UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Comissão de Graduação do Curso de Ciências Biológicas
Bacharelado em Ciências Biológicas

Gabriela Ferraz Rodrigues

ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE O GENE *ADRA2A* E O TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE (TDAH).

Porto Alegre
1º semestre
2011

Gabriela Ferraz Rodrigues

ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE O GENE *ADRA2A* E O TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE (TDAH).

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Comissão de Graduação do Curso de Ciências Biológicas – Bacharelado, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do título de Bacharelado em Ciências Biológicas.

Orientadora:
Profª. Dra. Tatiana Roman

Porto Alegre
1º Semestre
2011

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a algumas pessoas que me ajudaram com a realização desse trabalho tanto diretamente como indiretamente:

Aos meus familiares por compreenderem a minha ausência em alguns almoços de domingo. Muito obrigada pelo carinho e atenção!

Aos meus pais que sempre me deram todo o suporte em meus estudos e em minhas decisões. Ao meu pai, José Cesar, por toda paciência e por sempre trazer questões que me levam a uma reflexão. À minha mãe, Lyane, por toda a tua dedicação e por ser o meu exemplo de professora! À minha mana que mais do que irmã é minha amiga e minha segunda mãe.

Ao Felipe, que acompanhou toda minha trajetória acadêmica, muito obrigada pela compreensão, companheirismo, paciência e amor.

À minha colega e grande amiga Larissa, minha eterna dupla, que desde o primeiro dia de aula sentamos juntas e nunca mais nos desgrudamos. Tenho certeza que muito do que aprendi na faculdade veio das nossas discussões biológicas e educacionais.

A professora Tatiana Roman por toda a orientação para a realização desse trabalho e durante a minha iniciação científica. Obrigada pelo carinho e dedicação que muitas vezes não foram somente de uma orientadora, mas sim de uma amiga ou até mesmo mãe.

Aos meus colegas do laboratório de Genética Humana Molecular, principalmente a Gláucia, Angélica, Andressa, Jaque e o clubinho da marmita por tornarem os dias mais divertidos. A Gláucia em especial, por ser praticamente minha segunda orientadora, obrigada pelos ensinamentos.

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

RESUMO

O Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) é um dos transtornos psiquiátricos mais comuns da infância e adolescência, com prevalência mundial estimada em torno de 5%. Os sintomas são divididos em dois grupos, desatenção e hiperatividade/impulsividade, caracterizando três subtipos clínicos conforme a prevalência de um ou ambos os grupos. O TDAH é considerado uma doença complexa, multifatorial, causada por diferentes fatores de risco. A herdabilidade estimada de 76% demonstra que o TDAH está entre os transtornos psiquiátricos mais altamente herdáveis. Embora o sistema dopaminérgico seja o mais estudado, há também fortes evidências implicando o sistema noradrenérgico na origem do TDAH. Considerando que o α2A é o receptor adrenérgico mais prevalente do córtex pré-frontal, região implicada no TDAH, o gene que codifica este receptor (*ADRA2A*) parece ser bastante interessante para estudos genéticos. Em um estudo anterior do nosso grupo com uma amostra de crianças e adolescentes com TDAH do subtipo desatento (TDAH-D), verificou-se, através de uma abordagem caso-controle, que a homozigose para o alelo G no polimorfismo -1291C>G (*MspI*, rs1800544) aumentou o risco para o TDAH-D em comparação com outros genótipos. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar a associação entre outros SNPs localizados no gene *ADRA2A*, o -262G>A (*HhaI*, rs1800545) e o 1780C>T (*DraI*, rs553668), e o TDAH-D na amostra previamente estudada. Esta foi obtida em escolas públicas de Porto Alegre e consistiu de 100 casos (crianças e adolescentes com TDAH-D) e seus pais biológicos, e 100 controles (crianças e adolescentes não afetados por TDAH). Os polimorfismos foram genotipados por PCR *TaqMan* (*Applied Biosystems*). A análise de associação foi feita através de duas abordagens: caso-controle populacional e método baseado em famílias. Para esta última análise foi utilizado o *software* FBAT, analisando-se tanto os polimorfismos isolados como em haplótipos. A análise de desequilíbrio de ligação entre os SNPs e estimativas de haplótipos foi realizada através do programa MLocus. As freqüências genotípicas estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg. As freqüências gênicas concordam com o descrito na literatura para o mesmo grupo étnico. Não houve qualquer evidência de associação entre os polimorfismos analisados e o TDAH-D tanto pela abordagem caso-controle (P = 0,652 para *HhaI* e P = 0,858 para *DraI*) como pelo método baseado em famílias (P = 0,865 para *HhaI* e P = 0,492 para *DraI*). Há um forte DL entre os polimorfismos *MspI* (investigado previamente), *HhaI* e *DraI*; no entanto, não houve evidência de associação entre o TDAH-D e os haplótipos analisados. É possível sugerir, então, que o efeito do gene *ADRA2A* na amostra estudada seja de fato devido ao polimorfismo *MspI*. Porém, análises adicionais com os três SNPs, tanto em estudos de associação com outras amostras como em estudos funcionais, serão essenciais para compreender melhor o envolvimento do gene *ADRA2A* na etiologia do TDAH, especialmente no subtipo desatento, em nossa população.

Palavras-Chave: TDAH-D, *ADRA2A*, associação, polimorfismos.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 6
1.1 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E EPIDEMIOLÓGICA DO TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE (TDAH) 6
1.2 NEUROBIOLOGIA E ETIOLOGIA 7
1.3 O GENE *ADRA2A* E O TDAH 8
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS 11
3. MATERIAL E MÉTODOS 12
3.1 AMOSTRA 12
3.2 ANÁLISES LABORATORIAIS 14
3.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS 14
4. RESULTADOS 15
5. DISCUSSÃO 18
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 21

1. INTRODUÇÃO

1.1 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E EPIDEMIOLÓGICA DO TRANSTORNO DE DÉFICIT DE ATENÇÃO E HIPERATIVIDADE (TDAH)

O Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH) é um dos transtornos psiquiátricos mais comuns da infância e adolescência. POLANCZYK *et al* (2007a) estimaram a prevalência mundial de TDAH em torno de 5% das crianças em idade escolar. A principal característica do TDAH é um padrão persistente de desatenção e/ou hiperatividade-impulsividade, que é mais freqüente e severa do que é normalmente esperada em indivíduos com um nível de desenvolvimento comparável (WALLIS *et al*, 2008). De acordo com o Manual de Diagnóstico e Estatística de Transtornos Mentais – 4ª edição (DSM-IV), da Associação Norte-Americana de Psiquiatria (APA, 1994), os sintomas são divididos em dois grupos: desatenção e hiperatividade/impulsividade. O diagnóstico do TDAH é feito de acordo com a presença de, no mínimo, seis sintomas em um ou nos dois grupos, e com base nesta divisão três tipos clínicos são reconhecidos conforme a prevalência dos sintomas: predominantemente desatento, predominantemente hiperativo-impulsivo e combinado. Os padrões de sintomas colocam as crianças em risco de insucesso escolar e perturbações nas relações com a família, professores e colegas (STERGIAKOULI & THAPAR, 2010). Crianças com TDAH são também mais propensas a ter outros problemas de desenvolvimento, como a dislexia e dificuldades de aprendizagem, bem como comorbidades com transtornos de conduta (TC) e oposição desafio (TOD), de humor, de ansiedade e de abuso de substâncias (SMITH *et al*, 2009). A presença destes outros transtornos psiquiátricos ocorre em cerca de dois terços das crianças com TDAH (STERGIAKOULI & THAPAR, 2010). A ocorrência de TOD e TC, as comorbidades mais comuns, varia entre 20 e 40% e aumenta o risco de piores prognósticos nos pacientes com TDAH.

O TDAH foi por muito tempo considerado um transtorno tipicamente infantil; no entanto, BIEDERMAN (2007) afirma que até 65% das crianças com TDAH continuam apresentando problemas de comportamento e sintomas do transtorno em sua vida adulta. Segundo STERGIAKOULI & THAPAR (2010), os níveis de hiperatividade e impulsividade tendem a diminuir, enquanto que a desatenção é mais persistente.

1.2 NEUROBIOLOGIA E ETIOLOGIA

Já é aceito amplamente na literatura que os sintomas do TDAH se originam em alterações no funcionamento cerebral, porém, os mecanismos exatos envolvidos na neurobiologia desse transtorno ainda não são completamente conhecidos (SPENCER *et al*, 2007). Estudos de neuroimagem sugerem que o TDAH seja uma doença fronto-estriato-cerebelar, uma vez que essas regiões parecem ter volume e atividade diminuídos em pacientes com essa patologia (CASTELLANOS *et al*, 2002; CURATOLO *et al*, 2009). As principais teorias bioquímicas propostas para explicar o TDAH foram baseadas nas catecolaminas, visto que as regiões implicadas na sua patofisiologia são primariamente inervadas por esses neurotransmissores (ARNSTEN & LI, 2005; CURATOLO *et al*, 2009). Evidências de estudos farmacológicos também corroboram o envolvimento destes neurotransmissores. Entre os fármacos comumente utilizados no tratamento do TDAH está o metilfenidato, que é o mais prescrito na prática clínica. Embora seu mecanismo de ação não seja 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 (BIEDERMAN & SPENCER, 1999; MASELLIS *et al*, 2002; MADRAS *et al*, 2005).

A etiologia destas particularidades neurobiológicas do TDAH também não está ainda totalmente esclarecida. Estudos demonstram que é uma doença complexa, um transtorno multifatorial causado pela influência de muitos tipos diferentes de fatores de risco, cada um tendo um pequeno efeito no aumento da vulnerabilidade para o transtorno através de seus efeitos aditivos e interativos (BIEDERMAN & FARAONE, 2005). Segundo esses mesmos autores, essa visão multifatorial do TDAH é coerente com a heterogeneidade registrada em sua patofisiologia e expressão clínica.

LINNET *et al* (2003) e BANERJEE *et al* (2007) sugerem que diversos fatores ambientais podem estar relacionados ao TDAH, incluindo baixo peso ao nascer, prematuridade, consumo de álcool e tabagismo maternos pré-natais, estresse materno, dieta materna pobre, algumas toxinas presentes durante o período pré-natal ou neonatal, e diferentes adversidades psicossociais.

A herdabilidade estimada de 76%, a partir de diferentes estudos de gêmeos, demonstra que o TDAH está entre os transtornos psiquiátricos mais altamente herdáveis (FARAONE *et al*, 2005). Estudos de genética molecular na tentativa de identificar genes específicos envolvidos no aparecimento do TDAH estão sendo publicados em um ritmo acelerado

(GIZER *et al*, 2009; STERGIAKOULI & THAPAR, 2010). Estas investigações sugerem que a arquitetura genética do TDAH é complexa, e, mesmo com um grande número de estudos nesta área, ainda há muitas questões a serem esclarecidas. As poucas varreduras genômicas realizadas até agora mostraram resultados divergentes e são, portanto, não conclusivas (FRANKE *et al*, 2009; NEALE *et al*, 2010). Em contraste, muitos estudos com genes candidatos têm produzido evidências implicando diferentes genes na etiologia do transtorno (FARAONE *et al*, 2005; STERGIAKOULI & THAPAR, 2010).

1.3 O GENE *ADRA2A* E O TDAH

Entre os genes sugeridos pelos estudos moleculares estão aqueles que codificam componentes do sistema dopaminérgico, noradrenérgico e serotoninérgico. Embora genes dopaminérgicos sejam os mais estudados no TDAH (BIEDERMAN & FARAONE, 2005; FARAONE & MICK, 2010; STERGIAKOULI & THAPAR, 2010), este trabalho focalizou o sistema noradrenérgico. De acordo com ARNSTEN & PLISZKA (2011) a noradrenalina atua principalmente em receptores do tipo α1-, α2- e β-. ARNSTEN (2000) afirma que, entre estes, a noradrenalina tem alta afinidade pelos receptores α2 e baixa afinidade pelos tipos α1 e β. Segundo BELFER *et al* (2005), os receptores adrenérgicos α2 são amplamente distribuídos no sistema nervoso central e periférico. Eles são receptores de superfície celular acoplados a proteína-G para as catecolaminas endógenas, adrenalina e noradrenalina, mediando parte dos diversos efeitos biológicos desses neurotransmissores.

Os receptores α2 são subdivididos em α_{2A}, α_{2B} e α_{2C}. Estes subtipos estão localizados pré-sinapticamente nos neurônios noradrenérgicos, em dendritos ou terminais de axônio, e pós-sinapticamente nos neurônios que recebem sinapses noradrenérgicas (ARNSTEN & PLISZKA, 2011). Entre os receptores α2, os do subtipo α_{2A} são os mais prevalentes no córtex pré-frontal, uma das áreas cerebrais supostamente envolvidas no TDAH, e parecem ser essenciais para o funcionamento adequado desta região (WANG *et al*, 2007). No estudo de ADREWS & LAVIN (2006), os autores afirmam que o metilfenidato potencializa a atividade noradrenérgica através de um aumento da ativação de receptores adrenérgicos do tipo α_{2A}, entre outros efeitos, corroborando a idéia de uma alta afinidade da noradrenalina por esta classe de receptor (ARNSTEN, 2000). BELFER *et al* (2005) especulam que algumas das variações interindividuais nas respostas são explicadas por variações genéticas nos receptores α2, acarretando mudanças na quantidade ou na estrutura dos receptores. Todas estas

evidências sugerem que o gene que codifica o receptor adrenérgico α_{2A} (*ADRA2A*) seja um bom candidato para estudos moleculares.

O gene *ADRA2A* está localizado na região cromossômica 10q23-25 (LARIO *et al*, 1997). Muitos polimorfismos já foram estudados; no entanto, três deles são os mais descritos na literatura (Figura 1). O principal deles é um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) -1291C>G (rs1800544), identificado por LARIO *et al* (1997) e conhecido como *Msp*I, já que cria um sítio de restrição para a enzima *MspI* na região promotora do gene. Este polimorfismo já foi investigado no TDAH. No primeiro estudo publicado, XU *et al* (2001), com uma amostra de 94 famílias, verificaram que nenhum dos alelos foi transmitido preferencialmente, não detectando associação com o TDAH. Resultados negativos foram observados também em dois outros estudos com populações asiáticas. O trabalho de WANG *et al* (2006) não detectou associação através do Teste de Desequilíbrio de Transmissão (TDT) em uma população chinesa, enquanto que o trabalho de CHO *et al* (2008), também através da análise do TDT, não encontrou alelos sendo preferencialmente transmitidos em uma população coreana. É importante considerar que as populações asiáticas diferem das européias ou de descendentes de europeus na freqüência dos alelos para este polimorfismo, o que pode ter influenciado esses resultados.

Alguns estudos, no entanto, obtiveram resultados positivos para o SNP *MspI*. No trabalho de PARK *et al* (2005), através do TDT, foi observado que a transmissão do alelo G estava próximo à significância no grupo que incluía pacientes dos subtipos combinado e predominantemente desatento de TDAH. Já através de uma avaliação dimensional pela análise Quantitativa do Teste de Desequilíbrio de Transmissão (QTDT), tanto os escores dos sintomas de desatenção e como de hiperatividade mostraram associação com o alelo G do *MspI*. No trabalho de STEVENSON *et al*, (2005), com uma amostra de crianças com TDAH e suas famílias, houve transmissão significativa do alelo G, mas apenas na sub-amostra de pacientes que apresentavam comorbidade com Transtorno de Leitura. Esses resultados controversos impedem que se possa confirmar a influência do gene *ADRA2A* na etiologia do TDAH em diferentes populações.

A possibilidade de associação do *MspI* com o TDAH já foi investigada na nossa população. ROMAN *et al* (2003), em uma amostra de 92 pacientes e seus pais biológicos, detectou, por meio de análises dimensionais, associação do genótipo GG com aumento no número de sintomas na dimensão de desatenção e combinada (desatenção + hiperatividade/impulsividade). Em estudo posterior, ROMAN *et al* (2006), com uma amostra nova de 128 pacientes, detectaram novamente a associação do genótipo GG com um maior

escore de sintomas de desatenção. Em outro estudo do grupo, SCHMITZ *et al* (2006), em uma amostra composta por 100 crianças e adolescentes afetados por TDAH do subtipo desatento e seus respectivos pais biológicos, verificaram que a homozigose para o alelo G aumentou o risco para o TDAH em comparação com outros genótipos. Esses resultados estão de acordo com os trabalhos de PARK *et al*, (2005) e STEVENSON *et al*, (2005) e sugerem que, em nossa população, o gene *ADRA2A* está relacionado ao TDAH, particularmente à dimensão de desatenção.

Dois outros polimorfismos também estudados no gene *ADRA2A* são o SNP -262 G>A (rs1800545), conhecido como *HhaI* e localizado na região 5' não traduzida (5'UTR) (PARK *et al*, 2005), e o polimorfismo 1780 C>T (rs553668), conhecido como *DraI* e localizado na região 3'UTR (HOEHE *et al*, 1988). Esses polimorfismos receberam essa denominação por criarem sítios de restrição às enzimas *HhaI* e *DraI*, respectivamente. Estudos para o SNP *DraI* também são controversos, existindo na literatura tanto resultados positivos como negativos (PARK *et al*, 2005; WANG *et al*, 2006; DEUPREE *et al*, 2006; CHO *et al*, 2008). No trabalho de PARK *et al*, (2005), através do TDT, foi observado uma transmissão preferencial do alelo T do *DraI* no grupo que incluía pacientes apenas do subtipo clínico combinado de TDAH e no grupo com os subtipos combinado e predominantemente desatento. A análise de QTDT mostrou associação do mesmo alelo tanto com sintomas de desatenção como de hiperatividade-impulsividade. Em 2006, o estudo de WANG *et al* não encontrou associação do *DraI* com o TDAH através do TDT em uma população chinesa. Já o trabalho de DEUPREE *et al* (2006) não detectou associação para o polimorfismo *DraI* isoladamente. Porém, haplótipos contendo também os SNPs *Msp*I e *Hha*I mostraram associação com o TDAH, mas quando o alelo C do *Dra*I era considerado. Em 2008, CHO *et al*, através da análise do TDT, encontraram transmissão preferencial do alelo C do *DraI* na sua amostra coreana. É interessante ressaltar que o resultado positivo desses dois últimos trabalhos se refere ao alelo C, contrastando com o estudo de PARK *et al*, (2005), que encontrou associação com o alelo T. Como já mencionado, essas diferenças podem ocorrer devido a diferenças étnicas, sendo possível que o alelo de risco seja diferente entre as populações estudadas.

Para o SNP *HhaI* ainda não foi descrito nenhum resultado positivo (PARK *et al*, 2005; DEUPREE *et al*, 2006). No trabalho de PARK *et al* (2005), uma análise de desequilíbrio de ligação (DL) identificou entre os haplótipos mais freqüentes combinações onde tanto o alelo G como o alelo A do SNP *Hha*I estão em DL com o alelo G do *Msp*I, o que fez o autor sugerir os dois como possíveis alelos de risco, de acordo com a análise utilizada: na análise de

famílias, o alelo G foi considerado como de risco, enquanto que na análise dimensional o alelo A foi considerado como de risco. A ausência de resultados positivos, entretanto, faz com que nenhum dos dois alelos possa ser confirmado ou excluído como alelo de suscetibilidade até agora.

Além desses polimorfismos outros já foram descritos para o gene *ADRA2A*, três deles em regiões codificadoras e em populações caucasóides (PARK *et al*, 2005). Estes SNPs foram denominados rs18000034, rs1800035 e rs1800036, sendo variantes não sinônimas, com potencial de produzir diferenças funcionais na proteína. Porém, análises populacionais não identificaram esses SNPs na população estudada por PARK *et al* (2005), o que fez esses autores sugerirem que são de fato mutações raras.

Apesar dos resultados positivos para *MspI* e *DraI* e negativos para *HhaI*, a funcionalidade de cada um desses SNPs ainda não está esclarecida. BELFER *et al* (2005) sugere que o gene ADRA2A atuaria como um "bloco funcional", pois há um elevado desequilíbrio de ligação (DL) entre esses polimorfismos e outros presentes no gene. O bloco haplotípico, nesse estudo, é composto por 9 diferentes SNPs e foi suficiente para capturar o conteúdo de informação mesmo quando o suposto *locus* funcional não foi incluído. Assim, a associação de um polimorfismo do gene *ADRA2A* com TDAH, quando detectada, poderia ser um resultado de outro SNP funcional, em desequilíbrio de ligação com o SNP em estudo. Por isso, é necessário estudar esses diferentes polimorfismos para elucidar de que forma ocorre a influência do gene *ADRA2A* na etiologia do TDAH em geral, e particularmente na nossa população.

Figura 1: Representação esquemática da estrutura do gene *ADRA2A* e os três polimorfismos estudados (modificado de PARK *et al*, 2005).

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

O TDAH é um transtorno que tanto afeta crianças e adolescentes como pode continuar até a fase adulta. Muitos são os impactos que a doença pode ter nesses indivíduos, como prejuízos na escola, na relação familiar e social. Embora 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. As informações genéticas poderão ajudar a esclarecer a patofisiologia do transtorno e a produzir conhecimento que poderá auxiliar o profissional a melhorar a vida dos pacientes. Estudos sobre o papel do gene *ADRA2A* apresentam resultados conflitantes, como demonstrados anteriormente. Portanto, é necessário que mais estudos com esse gene sejam realizados, com a finalidade de compreender melhor o seu envolvimento na etiologia do TDAH. Em nossa população, este loco, especificamente o polimorfismo *MspI* tem mostrado associação, particularmente sobre sintomas de desatenção. Porém, dúvidas sobre a funcionalidade do polimorfismo impedem que se afirme que seja esse SNP que atua na etiologia do TDAH. Assim, justifica-se um estudo mais detalhado do gene *ADRA2A* na nossa amostra.

Objetivos:

1. Estudar a possibilidade de associação entre os polimorfismos -262 G>A (*HhaI*, rs1800545) e 1780 C>T (*DraI*, rs553668) do gene *ADRA2A* com o TDAH do subtipo desatento (TDAH-D) através de uma abordagem caso-controle;
2. Estudar a possibilidade de associação entre esses polimorfismos e o TDAH-D através de um método baseado em famílias;
3. Verificar o grau de Desequilíbrio de Ligação (DL) entre os polimorfismos -1291C>G (*MspI*, rs1800544), previamente estudado na presente amostra, *HhaI* e *DraI;*
4. Analisar a possibilidade de associação entre os haplótipos obtidos e o TDAH-D pelo método baseado em famílias.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRA

A amostra utilizada para este estudo foi previamente coletada para outras pesquisas do grupo. É composta por 100 casos (crianças e adolescentes afetados por TDAH do subtipo desatento) e seus respectivos pais biológicos, e 100 controles (crianças e adolescentes que não são afetados por TDAH), obtidos em escolas públicas de Porto Alegre. Os professores foram inicialmente treinados por um psiquiatra da infância e adolescência para detectar alunos com sintomas de desatenção e também aqueles que não apresentavam sintomas, possíveis

controles. Os alunos identificados nessa triagem foram convidados à fase diagnóstica do estudo realizada pelo Programa de Déficit de Atenção e Hiperatividade do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (ProDAH-HCPA), seguindo diretrizes do DSM-IV. A Figura 2 apresenta de forma esquemática as etapas da amostragem, e a Tabela 1 apresenta as características demográficas e clínicas da amostra. Mais detalhes sobre a obtenção, avaliação e caracterização da amostra podem ser vistos no trabalho de SCHMITZ *et al*. (2006).

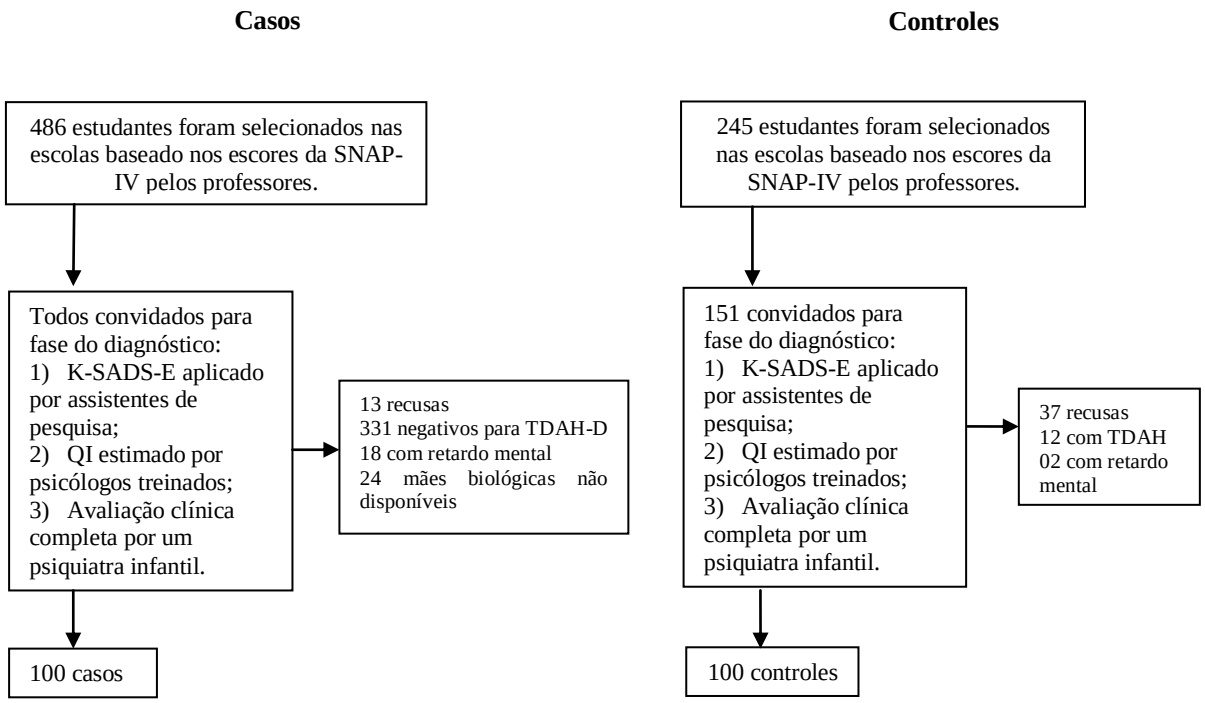

Figura 2: Fluxograma da participação dos pacientes (adaptado de SCHMITZ *et al*, 2006).

Tabela 1: Características demográficas e clínicas dos casos com TDAH-D e controles (adaptado de SCHMITZ *et al*, 2006).

Característica	TDAH-D (n=100)	Controles (n=100)	Valor de P
Média de idade (DP), meses	142 (39,5)	140 (38,5)	0,72
Sexo (Masculino), %	68	68	1
Etnia, %			0,13
Descendentes de Europeus	62	73	
Descendentes de Africanos	38	27	
Média de Escolar (DP), anos	4,4 (2,7)	4,7 (3)	0,12
NSE (classe B), %	49	56	0,13
TDAH Materno, %	28	3	<0,001
Média de QI estimado (DP)	94 (11)	99,3 (11,4)	0,002
Uso de álcool na gestação, %	9	4	0,2
Média de peso ano nascer (DP), kg	3,32 (0,6)	3,29 (0,6)	0,74
Média de idade materna no parto (DP), anos	27 (6,5)	27,6 (6,7)	0,53
Comorbidades, %			
Transtornos de Humor			
Depressão Maior	4	1	0,25
Distimia	4	1	0,22
Transtorno de Ansiedade			
Fobia simples	21	19	0,69
TAG	14	5	0,05
TAS	8	3	0,18
Fobia Social	21	5	0,004
Agorafobia	11	5	0,1
Transtornos Disruptivos			
TOD	38	14	0,001
TC	2	1	0,57

DP: Desvio Padrão; NSE: Nível sócio-econômico; TAG: Transtorno de Ansiedade Generalizada; TAS: Transtorno de Ansiedade de Separação; TOD: Transtorno de Oposição Desafio; TC: Transtorno de Conduta.

3.2 ANÁLISES LABORATORIAIS

O DNA foi obtido a partir de sangue total através da técnica de *salting out* descrita por LAHIRI & NURNBERGER (1991). A identificação dos dois polimorfismos, *HhaI* (rs1800545) e *DraI* (rs553668), foi realizada através da amplificação utilizando sistema de discriminação alélica TaqMan (Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System), conforme protocolo sugerido pelo fabricante.

3.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As freqüências genotípicas foram calculadas com o auxílio do programa SPSS, versão 12. As freqüências gênicas e o equilíbrio de Hardy–Weinberg foram obtidos por análises diretas das freqüências genotípicas e pelo cálculo de χ^2. A análise de associação foi feita através de duas abordagens. A primeira foi a de caso-controle populacional, utilizando a análise de Regressão Logística Condicional através do programa SPSS (versão 12) para

comparar freqüências gênicas e genotípicas entre os casos e os controles no contexto de potenciais confundidores. Para essa análise, a definição dos genótipos de risco foi feita de acordo com as hipóteses biológicas propostas por PARK *et al* (2005) e GIZER *et al* (2009). A outra abordagem realizada foi através de um método baseado em famílias, utilizando-se o *software* FBAT para análise tanto dos polimorfismos isolados como em haplótipos. Este programa estima as associações genéticas a partir da transmissão dos alelos ou haplótipos parentais à descendência afetada; havendo transmissão preferencial de um dos alelos ou haplótipos detecta-se associação. A análise de desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos e estimativas de haplótipos foi realizada através do programa MLocus. O nível de significância considerado em todas as análises foi de 0,05.

4. RESULTADOS

No cálculo das freqüências gênicas e genotípicas foram considerados somente os pacientes descendentes de europeus não aparentados (n=63), embora a amostra seja composta por indivíduos descendentes de europeus, africanos e mistos. Na tabela 2 podem ser visualizadas as freqüências gênicas e genotípicas dos polimorfismos *HhaI* e *DraI*. As freqüências gênicas para ambos estão de acordo com o descrito na literatura para esse grupo étnico. As freqüências genotípicas para os dois polimorfismos, em paciente e controles, estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg, ou seja, as freqüências observadas não diferiram do esperado significativamente. As freqüências gênicas e genotípicas não foram calculadas para os demais grupos étnicos devido ao reduzido número amostral desses grupos.

Tabela 2: Freqüências gênicas e genotípicas dos casos com TDAH-D e controles, considerados somente descendentes de europeus não aparentados (n=63).

Polimorfismos	**Alelos**	**Freqüências**		**Genótipos**	**Freqüências**	
		Casos	Controles		Casos	Controles
	A	0,14	0,10	**AA**	0,02	0
HhaI	**G**	0,86	0,90	**AG**	0,25	0,21
				GG	0,73	0,79
	C	0,78	0,76	**CC**	0,63	0,59
DraI	**T**	0,22	0,24	**CT**	0,29	0,35
				TT	0,08	0,06

Para a análise caso-controle, a regressão logística condicional foi realizada considerando-se o genótipo homozigoto para o suposto alelo de risco *versus* os outros genótipos. Realizamos a análise com genótipo de risco, pois seguimos a mesma abordagem do trabalho de SCHMITZ *et al* (2006). A escolha do genótipo de risco para os SNPs *HhaI* e *DraI* foi definida a partir do trabalho de PARK *et al* (2005), que julgamos ter abordagem e amostra mais similares às nossas. Em relação ao SNP *Hha*I, onde tanto o alelo G como o A foram sugeridos como de risco, optamos pelo alelo A para definição do genótipo de risco, já que este foi sugerido na análise dimensional realizada por PARK *et al* (2005), abordagem onde nossos achados prévios são mais consistentes. A definição dos potenciais confundidores a serem inseridos na análise teve como critério a presença de associação tanto com o fator em estudo quanto com o desfecho, sendo considerado significativo o valor de $p \leq 0,20$. No polimorfismo *HhaI*, os pacientes com genótipo de risco AA não tiveram um valor significativo de *odds ratios* (*ORs*) para o TDAH-D em relação aos outros genótipos (AG e GG; p= 0,652; *OR*= 1,701; ver tabela 3), mesmo controlando para possíveis confundidores (QI estimado, etnia e agorafobia). Para o polimorfismo *DraI*, o genótipo de risco TT também não mostrou um *OR* significante para o TDAH-D em relação aos outros genótipos (CT e TT; p= 0,858; *OR*= 1,108; ver tabela 3), controlando para possíveis confundidores (agorafobia).

Tabela 3: Análise de associação através de uma abordagem caso-controle para os polimorfismos *HhaI* e *DraI*, controlado para potenciais confundidores.

	Wald x^2	**Valor de P**	***OR***	**IC 95%[1]**
		HhaI		
QI estimado	9,352	0,002	0,955	0,92 – 0,98
Etnia	1,371	0,242	1,542	0,74 – 3,18
Agorafobia	1,293	0,255	1,937	0,62 – 6,05
Genótipo de risco AA	0,203	0,652	1,701	0,16 – 17,09
		DraI		
Agorafobia	2,098	0,147	2,187	0,75 – 6,30
Genótipo de risco TT	0,032	0,858	1,108	0,36 – 3,40

[1] IC= Intervalo de confiança.

A análise de associação pelo método baseado em famílias realizada para cada loco separadamente não mostrou diferença estatisticamente significativa entre alelos transmitidos e não transmitidos, com valores de P de 0,865 para o *HhaI* e de 0,492 para *DraI* (dados apresentados na Tabela 4).

Tabela 4: Resultados da análise de associação pelo método baseado em famílias realizada através do programa FBAT.

Polimorfismos	Alelos	N[1]	Observado[2]	Esperado[3]	Z	P
			TDAH-D			
HhaI	A	30	18	18,500	-0,169	0,865
	G		42	41,500	0,169	
DraI	C	41	57	54,500	0,687	0,492
	T		27	29,500	-0,687	

[1] Nº de famílias informativas incluídas no teste.
[2] Nº observado de transmissões.
[3] Nº esperado de transmissões sob a hipótese nula de ausência de associação.

Para a análise de desequilíbrio de ligação (DL) foi considerado também o polimorfismo *MspI*, previamente estudado na presente amostra, além dos SNPs *HhaI* e *DraI*. Os resultados indicam um forte DL entre os três polimorfismos; na tabela 5 esses resultados podem ser visualizados com detalhes.

Tabela 5: Resultados da análise de desequilíbrio de ligação (DL) para os três polimorfismos.

	MspI	***HhaI***	***DraI***
MspI	-	P <0,001 D' = 0,947	P <0,001 D' = 0,962
HhaI	P <0,001 D' = 0,947	-	P <0,001 D' = 1,000
DraI	P <0,001 D' = 0,962	P <0,001 D' = 1,000	-

Com base nos resultados das análises de DL, a hipótese de associação em haplótipos foi testada com os três SNPs. O programa FBAT estimou seis tipos de haplótipos. No entanto, somente foram incluídos no teste aqueles que apresentavam freqüência maior ou igual a 0,1, totalizando três haplótipos. Os resultados podem ser vistos na tabela 6. Não houve evidência de associação entre o TDAH-D e qualquer um dos haplótipos analisados (valores de P iguais a 0,532, 0,679 e 0,875).

Tabela 6: Resultados da análise de associação em haplótipos com os polimorfismos.

Haplótipos[1]	Freqüência	N[2]	Observado[3]	Esperado[4]	*Z*	*P*
			TDAH-D			
C/G/C	0.581	42.9	60.950	58.450	0.624	0.532
G/G/T	0.223	37.9	28.950	30.450	-0.413	0.679
G/A/C	0.152	29	19	19.500	-0.156	0.875

[1] A seqüência do haplótipo é: *MspI/HhaI/DraI*.
[2] Nº de famílias informativas incluídas no teste.
[3] Nº observado de transmissões.
[4] Nº esperado de transmissões sob a hipótese nula de ausência de associação.

5. DISCUSSÃO

Estudos anteriores do nosso grupo mostraram um efeito significante do SNP -1291C>G (*MspI*, rs1800544) em sintomas de desatenção, tanto através de análises dimensionais (ROMAN *et al* 2003, 2006), como através de uma abordagem caso-controle (SCHMITZ *et al* 2006), sugerindo que o gene *ADRA2A* seja um gene de suscetibilidade ao TDAH, particularmente à dimensão de desatenção, na nossa população. Com o objetivo de aprofundar o entendimento deste possível efeito, o presente estudo, utilizando a mesma amostra de SCHMITZ *et al* (2006), investigou a influência dos polimorfismos *HhaI* e *DraI* no TDAH-D tanto por uma abordagem caso-controle como por um método baseado em famílias (FBAT). No entanto, não houve associação desses polimorfismos com este subtipo clínico do transtorno, nas duas abordagens utilizadas, tanto isoladamente como em haplótipos.

Os trabalhos de PARK *et al* (2005) e DEUPREE *et al* (2006) corroboram nossos resultados negativos para o polimorfismo *HhaI*, sugerindo que esse SNP não está desempenhando um papel direto na predisposição para o TDAH na amostra estudada. Já em relação ao polimorfismo *DraI*, nossos achados concordam com os descritos por WANG *et al* (2006), mas discordam do observado nos demais estudos (PARK *et al*, 2005; DEUPREE *et al*, 2006; CHO *et al*, 2008). Uma possível explicação para estes resultados negativos seria um erro estatístico do tipo II, ocorrido em função do método de análise utilizado. Esta possibilidade se aplicaria às análises de associação baseadas em família, especialmente as que utilizam o teste de desequilíbrio de transmissão (TDT) e/ou o *software* FBAT. Embora sejam as metodologias mais utilizadas na literatura para o TDAH, estas abordagens são também as mais restritivas nos critérios de seleção das famílias a serem incluídas na análise. Desta maneira, o *n* amostral tende a diminuir drasticamente (apenas a parcela da amostra considerada informativa é analisada), dificultando a detecção de resultados significativos em se tratando de genes de pequeno efeito, como é o caso do TDAH. Porém, a análise de associação através de uma abordagem caso-controle, que diminuiria a chance de se obter um falso-negativo, também não evidenciou resultados positivos, sugerindo que o SNP *DraI* realmente não está associado ao TDAH do subtipo desatento na nossa população. As freqüências dos polimorfismos analisados também poderiam explicar um erro estatístico do tipo II, uma vez que para conseguir detectar efeitos pequenos, principalmente com número amostral pequeno, o ideal seriam freqüências em torno de 50% para cada alelo, o que não ocorre na nossa amostra. É importante considerar ainda que a maioria dos métodos de análise

utilizados pelos estudos moleculares, embora amplamente difundidos, não parecem ser totalmente adequados à investigação da influência de genes de pequeno efeito em doenças multifatoriais. Isto enfatiza a necessidade por estudos futuros que implementem novas estratégias capazes de fornecer poder estatístico suficiente para detectar tais efeitos pequenos em genes candidatos (FRANKE *et al*, 2009; GIZER *et al*, 2009; STERGIAKOULI & THAPAR, 2010).

Vinculada à detecção do efeito em genes de suscetibilidade, outra explicação para nossos resultados negativos para o *DraI* pode ser o número amostral reduzido, mesmo na abordagem caso-controle (100 casos x 100 controles). IOANNIDIS *et al* (2003) chamam a atenção para o número amostral utilizado nos estudos de genes candidatos, uma vez que estes precisam de amostras grandes para alcançar o poder estatístico adequado e resultados replicáveis. Entretanto, uma parte considerável dos estudos com o TDAH não satisfaz essa necessidade (GIZER *et al*, 2009; FARAONE & MICK, 2010; STERGIAKOULI & THAPAR, 2010). Para contornar essa limitação, e também com a finalidade de esclarecer os resultados discrepantes encontrados em diversos trabalhos, GIZER *et al* (2009) realizaram uma meta-análise para os principais genes investigados no TDAH. Para o gene *ADRA2A* não foi verificado efeito significativo para qualquer um dos três polimorfismos já estudados nessa doença. Porém, para o polimorfismo *DraI* foi observada uma heterogeneidade significativa no tamanho de efeito entre os estudos, o que pode ter contribuído para o resultado negativo da meta-análise, sendo o estudo de PARK *et al* (2005) o que mais contribuiu para esta heterogeneidade. É interessante observar ainda que os demais estudos que obtiveram resultados positivos para o SNP *Dra*I (DEUPREE *et al*, 2006; CHO *et al*, 2008) sugeriram o alelo C ou genótipo CC como de risco, ao contrário do sugerido por PARK *et al* (2005), e que cada um desses relatos analisou subgrupos diferentes de pacientes ou aspectos específicos do fenótipo TDAH, através de diferentes metodologias. Desta forma, o resultado negativo obtido no presente trabalho para este polimorfismo adiciona aos resultados controversos da literatura, que impedem uma conclusão sobre a possível influência desse SNP no transtorno.

Embora nossos resultados sugiram que nenhuma das variantes aqui investigadas está envolvida na etiologia do TDAH na nossa população, é possível que o efeito de cada uma delas dependa de diferentes polimorfismos atuando conjuntamente. Para verificar essa possibilidade, foi realizada uma análise de haplótipos, incluindo o *MspI*, além do *HhaI* e do *DraI*. Considerando o resultado positivo obtido por SCHMITZ *et al* (2006) para o TDAH-D e que os três polimorfismos apresentam um forte DL, essa análise poderia evidenciar uma associação. A nossa hipótese era de que um dos haplótipos contendo o alelo de risco para o

MspI (alelo G) fosse preferencialmente transmitido. No entanto, não obtivemos resultados positivos. Considerando que o achado de SCHMITZ *et al* (2006) se refere ao genótipo GG, é possível que o efeito real do gene *ADRA2A* na nossa amostra dependa não apenas do alelo G mas de sua presença em homozigose, condição que não é mantida na análise de haplótipos.

Considerando tudo o que foi discutido, concluímos que o efeito do gene *ADRA2A* na nossa população, particularmente sobre os sintomas de desatenção, parece estar mesmo relacionado ao polimorfismo *MspI*. Essa afirmação pode ser corroborada tanto pelos estudos de associação com outras amostras realizados por nosso grupo, que mostraram associação do genótipo GG com o mesmo grupo de sintomas (ROMAN *et al* 2003, 2006), como pelos nossos estudos de farmacogenética com o *ADRA2A*, que indicaram um efeito significativo do alelo G na melhora dos sintomas de desatenção com o tratamento com metilfenidato (POLANCZYK *et al*, 2007b; DA SILVA *et al*, 2008). A nossa hipótese, entretanto, não concorda com o que foi sugerido na literatura, de que o SNP *DraI* seja funcional e que o gene *ADRA2A* atue como um "bloco haplotípico funcional", devido ao alto DL que existe entre os diferentes SNPs (BELFER *et al*, 2005). O que podemos sugerir é que os SNPs *DraI* e *HhaI* atuem como marcadores apenas, não só do *MspI*, mas de outros polimorfismos ainda não analisados, não influenciando na etiologia do TDAH. Todas essas hipóteses já estão sendo investigadas pelo nosso grupo, através do estudo dos SNPs *HhaI* e *DraI* em outras amostras e também através de estudos funcionais *in vitro* e *in silico* com os três polimorfismos. Esses outros estudos aumentarão a nossa compreensão acerca da influência dessa região na neurotransmissão noradrenérgica e, consequentemente, no TDAH, e poderemos então inferir com mais certeza sobre o efeito do polimorfismo *MspI* e das demais variantes nos sintomas de desatenção e no TDAH como um todo, na nossa população.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ADREWS, G.D. & LAVIN, A. 2006. Methylphenidate Increases Cortical Excitability via Activation of Alpha-2 Noradrenergic Receptors. **Neuropsychopharmacology**, 31: 594–601.

ARNSTEN, A.F.T. 2000. Through the Looking Glass: Differential Noradenergic Modulation of Prefrontal Cortical Function. **Neural Plasticity**, 7(1-2): 133–146.

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

ARNSTEN, A.F.T. & PLISZKA, S.R. 2011. Catecholamine influences on prefrontal cortical function: Relevance to treatment of attention deficit/hyperactivity disorder and related disorders. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior,** E-pub: doi:10.1016/j.pbb.2011.01.020.

BANERJEE, T.D.; MIDDLENTON, F.; FARAONE, S.V. 2007. Environmental risk factors for attention-deficit hyperactivity disorder. **Acta Paediatr**, 96(9):1269-74.

BELFER, I.; BUZAS, B.; HIPP, H.; PHILLIPS, G.; TAUBMAN, J.; LORINCZ, I.; EVANS, C.; LIPSKY, R.H.; ENOCH, M-A; MAX, M.B.; GOLDMAN, D. 2005. Haplotype-based analysis of alpha 2A, 2B, and 2C adrenergic receptor genes captures information on common functional loci at each gene. **J Hum Genet** 50:12–20.

BIEDERMAN, J. 2007. Advances in the neurobiology of ADHD. **CNS Spectr,** 12: 4(Suppl 6):6-7.

BIEDERMAN, J. & FARAONE, S.V. 2005. Attention-deficit hyperactivity disorder. **Lancet**, 366: 237–48.

BIEDERMAN, J.; SPENCER, T. 1999. Attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) as a noradrenergic disorder. **Biol Psychiatry** 46: 1234-1242.

CASTELLANOS, F.X.; LEE, P.P.; SHARP, W.; JEFFRIES, N.O.; GREENSTEIN, D.K.; CLASEN, L.S.; BLUMENTHAL, J.D.; JAMES, R.S.; EBENS, C.L.; WALTER, J.M.; ZIJDENBOS, A.; EVANS, A.C.; GIEDD, J.N.; RAPOPORT, J.L. 2002. Developmental trajectories of brain volume abnormalities in children with attention-deficit/hyperactivity disorder. **JAMA** 288: 1740-1748.

CHO, S.C.; KIM, J.W.; KIM, B.N.; HWANG, J.W.; PARK, M.; KIM, S.A.; CHO, D.Y.; YOO, H.J.; CHUNG, U.S.; SON, J.W.; PARK, T.W. 2008. Possible Association of the Alpha-2A-Adrenergic Receptor Gene With Response Time Variability in Attention Deficit Hyperactivity Disorder. **Am J Med Genet Part B,** 147B:957–963.

CURATOLO, P.; PALOSCIA, C.; D'AGATI, E.; MOAVERO, R.; PASINI, A. 2009. The neurobiology of attention deficit/hyperactivity disorder. **Eur J Paediatr Neurology,** 13: 299-304.

DA SILVA, T.L.; PIANCA, T.G.; ROMAN, T.; HUTZ, M.H.; FARAONE, S.V.; SCHMITZ, M.; ROHDE, L.A. 2008. Adrenergic alpha2A receptor gene and response to methylphenidate in attention-deficit/hyperactivity disorder-predominantly inattentive type. **J Neural Transm**, 115(2): 341-5.

DEUPREE, J.; SMITH, S.; KRATOCHVIL, C.; BOHAC, D.; ELLIS, C.; POLAHA, J.; BYLUND, D. 2006. Possible involvement of alpha-2A adrenergic receptors in attention deficit hyperactivity disorder: Radioligand binding and polymorphism studies. **Am J Med Genet Part B**, 141B: 877–884.

FARAONE, S.V. & MICK, E. 2010. Molecular Genetics of Attention Deficit Hyperactivity Disorder. **Psychiatr Clin N Am**, 33: 159–180.

FARAONE, S.V.; PERLIS, R.H.; DOYLE, A.E.; SMOOLER, J.W.; GORALNICK, J.J.; HOLMGREN, M.A.; SKLAR, P. 2005. Molecular Genetics of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. **Biol Psychiatry**, 57: 1313–1323

FRANKE, B.; NEALE, B.M.; FARAONE, S.V. 2009. Genome-wide association studies in ADHD. **Hum Genet**, 126(1):13-50.

GIZER, I.R.; FICKS, C.; WALDMAN, I.D. 2009. Candidate gene studies of ADHD: a meta-analytic review. **Human Genetics**,126(1): 51-90.

HOEHE, M.R.; BERRETTINI, W.H.; LENTES, K.U. 1988. *DraI* identifies a two allele DNA polymorphism in the human alpha2-adrenergic receptor gene (ADRAR), using a 5.5 kb probe (p ADRAR). **Nucleic Acids Research**, 16(18): 9070.

IOANNIDIS, J.P.; TRIKALINOS, T.A; NTZANI, E.E; CONTOPOULOS-IOANNIDIS, D.G. 2003. Genetic associations in large versus small studies: anempirical assessment. **Lancet** 361:567–571

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

LARIO, S.; CALLS, J.; CASES, A.; ORIOLA, J.; TORRAS, A.; RIVERA, F. 1997. *MspI* identifies a biallelic polymorphism in the promoter region of the α_{2A}- adregnergic receptor gene. **Clin Genet**, 51: 129-130.

LINNET, K.M.; DALSGAARD, S; OBEL, C.; WISBORG, K.; HENRIKSEN, T.B.; RODRIGUEZ, A.; KOTIMAA, A.; MOILANEN, I.; THOMSEN, P.H.; OLSEN, J.; JARVELIN, M-R. 2003. Maternal lifestyle factors in pregnancy risk of attention deficit hyperactivity disorder and associated behaviors: review of the current evidence. **Am J Psychiatry,** 160(6):1028–1040.

MADRAS, B.K.; MILLER, G.M.; FISCHMAN, A.J. 2005. The dopamine transporter and attentiondeficit/hyperactivity disorder. **Biol Psychiatry** 57: 1397-1409.

MASELLIS, M.; BASILE, V.S.; MUGLIA, P.; ET AL. 2002. Psychiatric pharmacogenetics: personalizing psychostimulant therapy in attention deficit hyperactivity disorder. **Behav Brain Res** 130: 85-90.

NEALE, B.M.; MEDLAND, S.E.; RIPKE, S.; ASHERSON, P.; FRANKE, B.; LESCH, K.P.; FARAONE, S.V.; NGUYEN, T.T.; SCHAEFER, H.; HOLMANS, P.; DALY, M.; STEINHAUSEN, H.C.; FREITAG, C.; REIF, A.; RENNER, T.J.; ROMANOS, M.; ROMANOS, J.; WALITZA, S.; WARNKE, A.; MEYER, J.; PALMASON, H.; BUITELAAR, J.; VASQUEZ, A.A.; LAMBREGTS-ROMMELSE, N.; GILL, M.; ANNEY, R.J.; LANGELY, K.; O'DONOVAN, M.; WILLIAMS, N.; OWEN, M.; THAPAR, A.; KENT, L.; SERGEANT, J.; ROEYERS, H.; MICK, E.; BIEDERMAN, J.; DOYLE, A.; SMALLEY, S.; LOO, S.; HAKONARSON, H.; ELIA, J.; TODOROV, A.; MIRANDA, A.; MULAS, F.; EBSTEIN, R.P.; ROTHENBERGER, A.; BANASCHEWSKI, T.; OADES, R. D.; BARKE, E.; MCGOUGH, J.; NISENBAUM, L.; MIDDLETON F.; HU, X.; NELSON, S. 2010. Meta-Analysis of Genome-Wide Association Studies of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, 9: 884-897.

PARK, L.; NIGG, J.T.; WALDMAN, I.D.; NUMMY, K.A.; HUANG-POLLOCK, C.; RAPPLEY,M.; FRIDERICI, K.H. 2005. Association and linkage of α-$_{2A}$ adrenergic receptor gene polymorphisms with childhood ADHD. **Molecular Psychiatry**, 10: 572–580.

POLANCZYK, G.; DE LIMA, M.S.; HORTA, B.L.; BIEDERMAN, J.; ROHDE, L.A. 2007a. The Worldwide Prevalence of ADHD: A Systematic Review and Metaregression Analysis. **Am. J. Psychiatry**, 164: 942–948.

POLANCZYK, G.; ZENI, C.; GENRO, J.P.; GUIMARÃES, A.P.; ROMAN, T.; HUTZ, M.H.; ROHDE, L.A. 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.

ROMAN, T.; POLANCZYK, G.; ZENI, C.; GENRO, J.P.; RHODE, L.A.; HUTZ, M.H. 2006. Further evidence of the involvement of alpha-2Aadrenergic receptor gene (*ADRA2A*) in inattentive dimensional scores of attention-deficit/hyperactivity disorder. **Molecular Psychiatry**, 11: 8–10.

ROMAN, T.; SCHMITZ, M.; POLANCZYK, G.; EIZIRIK, M.; RHODE, L.A.; HUTZ, M.H. 2003. Is the a-2A Adrenergic Receptor Gene (ADRA2A) Associated With Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder? **Am J Med Genet Part B,** 120B:116–120.

SCHMITZ, M.; DENARDIN, D.; SILVA, T.L.; PIANCA, T.; ROMAN, T.; HUTZ, M.H.; FARAONE, S.V.; ROHDE, L.A. 2006. Association Between Alpha-2a-adrenergic Receptor Gene and ADHD Inattentive Type. **Biology Psychiatry**, 60(10): 1028-1033

SMITH, A.K.; MICK, E.; FARAONE, S.V. 2009. Advances in Genetic Studies of Attention-Defi cit/Hyperactivity Disorder. **Current Psychiatry Reports**, 11:143–148.

SPENCER, T.J.; BIEDERMAN, J.; MICK, E. 2007. Attention-deficit/hyperactivity disorder: diagnosis, lifespan, comorbidities, and neurobiology. **J Pediatr Psychol**.: 32(6):631-42.

STERGIAKOULI, E. & THAPAR, A. 2010. Fitting the pieces together: current research on the genetic basis of attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, 6: 551–560.

STEVENSON, J.; LANGLEY, K.; PAY, H.; PAYTON, A.; WORTHINGTON, J.; OLLIER, W.; THAPAR, A. 2005. Attention deficit hyperactivity disorder with reading disabilities: preliminary genetic findings on the involvement of the ADRA2A gene. **Journal of Child Psychology and Psychiatry**, 46(10): 1081–1088.

WALLIS, D.; RUSSEL, H.F.; MUENKE, M. 2008. Review: Genetics of Attention Deficit/Hyperactivity Disorder. **Journal of Pediatric Psychology,** 33(10): 1085–1099.

WANG, M.; RAMOS, B.; PASPALAS, C.; SHU, Y.; SIMEN, A.; DUQUE, A.; VIJAYRAGHAVAN, S.; BRENNAN, A.; DUDLEY, A.; NOU, E.; MAZER, J.A.; MCCORMICK, D. A.; ARNSTEN, A.F.T. 2007. Alpha2A-adrenoceptor stimulation strengthens working memory networks by inhibiting cAMP-HCN channel signaling in prefrontal cortex. **Cell**,129:397–410.

WANG, B.; WANG, Y.; ZHOU, R.; LI, J.; QIAN, Q.; YANG, L.; GUAN, L.; FARAONE, S.V. 2006. Possible association of the alpha-2A adrenergic receptor gene (*ADRA2A*) with symptoms of attention-deficit/hyperactivity disorder. **Am J Med Genet Part B**, 141B:130–134.

XU, C.; SCHACHAR, R.; TANNOCK, R.; ROBERTS, W.; MALONE, M.; KENNEDY, J.L.; BARR, C.L. 2001. Linkage study of the alpha2A adrenergic receptor in attention-deficit hyperactivity disorder families. **Am J Med Genet,** 105:159–162.