultaria em maior disponibilidade de dopamina e menor de noradrenalina no córtex (Greene e cols., 2009).

Com relação às medidas bioquímicas da enzima DβH, diversos estudos têm sido realizados em transtornos neuropsiquiátricos como esquizofrenia, depressão, alcoolismo e TDAH, e em doenças neurodegenerativas como mal de Alzheimer, tentando avaliar o papel de polimorfismos no gene *DBH* que estejam envolvidos com mudanças na atividade enzimática (Cubells e Zabetian, 2004).

Os estudos de associação realizados entre o TDAH e o polimorfismo C-1021T (rs1611115) não são numerosos. Zhang e cols., (2005) em uma população chinesa evidenciaram associação entre o TDAH e o alelo T; entretanto Bhaduri e cols (2006) em uma amostra com crianças indianas, não evidenciaram associação entre este polimorfismo e o TDAH.

Vários estudos têm investigado o polimorfismo TaqI (rs2519152) em amostras de TDAH e em estudos que avaliam a atividade enzimática, uma vez que o efeito deste SNP, sobre os níveis da enzima ainda não são completamente conhecidos. Este polimorfismo é um SNP comum em indivíduos europeus e localiza-se no intron 5 do gene *DBH*. Além disso, pode ser facilmente genotipado através da endonuclease de restrição *TaqI*, onde o alelo A2 corresponde ao sítio de clivagem para esta enzima (D'Amato 1989).

Diversos estudos entre o *TaqI* e o TDAH foram efetuados e observaram associações significantes. O primeiro estudo foi realizado por Comings e cols., (1996), onde investigaram se o *TaqI* (B1/B2) estaria associado ao TDAH em um grupo de probandos com Síndrome de Tourette. Eles detectaram uma associação com o alelo B1 (sem o sítio de clivagem). Outro estudo envolvendo o *TaqI* foi feito por Daly e cols. (1999); neste estudo, eles usaram uma amostra de crianças com TDAH e encontraram uma associação com o alelo A2 do *TaqI* (A1/A2). É provável que estes autores descritos acima tenham examinado o mesmo polimorfismo, mas com outra nomenclatura e outras amostras de probandos, resultando, assim, em dados diferentes (Kopečková e cols., 2006). Confirmando os achados prévios de Daly e cols. (1999), Roman e cols. (2002) detectaram uma associação entre o alelo A2 do polimorfismo *TaqI* e o TDAH em uma amostra com famílias brasileiras com TDAH. Em um estudo canadense, efetuado por Wigg e cols. (2002), tentou-se replicar estes estudos, mas não se encontrou evidências significantes de associação do alelo A2 com o TDAH em amostras de família com TDAH. Os dados obtidos por Inkster e cols (2004) em duas amostras independentes de adultos com TDAH não se mostraram significantes. O primeiro estudo de associação caso-controle efetuado com uma amostra de crianças indianas com TDAH por Bhaduri e cols (2005) explorando o polimorfismo *TaqI* no gene *DBH*, não encontrou evidências de associação. Em outro estudo, Smith e cols. (2003) testaram o

polimorfismo em indivíduos caucasianos com TDAH e controles, e observaram que o alelo A1 do polimorfismo *TaqI* teve frequência maior no grupo de TDAH do que no grupo controle.

As associações entre *TaqI* e TDAH encontrados por Comings e cols. (1996) com o alelo B1, Smith e cols. (2003) com o alelo A1, Daly e cols. (1999), Roman e cols. (2002), Inkster e cols (2004) e Kirley e cols. (2002) todos com o alelo A2 e considerando alguns estudos com resultados negativos (Wigg e cols., 2002; Bhaduri e cols., 2005), demonstram que essas diferenças no polimorfismo *TaqI* poderiam ser atribuídas a estratificação populacional, resultando em uma associação falso-positiva do alelo A1 com o TDAH (Smith e cols., 2003).

Como pode ser verificado, os resultados até aqui obtidos são contraditórios. Gizer e cols. (2009) realizaram meta-análise de seis estudos envolvendo o polimorfismo *TaqI* (Gizer e cols., 2009), encontrando uma tendência para associação entre o alelo A2 do polimorfismo *TaqI* e o TDAH (P=0.074). Neste mesmo estudo, o polimorfismo C-1021T não se mostrou associado com o TDAH. Por outro lado, os autores verificaram uma heterogeneidade significativa entre os achados envolvendo o *TaqI.* Portanto, são necessários mais estudos buscando as razões para a discrepância nos resultados.

2. Justificativa

O TDAH é um transtorno comum em adultos, podendo ser considerado complexo e heterogêneo por envolver vários genes de diferentes sistemas que contribuirão para a variabilidade clínica da patologia. Assim, os estudos de associação são importantes para uma maior compreensão e avaliação do papel de genes que podem estar envolvidos na suscetibilidade ao transtorno.

Uma vez que genes envolvidos na transmissão nervosa têm sido implicados no desenvolvimento do TDAH e que alterações nos níveis de atividade da enzima DβH podem estar associadas com transtornos psiquiátricos, o gene que codifica a enzima dopamina β-hidroxilase (gene *DBH*) tornou-se um gene candidato para o TDAH.

Para tanto, foram utilizados no estudo dois polimorfismos que geram interesse: o polimorfismo *TaqI*, que já teve resultados positivos e/ou indicando heterogeneidade, e o polimorfismo C-1021T, possivelmente funcional.

3. Objetivos

- Genotipar os polimorfismos *TaqI*, no íntron 5, e C-1021T, na região flanqueadora 5' do gene da dopamina β-hidroxilase, em amostras de adultos com TDAH e controles;

- Avaliar uma possível associação destes dois polimorfismos no gene *DBH* em uma amostra de pacientes adultos com TDAH em comparação com um grupo controle.

- Buscar identificar variáveis mediadoras da heterogeneidade observada nos resultados de estudos prévios de associação entre polimorfismos no *DBH* e o TDAH.

4. Material e Métodos

A amostra é constituída por 452 adultos portadores de TDAH. Todos os pacientes foram coletados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Os critérios de exclusão foram doença neurológica significativa que pudesse afetar a cognição, história atual ou passada de psicose e QI ≤ 70. As entrevistas psiquiátricas seguiram os critérios do DSM-IV, utilizando o K-SADS-E para o TDAH e transtorno de oposição desafiante e o SCID-I e MINI para as comorbidades. Além disso, o TCI foi utilizado na avaliação da personalidade.

O grupo controle é formado por 233 homens doadores de sangue do Hemocentro do Rio Grande do Sul. Para o grupo controle não realizou-se entrevistas para diagnósticos psiquiátricos. A freqüência esperada de TDAH neste grupo é a mesma para a população em geral. Assim, ao se achar uma diferença, essa seria possivelmente subestimada.

Todos os indivíduos incluídos na amostra (pacientes e controles) são eurodescendentes. Em estudo realizado por Zembrzuski e cols. (2006), a população de eurodescendentes no estado não apresenta estratificação populacional.

Todos os pacientes e controles assinaram um termo de consentimento informado, o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do hospital e da UFRGS.

A extração de DNA foi realizada segundo protocolo de Lahiri e Nurnberger (1991). O polimorfismo *TaqI* foi amplificado segundo a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) usando primers e protocolos de amplificação adaptados de Daly e cols (1999). Os fragmentos de 464 pb produzidos nesta reação foram digeridos com a enzima *Taq*I. Os produtos da digestão foram separados em gel de agarose a 2% e apresentaram 464pb, no caso da seqüência sem o sítio de restrição (alelo A1), e 300pb + 164pb, no caso da seqüência com este sítio (alelo A2). O polimorfismo C-1021T foi também

analisado utilizando a técnica de PCR e usando primers e as condições descritas por Köhnke e cols (2002). Os fragmentos de 130 pares de bases (pb) produzidos foram digeridos com a enzima *HhaI.* Os produtos da digestão foram separados em gel de agarose a 3% e apresentaram 130pb, no caso da seqüência sem o sítio de restrição (alelo T) e 20pb + 110pb, quando ocorreu a clivagem enzimática (alelo C). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste do qui-quadrado. O nível de significância estatística foi definido em 0,05. As análises foram realizadas com o programa estatístico SPSS 16.

5. Resultados

Os genótipos distribuídos entre os grupos de pacientes e controles estão de acordo com o esperado para o equilíbrio de Hardy-Weinberg nos polimorfismos analisados C-1021T e *TaqI*.

As freqüências alélicas e genotípicas do polimorfismo C-1021T em pacientes e em controles são apresentadas na tabela 2. As freqüências alélicas e genotípicas entre adultos com TDAH e controles não diferiram significativamente.

Tabela 2. Freqüências alélicas e genotípicas do polimorfismo C-1021T em pacientes e controles.

	TDAH		Controles	
	N	%	N	%
Genótipo				
CC	260	57,5	138	59,2
CT	172	38,1	78	33,5
TT	20	4,4	17	7,3
Total	452	100	233	100
Alelos				
C	692	76	354	76
T	212	24	112	24
Total	904	100	466	100

Genótipos x^2= 3,30, P= 0,191; Alelos: x^2= 0,03, P= 0,86

As freqüências alélicas e genotípicas do polimorfismo *TaqI* em pacientes em controles são apresentadas na tabela 3. As freqüências alélicas e genotípicas entre adultos com TDAH e controles não diferiram significativamente.

Tabela 3. Freqüências alélicas e genotípicas do polimorfismo *DBH TaqI* em pacientes e controles.

	TDAH		Controles	
	N	%	N	%
Genótipo				
A1A1	78	17	45	19,3
A1A2	206	46	109	46,8
A2A2	166	37	79	33,9
Total	450	100	233	100
Alelos				
A1	362	40	199	43
A2	538	60	267	57
Total	900	100	466	100

Genótipos: x^2= 0,749, P= 0,688; Alelos: x^2= 0,68, P= 0,41

As análises realizadas com outras variáveis clínicas do TDAH (comorbidades, subtipos de TDAH e variáveis de personalidade) e o *DBH* não mostraram-se significantes (P>0.05).

6. Discussão

O presente estudo não encontrou evidências para associação entre os genótipos dos polimorfismos C-1021T e *TaqI* e o TDAH em uma amostra de adultos.

Na literatura, são encontrados poucos estudos de associação com o polimorfismo C-1021T, e aqueles disponíveis, demonstram tanto resultados negativos quanto positivos. Um destes estudos verificou ausência de associação significativa entre o polimorfismo C-1021T (rs1611115) e o TDAH (Bhaduri e cols., 2006). Já outro estudo realizado por Zhang e cols. (2005) informou associação do alelo -1021T em famílias de probandos chineses com TDAH.

Quanto ao seu papel na atividade enzimática, o polimorfismo C-1021T, seria responsável por 35-52% da variação na atividade da enzima no plasma e a presença do alelo T em homozigose estaria associado com níveis muito baixos de atividade de DβH no plasma (Zabetian e cols., 2001). Assim, esse SNP mostrou evidências de uma associação com níveis de DβH. Apesar disso, não temos resultados positivos para o TDAH. Outros polimorfismos, além do C-1021T, parecem alterar a atividade da enzima no plasma (Tang e cols., 2005). Por exemplo, o genótipo homozigoto AA para o polimorfismo G444A foi associado com baixa atividade plasmática de DβH em pacientes euro-americanos com transtorno de humor e de ansiedade (Cubells e cols., 1998). Porém, não temos estudos com esse polimorfismo com o TDAH.

A ausência de associação significante entre o polimorfismo *TaqI* e TDAH em nosso estudo é consistente com um estudo canadense de pacientes adultos que não observou associação entre o transtorno e a transmissão de qualquer um dos alelos no *TaqI* (Inkster e cols., 2003). Em contraste com esses resultados, associação significante foi observada entre o TDAH e o alelo A2 deste SNP em populações de

irlandeses e brasileiros (Daly e cols., 1999; Roman e cols., 2002). Vale ainda destacar que este estudo de Roman e cols. (2002) foi realizado em uma amostra de Porto Alegre. E diferentemente dos estudos mencionados acima, Smith e cols. (2003) efetuaram um estudo longitudinal e encontraram associação significante do alelo A1 deste polimorfismo com o TDAH. Tais diferenças no polimorfismo *TaqI* poderiam ser atribuídas a estratificação populacional, resultando em uma associação falso-positiva do alelo *TaqI* A1 com o TDAH.

Embora os dados da literatura sejam contraditórios, uma meta-análise de seis estudos envolvendo o polimorfismo *TaqI* (Gizer e cols., 2009), encontrou uma heterogeneidade significativa além de tendência para associação entre o alelo A2 do polimorfismo *TaqI* e o TDAH (P=0.074). Neste mesmo estudo, o polimorfismo C-1021T não se mostrou associado com o TDAH. No presente estudo, buscamos identificar variáveis possivelmente explicativas da heterogeneidade (comorbidades, subtipos e personalidade), porém não obtivemos sucesso.

Enquanto o polimorfismo C-1021T mostrou evidências de uma associação com os níveis de dopamina β-hidroxilase, o polimorfismo *TaqI* não demonstrou tal resultado (Cubells et al. 2000; Zabetian et al. 2001, 2003).

Nossos resultados devem ser interpretados em um contexto de limitações; já que no gene *DBH*, existem outros polimorfismos que podem afetar o produto gênico ou modificar a expressão gênica, os quais não foram estudados e que poderiam influenciar no aparecimento do TDAH.

Para concluir, embora não seja possível excluir o gene *DBH* como um fator de risco para o TDAH, as evidências já obtidas indicam que variações no gene não devem ter um grande impacto no risco incluindo a presente amostra. No entanto, considerando a relevância do gene na fisiologia e a importância do tema, é válida a realização de mais estudos incluindo outros polimorfismos no gene *DBH* para

ajudar na compreensão geral do papel do sistema dopaminérgico em aspectos do desenvolvimento do TDAH.

7. Referências bibliográficas

American Psychiatric Association (1994) Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition. American Psychiatric Association. Washington.

Arnsten AF. (2006) Stimulants: Therapeutic actions in ADHD. Neuropsychopharmacology 31:2376–2383.

Banerjee TD, Middleton F, Faraone SV (2007) Environmental risk factors for attention-deficit hyperactivity disorder. Acta Pediatrica 96: 1269–1274.

Barkley RA (2002) Major life activity and health outcomes associated with Attention-deficit/hyperactivity disorder. J Clin Psychiatry 63: 10-15.

Barkley RA, Fischer M, Smallish L, Fletcher K (2004) Young adult follow-up of hyperactive children: antisocial activities and drug use. J Child Psychol Psychiatry 45(2): 195-211.

Barkley RA, Fischer M, Smallish L, Fletcher K. (2006) Young adult outcome of hyperactive children: adaptive functioning in major life activities. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry 45(2):192-202.

Barkley RA, Murphy KR, Kwaskik D (1996) Motor vehicle driving competencies and risks in teens and young adults with attention deficit hyperactivity disorder. Pediatrics 98(6): 1089-1095.

Bhaduri, N., Sinha, S., Chattopadhyay, A., Gangopadhyay, P. K., Singh, M., Mukhopadhyay, K. K. (2005) Analysis of polymorphisms in

the dopamine β hydroxylase gene: association with attention deficit hyperactivity disorder in Indian children. Indian Pediatr 42: 123-129.

Bhaduri N, Mukhopadhyay K. (2006) Lack of significant association between -1021C–OT polymorphism in the dopamine beta hydroxylase gene and attention deficit hyperactivity disorder. Neurosci Lettt 402(1–2):12–16.

Biederman J (2004) Impact of comorbidity in adults with attention deficit/hyperactivity disorder. Journal of Clinical Psychiatry 65: 3-7.

Biederman J, Faraone SV, Monuteaux MC, Bober M, Cadogen E (2004) Gender effects on attention-deficit/hyperactivity disorder in adults, revisited. Biological Psychiatry 55: 692-700.

Biederman J, Mick E, Faraone SV (2000) Age-dependent decline of symptoms of attention deficit hyperactivity disorder: impact of remission definition and symptom type. Am J Psychiatry 157: 816-818.

Biederman J, Mick E, Faraone SV, Braaten E, Doyle A, Spencer T, Wilens ET, Frazier E, Johnson MA (2002) Influence of gender on attention deficit hyperactivity disorder in children referred to a psychiatric clinic. Am J Psychiatryc 159: 36-42.

Biederman J, Monuteaux MC, Mick E, Spencer T, Wilens TE, Silva JM, Snyder LE, Faraone, SV (2006). Young adult outcome of attention deficit hyperactivity disorder: a controlled 10-year follow-up study. Psychological Medicine 36: 167-79.

Biederman, J (2005) Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: A Selective Overview. Biol Psychiatry 57(11): 1215-1220.

Castellanos FX, Lee PP, Sharp W, Jeffries NO, Greenstein DK, Clasen LS (2002) Developmental trajectories of brain volume abnormalities in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder. JAMA 288: 1740 –1748.

Crystal DS, Ostrander R, Chen RS, August GJ (2001) Multimethod assessment of psychopathology among DSM-IV subtypes of children with attention-deficit/hyperactivity disorder: self-, parent, and teacher reports. Journal of Abnormal Child Psychology 29: 189-205.

Coccaro EF, Lee R, McCloskey M (2003) Norepinephrine function in personality disorder: plasma free MHPG correlates inversely with life history of aggression. CNS Spectr 8: 731–736

Comings DE, Wu S, Chiu C, Ring RH, Gade R, Ahn C, MacMurray JP, Dietz G, Muhleman D (1996) Polygenic inheritance of Tourette syndrome, stuttering, attention deficit hyperactivity, conduct, and oppositional defiant disorder: The additive and subtractive effect of the three dopaminergic genes – DRD2, D β H, and DAT1. Am J Med Genet Neuropsychiatr Genet 67: 264-288.

Cubells JF, van Kammen DP, Kelley ME, Anderson GM, O'Conner DT, Price LH, Malison PR, Rao PA, Kobayashi K, Nagatsu T, Gelernter J (1998) Dopamine beta-hydroxylase: two polymorphisms in linkage disequilibrium at the structural gene DBH associate with biochemical phenotypic variation. Hum Genet 102: 533–540.

Cubells JF, Zabetian CP (2004) Human genetics of plasma dopamine β-hydroxylase activity: applications to research in psychiatry and neurology. Psychopharmacology 174: 463–476.

Cummings J L (1993) Frontal-subcortical circuits and human behavior. Arch Neurol 50: 873– 880.

D'Amato T, Leboyer M, Malafossel A, Samolykl D, Lamourouxl A, Junien C Mallet J (1989) Two TaqI dimorphic sites at the human β-hydroxylase locus. Nucleic Acids Research 17(14): 5871.
Daly G, Hawi Z, Fitzgerald M e Gill M (1999) Mapping susceptibility loci in attention deficit hyperactivity disorder: preferential transmission of parental alleles at DAT1, DBH and DRD5 to affected children. Mol Psychiatry 4:192-196.

Faraone SV, Biederman J, Mick E (2006) The age-dependent decline of attention deficit hyperactivity disorder: a meta-analysis of follow-up studies. Psychol Med 36(2):159-165.

Faraone SV, Perlis RH, Doyle AE, Smoller JW, Goralnick JJ, Holmgren MA, Sklar P (2005) Molecular genetics of attention-deficit/ hyperactivity disorder. Biol Psychiatry 57: 1313–1323.

Gizer IR, Ficks C, Waldman ID. (2009) Candidate gene studies of ADHD: a meta-analytic review. Hum Genet 126(1):51-90.

Greene C, Bellgrove MA, Gill M, Robertson IH (2009) Noradrenergic genotype predicts lapses in sustained attention Neuropsychologia 47: 591–594.

Inkster B, Muglia P, Jain U, Kennedy JL (2004) Linkage disequilibrium analysis of the dopamine β-hydroxylase gene in persistent attention deficit hyperactivity disorder. Psychiatr Genet 14: 117-120.

Kessler RC, Adler L, Barkley R, Biederman J, Conners CK, Demler O, Faraone SV, Greenhill LL, Howes MJ (2006) The prevalence and

correlates of adult ADHD in the United States: results from the National Comorbidity Survey Replication. Am J Psychiatry 163(4):716-723.

Kim CH, Zabetian CP, Cubells JF, Cho S, Biaggioni I, Cohen BM, Robertson D, Kim KS (2002) Mutations in the dopamine beta-hydroxylase gene are associated with human norepinephrine deficiency. Am J Med Genet 108:140–147.

Kirley A, Hawi Z, Phil M, Daly G, McCarron M, Mullins C, Millar N, Waldman I, Fitzgerald M, Gill M (2002) Dopaminergic system genes in adhd: toward a biological hypothesis. Neuropsychopharmacology 27 (4): 607-619.

Kohnke MD, Zabetian CP, Anderson GM, Kolb W, Gaertner I, Buchkremer G, Vonthein R, Schick S, Lutz U, Kohnke AM, Cubells JF (2002) A genotype-controlled analysis of plasma dopamine beta-hydroxylase in healthy and alcoholic subjects: evidence for alcohol-related differences in noradrenergic function. Biol Psychiatry 52:1151–1158.

Kolar D, Keller A, Golfinopoulos M, Cumyn L, Syer C, Hechtman L (2008) Treatment of adults with attention-deficit/hyperactivity. Neuropsychiatric Disease and Treatment 4(2): 389–403.

Kopečková M, Paclt I, Goetz P (2006) Polymorphisms of Dopamine-β-Hydroxylase in ADHD Children. Folia Biologica (Praha) 52: 194-201.

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

Levy F, Hay DA, Bennett KS, McStephen M (2005) Gender differences in ADHD subtype comorbidity. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry 44 (4): 368-376.

McGough JJ, Smalley SL, McCracken JT, Yang M, Del'Home M, Lynn DE, Loo S. (2005) Psychiatric comorbidity in adult attention deficit hyperactivity disorder: findings from multiplex families. American Journal of Psychiatry 62: 1621-1627.

Mick E, Faraone SV (2008) Genetics of attention deficit hyperactivity disorder. Child Adolesc Psychiatr Clin N Am 17(2):261-284.

Murphy KR, Barkley RA, Bush T (2002) Young adults with attention deficit hyperactivity disorder: subtype differences in comorbidity, educational, and clinical history. J Nerv Ment Dis 190:147–157.

Organização Mundial da Saúde (1993) Classificação de transtornos mentais e de comportamento da CID-10. Artes Médicas, Porto Alegre, 351pp.

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: 942–948.

Rohde LA, Halpern R (2004) Transtorno de déficit de atenção/hiperatividade: atualização. Jornal de Pediatria 80 (2): 61-70.

Roman T, Schmitz M, Polanczyk GV, Eizirik M, Rohde LA e Hutz MH (2002) Further evidence for the association between attention-deficit/hyperactivity disorder and the dopamine-β-hydroxylase gene. Am J Med Genet 114: 154-158.

Sharp SI, McQuillin A, Gurling HM. (2009) Genetics of attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD). Neuropharmacology 57(7-8): 590-600.

Simon V, Czobor P, Bálint S, Mészáros Á, Bitter I (2009) Prevalence and correlates of adult attention-deficit hyperactivity disorder: meta-analysis. The British Journal of Psychiatry 194: 204–211.

Smith K M, Daly M, Fischer M, Yiannoutsos CT, Bauer L, Barkley R e Navia BA (2003) Association of the dopamine beta hydroxylase gene with attention deficit hyperactivity disorder: genetic analysis of the Milwaukee longitudinal study. Am J Med Genet 119B: 77-85.

Spencer TJ, Biederman J, Wilens T (1999) Attention-deficit/hyperactivity disorder and comorbidity. Pediatr Clin North Am 46: 915-927.

Tang Y, Anderson GM, Zabetian CP, Kohnke MD, Cubells JF (2005): Haplotype-controlled analysis of the association of a non-synonymous single nucleotide polymorphism at DBH(+1603C→T) with plasma dopamine beta-hydroxylase activity. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 139: 88-90.

Wilens TE, Faraone SV, Biederman J (2004) Attention-deficit/hyperactivity disorder in adults. JAMA 292: 619-623.

Zabetian CP, Anderson GM, Buxbaum SG, Elston RC, Ichinose H, Nagatsu T, Kim K-S, Kim C-H, Malison RT, Gelernter J e Cubells JF (2001) A quantitative-trait analysis of human plasma-dopamine beta-hydroxylase activity: evidence for a maojor functional polymorphism at the DBH locus. Am J Hum Genet 68:515-522.

Zabetian CP, Buxbaum SG, Elston RC, Köhnke MD, Anderson GM, Gelernter J, Cubells JF (2003) The structure of linkage disequilibrium at the DBH locus strongly influences the magnitude of association between diallelic markers and plasma dopamine beta-hydroxylase activity. Am J Hum Genet 72(6):1389-400.

Zembrzuski VM, Callegari-Jacques SM, Hutz MH (2006) Application of an African Ancestry Index as a genomic control approach in a Brazilian population. Ann Hum Genet 70(Pt 6):822-828.

Zhang HB, Wang YF, Li J, Wang B, Yang L (2005) [Association between dopamine beta hydroxylase gene and attention deficit hyperactivity disorder complicated with disruptive behavior disorder] [Chinese]. Zhonghua Er Ke Za Zhi 43(1):26–30.